



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Π.Μ.Σ

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
National Hellenic Research Foundation

Μεταπτυχιακή Μελέτη

**«Βελτιστοποίηση μικρογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων με αιθέριο
έλαιο και νισίνη. Έλεγχος της αντιμικροβιακής τους δράσης».**



Όνοματεπώνυμο: Φανή Δ. Μπαλκίζα

Επιβλέπουσα Καθ.: Τσακαλίδου Έφη

ΑΘΗΝΑ 2016



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Π.Μ.Σ

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
National Hellenic Research Foundation

Μεταπτυχιακή Μελέτη

**«Βελτιστοποίηση μικρογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων με αιθέριο
έλαιο και νισίνη. Έλεγχος της αντιμικροβιακής τους δράσης».**



Όνοματεπώνυμο: Φανή Δ. Μπαλκίτζα

Επιβλέπουσα Καθ.: Τσακαλίδου Έφη

ΑΘΗΝΑ 2016

Μεταπτυχιακή Μελέτη

**«Βελτιστοποίηση μικρογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων με αιθέριο
έλαιο και νισίνη. Έλεγχος της αντιμικροβιακής τους δράσης».**

Όνοματεπώνυμο: Φανή Δ. Μπαλκίτζα

Επιβλέπουσα Καθ.: Τσακαλίδου Έφη

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Όνομα επιβλέποντος: Καθ. Τσακαλίδου Έφη, ΓΠΑ

Όνομα Α' μέλους Τριμελούς: Δρ. Α. Ξενάκης, Ερευνητής Α, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Όνομα Β' μέλους Τριμελούς: Επικ. Καθ. Ι.Μαντάλα, ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η βελτιστοποίηση μικρογαλακτωμάτων τύπου W/O με (ελαιόλαδο και) αιθέρια έλαια, παρουσία ή απουσία της βιοδραστικής ένωσης, νισίνη. Τα συστήματα μελετώνται ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση και στη συνέχεια ακολουθεί αναλυτικότερη περιγραφή της δομής τους, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές.

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα αιθέρια έλαια και συγκεκριμένα δενδολίβανο, θυμάρι, ρίγανη και δίκταμος. Εντός των μικρογαλακτωμάτων εγκλωβίστηκε η νισίνη, μια βακτηριοσίνη, η οποία παράγεται από το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactococcus lactis*. Εξετάστηκε η δράση των μικρογαλακτωμάτων με τη μέθοδο Well Diffusion Assay (WDA), έναντι των αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus*. Η μελέτη της συμπεριφοράς των μικρογαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Τριγωνικού Διαγράμματος Φάσης (Ψευδοτριγωνικό Διάγραμμα). Ο περεταίρω δομικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Δυναμικής Σκέδασης φωτός (DLS), για την εύρεση του μεγέθους των σταγονιδίων των μικρογαλακτωμάτων και της ομοιογένειας του συστήματος. Τέλος, οι ιδιότητες της μεμβράνης των μικρογαλακτωμάτων (διεπιφάνεια μεταξύ ελαιώδους και υδατικής φάσης) και η κινητικότητα του ιχνηθέτη 5-DSA που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο αυτών, μελετήθηκαν με τη μέθοδο Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR).

Με βάση τις τεχνικές που εφαρμόστηκαν, προέκυψαν θετικά αποτελέσματα από τη δράση των μικρογαλακτωμάτων κατά των Gram-θετικών βακτηρίων. Τα καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισαν τα συστήματα με αιθέρια έλαια και συγκεκριμένα με δίκταμο, σχηματίζοντας τις πιο έντονες ζώνες έναντι του *S. aureus*, τις πιο μεγάλες, μεγέθους (13mm) έναντι της *L. monocytogenes*, αλλά ασθενέστερες, ενώ τις μεγαλύτερες ζώνες εμφάνισαν τα μικρογαλακτώματα με αιθέριο έλαιο θυμαριού και ρίγανης έναντι του *B. cereus*, μεγέθους (15mm) αλλά πολύ πιο ασθενείς. Επίσης, διαπιστώθηκε η συνεργιστική δράση νισίνης-αιθέριου ελαίου. Από τη μελέτη της δομής τους διαπιστώθηκε η ομοιογένεια των συστημάτων και το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων τους, καθώς και η σχετικά αργή κίνηση/δυσκολία περιστροφής του ιχνηθέτη, ειδικά παρουσία νισίνης.

Λέξεις κλειδιά: μικρογαλακτώματα, αιθέρια έλαια, νισίνη

ABSTRACT

This dissertation focuses on the improvement of type w/o microemulsions with olive oil and essential oils, and with or without the bioactive compound nisin. The systems were studied in terms of their antimicrobial action and their structure was subsequently analysed using several techniques.

Four essential oils were used: Rosemary, thyme, oregano, and dittany. Nisin which is produced by the lactobacillus *Lactococcus lactis* was also entrapped in the microemulsions. Using the Well Diffusion Assay (WDA) technique, the action of the microemulsions against the following pathogens found in foods was tested: *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. The action of the microemulsions was studied by the Ternary Phase Diagram (Pseudoternary Phase Diagram). Their structure was further analysed using the DLS method, in order to find out the size of the microemulsions' droplets, as well as to assess their homogeneity. Finally the microemulsions' membrane properties (interface between oil and aqueous solution) and the motility of the 5-DSA tracer was assessed by EPR.

According to the techniques used, the results of the microemulsions' actions against the Gram-positive bacteria were positive/significant. The best results were observed when essential oils were used, especially dictamus, as it formed the most distinct zones against *S. aureus*, and the widest but weaker ones (13nm) against *L. monocytogenes*. The widest/biggest zones (15mm) against *B. cereus* resulted from the microemulsions that contained thyme and oregano essential oils but they were substantially weaker. Moreover, the synergistic action of nisin with essential oils was detected. The structural studies revealed the homogeneous nature of the systems, the small size of their droplets, and the fairly slow motility / difficulty of the rotational movement of the tracer, especially in the presence of nisin.

Keywords: microemulsion, essential oil, nisin, EPR, DLS

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Έφη Τσακαλίδου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας και να αποκτήσω πολύτιμες εμπειρίες. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος αυτής της εργασίας.

Μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, Διευθυντή Ερευνών στο Ινστιτούτο, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου επέτρεψε την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας στο εργαστήριο του. Τον ευχαριστώ για τις γνώσεις που μου προσέφερε αλλά και την σημαντική καθοδήγησή του καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ θερμά την Ερευνήτρια Γ΄ του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου και τον Δρ. Αβραμιώτη Σπύρο, οι οποίοι με τις γνώσεις τους, το ενδιαφέρον τους και τον χαρακτήρα τους, με βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την Δρ. Μαρία Χατζηδάκη, η οποία με στήριξε σε καθημερινή βάση και μου προσέφερε τις γνώσεις της αλλά και τον χρόνο της, συμβάλλοντας σημαντικά στον σχεδιασμό του πειράματος, μέχρι και την ολοκλήρωση και συγγραφή της μελέτης μου.

Επίσης, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας και ιδιαίτερα την Μαρίνα Γεωργαλάκη και την Δρ. Βούλα Αλεξανδράκη για τη συνεχή παρακολούθηση της εργασίας μου, τις προτάσεις τους, αλλά και τον χρόνο και την υπομονή τους. Με τις γνώσεις που μου προσέφεραν με βοήθησαν να διευρύνω τον επιστημονικό τρόπο σκέψης μου.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες σε όλη την ομάδα Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για τις πολύτιμες συμβουλές τους, κυρίως, στην βιολόγο Μήτσου Ευγενία και την χημικό Θεοχάρη Ιωάννα, για την άψογη συνεργασία μαζί τους και την βοήθεια που μου προσέφεραν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ	10
1.2 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	12
1.2.1 Μηχανισμός δράσης αιθέριων ελαίων στα βακτήρια	14
1.2.2 Δενδρολίβανο - <i>Rosmarinus officinalis</i>	17
1.2.3 Θυμάρι - <i>Thymus vulgaris</i>	18
1.2.4 Ρίγανη - <i>Origanum vulgare</i>	19
1.2.5 Δίκταμος - <i>Origanum dictamnus</i>	20
1.3 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ	21
1.3.1 Βακτηριοσίνες	23
1.3.2 Νισίνη	25
1.4 ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	27
1.4.1 Κατηγορίες Γαλακτωμάτων	27
1.4.2 Μικρογαλακτώματα	29
1.4.3 Ιδιότητες Μικρογαλακτωμάτων	30
1.4.4 Επιφανειοενεργές ουσίες	31
1.4.5 Φύση και Ρόλος επιφανειοενεργών ουσιών	32
1.4.6 Υδρόφιλη – Λιπόφιλη συζυγία HLB (<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>)	33
1.4.7 Συνεπιφανειοενεργές ουσίες	33
1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	34
1.5.1 Μικρογαλακτώματα και βιοδιαθεσιμότητα	34
1.5.2 Μικρογαλακτώματα και τρόφιμα	36
1.6 ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	37
1.6.1. Διάγραμμα Φάσης	37
1.6.2 Ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσης	37
1.6.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός – DLS (<i>Dynamic Light Scattering</i>)	39
1.6.4 Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός - EPR (<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)	40
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	44
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	44
3.1.1 Αντιδραστήρια για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων	44

3.1.2 Αντιδραστήρια για τη μελέτη της διεπιφάνειας του μικρογαλακτώματος	46
3.1.3 Αντιδραστήρια για την παρασκευή θρεπτικών υλικών για τρυβλία	46
3.2. ΟΡΓΑΝΑ	47
3.2.1 Διαθλασίμετρο (Refractometer)	47
3.2.2 Ιξωδόμετρο	48
3.2.3 DLS (<i>Dynamic light scattering</i>)	48
3.2.4 EPR (<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)	48
3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ	49
3.3.1 Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων W/O	49
3.3.2 Πρωτόκολλο Διαλυτοποίησης Νισίνης	51
3.3.3 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης	52
3.3.4 Διάγραμμα Φάσης	53
3.3.5 Μέθοδος DLS	54
3.3.6 Μέθοδος EPR	55
3.3.6.1 Ανάλυση Δεδομένων EPR – Matlab	56
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
4.1 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ	57
4.2 ΨΕΥΔΟΤΡΙΓΩΝΙΚΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΦΑΣΗΣ	64
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ DLS.....	68
4.3.1. Μέτρηση Δείκτη Διάθλαση (<i>Refractive Index, RI</i>)	68
4.3.2 Μέτρηση Ιξώδους (<i>Viscosity</i>)	69
4.3.3 Μετρήσεις DLS	69
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ EPR	72
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	79
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 3.1:</i> Εκατοστιαία σύσταση μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια.	51
<i>Πίνακας 3.2:</i> Θρεπτικό μέσο, συνθήκες επώασης και βαθμός επικινδυνότητας μικροοργανισμών που μελετήθηκαν.	53
<i>Πίνακας 3.3:</i> Παράμετροι λειτουργίας οργάνου EPR.	56
<i>Πίνακας 4.1:</i> Συστήματα και μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν.	57
<i>Πίνακας 4.2:</i> Εκατοστιαία σύσταση μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια.	58
<i>Πίνακας 4.3:</i> Μέγεθος ζώνης παρεμπόδισης (mm) των συστημάτων Σ1, Σ2, Σ3, Σ4, Σ2α, Σ2β, Empty (E), Full (F) και νισίνης διαλυμένης σε νερό (N), καθώς και των αιθέριων ελαίων δενδρόλιβανου, θυμαριού, ρίγανης και δικτάμου.	60
<i>Πίνακας 4.4:</i> Τιμές μέσου όρου ιζώδους συνεχούς φάσης συστημάτων (Σ1, Σ2, Σ3, Σ4, Σ2α, Σ2β).	69
<i>Πίνακας 4.5:</i> Τιμές μέσου όρου υδροδυναμικής διαμέτρου d_h και δείκτη πολυδιασποράς, PdI	70
<i>Πίνακας 4.6:</i> Τιμές μέσου όρου του χρόνου συσχέτισης τ_R της παραμέτρου S και του μέτρου πολικότητας A_N των μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια (Empty & Full), οι οποίες προέκυψαν από τις προσομοιώσεις των υπολογιστικών προγραμμάτων.	72
<i>Πίνακας 4.7:</i> Τιμές μέσου όρου του χρόνου συσχέτισης τ_R του μέτρου πολικότητας A_N και του ιζώδους μ , των δειγμάτων (μίγμα: M1, M2, M3, M4), τα οποία περιέχουν (ROO:αιθέριο έλαιο/PG/DMG), των δειγμάτων (R1, R2, R3), τα οποία περιέχουν (ROO:αιθέριο έλαιο) και του ελαιόλαδου (ROO), όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις των υπολογιστικών προγραμμάτων.	73

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1.1:</i> Μηχανισμός και περιοχή δράσης αιθέριων ελαίων στο βακτηριακό κύτταρο.	15
<i>Εικόνα 1.2:</i> Δομή κυττάρου Gram-αρνητικού και Gram-θετικού μικροοργανισμού.	16
<i>Εικόνα 1.3:</i> Μηχανισμός δράσης νισίνης στο κύτταρο Gram-θετικού βακτηρίου.	27
<i>Εικόνα 1.4:</i> Μικρογαλάκτωμα W/O vs Νανογαλάκτωμα W/O. Διαφορές στο μέγεθος των σταγονιδίων και στην οπτική διαύγεια του συστήματος.	28
<i>Εικόνα 1.5:</i> Σχηματισμός μικρογαλακτώματος με προσθήκη νερού και οι πιθανές φάσεις του W/O, Bicontinuous, O/W.	29
<i>Εικόνα 1.6:</i> Τύποι δομών μικρογαλακτωμάτων: a. σφαιρική, b. δισκοειδής, c. κυλινδρική, d. φυλλοειδής (lamellar), e. σφαιρικό κυστίδιο - (vesicle).	29
<i>Εικόνα 1.7:</i> Κατηγορίες μικρογαλακτωμάτων, συστήματα τύπου W/O , Bicontinuous, O/W (Διφασικά-Δισυνεχή).	31
<i>Εικόνα 1.8:</i> Μόριο επιφανειοενεργούς ουσίας (surfactant).	32
<i>Εικόνα 1.9:</i> Φύση επιφανειοενεργών ουσιών, ιοντικές (ανιονικές, κατιονικές), μη ιοντικές και επαμφοτερίζουσες.	32
<i>Εικόνα 1.10:</i> Απεικόνιση σταγονιδίου μικρογαλακτώματος W/O και μικρογαλακτώματος O/W με τις επιφανειοενεργές (μπλε χρώμα) και συνεπιφανειοενεργές ουσίες (μωβ χρώμα). Οι υδρόφιλες κεφαλές είναι στραμμένες προς την υδατική φάση (κόκκινο χρώμα) του συστήματος W/O ενώ στο σύστημα O/W, οι λιπόφιλες ουρές προσανατολίζονται προς την ελαιώδη περιοχή (πράσινο χρώμα).	34
<i>Εικόνα 1.11:</i> Δομές και φάσεις που σχηματίζονται σε ένα υποθετικό τριγωνικό διάγραμμα. ..	38
<i>Εικόνα 1.12:</i> Απόκλιση του $\pm \frac{1}{2}$ επιπέδου ενός ηλεκτρονίου με την παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.	41
<i>Εικόνα 1.13:</i> Ενδεικτική εικόνα φάσματος EPR. Το μαγνητικό πεδίο μετριέται σε mT, ενώ απεικονίζονται τα ύψη των κορυφών h_{+1} , h_0 και h_{-1} , από το χαμηλό στο υψηλό πεδίο, αντίστοιχα, το πλάτος της κεντρικής κορυφής ΔH_0 , η απόσταση της εξωτερικής μέγιστης υπέρλεπτης διάσπασης $2A_{max}$ και της εσωτερικής ελάχιστης $2A_{min}$	43
<i>Εικόνα 3.1:</i> Γενικός τύπος απεσταγμένων μονογλυκεριδίων.	45
<i>Εικόνα 3.2:</i> Χημική δομή του 5-DSA.	46
<i>Εικόνα 3.3:</i> Διαθλασίμετρο Kern Optics.	47
<i>Εικόνα 3.4:</i> Περιστροφικό Ιξωδόμετρο DV-I Prime της Brookfield.	48
<i>Εικόνα 3.5:</i> Συσκευή Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) από την Malvern Instruments (UK).	48

Εικόνα 3.6: Φασματοφωτόμετρο ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού EPR. Παρατηρείται η πηγή της μικροκυματικής ακτινοβολίας ‘κλείστρον’ (των μικροκυμάτων) και ο μαγνήτης. Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλη κυψελίδα στο κέντρο ειδικής κοιλότητας (sample cavity) στην περιοχή του μέγιστου μικροκυματικού μαγνητικού πεδίου.	49
Εικόνα 4.1.1: Απεικόνιση διάχυσης των συστημάτων με αιθέρια έλαια Σ1, Σ2, Σ3, Σ4 σε άγαρ, στα βακτήρια <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Bacillus cereus</i>	59
Εικόνα 4.1.2: Απεικόνιση διάχυσης των συστημάτων με αιθέρια έλαια Σ1, Σ2, Σ3, Σ4 σε άγαρ, στα βακτήρια <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Lactococcus lactis</i>	59
Εικόνα 4.1.3: Απεικόνιση διάχυσης των συστημάτων με ελαιόλαδο Σ2α και Σ2β σε άγαρ, στα βακτήρια <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Lactococcus lactis</i>	61
Εικόνα 4.1.4: Σχηματική απεικόνιση της θέσης των αιθέριων ελαίων στα τρυβλία.	62
Εικόνα 4.1.5: Απεικόνιση διάχυσης των αιθέριων ελαίων σε άγαρ, στα βακτήρια <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Lactococcus lactis</i>	62
Εικόνα 4.2.1: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ1) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου.	65
Εικόνα 4.2.2: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ2) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο θυμαριού.	65
Εικόνα 4.2.3: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ3) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο ρίγανης.	66
Εικόνα 4.2.4: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ4) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο δικτάμου.	66
Εικόνα 4.2.5: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ2α+β) - μικρογαλάκτωμα με ελαιόλαδο.	67
Εικόνα 4.3.1: Διαγράμματα DLS (Empty) μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια θυμαριού (μπλε γραμμή--), δικτάμου (πράσινη γραμμή---) και δενδρολίβανου (κόκκινη γραμμή--). Μέγεθος υδροδυναμικής διαμέτρου d_h (nm).	71
Εικόνα 4.4.1: Φάσμα EPR για το ελαιόλαδο.	74
Εικόνα 4.4.2: Φάσμα EPR δείγματος (R1) ελαιόλαδου-δενδρολίβανου.	74
Εικόνα 4.4.3: Φάσμα EPR μίγματος (M1) ελαιόλαδου-δενδρολίβανου/PG/DMG.	75
Εικόνα 4.4.4 Φάσμα EPR (Empty) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (σύστημα Σ1).	76
Εικόνα 4.4.5 Φάσμα EPR (Full) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (σύστημα Σ1).	76

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

Η ελληνική χλωρίδα είναι πλουσιότατη σε αυτοφυή αρωματικά φυτά, εξαιρετικής ποιότητας και οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες της χώρας ευνοούν ακόμα περισσότερο την καλλιέργεια πολλών εξ' αυτών. Έτσι, στην Ελλάδα εντοπίζεται ένας μεγάλος αριθμός σημαντικών και σπάνιων ειδών ανά τον κόσμο από αρωματικά φυτά, βότανα και μπαχαρικά, όπως είναι η ρίγανη, το θυμάρι, το τσάι του βουνού και άλλα.

Τα προαναφερθέντα φυτά ονομάζονται **αρωματικά**, διότι αναδίδουν στο περιβάλλον τους κάποιο ειδικό άρωμα, χαρακτηριστικό για κάθε είδος ή και για κάθε ποικιλία φυτού. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στην ύπαρξη ευωδών πτητικών ουσιών, οι οποίες είναι γνωστές ως αιθέρια έλαια και βρίσκονται σε διάφορα όργανα και μέρη του φυτού (Σαρλής, 1994).

Τα αρωματικά φυτά αναφέρονται συνήθως ως **αρωματικά-φαρμακευτικά** φυτά, δεδομένου ότι πολλά από αυτά χρησιμοποιούνται είτε για την παραλαβή φαρμακευτικών ουσιών από τα αιθέρια έλαιά τους, είτε ως δρόγες που τους αποδίδονται φαρμακευτικές ιδιότητες (Σκουμπρής, 1985). Φαρμακευτικό φυτό λοιπόν ονομάζεται κάθε φυτό, το οποίο διαθέτει ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά, τα οποία έχουν την ικανότητα να προλάβουν, να ανακουφίσουν ή να θεραπεύσουν ασθένειες (Σαρλής, 1994). Όλα τα αρωματικά φυτά είναι φαρμακευτικά, το αντίθετο όμως δεν ισχύει (Κουτσός, 2007). Κοινό γνώρισμα όλων αυτών (αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών) είναι η ύπαρξη αρωματικών αιθέριων ελαίων, ανεξάρτητα από τον τρόπο χρήσης τους (Σαρλής, 1994). Τα αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά είναι μια κατηγορία φυτών με μεγάλη σημασία για τον άνθρωπο, γιατί περιέχουν χρήσιμες ουσίες για τη βιομηχανία τροφίμων, τη φαρμακευτική, την αρωματοποιία, τη ζαχαροπλαστική και σε άλλους τομείς (Σαρλής, 1994).

Η ταξινόμηση των φυτών γίνεται αρχικά σε οικογένειες και μετά σε γένη, τα οποία περιλαμβάνουν πολλά είδη. Τα αρωματικά φυτά ανήκουν σε διάφορες οικογένειες, με την πλειονότητα των Ελληνικών φυτών να ανήκει στις οικογένειες *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* και *Pinaceae*. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει αυτή των Χειλανθών (*Lamiaceae* ή *Labiatae*), η οποία είναι και η πολυπληθέστερη, καθώς μόνο στον Ελλαδικό χώρο εμφανίζονται 320 είδη με πολλά από αυτά να παράγουν αιθέρια έλαια (Kokkini et al., 1994). Από τα πιο γνωστά Ελληνικά αρωματικά φυτά της οικογένειας αυτής είναι η μέντα, ο βασιλικός, η ρίγανη, το θυμάρι, η λεβάντα, η δάφνη, το φασκόμηλο κ.α. (Σαρλής, 1994). Μάλιστα, το πιο εμπορικό είδος ρίγανης (*vulgare* ssp. *hirtum*), είναι γνωστό διεθνώς ως

Ελληνική ρίγανη (Greek Oregano) (Κουτσός, 2007, Kokkini et al., 1997). Τα γένη που εντοπίζονται συχνότερα στον Ελλαδικό χώρο είναι τα *Teucrium*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Sideritis*, *Satureja*, *Thymus*, *Origanum* κ.ά. (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999). Σε παγκόσμια κλίμακα, η οικογένεια των χειλανθών περιλαμβάνει 200 γένη, με 3.200 περίπου είδη που βρίσκονται σε διάφορες περιοχές όπως η Αυστραλία, η Ν.Δ. Ασία, η Αφρική, η Ευρώπη και η Ν. Αμερική, με επίκεντρο την περιοχή της Μεσογείου (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999). Άλλες γνωστές οικογένειες αρωματικών φυτών, βάσει της εμπορικότητάς των αιθέριων ελαίων τους, είναι οι εξής: *Pinaceae*, *Cupressaceae*, *Graminae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Oleaceae*, *Rosaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae*, *Myristicaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Apiaceae*. κ.α. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου 2010).

Από την αρχαιότητα, τα μπαχαρικά και τα βότανα προστίθενται στα τρόφιμα κυρίως ως καρυκεύματα λόγω των αρωματικών τους χαρακτηριστικών. Επίσης, χρησιμοποιούνταν στη συντήρηση πολλών τοπικών τροφίμων στη Μέση Ανατολή, τα Βαλκάνια, την Ινδική ήπειρο και την Άπω Ανατολή (Νυχάς, 1995). Βάσει της βιβλιογραφίας, πολλά μπαχαρικά, βότανα και εκχυλίσματα αυτών έχουν αντιμικροβιακή δράση, η οποία αποδίδεται στο κλάσμα αιθέριου ελαίου τους. Η αποτελεσματικότητα αυτών των ενώσεων έχει εξακριβωθεί τόσο σε υγρά μέσα ανάπτυξης όσο και σε τρόφιμα (Chorianopoulos et al., 2007). Για αυτό τον λόγο άλλωστε, (τα αιθέρια έλαια) θεωρούνται “φυσικά” συντηρητικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα μέσα ελέγχου των παθογόνων μικροοργανισμών. Έτσι, τα μπαχαρικά και τα βότανα αποτελούν εναλλακτικά μέσα για την καθυστέρηση αλλοίωσης των τροφίμων ή την πρόληψη της ανάπτυξης τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών (Skandamis et al., 2002).

Η δημοτικότητα μάλιστα, της χρήσης φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων, όπως τα αιθέρια έλαια, έχει αυξηθεί στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ, ως αποτέλεσμα της ζήτησης των καταναλωτών για μείωση των χημικών προσθέτων σε προϊόντα τροφίμων (Skandamis et al., 2000).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι τα μπαχαρικά και τα βότανα, όπως το δενδρολίβανο, το φασκόμηλο, η ρίγανη, αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις. Σε συνδυασμό με τον χαρακτηρισμό τους ως φυσικά συντηρητικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα για τον έλεγχο της οξείδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα (Embuscado, 2015).

1.2 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά ελαιώδη υγρά που λαμβάνονται από διάφορα όργανα και μέρη των φυτών, όπως είναι τα άνθη, τα φύλλα, οι σπόροι, οι ρίζες, τα φρούτα και άλλα (Vilela et al., 2016). Πρόκειται για πολυσύνθετα μίγματα οργανικών ουσιών που η σύνθεσή τους διαφέρει στα διάφορα είδη ή και ποικιλίες φυτών (Σκουμπής, 1985). Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες που συντίθεται από τα φυτά που δίνουν βότανα και μπαχαρικά (Κατσιώτης & Χατζοπούλου 2010, Vilela et al., 2016) και είναι γνωστά για την πτητικότητα τους (Σαρλής, 1994).

Ο ρόλος τους στη φυσιολογία του φυτού δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως αλλά φαίνεται ότι χρησιμεύουν ως μια μορφή προστασίας από βακτήρια, ιούς, μύκητες, έντομα, φυτοφάγα ζώα και το κλίμα (μέσα προσαρμογής στις διακυμάνσεις των συνθηκών της θερμοκρασίας και του φωτός). Από την άλλη πλευρά, μπορεί να προσελκύσουν μερικά έντομα για την προώθηση της διασποράς της γύρης και των σπόρων (Vilela et al., 2016) συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη γονιμοποίηση του φυτού (Σαρλής, 1994).

Τα περισσότερα αιθέρια έλαια είναι υγρά και διαφανή. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου 2010). Η παραλαβή τους από τα αρωματικά φυτά πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους, η επιλογή των οποίων βασίζεται σε κριτήρια όπως το είδος και το τμήμα του φυτού, η περιεκτικότητά του σε αιθέριο έλαιο, η επιθυμητή ποιότητα και η χημική σύσταση των συστατικών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η απόσταξη και η εκχύλιση (Σαρλής, 1994).

Κάθε αρωματικό φυτό περιέχει αιθέριο έλαιο, το οποίο αποτελείται από πολλές χημικές ενώσεις (Σαρλής, 1994) και μπορεί να περιλαμβάνει περισσότερα από εξήντα μεμονωμένα συστατικά (Senatore, 1996). Το μέρος του φυτού, από το οποίο απομονώνεται το αιθέριο έλαιο, η εποχή συγκομιδής του, η περιοχή όπου καλλιεργείται, οι κλιματολογικές συνθήκες, η μέθοδος εκχύλισης, επηρεάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τη χημική σύστασή του κι επομένως καθορίζουν και τις οργανοληπτικές του ιδιότητες. Για αυτό είναι δυνατόν το ίδιο αιθέριο έλαιο να βρίσκεται σε πολλά μέρη του φυτού με διαφορετική συγκέντρωση ή και σε ένα μέρος με άλλη συγκέντρωση αναλόγως και με τις παραπάνω παραμέτρους (Chorianopoulos et al., 2007). Στα περισσότερα φυτά η μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου παρατηρείται κατά την ανθοφορία τους ενώ και η απόδοση του αιθέριου ελαίου εξαρτάται επίσης από τις παραπάνω παραμέτρους (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

Τα αιθέρια έλαια μπορεί να βρίσκονται σε οποιοδήποτε φυτικό κυτταρικό ιστό ή σε ειδικά κύτταρα, σε αδένες (εσωτερικούς ή εξωτερικούς) ή αγωγούς που βρίσκονται στα διάφορα μέρη του φυτού (φύλλα, ρίζες, άνθη, σπόρους) (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

Πάντα μία ή κάποιες από τις ουσίες τους βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία και αποτελούν τα «κύρια» συστατικά του αιθέριου ελαίου, που μπορούν να φτάσουν και το 85% της συνολικής σύστασης, ενώ οι υπόλοιπες αναφέρονται ως ίχνη (Σαρλής, 1994, Chorianoopoulos et al., 2007, Burt, 2004). Το χαρακτηριστικό άρωμα κάθε αιθέριου ελαίου είναι η συνισταμένη όλων των συστατικών του, από τα οποία κάποια παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωσή του. Έτσι, σε μερικά αιθέρια έλαια η παρουσία ενός συστατικού ακόμα και σε αναλογία μικρότερη από 1% επιδρά καταλυτικά στο άρωμά του (Σκουμπής, 1985).

Όσον αφορά στη χημική σύσταση, τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι οργανικές ενώσεις όπως αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, εστέρες, φαινόλες και τερπένια (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010, Nazzaro et al., 2013, Zhang et al., 2014), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις αρωματικές και βιολογικές ιδιότητες των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Πρόκειται για οξυγονούχα συστατικά (Σκουμπής, 1985), τα οποία περιλαμβάνουν μονοτερπένια και σεσκιτερπένια (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010, Nazzaro et al., 2013), ενώ στα μη οξυγονούχα συγκαταλέγονται οι υδρογονάνθρακες, χωρίς να επηρεάζουν το άρωμά τους (Σκουμπής, 1985). Πιο συγκεκριμένα, τερπενικές ενώσεις όπως (γ-τερπένιο, α-πινένιο, π-κυμένιο), φαινολικές (καρβακρόλη, θυμόλη, κινεόλη) και άλλες, όπως η βορνεόλη και η καμφορά, είναι παρούσες (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων είναι γνωστές από το 1881, όταν ο Γάλλος De la Croix παρατήρησε τη δράση τους (Tassou et al., 2012). Μάλιστα, η αντιμικροβιακή δράση των περισσότερων οφείλεται στη δράση της καρβακρόλης, η οποία αποτελεί το κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων της ρίγανης, του δικτάμου και του θυμαριού, στο τελευταίο μάλιστα συναντάμε και τη θυμόλη που είναι εξίσου σημαντική. Αυτές οι δύο φαινολικές ουσίες φαίνεται να καθιστούν την κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών διαπερατή (Lambert et al., 2001).

Μελέτες *in vitro* με αιθέρια έλαια δείχνουν ότι είναι αποτελεσματικά έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων, όπως η *Listeria monocytogenes*, ο *Bacillus cereus* και ο *Staphylococcus aureus*, ενώ υπάρχουν ενδείξεις για τη δράση τους και σε Gram-αρνητικά βακτήρια όπως η *Shigella dysenteria*, η *Salmonella typhimurium* και το *Echerichia coli O157:H7* (Burt, 2004). Βέβαια η ευαισθησία των Gram-αρνητικών βακτηρίων είναι μικρότερη, καθώς διαθέτουν μια επιπλέον εξωτερική μεμβράνη, την οποία δεν μπορούν πάντα να διαπεράσουν τα αιθέρια έλαια (Vilela et al., 2016).

Κρίσιμο ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση διαδραματίζουν και τα δευτερεύοντα συστατικά των αιθέριων ελαίων, πιθανώς λόγω συνεργιστικής δράσης με τα κύρια ή και άλλα συστατικά, όπως έχει βρεθεί για το αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου, ορισμένα είδη *Thymus* και της ρίγανης. (Chorianoopoulos et al., 2007, Burt, 2004). Παράλληλα, η παρεμπόδιση παραγωγής

τοξινών από τον *B. cereus* λόγω της παρουσίας καρβακρόλης κεντρίζει το ενδιαφέρον των επιστημόνων (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010, Burt, 2004).

Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων είναι ισχυρή λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις. Παρόλα αυτά, η δράση τους δεν οφείλεται πάντα στα κύρια συστατικά, αλλά σε φλαβονοειδή και άλλες ουσίες όπως καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, καρνοσόλη, καρνοσικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, ροσμανόλη κ.α. τα οποία υπάρχουν στα έλαια (Embuscado, 2015, Vilela et al., 2016).

Γενικά, τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, αντιβακτηριακών, αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών. Συνεπώς, η μελέτη τέτοιων ουσιών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας με εφαρμογές σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (Vilela et al., 2016).

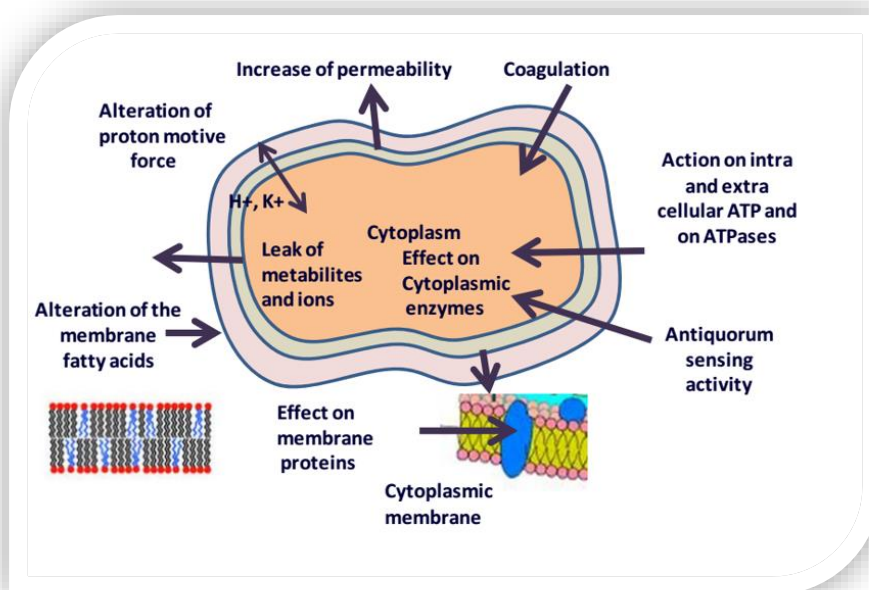
Οι περισσότερες χρήσεις στην ΕΕ αφορούν στα τρόφιμα (ως αρωματικές ουσίες), τα αρώματα (fragrances & aftershaves) και τα φαρμακευτικά σκευάσματα (Burt, 2004). Πιο συγκεκριμένα, στον τομέα των τροφίμων χρησιμοποιούνται ως φρέσκα ή αποξηραμένα αρτύματα, βότανα, καρυκεύματα και μπαχαρικά. Από την άλλη μεριά, στην αρωματοποιία, απαντώνται ευρέως σε καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής υγιεινής. Στη ζαχαροπλαστική και τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών χρησιμοποιούνται κυρίως ως βελτιωτικά οσμής. Στον ιατρικό τομέα και τη φαρμακευτική, τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ως συστατικά σκευασμάτων λόγω της βιολογικής τους δραστηριότητας (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

Πρόσφατα έχει παρατηρηθεί ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για φυσικά προϊόντα με αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες προκειμένου να αντικατασταθούν χημικά και συνθετικά πρόσθετα που χρησιμοποιούνται σήμερα στη βιομηχανία τροφίμων (Vilela et al., 2016).

1.2.1 Μηχανισμός δράσης αιθέριων ελαίων στα βακτήρια

Σε γενικές γραμμές, τα αιθέρια έλαια, τα οποία διαθέτουν τις ισχυρότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες κατά των παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται στα τρόφιμα, περιέχουν ένα υψηλό ποσοστό φαινολικών ενώσεων όπως η καρβακρόλη, η ευγενόλη και η θυμόλη (Lambert et al., 2001). Επομένως, ο μηχανισμός δράσης τους αναμένεται να είναι παρόμοιος με αυτών των φαινολών, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την διατάραξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και της πρωτονιοκινητικής δύναμης (Proton Motive Force, PMF), τη ροή ηλεκτρονίων καθώς και την ενεργή μεταφορά του περιεχομένου των κυττάρων και την πήξη του κυτταροπλάσματος (Burt, 2004).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους είναι η **υδροφοβία** τους, η οποία τους δίνει τη δυνατότητα να διαλύονται στα λιπίδια της μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου και τα μιτοχόνδρια, διαταράσσοντας τις δομές τους και καθιστώντας τις πιο διαπερατές. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προκληθεί εκροή ιόντων και άλλων συστατικών που περιέχονται στο κύτταρο (Lambert et al., 2001). Αν και τα βακτήρια είναι ικανά να επιβιώνουν παρά την εκροή (μέχρι ένα όριο) συστατικών που λαμβάνει χώρα, εκτεταμένη απώλεια του περιεχομένου των κυττάρων ή έξοδος των κρίσιμων μορίων τους και ιόντων τα οδηγεί στο θάνατο (Burt, 2004).

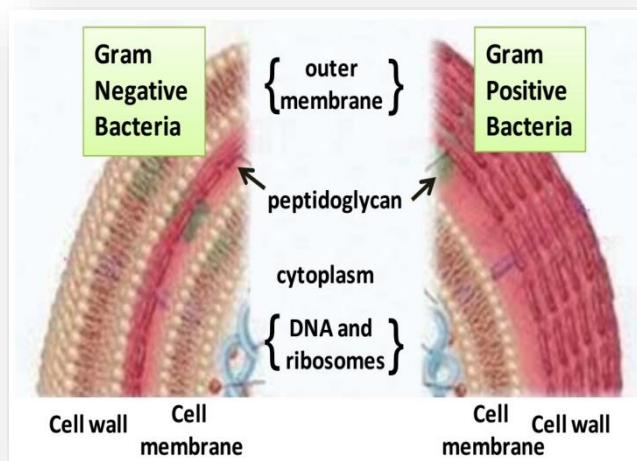


Εικόνα 1.1: Μηχανισμός και περιοχή δράσης αιθέριων ελαίων στο βακτηριακό κύτταρο (Nazzaro et al., 2013).

Πιο αναλυτικά, συστατικά των αιθέριων ελαίων φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του κυττάρου, οι οποίες είναι ενσωματωμένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ένζυμα όπως οι ΑΤΡάσες είναι γνωστό ότι βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και συνορεύουν με μόρια των λιπιδίων. Δύο είναι οι πιθανοί μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους οι κυκλικοί υδρογονάνθρακες θα μπορούσαν να δράσουν σε αυτά τα ένζυμα. Στην πρώτη περίπτωση, λιπόφιλα μόρια υδρογονανθράκων συσσωρεύονται στη διπλοστοιβάδα λιπιδίων και διαταράσσουν τη σύνδεση και τη δράση λιπιδίων-πρωτεϊνών. Εναλλακτικά, λαμβάνει χώρα άμεση αλληλεπίδραση λιποφίλων ενώσεων με τα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης. Αυτός ο τρόπος, αποτελεί ένδειξη ότι τα αιθέρια έλαια αλληλεπιδρούν με τα ένζυμα

που εμπλέκονται στην ρύθμιση της ενέργειας ή τη σύνθεση των δομικών συστατικών, με κυρίαρχο μηχανισμό δράσης τη δέσμευση πρωτεϊνών (Burt, 2004).

Όσον αφορά στα Gram-θετικά βακτήρια, τα αιθέρια έλαια ευθύνονται για την αποικοδόμηση/υποβάθμιση του κυτταρικού τους τοιχώματος, την καταστροφή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των πρωτεϊνών αυτής, την πήξη του κυτταροπλάσματος, την αύξηση της διαπερατότητας που οδηγεί σε εκροή του περιεχομένου των κυττάρων και τη μείωση της κινητήριας δύναμης πρωτονίων (Nazzaro et al., 2013).



Εικόνα 1.2: Δομή κυττάρου Gram-αρνητικού και Gram-θετικού μικροοργανισμού (Nazzaro et al., 2013).

Τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στην αντιβακτηριακή δράση των αιθέρων ελαίων, δεδομένου ότι διαθέτουν μία εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα, η οποία περιορίζει τη διάχυση των υδρόφοβων ενώσεων μέσω του λιποπολυσακχαρίτη που την καλύπτει (Burt, 2004).

Πιο συγκεκριμένα, οι επιδράσεις της δράσης των αιθέρων ελαίων συνήθως οδηγούν στην αποσταθεροποίηση της διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίων, την καταστροφή της λειτουργίας και της σύνθεσης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, την απώλεια ζωτικών ενδοκυτταρικών συστατικών και την αδρανοποίηση των ενζυμικών μηχανισμών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα αιθέρια έλαια μεταβάλλουν επίσης τη διαπερατότητα της μεμβράνης καταστρέφοντας το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Nazzaro et al., 2013). Συστατικά των αιθέρων ελαίων, όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη, είναι σε θέση να διαλύσουν την εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, απελευθερώνοντας λιποπολυσακχαρίτες (*Lipopolysaccharides*, LPS), αυξάνοντας παράλληλα την διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε ATP (Burt, 2004, Nazzaro et al., 2013).

Μελέτες με τον *B. cereus* έχουν δείξει ότι η καρβακρόλη αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη του, όπου διαλύεται στη διπλή στοιβάδα φωσφολιπιδίων και τείνει να ευθυγραμμιστεί μεταξύ των αλυσίδων λιπαρών οξέων (Ultee et al, 2000, Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010, Burt, 2004). Αυτή η στρέβλωση της φυσικής δομής προκαλεί επέκταση

και αποσταθεροποίηση της μεμβράνης, αυξάνοντας τη ρευστότητά της, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την παθητική διαπερατότητα (Burt, 2004).

Γενικά, η ευαισθησία των βακτηρίων στην αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων φαίνεται να αυξάνει με τη μείωση του pH του τροφίμου, τη θερμοκρασία αποθήκευσης και την ποσότητα του οξυγόνου εντός της συσκευασίας. Σε χαμηλό pH, η υδροφοβία των αιθέριων ελαίων αυξάνεται, επιτρέποντας την ευκολότερη διάλυσή τους στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων στόχων (Burt, 2004).

Παρακάτω περιγράφονται εκτενέστερα τα φυτά από τα οποία παράγονται τα τέσσερα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* και *Origanum dictamnus*.

1.2.2 Δενδρολίβανο - *Rosmarinus officinalis*



Το δενδρολίβανο (rosemary) είναι ένας θάμνος που ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* (*Labiatae*) και απαντάται στο Μαρόκο και σε χώρες της Νότιας Ευρώπης. Καλλιεργείται γενικότερα στις παραμεσόγειες περιοχές (Σκουμπής, 1985), ενώ το είδος *Rosmarinus officinalis*, είναι το μοναδικό που βρίσκεται ως αυτοφυές στη Μεσόγειο. Εμφανίζει 3 χημειότυπους (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010, Vilela et al., 2016) και στην παρούσα εργασία μελετάται το *Rosmarinus officinalis*. Το αιθέριο έλαιό του είναι ελαφρά κιτρινωπό έως άχρωμο και η χαρακτηριστική μυρωδιά του οφείλεται στη βορνεόλη (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Γενικότερα, αποτελείται από μονοτερπένια όπως το α-πινένιο, αλκοόλες όπως η βορνεόλη, εστέρες και κετόνες (καμφορά). Κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου είναι η 1,8-κινεόλη έως 89%, το α-πινένιο 2-25%, η καμφορά 2-14% και η βορνεόλη 0-17% (Tassou et al., 2012). Η αποδεκτή περιεκτικότητα καμφοράς στο εμπόριο είναι κάτω του 40% (Κουτσός, 2007). Η απόδοση του φυτού *Rosmarinus* (φύλλα και άνθη) σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται μεταξύ 1.3-3.1% (Papageorgiou et al., 2008).

Το δενδρολίβανο χρησιμοποιείται ως άρτυμα και φυσικό συντηρητικό κι έχει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση (Papageorgiou et al., 2008). Η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται στη βορνεόλη και σε άλλα τερπένια (1,8-κινεόλη, καμφορά, α-πινένιο) (Rasooli et al., 2008), ενώ η αντιφλεγμονώδης δράση και οι υψηλές αντιοξειδωτικές

ιδιότητες οφείλονται σε φαινολικές ενώσεις, όπως η καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ, η ροσμανόλη και το ροσμαρινικό οξύ, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τέλος, το καρνοσικό οξύ παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Vilela et al., 2016).

1.2.3 Θυμάρι - *Thymus vulgaris*

Το θυμάρι (thyme) είναι ένα φυτό που ανήκει κι αυτό στην οικογένεια *Lamiaceae* (*Labiatae*) και αυτοφύεται στα βουνά της Ισπανίας, στην Τυνησία, στην Αλγερία και στην Ελλάδα ενώ καλλιεργείται σε πολλές περιοχές της Κεντρικής Ευρώπης και των ΗΠΑ (Σκρουμπής, 1985). Το γένος *Thymus*, εκτός



από το κοινό θυμάρι, αριθμεί 120 περίπου είδη, από τα οποία τα 24 αυτοφύονται στην Ελλάδα (Κουτσός, 2007). Χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλο πολυμορφισμό και διακρίνεται σε ποικίλους χημειότυπους εξαιτίας της διαφοροποιημένης σύστασης των πτητικών συστατικών του. Συνολικά περιλαμβάνει 7 χημειότυπους (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Η Ισπανική ρίγανη (*Spanish Oregano*) για παράδειγμα, είναι τριμμένη ξηρή δρόγη αυτού του φυτού. Η απόδοσή του σε αιθέριο έλαιο κι εδώ κυμαίνεται στο 1-3% ανάλογα με την ποικιλία και άλλες συνθήκες και σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να φτάσει σε πολύ υψηλό επίπεδο έως και 6% (Κατσιώτης & Χατζοπούλου 2010, Κουτσός, 2007).

Πιο συγκεκριμένα για το είδος *Thymus vulgaris* L., το αιθέριο έλαιό του είναι πλούσιο σε θυμόλη, η οποία αποτελεί το κύριο συστατικό του σε ποσοστό μέχρι και 64%, και ακολουθεί το π-κυμένιο σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα (56%) και μετά το γ-τερπένιο (2-31%) και η καρβακρόλη σε ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 2-11% (Tassou et al., 2012). Άλλα συστατικά του είναι το καφεϊκό, οξύ, το ροσμαρινικό οξύ, οι ταννίνες, τα φλαβονοειδή κ.α. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε θυμόλη θεωρείται πολύ καλό αντισηπτικό και χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική (Σκρουμπής, 1985). Ακόμα, είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και λόγω αυτών χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως αρωματικό, αφέψημα, βελτιωτικό οσμής και γεύσης και ως συντηρητικό (Σκρουμπής, 1985, Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

1.2.4 Ρίγανη - *Origanum vulgare*

Η ρίγανη (*origan* ή *Greek oregano*) ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των χειλανθών (*Lamiaceae, Labiatae*) και αποτελεί ιθαγενές φυτό της Ελλάδας. Το φυτό αυτοφύεται στη Μεσόγειο σε χώρες όπως η Γαλλία, η Τουρκία, η Ισπανία καθώς και στις παραμεσόγειες χώρες της Αφρικής. Επίσης, κάποια είδη του καλλιεργούνται στο Μεξικό και την Αμερική (Κουτσός, 2007). Η Ευρωπαϊκή ρίγανη θεωρείται ανώτερη σε ποιότητα και μάλιστα η Ελληνική ρίγανη είναι η καλύτερη παγκοσμίως, είτε ως αυτοφυής, είτε ως καλλιεργήσιμη (Fleisher & Sneer, 1982).



Το γένος *Origanum* περιλαμβάνει πολλά είδη, υποείδη και ποικιλίες, με 42 είδη (7 υποείδη, 10 φυσικά υβρίδια) να εντοπίζονται γύρω από τη Μεσόγειο ενώ στην Ελλάδα απαντώνται 3 υποείδη του *Origanum vulgare* L. (Κουτσός, 2007). Στο γένος *Origanum* μάλιστα, ανήκει και ο Δίκταμος.

Το χρώμα του αιθέριου ελαίου της ρίγανης είναι κίτρινο-πορτοκαλί και έχει έντονη οσμή, χαρακτηριστική της ρίγανης. Η ποσότητα και η χημική σύνθεση του ριγανελαίου ποικίλει μεταξύ των διάφορων ειδών ή παραλλαγών του φυτού κι αλλάζει ακόμα και με την περιοχή όπου εντοπίζεται (Σκρουμπής, 1985). Η περιεκτικότητα σε ριγανέλαιο μπορεί να φτάσει μέχρι και 7%, ο μέσος όρος όμως σε βιομηχανική κλίμακα κυμαίνεται στο 3-4%. (Κουτσός, 2007). Το αιθέριο έλαιο στα φυτά του Ελλαδικού χώρου κυμαίνεται σε μεγάλα ποσοστά από 1.1-8.2%, τις υψηλότερες τιμές που έχουν καταγραφεί (Kokkini et al., 1997, Fleisher & Sneer, 1982).

Τα κύρια συστατικά του συγκεκριμένου αιθέριου ελαίου είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη καθώς και τα πρόδρομα μόριά τους, π-κυμένιο και γ-τερπένιο (Κουτσός, 2007). Σε μελέτες που έγιναν εντοπίστηκαν έως και 30 διαφορετικά χημικά συστατικά στη σύνθεση του ριγανελαίου. Από αυτά, το περιεχόμενο των τεσσάρων παραπάνω συστατικών άγγιζε το ποσοστό 88-96%, που είναι πολύ μεγάλο, ενώ τα υπόλοιπα 26 συστατικά βρέθηκαν σε ποσοστό μικρότερο του 1% συνολικά (Kokkini et al., 1997).

Η καρβακρόλη που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα της ρίγανης και του αιθέριου ελαίου, κυμαίνεται από 70% έως και 85%, ενώ σε αυτοφυείς πληθυσμούς μπορεί να φτάσει και το 90% (Stefanaki et al., 2015). Στο αιθέριο έλαιο από Ελληνική ρίγανη, η καρβακρόλη εμφανίζεται σε υψηλότερα επίπεδα από τη θυμόλη (πάνω από 57%, συνήθως 60-90%), η θυμόλη γύρω στο 42%, ενώ το π-κυμένιο από 17-53% και το γ-τερπένιο από 0.6-3%.

(Kokkini et al., 1997, Fleisher & Sneer, 1982, Tassou et al., 2012). Στα υπόλοιπα συστατικά περιλαμβάνονται οι φλαβόνες, οι κατεχίνες και τα φαινολικά οξέα (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

Το ριγανέλαιο χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων καθώς και σε άλλους τομείς, όπως η αρωματοποιία και η βιομηχανία τροφίμων (Σαρλής, 1994). Στο τελευταίο χρησιμοποιείται ως βελτιωτικό γεύσης ή/και ως φυσικό συντηρητικό. Απαντάται ακόμα και στην τροφή για τα ζώα, αντικαθιστώντας τα αντιβιοτικά (Κουτσός, 2007).

Η ανασταλτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε αλλοιωγόνα τροφιμογενή βακτήρια, σε μύκητες και ζύμες έχει αναφερθεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία (Skandamis et al., 2000), καθώς παρουσιάζει αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δράση. Μάλιστα, η αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση ενισχύονται όταν η περιεκτικότητα σε καρβακρόλη είναι υψηλή (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

1.2.5 Δίκταμος - *Origanum dictamnus*



Ο δίκταμος (dittany) ή «έρωντας» όπως είναι γνωστός, αποτελεί συγγενές φυτό της ρίγανης, αφού ανήκει στο ίδιο γένος *Origanum*. Πρόκειται για έναν αυτοφυή θάμνο, ο οποίος εντοπίζεται στην Κρήτη. Ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (*Lamiaceae*, *Labiatae*) και στον Ελλαδικό χώρο απαντώνται 9 είδη αυτού με πιο γνωστό το *Origanum dictamnus* L.. Οι ονομασίες του ποικίλουν ανάλογα με τον τόπο που καλλιεργείται και τις χρήσεις που έχει λόγω των ιδιοτήτων του. Αποτελεί και αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό, καθώς μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει είτε το αιθέριο έλαιό, είτε τις δρόγες του.

Το αιθέριο έλαιο του δικτάμου έχει χρώμα ανοιχτό κίτρινο και η απόδοσή του κυμαίνεται στο 1.5-2.5% (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Περιέχει 42 διαφορετικά συστατικά από τα οποία τα κύρια είναι η καρβακρόλη (55%) και το πρόδρομό του μόριο το πικυμένιο (14%), ενώ συναντάται και το γ-τερπένιο (13%). Άλλα συστατικά είναι η λιναλοόλη (4%) και ίχνη από τρικυκλένιο, σαβινένιο, λιμονένιο και καμφορά καθώς και άλλες τερπενικές ενώσεις (3-θουγένιο, α-πινένιο, β-πινένιο, β-καρυοφυλλένιο). Φλαβονοειδή και τοκοφερόλες είναι επίσης παρόντα.

Εκτός από τις θεραπευτικές του ιδιότητες (επουλωτικό, καταπραϋντικό κ.α.), οι οποίες είναι γνωστές από την αρχαιότητα, από τον Αριστοτέλη, τον Ιπποκράτη, τον Διοσκουρίδη κ.α., (Κουτσός, 2007), το αιθέριο έλαιο δικτάμου χρησιμοποιείται στην ποτοποιία, την

αρωματοποίηση και τη φαρμακευτική. Εμφανίζει, επίσης, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σύμφωνα με μελέτες, αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης σε μικροοργανισμούς όπως *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Echerichia coli*, ενώ οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες οφείλονται στην παρουσία πολυφαινόλων (Κουτσός, 2007, Σαρλής, 1994, Σκρουμπής, 1985).

Συνοψίζοντας, έχει αναφερθεί ότι συνδυασμοί αιθέριων ελαίων, τα οποία εμφανίζουν συνεργιστική δράση και συνδυασμοί αιθέριων ελαίων με άλλες φυσικές αντιβακτηριακές ενώσεις (π.χ. νισίνη), μπορούν να έχουν αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση σε αρκετά χαμηλές δόσεις και να μειώσουν εντυπωσιακά τις αρνητικές οργανοληπτικές επιπτώσεις στα τρόφιμα (Zhang et al., 2014).

1.3 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (**Lactic Acid Bacteria, LAB**) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα κατά κανόνα ωφέλιμων βακτηρίων με παρόμοιες ιδιότητες που χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις τροφίμων και στη συντήρηση αυτών



(Klaenhammer, 1988). Η βιομηχανοποίηση των τροφίμων αύξησε την οικονομική σημασία των LAB, καθώς παίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και την ποιότητα των προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση (Guchte et al., 2002). Ταυτόχρονα, αναστέλλουν τη βακτηριακή αλλοίωση των τροφίμων, είτε μειώνοντας το pH των τροφίμων (οξύνιση) (Axelsson & Ahrne, 2000), είτε παράγοντας αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως τις βακτηριοσίνες, οι οποίες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Guchte et al., 2002).

Πιο αναλυτικά, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μια ετερογενής ομάδα Gram-θετικών βακτηρίων, μη σποριογόνων, τα οποία είναι αναερόβια αλλά ταυτόχρονα αεροανεκτικά/αεροάντοχα. Αποτελούν αυστηρώς ζυμωτικά βακτήρια και διακρίνονται με βάση το τελικό προϊόν ζύμωσης σε ομοζυμωτικά, τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ ως τελικό προϊόν από τη ζύμωση της λακτόζης και ετεροζυμωτικά, τα οποία παράγουν εκτός του γαλακτικού οξέος, οξικό οξύ ή αιθανόλη και CO₂ (Salminen et al., 2004). Η μείωση που προκαλείται στο pH κατά την παραγωγή των παραπάνω ενώσεων, βοηθά στη διατήρηση των

τροφίμων, καθώς αποτελεί εμπόδιο για την ανάπτυξη αρκετών μικροοργανισμών (Salminen et al., 2004).

Τα γένη που περιλαμβάνουν είναι πολλά, μεταξύ αυτών και τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Streptococcus*, που είναι ιδιαίτερης σημασίας για τα τρόφιμα (Guchte et al., 2002, Axelsson & Ahrne, 2000).

Βρίσκονται σε προϊόντα είτε ζωικής (γάλα, κρέας, ψάρι) είτε φυτικής (λαχανικά, κρασί, ελιές κ.α) προέλευσης (Guchte et al., 2002). Αποτελούν όμως και φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου, και απαντώνται στη στοματική κοιλότητα, τον εντερικό σωλήνα και τον κόλπο, συμβάλλοντας στη διατήρηση της καλής κατάστασης του οργανισμού (Salminen et al., 2004).

Τα LAB που αναπτύσσονται ως τυχαία μικροχλωρίδα των τροφίμων ή προστίθενται στα τρόφιμα ως καλλιέργειες εκκίνησης θεωρούνται γενικά ακίνδυνα ή ακόμα και ωφέλιμα για την ανθρώπινη υγεία. Από την ανακάλυψή τους, έχουν αποκτήσει ενδιαφέρον σε διάφορες εφαρμογές, ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε ζυμώσεις τροφίμων και ζωοτροφών, σε φαρμακευτικά προϊόντα, ως προβιοτικά και ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου. Στη βιομηχανία τροφίμων, τα LAB χρησιμοποιούνται ευρέως ως εναρκτήριες καλλιέργειες με στόχο να επιτευχθούν ευνοϊκές αλλαγές στην υφή, το άρωμα, τη γεύση και την οξύτητα των τροφίμων (Harzallah & Belhadj, 2013).

Ως εκ τούτου, η επιλογή των σωστών εναρκτήριων καλλιεργειών είναι μέγιστης σημασίας για την επίτευξη της επιθυμητής ποιότητας των τροφίμων και των λειτουργικών τους ιδιοτήτων. Γι' αυτό το λόγο, τα τρόφιμα εμπλουτισμένα με αυτές τις καλλιέργειες είναι απαραίτητο να προστατευτούν από τις δυσμενείς συνθήκες που συναντούν στις βιομηχανικές διεργασίες και στον ανθρώπινο οργανισμό (Harzallah & Belhadj, 2013, Guchte et al., 2002).

Το 2002 οι οργανισμοί FAO/WHO όρισαν ως «προβιοτικά» βακτήρια τους ζωντανούς μικροοργανισμούς οι οποίοι όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες προσφέρουν ένα ευεργετικό αποτέλεσμα στην υγεία του καταναλωτή. Σε σχέση με τα τρόφιμα, τα προβιοτικά θεωρούνται ως «βιώσιμα σκευάσματα σε τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής για τη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων και των ζώων». Μάλιστα, ένας εντυπωσιακός αριθμός των μικροβιακών ειδών θεωρούνται ότι περιλαμβάνουν προβιοτικά στελέχη (Harzallah & Belhadj, 2013). Η ζήτηση άλλωστε της παγκόσμιας αγοράς για αυτά τα προϊόντα συνεχώς αυξάνεται, ως απάντηση στις απαιτήσεις ενός ολοένα και πιο συνειδητοποιημένου καταναλωτικού κοινού, όσον αφορά στην σχέση τροφίμων υγείας (Harzallah & Belhadj, 2013).

Σήμερα, στη βιομηχανία τροφίμων όπως είναι γνωστό, τα LAB χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση τροφίμων και για την παραγωγή βασικών χημικών προϊόντων όπως οργανικά οξέα και πολυόλες. Επίσης, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων.

Οι νέες εφαρμογές των LAB επεκτείνονται στο φαρμακευτικό χώρο με τη δημιουργία ακόμα και εμβολίων (Wells et al., 1996, Wu et al., 2002, Harzallah & Belhadj, 2013).

1.3.1 Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικής φύσεως ενώσεις που εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σχεδόν πριν από 100 περίπου χρόνια σε καλλιέργειες *Escherichia coli*, από τον Γάλλο Gratia (Gillor et al., 2008). Παράγονται από Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια (Teather et al., 1999) και συντίθενται ριβοσωμικά ενώ συχνά κωδικοποιούνται από πλασμιδιακό DNA (Gillor et al., 2008).

Εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση αλλά έχουν ένα σχετικά στενό φάσμα παρεμπόδισης/θανάτωσης συγκριτικά με τα αντιβιοτικά (Teather et al., 1999). Το φάσμα τους περιορίζεται είτε σε στελέχη που σχετίζονται φυλογενετικά άμεσα με το βακτήριο που τις παράγει ή είναι ευρύτερο, περιλαμβάνοντας διαφορετικές ομάδες Gram-θετικών μικροοργανισμών (Klaenhammer, 1988). Παρόλα αυτά, κάποιες από αυτές είναι πιο θερμοσταθερές από τα αντιβιοτικά και μπορούν να δράσουν σε μεγαλύτερο εύρος pH, όντας βιοδραστικές σε κλίμακα νανομέτρων και μικρομέτρων. Ακόμη είναι άχρωμες, άγευστες και άοσμες και βρίσκουν εφαρμογή τόσο σε φαρμακευτικές εφαρμογές, όσο και στον τομέα των τροφίμων (Perez et al., 2015).

Η οικογένεια των βακτηριοσινών περιλαμβάνει μια ποικιλία πρωτεϊνών που διαφοροποιούνται ως προς το μέγεθος, τον μικροοργανισμό στόχο, τον τρόπο δράσης, καθώς και τους μηχανισμούς ανοσίας και μπορεί να διαχωριστεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες, αυτές που παράγονται από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια (Gillor et al., 2008).

Οι βακτηριοσίνες διακρίνονται σε τρεις κλάσεις (Salminen et al., 2004). Η πρώτη κλάση είναι γνωστή ως **λαντιβιοτικά** και αποτελείται από τροποποιημένες βακτηριοσίνες, οι οποίες περιέχουν ασυνήθιστα αμινοξέα. Οι βακτηριοσίνες συντίθενται ριβοσωμικά και στοχεύουν σε ένα ευρύ φάσμα Gram-θετικών βακτηρίων (Salminen et al., 2004, Gillor et al., 2008, Perez et al., 2015, Cotter et al., 2005). Αυτή η κατηγορία υποδιαιρείται σε δύο ομάδες με βάση τη δομή και τον τρόπο δράσης τους. Στα λαντιβιοτικά τύπου A ανήκουν επιμήκεις πρωτεΐνες μικρού μεγέθους (2-5kDa), όπως η **νισίνη**. Η δράση τους πραγματοποιείται προσβάλλοντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη των Gram-θετικών βακτηρίων, δημιουργώντας οπές που οδηγούν σε άμεσο κυτταρικό θάνατο (Salminen et al., 2004, Gillor et al., 2008). Στα λαντιβιοτικά τύπου B, ανήκουν σφαιρικά πεπτιδία, τα οποία δρουν παρεμποδίζοντας τη λειτουργία ενζύμων, προκαλώντας έτσι την καταστροφή των βακτηρίων (Perez et al., 2015, Cotter et al., 2005, Salminen et al., 2004)

Η δεύτερη κλάση των βακτηριοσινών, περιλαμβάνει και πάλι μικρού μεγέθους (<10kDa), θερμοσταθερά πεπτίδια (Perez et al., 2015, Cotter et al., 2005). Αυτή η κατηγορία υποδιαιρείται σε τέσσερις ομάδες (κλάση IIa, IIb, IIc, IId) και επιδρά στα βακτήρια επηρεάζοντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης τους και συμβάλλοντας στην εκροή μορίων από το εσωτερικό τους (Perez et al., 2015, Cotter et al., 2005). Οι κλάσεις I και II αποτελούν τις κύριες κλάσεις των βακτηριοσινών λόγω της ανοσίας τους και της δυναμικής χρήσης τους σε εμπορικές εφαρμογές (Salminen et al., 2004).

Η τρίτη κλάση βακτηριοσινών, περιλαμβάνει τις υδρολάσες, αντιμικροβιακές πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους και ευαίσθητες στη θερμότητα, οι οποίες ονομάζονται βακτηριολυσίνες (bacteriolysins). Έως τώρα, μόνο τέσσερις βακτηριολυσίνες που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν χαρακτηριστεί γενετικά και η δράση τους βασίζεται στη λύση των ευαίσθητων κυττάρων, υδρολύοντας το κυτταρικό τοίχωμα Cotter et al., 2005).

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για την αποτελεσματική δράση των βακτηριοσινών που παράγονται από Gram-θετικά βακτήρια έναντι Gram-αρνητικών βακτηρίων χωρίς τη χρήση κάποιας ουσίας δραστικής στην εξωτερική μεμβράνη τους (Salminen et al., 2004).

Γενικότερα, οι βακτηριοσίνες έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων ως βιο-συντηρητικά διαφόρων τροφίμων, είτε μόνες τους, είτε σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους συντήρησης γνωστές ως τεχνολογία εμποδίων (hurdle technology). Η ενσωμάτωση των βακτηριοσινών σε φιλμ συσκευασίας τροφίμων ή σε επιφάνειες αυτών, έχει διερευνηθεί αρκετά. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις με τις οποίες οι βακτηριοσίνες μπορούν να εφαρμοστούν σε συστήματα τροφίμων: (i) με απευθείας εμβολιασμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων που παράγουν τη βακτηριοσίνη στα τρόφιμα, (ii) την προσθήκη της βακτηριοσίνης σε καθαρή μορφή, ως συντηρητικό τροφίμων και (iii) τη χρησιμοποίηση του προϊόντος το οποίο έχει υποστεί ζύμωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία παράγουν βακτηριοσίνη ως πρώτη ύλη για την επεξεργασία τροφίμων (Perez et al., 2015).

Επί του παρόντος, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εφαρμογή των βακτηριοσινών στη συντήρηση των τροφίμων, αφού συμβάλλουν στην αναστολή της ανάπτυξης αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων (Teather et al., 1999), καθώς μελέτες έδειξαν ότι είναι αποτελεσματικές έναντι ειδών των γενών *Listeria* και *Staphylococcus* αλλά και βακτηρίων που σχηματίζουν σπόρια, όπως το *Clostridium botulinum* και στελέχη *Bacillus* (Harzallah & Belhadj, 2013, Salminen et al., 2004, Gillor et al., 2008).

1.3.2 Νισίνη

Η πρώτη βακτηριοσίνη που βρέθηκε από τους Ουαλούς Rogers και Whittier και μελετήθηκε περισσότερο απ' όλες τις άλλες, είναι η νισίνη (Shin et al., 2015). Πρόκειται για μια γραμμική βακτηριοσίνη μεγέθους 3.5kDa, η οποία αποτελείται από 34 αμινοξέα (Aly et al., 2012) και παράγεται από διάφορα στελέχη του *Lactococcus lactis*. Η νισίνη έχει ταξινομηθεί ως Τύπου Α λαντιβιοτικό που συντίθεται ριβοσωμικά και έχει σχήμα κοχλία (Shin et al., 2015).

Το 1969, η «nisaplin» όπως είναι η εμπορική της ονομασία, εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (FAO/WHO) ως ένα ασφαλές πρόσθετο τροφίμων με τον κωδικό (E234) (Aly et al., 2012, Cotter et al., 2005). Επί του παρόντος, η χρήση της επιτρέπεται σε πάνω από 40 χώρες και κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων ως ένα φυσικό βιο-συντηρητικό, κατάλληλο για διαφορετικά είδη τροφίμων. Επιπροσθέτως, εκτεταμένες μελέτες που έγιναν από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) το 1988 στην τοξικότητα της, την έχουν καθιερώσει ως GRAS (Generally Recognized As Safe) (Shin et al., 2015).

Η νισίνη εμφανίζει θετικά αποτελέσματα στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης θετικών κατά Gram-βακτηρίων, είτε αλλοιωγόνων είτε παθογόνων, όπως *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., κλπ., όντας αποτελεσματική ακόμα και στα σπόρια αυτών (Aly et al., 2012, Shi et al., 2017). Μελέτες έχουν δείξει ότι η νισίνη σε καθαρή μορφή ή η νισίνη σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά μπορεί να είναι αποτελεσματική έναντι και Gram-αρνητικών παθογόνων και ότι με ορισμένες βιομηχανικές παραλλαγές η δραστηριότητά της μπορεί να ενισχυθεί κατά αμφοτέρων των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών παθογόνων. Η διαφορά των Gram-αρνητικών μικροοργανισμών είναι ότι διαθέτουν μια επιπλέον μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τους τοίχωμα, το οποίο δεν μπορεί να διαπεράσει το αμφίφιλο μόριο της νισίνης, λόγω και του σχετικά μεγάλου μεγέθους του (Zhang et al., 2014), για να προσβάλλει την ευαίσθητη κυτταροπλασματική μεμβράνη-στόχο τους, όπως εύκολα συμβαίνει με τα Gram-θετικά βακτήρια (Shin et al., 2015). Κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος είναι η πεπτιδογλυκάνη, ενώ η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες. Η εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες (Perez et al., 2015, Cotter et al., 2005).

Η δράση της νισίνης πραγματοποιείται με δύο τρόπους, είτε αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, είτε δημιουργώντας οπές στην μεμβράνη του βακτηρίου (Aly et al., 2012, Perez et al., 2015). Ο μηχανισμός δράσης όμως, είναι κοινός και αφορά στο δεσμό που σχηματίζεται μεταξύ νισίνης και λιπιδίου II (Perez et al., 2015). Μελέτες μάλιστα *in vitro*, έδειξαν ότι η ανασταλτική επίδραση της νισίνης σχετίζεται άμεσα με την

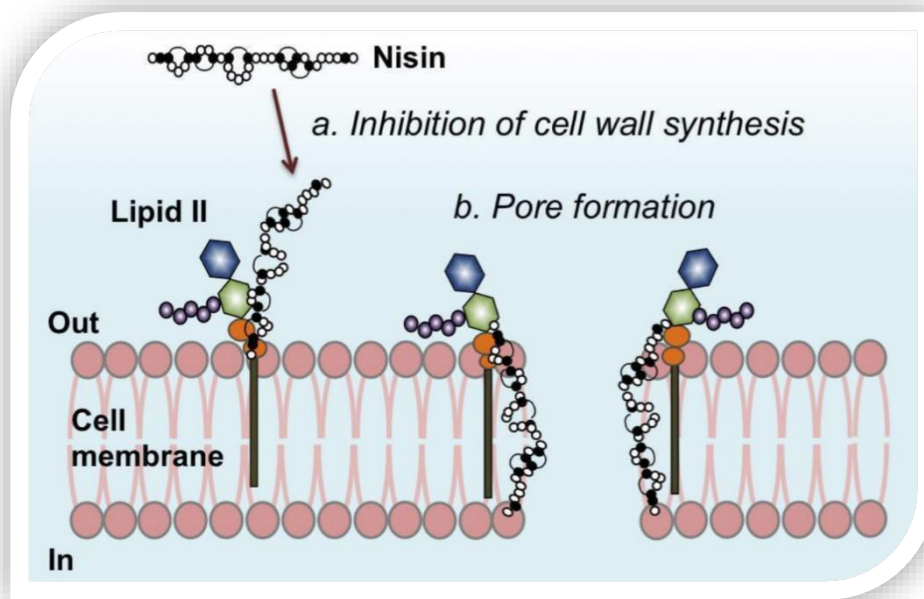
αλληλεπίδραση της με το πρόδρομο μόριο λιπίδιο II (Zhang et al., 2014). Το λιπίδιο II είναι ο κύριος μεταφορέας των υπομονάδων πεπτιδογλυκάνης από το κυτταρόπλασμα στο κυτταρικό τοίχωμα.

Πιο συγκεκριμένα, όταν η νισίνη βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζει τη λειτουργία των ενζύμων και κατ' επέκταση τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Όταν η συγκέντρωση της νισίνης είναι μεγάλη, το πολύπλοκο μόριο νισίνης-λιπιδίου II, διεισδύει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη προκαλώντας οπές, καταστρέφοντας έτσι την ακεραιότητά της (Perez et al., 2015). Αυτή η διαδικασία αποτελεί αφετηρία για μια σειρά δυσλειτουργιών, όπως η διατάραξη του δυναμικού της μεμβράνης, την εκροή μικρών μεταβολιτών, όπως ιόντων, αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και άλλων συστατικών του κυτταροπλάσματος, προκαλώντας τη λήξη κάθε βιοσυνθετικής διεργασίας (Perez et al., 2015, Gao et al., 1991).

Οι ερευνητικές προσπάθειες στρέφονται σε εφαρμογές της νισίνης στα συσκευασμένα τρόφιμα, με την ενσωμάτωση της στο τρόφιμο ή την επιφανειακή απορρόφησή της στο υλικό της συσκευασίας. Οι τρόποι ενσωμάτωσης των βακτηριοσινών στα τρόφιμα είναι δύο. Στην πρώτη περίπτωση, πραγματοποιείται η παραγωγή της βακτηριοσίνης και στη συνέχεια προστίθεται στο τρόφιμο (*ex situ*). Εδώ, η βακτηριοσίνη παράγεται έξω από το τρόφιμο και προστίθεται σε αυτό ως συστατικό. Στη δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται απευθείας η παραγωγή της βακτηριοσίνης στο τρόφιμο (*in situ*) (Leroy & De Vuyst, 2004). Όταν η νισίνη παράγεται *in situ*, τα βακτήρια παγιδεύονται στο τρόφιμο και αυξάνονται ως αποικίες. Για να είναι αποτελεσματική η νισίνη αφού απελευθερωθεί, πρέπει να μεταναστεύσει προς τον μικροοργανισμό-στόχο (Aly et al., 2012).

Σε μελέτες διαπιστώθηκε πως ο συνδυασμός αιθέριων ελαίων και νισίνης εγκλωβισμένης σε νανογαλακτώματα εμφανίζει πιο αποτελεσματική δράση στην καταστροφή της μεμβράνης του βακτηρίου *S. aureus*, απ' ότι η νισίνη μεμονωμένα (Shi et al., 2017).

Η εφαρμογή της νισίνης έχει προχωρήσει πέρα από το ρόλο της ως φυσικό συντηρητικό των τροφίμων και η μελλοντική μελέτη εστιάζει στις βιοϊατρικές εφαρμογές της, καθώς στοιχεία δείχνουν ότι μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη όγκων, εμφανίζοντας εκλεκτική κυτταροτοξικότητα άμεσα προς τα καρκινικά κύτταρα (Shin et al., 2015). Παρόλα αυτά δεν είναι αποτελεσματική έναντι ζυμών και μυκήτων (Aly et al., 2012).



Εικόνα 1.3: Μηχανισμός δράσης νισίνης στο κύτταρο Gram-θετικού βακτηρίου (Perez et al., 2015).

1.4 ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

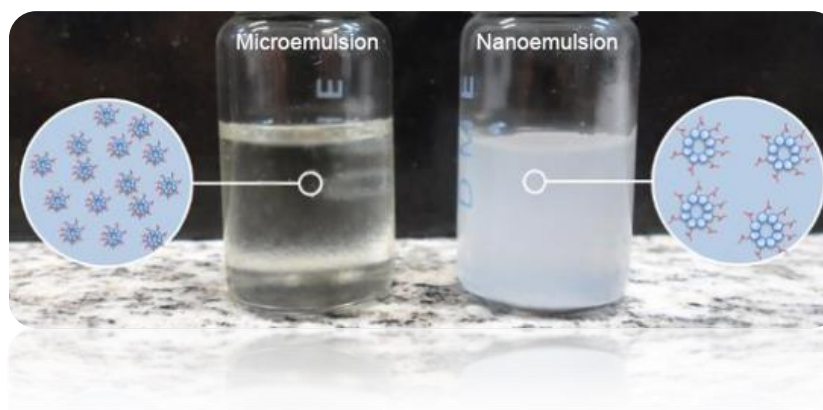
1.4.1 Κατηγορίες Γαλακτωμάτων

Τα γαλακτώματα είναι κολλοειδή συστήματα διασποράς, τα οποία αποτελούνται από δύο μη αναμίξιμα υγρά, έλαιο και νερό συνήθως, όντας το ένα διεσπαρμένο (εσωτερική, ασυνεχής, διεσπαρμένη φάση) μέσα στο άλλο (εξωτερική, συνεχή φάση, μέσο διασποράς), παρουσία επιφανειοενεργών ουσιών. Το μέγεθος των σταγονιδίων ενός τυπικού γαλακτώματος, με βάση την διάμετρό του, κυμαίνεται από 100nm έως 100μm. Τα συστήματα αυτά, δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερά, εξαιτίας της σχετικά μεγάλης διεπιφανειακής τάσης μεταξύ των δύο μη αναμίξιμων υγρών, απαιτώντας έτσι ενέργεια για τον σχηματισμό τους. Τα γαλακτώματα είναι οπτικά αδιαφανή, επειδή τα σταγονίδια έχουν παρόμοιες διαστάσεις με το μήκος κύματος του φωτός και έτσι σκεδάζουν το φως έντονα (Amadei et al., 2014, Leal-Calderon et al., 2007, McClements & Rao, 2011).

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τη μελέτη μιας άλλης κατηγορίας γαλακτωμάτων, τα λεγόμενα «νανογαλακτώματα». Σε αυτού του είδους τα

συστήματα, το μέγεθος της διεσπαρμένης φάσης περιορίζεται σε 100nm με αποτέλεσμα να είναι μακροσκοπικά σχεδόν διαυγή.

Μια τρίτη πολύ σημαντική κατηγορία στον τομέα των κολλοειδών συστημάτων διασποράς αποτελούν τα «μικρογαλακτώματα». Τα συστήματα αυτά έχουν μέγεθος μικρότερο από 100nm και χαρακτηρίζονται από διαφάνεια και θερμοδυναμική σταθερότητα (McClements, 2012).



Εικόνα 1.4: Μικρογαλάκτωμα W/O vs Νανογαλάκτωμα W/O. Διαφορές στο μέγεθος των σταγονιδίων και στην οπτική διαύγεια του συστήματος (Fonseca-Santos et al., 2015).

Υπάρχει μία σύγχυση όσον αφορά στα μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα ως προς τα προθέματα που χρησιμοποιούνται για να υποδηλωθούν αυτές οι ορολογίες. Όπως είναι γνωστό, η πρόθεση "μικρο" αντιστοιχεί σε τάξη μεγέθους 10^{-6} , ενώ ο όρος "νανο" σε 10^{-9} , πράγμα που θα σήμαινε ότι τα νανογαλακτώματα περιέχουν σωματίδια μικρότερα των μικρογαλακτωμάτων. Αλλά στην πραγματικότητα συμβαίνει το αντίθετο (McClements, 2012, Schulman et al., 1959).

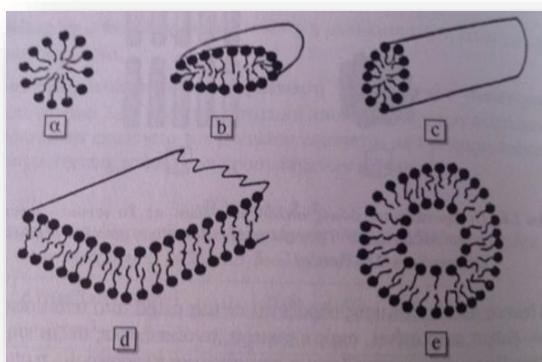
Η σύγχυση στην ορολογία είναι αποτέλεσμα της ιστορικής εξέλιξης στο πεδίο της κολλοειδούς επιστήμης. Ο όρος μικρογαλακτώματα εμφανίστηκε νωρίτερα στον επιστημονικό χώρο και αργότερα που πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός νανογαλακτωμάτων και μικρογαλακτωμάτων με βάση το μέγεθος των σταγονιδίων τους, καθιερώθηκε (παρότι αντίθετο) ως μικρογαλάκτωμα να θεωρείται το σύστημα που περιέχει τα μικρότερα σωματίδια. Άρα, τα σωματίδια σε ένα μικρογαλάκτωμα είναι μικρότερα από αυτά ενός νανογαλακτώματος.

1.4.2 Μικρογαλακτώματα

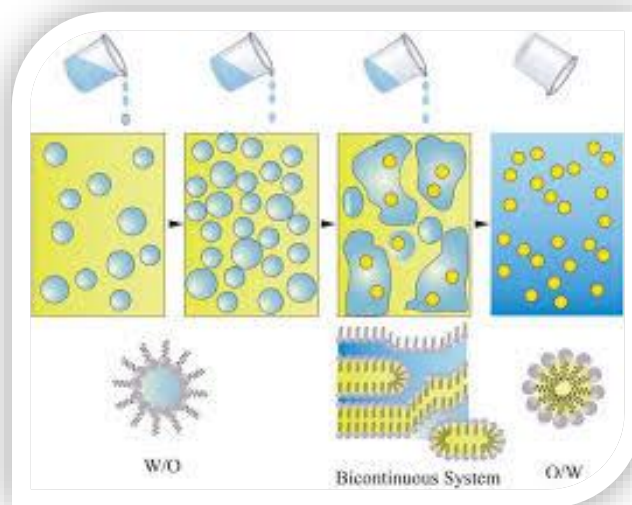
Στη συγκεκριμένη μελέτη ασχοληθήκαμε με τα μικρογαλακτώματα, όπου ως μικρογαλακτώματα θεωρούνται τα συστήματα που αποτελούνται από νερό, έλαιο και κάποιο αμφίφιλο μόριο και είναι οπτικά ισότροπα και θερμοδυναμικά σταθερά (Danielsson and Lindman, 1981).

Μπορούν να σχηματίσουν μία, δύο, τρεις ή περισσότερες ξεχωριστές φάσεις όντας σε ισορροπία η μία με την άλλη. Οι φάσεις αυτές ενδέχεται να είναι συνεχείς σε νερό, συνεχείς σε έλαιο, ή διαφασικές, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις και τη φύση των μορίων που λαμβάνουν μέρος.

Οι δομές στις φάσεις αυτές μπορεί να σφαιρικές (π.χ. μικύλλια ή αντίστροφα μικκύλια), κυλινδρικές (ραβδοειδή μικκύλια ή αντίστροφα ραβδοειδή μικκύλια), επίπεδες (π.χ., ελασματοειδείς/στρωτές δομές), ή όπως το σφουγγάρι (δισυνεχή μικρογαλακτώματα-bicontinuous) (McClements 2012, Lee, 2010, Lawrence & Rees, 2012, Flanagan & Singh, 2006).



Εικόνα 1.6: Τύποι δομών μικρογαλακτωμάτων: a. σφαιρική, b. δισκοειδής, c. κυλινδρική, d. φυλλοειδής (lamellar), e. σφαιρικό κυστίδιο (vesicle) (Παναγιώτου, 1998)



Εικόνα 1.5: Σχηματισμός μικρογαλακτώματος με προσθήκη νερού και οι πιθανές φάσεις του W/O, Bicontinuous, O/W (McClements, 2010).

1.4.3 Ιδιότητες Μικρογαλακτωμάτων

Τα μικρογαλακτώματα, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω είναι μακροσκοπικά ισότροπα συστήματα, ανομοιογενή/ετερογενή σε μοριακό επίπεδο, οπτικά διαφανή και θερμοδυναμικά σταθερά. Χαρακτηρίζονται, συνήθως, από μικρό ιξώδες, χαμηλή διεπιφανειακή τάση, μεγάλη διεπιφανειακή περιοχή καθώς και την ικανότητα να ενισχύουν τη διαλυτοποίηση ειδήλλως/κατεξοχήν μη αναμίξιμων υγρών (Lee, 2010, Papadimitriou et al., 2007).

Λόγω αυτών των μοναδικών ιδιοτήτων διαφέρουν τόσο από τα συμβατικά γαλακτώματα, τα οποία είναι κυρίως θολά και θερμοδυναμικά μη σταθερά, όσο και από τα νανογαλακτώματα, τα οποία παρότι είναι οπτικά διαφανή ή ελαφρώς θολά, είναι μόνο κινητικά σταθερά.

Με αυτά τα χαρακτηριστικά, τα μικρογαλακτώματα θεωρούνται τα πλέον κατάλληλα συστήματα για να λειτουργήσουν ως φορείς ουσιών, οι οποίες είναι εγκλωβισμένες στο εσωτερικό τους και μάλιστα το μικρογαλάκτωμα μπορεί να αυξήσει και τη βιοδραστικότητά τους. Γι' αυτό το λόγο, υπάρχουν πολλές εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων τόσο στον φαρμακευτικό τομέα όσο και στο χώρο των τροφίμων, είτε ως καταναλωτικά προϊόντα καλύτερα και φθηνότερα, είτε χρησιμοποιούνται στις βιομηχανικές διεργασίες για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (McClements 2012, Lee, 2010).

Άλλη μια εξίσου σημαντική ιδιότητα και ταυτόχρονα διαφορά με τις άλλες κατηγορίες γαλακτωμάτων, αφορά στην παρασκευή τους και είναι ο αυθόρμητος ή με προσφορά χαμηλής ενέργειας σχηματισμός τους (Lee, 2010). Το μέγεθος των σωματιδίων της εσωτερικής διεσπαρμένης φάσης είναι της τάξης των νανομέτρων (nm) και κυμαίνεται μεταξύ 5-100nm (Flanagan & Singh, 2006, Chatzidaki et al., 2015).

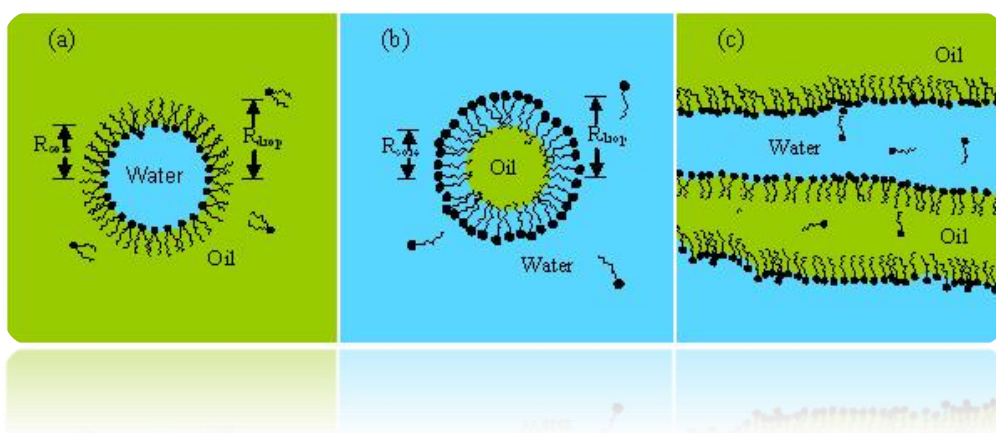
Τα μικρογαλακτώματα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες βάση της αναλογίας των επιμέρους συστατικών τους, οι οποίες είναι:

➤ **Μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο W/O** (water in oil), όπου τα σταγονίδια του νερού που σχηματίζονται, περιβάλλονται από μια μονοστρωματική στοιβάδα των επιφανειοενεργών ουσιών, τα οποία διασπείρονται στην μη πολική, συνεχή φάση του ελαίου. Αυτά τα σταγονίδια ονομάζονται **αντίστροφα μικκύλια** (*reversed micelles*). Είναι ένας τύπος μικρογαλακτώματος πλούσιος σε έλαιο και φτωχός σε νερό. Αυτού του είδους τα μικρογαλακτώματα μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

➤ **Μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό O/W** (oil in water), όπου τα σταγονίδια του ελαίου (διεσπαρμένη, εσωτερική φάση) διασπείρονται στην υδατική φάση (συνεχής, εξωτερική

φάση). Τα επιφανειοενεργά μόρια είναι προσανατολισμένα με τις υδρόφοβες ουρές τους προς την εσωτερική ελαιώδη φάση και την υδρόφιλη κεφαλή τους στην εξωτερική υδατική φάση, σχηματίζοντας το **μικκύλιο (micelle)**. Είναι ένας τύπος μικρογαλακτώματος πλούσιος σε νερό αλλά φτωχός σε έλαιο.

➤ **Διφασικά-Δισυνεχή μικρογαλακτώματα (Bicontinuous).** Η τελευταία περίπτωση μικρογαλακτωμάτων αποτελείται από συγκρίσιμες ποσότητες νερού και ελαίου. Η δομή τους δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και υποστηρίζεται ότι στη φάση αυτή συνυπάρχουν και τα δύο παραπάνω είδη μικρογαλακτωμάτων (Kalaitzaki et al., 2013, Flanagan & Singh, 2006).



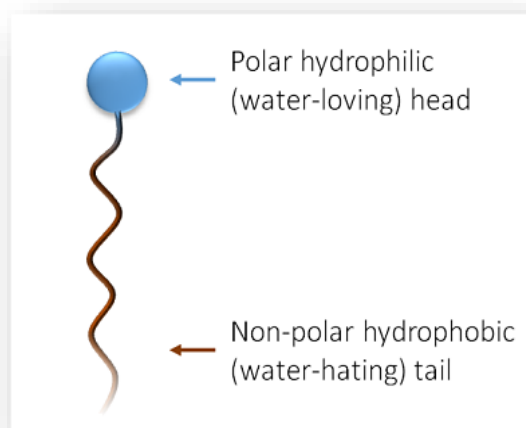
Εικόνα 1.7: Κατηγορίες μικρογαλακτωμάτων, συστήματα τύπου a) W/O, b) O/W και c) Bicontinuous (Διφασικά-Δισυνεχή).

1.4.4 Επιφανειοενεργές ουσίες

Εφόσον νερό και έλαιο είναι δυο μη αναμίξιμα υγρά, χρειάζεται μια ουσία, η οποία να μπορεί να “αναμίξει” αυτά τα δυο υγρά, για να διεκπερωθεί ο σχηματισμός του μικρογαλακτώματος και να παραμείνει σε σταθερή κατάσταση το σύστημα. Τέτοιες ουσίες είναι οι επιφανειοενεργές, οι οποίες είναι αμφίφιλες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη διαμόρφωση/παρασκευή όσο και στη σταθεροποίηση του γαλακτώματος, καθώς μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ ελαίου και νερού (Flanagan & Singh, 2006).

Ο Shulman και οι συνεργάτες του πρότειναν πως κινούσα δύναμη για την αυθόρμητη δημιουργία των μικρογαλακτωμάτων είναι η ύπαρξη μιας μεταβατικής αρνητικής διεπιφανειακής τάσης μεταξύ της ελαιώδους και της υδατικής φάσης. Αυτή η αρνητική διεπιφανειακή τάση είναι ένα μεταβατικό φαινόμενο (ασταθής μεσεπιφάνεια), η οποία διευκολύνει την ταχεία μεταφορά της μιας από τις δύο φάσεις, μέσω της διεπιφάνειας. Η

μεσεπιφάνεια λοιπόν, αυξάνεται ώσπου η διεπιφανειακή τάση να αποκτήσει μια μικρή θετική τιμή, παράγοντας έτσι, το άριστο μέγεθος σταγονιδίων για το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος για τη δεδομένη σύσταση. Στην ισορροπία, η διεπιφανειακή τάση θα πρέπει να είναι μηδενική ή ελάχιστα θετική, αλλιώς οι δυο φάσεις θα ήταν πλήρως αναμίξιμες (Παναγιώτου, 1998).



Εικόνα 1.8: Μόριο επιφανειοενεργούς ουσίας (surfactant) (University of Bristol, Chemistry).

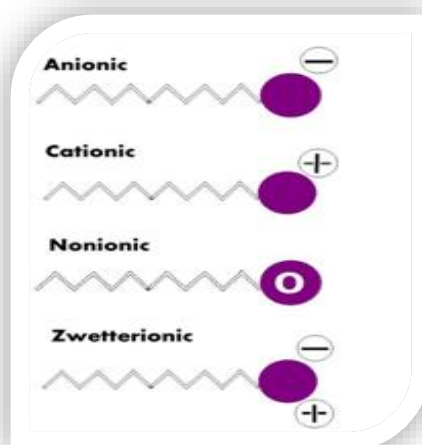
Οι επιφανειοενεργές ουσίες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι αμφίφιλα μόρια στα οποία είναι διακριτά τόσο πολικά (υδρόφιλα) τμήματα όσο και μη πολικά (υδρόφοβα) μέρη. Αποτελούνται από μια υδρόφιλη κεφαλή, συνήθως η πολική ομάδα -COOH ή -OH, η οποία στο μικρογαλάκτωμα προσανατολίζεται προς την υδατική φάση, και μια υδρόφοβη ουρά (λιπόφιλη), το

υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου, η οποία προσανατολίζεται προς την ελαιώδη φάση.

Οργανικές ουσίες όπως οι αλκοόλες είναι διαλυτές τόσο στο νερό όσο και σε ελαιώδεις διαλύτες, καθώς αποτελούν επιφανειοενεργές ουσίες, όπως επίσης, φυσικά μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, το άμυλο αλλά και συνθετικά όπως πολύ(βινυλικές) αλκοόλες (Παναγιώτου, 1998).

1.4.5 Φύση και Ρόλος επιφανειοενεργών ουσιών

Οι επιφανειοενεργές ουσίες ταξινομούνται ανάλογα με τη φύση τους σε ιοντικές, μη-ιοντικές και διπολικού ιόντος ή επαμφοτερίζουσες. Οι μη ιοντικές ουσίες εμφανίζουν συνήθως χαμηλά επίπεδα τοξικότητας (Benichou et al., 2001, Fanum et al., 2011) και είναι ουσίες όπως οι εστέρες (Glatter et al., 2001) και τα μονο- και δι- γλυκερίδια λιπαρών οξέων (DMG) (Gulik-Krzywicki & Larsson, 1984).



Εικόνα 1.9: Φύση επιφανειοενεργών ουσιών, ιοντικές (ανιονικές, κατιονικές), μη ιοντικές και επαμφοτερίζουσες (Sharma, 2014).

Τα προσροφημένα επιφανειοενεργά μόρια στη διεπιφάνεια ελαίου - νερού δρουν προστατευτικά με τους εξής τρόπους: 1. Μειώνουν τη διεπιφανειακή ενέργεια του συστήματος, 2. Δημιουργούν ένα ανθεκτικό, πολύ ιξώδες φράγμα στη διεπιφάνεια, το οποίο εμποδίζει τη συνένωση κατά τη σύγκρουση των σταγόνων και 3. Τα ιοντικά επιφανειοενεργά μόρια προσδίδουν ένα φορτίο στη διεπιφάνεια οπότε τα σταγονίδια, ως ομώνυμα φορτισμένα απωθούνται, ενισχύοντας έτσι τη σταθερότητά τους (Παναγιώτου, 1998).

1.4.6 Υδρόφιλη – Λιπόφιλη συζυγία **HLB** (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*)

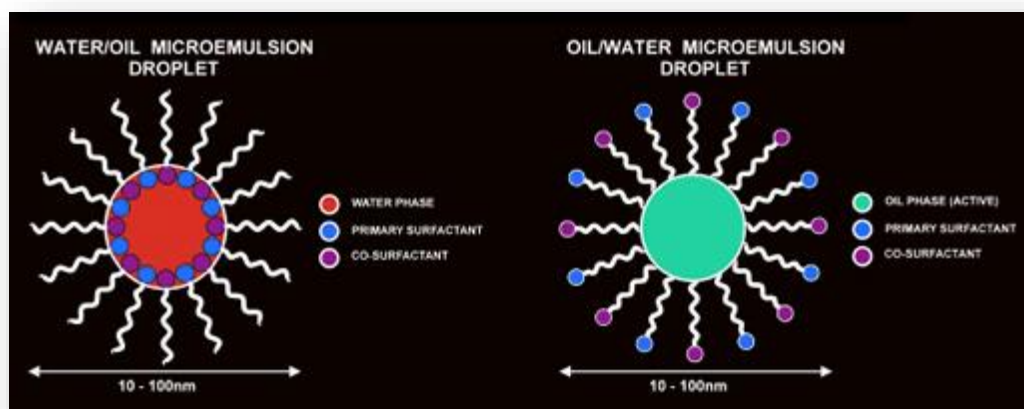
Για την επιλογή της κατάλληλης επιφανειοενεργής ουσίας για τη δημιουργία του μικρογαλακτώματος χρησιμοποιείται η εμπειρική παράμετρος **HLB** (Hydrophilic-Lipophilic Balance), υδρόφιλη-λιπόφιλη συζυγία όπως ονομάζεται, η οποία εκφράζει τον λόγο υδροφιλικών-λιποφιλικών ομάδων, χαρακτηρίζει τα επιφανειοενεργά και αποτελεί έναν παράγοντα πρόβλεψης του τρόπου δράσης τους. Ο Griffin όρισε μια κλίμακα με τιμές από 0 έως 20 για το HLB. Στις ανώτερες τιμές τοποθετούνται τα πολύ υδρόφιλα μόρια επιφανειοενεργών κατάλληλα για το σχηματισμό γαλακτωμάτων του τύπου O/W, ενώ στις κατώτερες τα πολύ υδρόφοβα επιφανειοδραστικά, κατάλληλα για τη σταθεροποίηση W/O γαλακτωμάτων (Griffin, 1949).

Η παρουσία επιφανειοενεργών μπορεί να προκαλέσει μικρή μείωση της διεπιφανειακής τάσης, από 10^{-2} έως 10^{-4} mN/m (Lawrence & Rees, 2012). Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι επιφανειοενεργές ουσίες δεν είναι σε θέση να μειώσουν τη διεπιφανειακή τάση σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματιστούν τα μικρογαλακτώματα. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται και κάποιες άλλες ουσίες τα συνεπιφανειοενεργά.

1.4.7 Συνεπιφανειοενεργές ουσίες

Για τη δημιουργία μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιούνται συνήθως εκτός από τα επιφανειοενεργά, βοηθητικά μόρια, τα οποία ονομάζονται συνεπιφανειοενεργές ουσίες (co-surfactants). Η χρήση τους δεν καθίσταται πάντα απαραίτητη για τη δημιουργία μικρογαλακτώματος. Τέτοιες ουσίες είναι οι κατώτερες αλκοόλες και αμίνες (4-8 άτομα άνθρακα) ή πολυόλες με μικρό μήκος αλυσίδας. Ο ρόλος τους είναι σύνθετος αλλά καθοριστικός, καθώς μειώνουν την επιφανειακή τάση και αυξάνουν τη ρευστότητα της διεπιφάνειας ελαίου-νερού, καθώς και την εντροπία του συστήματος (Lee, 2010). Επίσης, λόγω της διεϊσδυσης των μορίων στη διεπιφάνεια, αυξάνεται και η ελαστικότητα της μεμβράνης

(Flanagan & Singh, 2006). Ως αποτέλεσμα όλων αυτών διευκολύνεται ο σχηματισμός του μικρογαλακτώματος και η σταθεροποίηση του συστήματος (Lee, 2010).



Εικόνα 1.10: Απεικόνιση σταγονιδίου μικρογαλακτώματος W/O και μικρογαλακτώματος O/W με τις επιφανειοενεργές (μπλε χρώμα) και συνεπιφανειοενεργές ουσίες (μωβ χρώμα). Οι υδρόφιλες κεφαλές είναι στραμμένες προς την υδατική φάση (κόκκινο χρώμα) του συστήματος W/O ενώ στο σύστημα O/W, οι λιπόφιλες ουρές προσανατολίζονται προς την ελαιώδη περιοχή (πράσινο χρώμα) Constantinides et al., 1997).

Κάποιες επιφανειοενεργές και συνεπιφανειοενεργές ουσίες εμφανίζουν τοξικότητα, επομένως πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή τους όταν χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα με μικροοργανισμούς σε φαρμακευτικές εφαρμογές και κυρίως στον τομέα των τροφίμων (Παναγιώτου, 1998). Για τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, δεν υπάρχουν περιορισμοί καθώς είναι όλες ασφαλείς για κατανάλωση.

1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ

1.5.1 Μικρογαλακτώματα και βιοδιαθεσιμότητα

Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών όσον αφορά στη χρήση κολλοειδών συστημάτων για τον εγκλωβισμό λειτουργικών παραγόντων, όπως βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, αρώματα, χρώματα, αντιμικροβιακές ενώσεις, ιχνοστοιχεία, και (φαρμακευτικά) προϊόντα διατροφής (McClements & Rao, 2011). Πολλά όμως, από αυτά τα συστατικά είναι ασταθή όταν υποβάλλονται σε φυσικές ή χημικές διεργασίες και η

ενσωμάτωσή τους μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστες οργανοληπτικές ιδιότητες, σε περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα (Chatzidaki et al., 2016), ή ακόμα και κακή διαλυτότητα αυτών των βιοδραστικών ενώσεων μέσα στο ανθρώπινο σώμα (Chatzidaki et al., 2015).

Τα μικρογαλακτώματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως συστήματα εγκλωβισμού, μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης βιοδραστικών ουσιών καθώς εμφανίζουν κάποια ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από τα άλλα κολλοειδή συστήματα. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες περιλαμβάνουν μέγεθος στη νανοκλίμακα, διαφάνεια, χαμηλό ιξώδες, θερμική και θερμοδυναμική σταθερότητα σε μία ευρεία περιοχή pH και ιοντικού περιβάλλοντος (Kogan et al., 2009). Επίσης, μπορούν να παρασκευαστούν σε μεγάλους όγκους (Lee, 2010), εύκολα, από συστατικά τροφίμων (McClements & Rao, 2011). Λόγω του ότι παραμένουν σταθερά και διαφανή για μεγάλα χρονικά διαστήματα, δεν διακυβεύεται η εμφάνισή τους και μπορούν να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις των καταναλωτών (Amadei et al., 2014). Τέλος, λόγω της ικανότητας τους για υψηλή διαλυτοποίηση υδρόφιλων, υδρόφοβων και αμφίφιλων δραστικών μορίων, τα βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα μικρογαλακτώματα βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, αγροχημικών, φαρμάκων και φαρμακευτικών προϊόντων (Papadimitriou et al., 2007, McClements, 2012).

Δεν είναι τυχαίο ότι κατά την τελευταία δεκαετία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία διάφορα σκευάσματα για στοματική, διαδερμική, οφθαλμική και παρεντερική χορήγηση φαρμάκων, τα οποία βασίζονται στην εφαρμογή μικρογαλακτωμάτων (Fanum et al., 2011). Έτσι, θεωρούνται ένα από τα πιο αποτελεσματικά υλικά για τη βελτίωση της στοματικής βιοδιαθεσιμότητας και βιολογικής αποτελεσματικότητας των λιπόφιλων φαρμάκων (Shah et al., 2010). Επίσης, πολλές ενζυμικές και βιο-καταλυτικές εφαρμογές προτείνουν μικρογαλακτώματα τύπου W/O, λόγω της ικανότητας τους να ενσωματώνουν το ένζυμο μέσα στον υδρόφιλο πυρήνα ενώ απελευθερώνουν προϊόντα διαφορετικών πολικιοτήτων στη συνεχή φάση (Stamatis et al., 1999, Zoumpantioti et al., 2006). Η καταλληλότητά τους λοιπόν, για τις παραπάνω χρήσεις, βασίζεται και στο ότι μπορούν να εξασφαλίσουν την προστασία της εγκλωβισμένης ουσίας από το περιβαλλοντικό στρες (π.χ. pH, οξυγόνο, και αποικοδόμηση από ένζυμα) (Amadei et al., 2014) και την επιτυχημένη μεταφορά της και χορήγηση/απελευθέρωση στο προϊόν-στόχο. Ταυτόχρονα ενισχύουν /μεγιστοποιούν τη διαλυτότητα της και βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητά της (Flanagan & Singh, 2006, Fanum et al., 2011).

1.5.2 Μικρογαλακτώματα και τρόφιμα

Μέχρι στιγμής, οι περισσότερες μελέτες κι εφαρμογές σχετικά με μικρογαλακτώματα τροφίμων έχουν επικεντρωθεί σε συστήματα τύπου O/W προκειμένου να μεγιστοποιηθούν τα ευεργετικά οφέλη των λιπόφιλων συστατικών που εμφανίζουν περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό, μέσα σε προϊόντα διατροφής.

Οι βιομηχανίες τροφίμων ωστόσο, βρίσκουν ελκυστικά τα διάφορα μικρογαλακτώματα τύπου W/O ως μέσα εγκλωβισμού υδρόφιλων ουσιών όπως βιταμίνες, μέταλλα, αντιοξειδωτικά, μικρά πεπτίδια, πρωτεΐνες κ.α (Amadei et al., 2014). Κύριος στόχος σε αυτόν τον τομέα έρευνας (των τροφίμων) είναι η εισαγωγή νέων φορέων, όπως τα μικρογαλακτώματα, που θα λειτουργήσουν ως δεξαμενές και οχήματα για ενώσεις φυσικής προέλευσης (nutraceuticals). Επίσης, επιθυμητό αποτέλεσμα αποτελεί και η πρακτική εφαρμογή αυτών των συστημάτων στα λειτουργικά τρόφιμα, τα οποία θα έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου (πέραν της διατροφικής τους αξίας, όταν καταναλώνονται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις) (Chatzidaki et al., 2015). Το 1994, το Ιατρικό Ινστιτούτο Τροφίμων και Διατροφής (IOM/FNB, 1994) όρισε ως **λειτουργικό τρόφιμο** «κάθε τρόφιμο ή συστατικό τροφίμων που μπορεί να παρέχει ένα όφελος για την υγεία πέρα από τα παραδοσιακά θρεπτικά συστατικά που περιέχει».

Το δύσκολο μέρος στην εφαρμογή μικρογαλακτωμάτων στα τρόφιμα, αφορά στη χρήση των κατάλληλων συστατικών κατά την παρασκευή τους, καθώς υπάρχουν περιορισμοί στην επιλογή κυρίως των επιφανειοενεργών και συνεπιφανειοενεργών ουσιών, λόγω πιθανής τοξικότητάς τους. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται συστατικά φιλικά προς το περιβάλλον, τα οποία έχουν αναγνωριστεί ως **GRAS (Generally Recognized As Safe)**, ασφαλείς επιφανειοενεργές ουσίες όπως μονο- και δι- γλυκερίδια και εστέρες αυτών, φωσφολιπίδια, εστέρες σορβιτόλης, αλκοόλες μικρού μήκους ανθρακικής αλυσίδας ως συνεπιφανειοενεργές ουσίες, καθόλου (ή ελάχιστης/επιτρεπόμενης) τοξικότητας και τριγλυκερίδια μέσης (MCT, *medium-chain triglycerides*) ή μακράς αλυσίδας (LCT, *long-chain triglycerides*), εστέρες λιπαρών οξέων, βρώσιμα έλαια και αιθέρια έλαια (Chatzidaki et al., 2016).

Στη συγκεκριμένη εργασία αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν βιοσυμβατά μικρογαλακτώματα τύπου W/O, παρασκευασμένα από GRAS συστατικά, όπως βρώσιμα έλαια, τριγλυκερίδια μακράς αλυσίδας (LCT) και αιθέρια έλαια, τα οποία εγκλώβισαν στο εσωτερικό των υδάτινων πυρήνων τους την αντιμικροβιακή πρωτεΐνη νισίνη, προκειμένου να λειτουργήσουν ως φορείς της βιοδραστικής ένωσης στα τρόφιμα που θα εφαρμοστούν.

1.6 ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Παρά τη σχετικά εύκολη παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων, ο δομικός χαρακτηρισμός τους, τόσο σε μακροσκοπικό όσο και σε μικροσκοπικό επίπεδο, παραμένει δύσκολος, δεδομένου ότι η απαιτείται η εφαρμογή πολλών διαφορετικών τεχνικών, οι οποίες δρουν συμπληρωματικά. Παρόλα αυτά, η αναλυτικότερη εκτίμηση της δομής τους, είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των συστημάτων αυτών και την επιτυχή εμπορική εκμετάλλευσή τους (Papadimitriou et al., 2008).

1.6.1. Διάγραμμα Φάσης

Για την απεικόνιση συστημάτων αποτελούμενων από τρία συστατικά σε σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας χρησιμοποιούνται τα τριγωνικά διαγράμματα φάσης. Με τα διαγράμματα φάσης μπορούμε να δούμε τη σχέση μεταξύ της συμπεριφοράς ενός μίγματος και της σύστασής του (Lawrence and Rees, 2012).

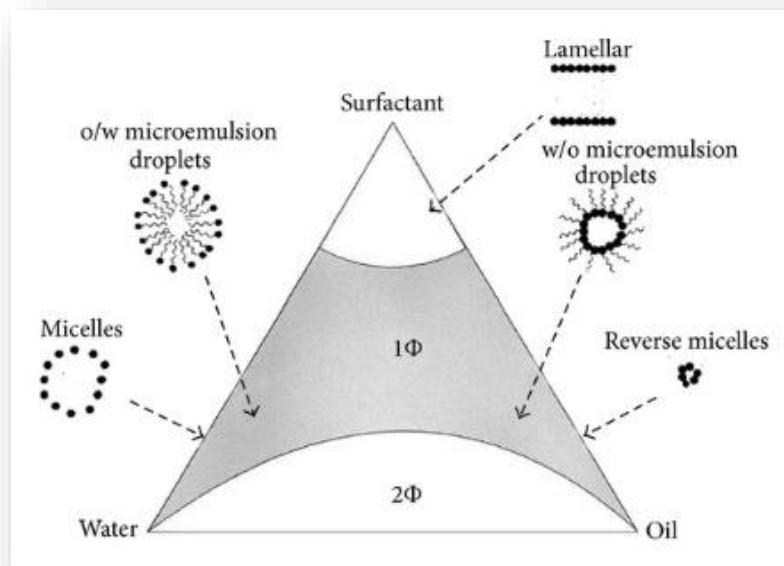
Ένα τυπικό διάγραμμα φάσης συστήματος που αποτελείται από τρία συστατικά αναπαρίσταται από ένα ισόπλευρο τρίγωνο. Κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει το καθαρό συστατικό 100% (κατά βάρος σύσταση), ενώ οι πλευρές του τριγώνου αντιπροσωπεύουν μίγματα δύο συστατικών σταθερής αναλογίας. Κάθε σημείο στο εσωτερικό του τριγώνου αποτελεί μίγμα τριών συστατικών (νερό, έλαιο, επιφανειοενεργό) σταθερής συγκέντρωσης. Το τρίγωνο διαιρείται σε μικρότερα ισόπλευρα τρίγωνα με ευθύγραμμα τμήματα παράλληλα προς τις πλευρές του. Στο εσωτερικό του τριγώνου, υπάρχουν και οι γραμμές τιτλοδότησης, οι οποίες εκφράζουν τη μεταβολή που προκαλείται όταν τα δύο από τα τρία συστατικά παραμένουν σταθερά, ενώ το τρίτο αλλάζει (Παναγιώτου, 1998).

Με τη βοήθεια του τριγωνικού διαγράμματος είναι δυνατόν να παρατηρηθεί η μετάβαση από τη μονοφασική περιοχή στη πολυφασική περιοχή και να καθοριστούν τα όρια εντός των οποίων υπάρχουν τα μικρογαλακτώματα (Lawrence, 2000). Η πορεία κατασκευής του αρχίζει με το σχηματισμό μιγμάτων δύο συστατικών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και ακολουθεί η ογκομέτρηση με το τρίτο συστατικό σε σταθερή θερμοκρασία (Papadimitriou et al., 2008, Kalaitzaki et al., 2015).

1.6.2 Ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσης

Όταν το σύστημα περιέχει περισσότερα από τρία συστατικά τότε χρησιμοποιούνται τα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσης. Σε αυτή την περίπτωση, κάθε κορυφή του ισόπλευρου

τριγώνου, αντιπροσωπεύει μίγμα δύο ή περισσότερων συστατικών, σταθερής αναλογίας (όπως επιφανειοενεργό/συνεπιφανειοενεργό, διαλύτη/συν-διαλύτη).



Εικόνα 1.11: Δομές και φάσεις που σχηματίζονται σε ένα υποθετικό τριγωνικό διάγραμμα φάσης συστήματος νερού-ελαίου-επιφανειοενεργού (Lawrence and Rees, 2000).

Στα τριγωνικά διαγράμματα, όπως προαναφέρθηκε, απεικονίζονται (πολλές) διαφορετικές περιοχές φάσεων. Στη μονοφασική περιοχή εντοπίζονται τα μικρογαλακτώματα, τύπου είτε W/O είτε O/W, αναλόγως με την περίσσεια ελαίου ή νερού. Κοντά στον άξονα ελαίου/επιφανειοενεργού σχηματίζονται τα **αντίστροφα μικκύλια** και αντίστοιχα κοντά στον άξονα νερού/επιφανειοενεργού σχηματίζονται τα μικκύλια. Για τα μίγματα στον άξονα νερού/ελαίου, λόγω μη επαρκούς ποσότητας επιφανειοενεργού παρατηρείται/συμβαίνει διαχωρισμός φάσεων. Τα δισυνεχή-μικρογαλακτώματα (διφασικά συστήματα) βρίσκονται στην μονοφασική περιοχή, ή καλύτερα στα όρια της μονοφασικής περιοχής με την πολυφασική (2φ), κατά μήκος της καμπύλης γραμμής ελαιόδου και υδατικής φάσης. Η πολυφασική περιοχή (2φ) περιέχει άλλα είδη δομών, όπως πηκτές (gel), κρυστάλλους κ.α. (Flanagan & Singh, 2006).

Μέσω του τριγωνικού ή ψευδοτριγωνικού διαγράμματος φάσης, μελετάται η δομή συστήματος τριών ή περισσότερων συστατικών και επιτυγχάνεται η επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης αυτών, προκειμένου να παρασκευαστούν τα επιθυμητά μικρογαλακτώματα. (Παναγιώτου, 1998). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως ως εργαλείο σε πολλές μελέτες

σχετικά με αγροχημικά (Kalaitzaki et al., 2015), με φαρμακευτικές εφαρμογές (Constantinides, 1995) κι εφαρμογές με τρόφιμα (Garti, 2003), όπου τα μικρογαλακτώματα αποτελούν συστήματα υπό διερεύνηση.

Για το δομικό χαρακτηρισμό των μικρογαλακτωμάτων, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές όπως η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (*DLS, Dynamic Light Scattering*), ο Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός (*EPR, Electron Paramagnetic Resonance*) (Kalaitzaki et al., 2015), η σκέδαση ακτινών-X σε μικρές γωνίες (*SAXS, Small Angle X-ray Scattering*) (Yagmur et al., 2004), ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (*NMR, Nuclear Magnetic Resonance*), (Tzika et al., 2011) και η CRYO-TEM (*Cryogenic Temperature Transmission Electron Microscopy*), (Chatzidaki et al., 2015). Τέλος, υπάρχουν και οι τεχνικές που βασίζονται στη μέτρηση ιδιοτήτων μεταφοράς, όπως η αγωγιμότητα και το ιξώδες (Papadimitriou et al., 2008).

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος *DLS*, η οποία έχει καθιερωθεί για τη μελέτη αυτοοργανωμένων συστημάτων όπως τα μικρογαλακτώματα, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος και την κατανομή των μεγεθών των σταγονιδίων νερού, που αποτελούν τη διεσπαρμένη φάση. (Papadimitriou et al., 2008). Η άλλη είναι η μέθοδος *EPR*, χρησιμοποιώντας την τεχνική spin probing, η οποία παρέχει πληροφορίες για τη μονοστιβάδα των επιφανειοενεργών και τις ιδιότητές της (Kalaitzaki et al., 2015).

1.6.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός – *DLS (Dynamic Light Scattering)*

Η δυναμική σκέδαση φωτός (*Dynamic Light Scattering*) είναι μια φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως σε κolloειδή συστήματα όπως τα μικρογαλακτώματα για τον προσδιορισμό του μεγέθους των διεσπαρμένων σωματιδίων και την πολυδιασπορά αυτών. Η τεχνική αυτή ονομάζεται επίσης και Photon Correlation Spectroscopy (PCS), καθώς και Quasi-Elastic Light Scattering (QELS). Ο τελευταίος όρος συναντάται κατά κύριο λόγο στην παλαιότερη βιβλιογραφία.

Πιο αναλυτικά, η μέθοδος *DLS* μέτρα σωματίδια μικρότερα σε μέγεθος από το μήκος κύματος του φωτός, λαμβάνοντας υπόψη ότι υποβάλλονται/υπόκεινται σε κίνηση Brown. Όταν μια μονοχρωματική δέσμη προσκρούει σε ένα δείγμα, κάθε σωματίδιο δρα ως δευτερεύουσα πηγή λόγω/εξαιτίας της σκέδασης της ακτινοβολίας, με τα μεγαλύτερα σωματίδια να σκεδάζουν περισσότερο σε σχέση με τα μικρότερα. Ο ανιχνευτής καταγράφει τις τυχαίες διακυμάνσεις της έντασης της ακτινοβολίας στο χρόνο, λόγω των σχετικών αλλαγών θέσεων των σωματιδίων. Ο χρόνος διακύμανσης της έντασης εξαρτάται από το συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων. Τα μεγαλύτερα σωματίδια διαχέονται πιο αργά συγκριτικά με τα μικρότερα.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων πραγματοποιείται με τον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας R_h των σωματιδίων, μέσω της εξίσωσης Stokes-Einstein:

$$D = k_B T / (6\pi\eta R_h)$$

Όπου, **D**: ο συντελεστής διάχυσης
 k_B : η σταθερά Boltzman
T: η απόλυτη θερμοκρασία
 η : το ιξώδες του μικρογαλακτώματος
 R_h : η υδροδυναμική ακτίνα

Στη συγκεκριμένη μέθοδο η ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων έγινε με βάση το λογισμικό της Malvern Zetasizer Nano που είναι κατάλληλο για σωματίδια που είναι σφαίρες και έχουν χαμηλή πολυδιασπορά. Στην περίπτωση όπου τα σωματίδια δεν είναι σφαιρικά, ως R_h θεωρείται η φαινομενική/φαινόμενη υδροδυναμική ακτίνα ή ισοδύναμη ακτίνα σφαίρας (Hassan et al., 2014).

1.6.4 Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός - EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*)

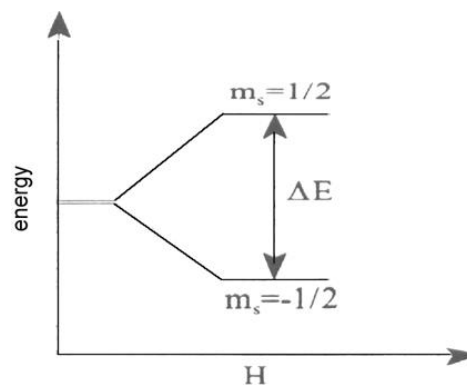
Ο ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός είναι μια φασματοσκοπική μέθοδος κατά την οποία ακτινοβολία μικροκυματικής συχνότητας απορροφάται από μόρια τα οποία περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το φαινόμενο οφείλεται σε συντονισμό spin ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Μέσω της τεχνικής EPR είναι εφικτή η μέτρηση της ενέργειας του διαχωρισμού (splitting) ασύζευκτων ηλεκτρονίων, όταν υποβάλλονται σε μαγνητικό πεδίο. Αυτή η τεχνική αναφέρεται και ως συντονισμός στροφορμής ηλεκτρονίου (*Electron Spin Resonance, ESR*) και θεωρείται κατάλληλη για τη μελέτη της δομής, της μοριακής κινητικότητας και της μικροπολικότητας των φυσικοχημικών (Di Meglio et al., 1985, Σκούτας et al., 2001, Avramiotis et al., 2007) και των βιολογικών συστημάτων (Belle et al., 2008), καθώς και για τη μελέτη ενζύμων, εγκλωβισμένων σε αντίστροφα μικκύλια (Xenakis & Cazianis, 1988, Avramiotis et al., 1999).

Πιο αναλυτικά, 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 παραμαγνητισμό 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 (Δεληγιαννάκης).

Απουσία μαγνητικού πεδίου, ένα ηλεκτρόνιο έχει spin $m_s = \pm 1/2$. Παρουσία μαγνητικού πεδίου αυτή η ενεργητική κατάσταση αναλύεται σε μια κατώτερη ενεργειακή κατάσταση, όπου η μαγνητική ροπή προσανατολίζεται παράλληλα με το πεδίο και αντιστοιχεί σε $m_s = -1/2$ και μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση, όπου η μαγνητική ροπή είναι προσανατολισμένη αντιπαράλληλα, με spin με $m_s = 1/2$.



Εικόνα 1.12: Απόκλιση του $\pm 1/2$ επιπέδου ενός ηλεκτρονίου με την παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Στην φασματοσκοπία EPR, η μετάβαση μεταξύ δύο διαφορετικών ενεργειακών επιπέδων λαμβάνει χώρα μετά την απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, στην περιοχή μικροκυμάτων. Για να ληφθεί η απορρόφηση, η κατάσταση συντονισμού είναι:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H_0$$

όπου, ΔE είναι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων, h η σταθερά του Planck, ν η συχνότητα της ακτινοβολίας, β η σταθερά Bohr, H_0 η ένταση του μαγνητικού πεδίου και g είναι μια αδιάστατη μαγνητική ροπή ή παράγοντας/συντελεστής διαχωρισμού/διάσπασης. Για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο είναι $g=2.0023$ ενώ για μεταλλικά ιόντα ο λεγόμενος g παράγοντας θα μπορούσε να είναι διαφορετικός (Carrington & McLachlan, 1967).

Τα φάσματα EPR, λαμβάνονται σε μία σταθερή συχνότητα του πεδίου μικροκυμάτων και το κύριο μαγνητικό πεδίο μεταβάλλεται έως ότου η συνθήκη συντονισμού ικανοποιείται.

Για τη μελέτη της μεσεπιφάνειας/διεπιφάνειας των μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιείται ένα μόριο-ιχνηθέτης (spin probe), στη συγκεκριμένη περίπτωση το αμφίφιλο

μόριο 5-doxyl stearic acid (5-DSA), το οποίο ως λιπαρό οξύ, έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τα μόρια των επιφανειοενεργών ουσιών, καθώς ευθυγραμμίζεται με αυτά. Τα φάσματα EPR του ιχνηθέτη, ο οποίος βρίσκεται στη διεπιφάνεια, δίνουν πληροφορίες για την κινητικότητα του και την ακαμψία του περιβάλλοντός του (ελαστικότητα μεμβράνης/διεπιφάνειας). Η *κινητικότητα του μορίου* εκφράζεται με την παράμετρο τ_R (*rotational correlation time*) ενώ η *ελαστικότητα της μεμβράνης* εκφράζεται με την παράμετρο S .

Συγκεκριμένα, η παράμετρος τ_R είναι ο χρόνος, ο οποίος απαιτείται για το μόριο του ιχνηθέτη να πραγματοποιήσει μια περιστροφή γύρω από τον εαυτό του. Η μονάδα μέτρησής του είναι τα **nanoseconds**. Ο παράγοντας S αποτελεί ένα μέτρο για την ελαστικότητα της μεμβράνης και κυμαίνεται σε τιμές μεταξύ 0 και 1 , με το 0 να εκφράζει την τυχαία κατάσταση ενώ το 1 την απόλυτα διευθετημένη κατάσταση. Ο χρόνος τ_R υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\tau_R = (6 \times 10^{-10}) * [(h_0/h_{+1})^{1/2} + (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] * \Delta H_0$$

όπου ΔH_0 είναι το πλάτος (mT) της κεντρικής κορυφής και h_{+1} , h_0 , και h_{-1} είναι τα ύψη των κορυφών από το χαμηλό στο υψηλό πεδίο, αντίστοιχα.

Η εξίσωση εφαρμόζεται στην περιοχή '*γρήγορης κίνησης*', δηλαδή για χρόνους στην περιοχή $10^{-11} < \tau_R < 3 \times 10^{-9} s$ (Kommareddi et al., 1994). Για χρόνους μεγαλύτερους από $\tau_R > 3 \times 10^{-9} s$, τα αποτελέσματα υπάγονται στην περιοχή '*αργής κίνησης*' και οι υπολογισμοί γίνονται είτε με βάση θεωρητικά διαγράμματα είτε με υπολογιστικά μοντέλα προσομοίωσης.

Από τα χαρακτηριστικά του φάσματος υπολογίζονται και οι παράμετροι S και η ιστροπική υπέρλεπτη σταθερά διάσπασης, a_0 . Η παράμετρος S ορίζεται ως:

$$S = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / [A_{ZZ} - (1/2) * (A_{XX} + A_{YY})] * (a_0/a_0') \text{ ή } k$$

όπου A_{\parallel} αντιστοιχεί στο ήμισυ της απόστασης της εξωτερικής μέγιστης υπέρλεπτης διάσπασης ($2A_{\max}$), και το A_{\perp} υπολογίζεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4 * (1 - S^{\text{app}})$$

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

όπου A_{min} είναι ίσο με το ήμισυ της απόστασης της εσωτερικής ελάχιστης υπέρλεπτης διάσπασης. Το a_0 είναι η ιστροπική υπέρλεπτη σταθερά διάσπασης για το μόριο νιτροξειδίου στην κρυσταλλική κατάσταση και a_0' είναι η ιστροπική υπέρλεπτη σταθερά διάσπασης για τον ιχνηθέτη (spin probe) στη μεμβράνη:

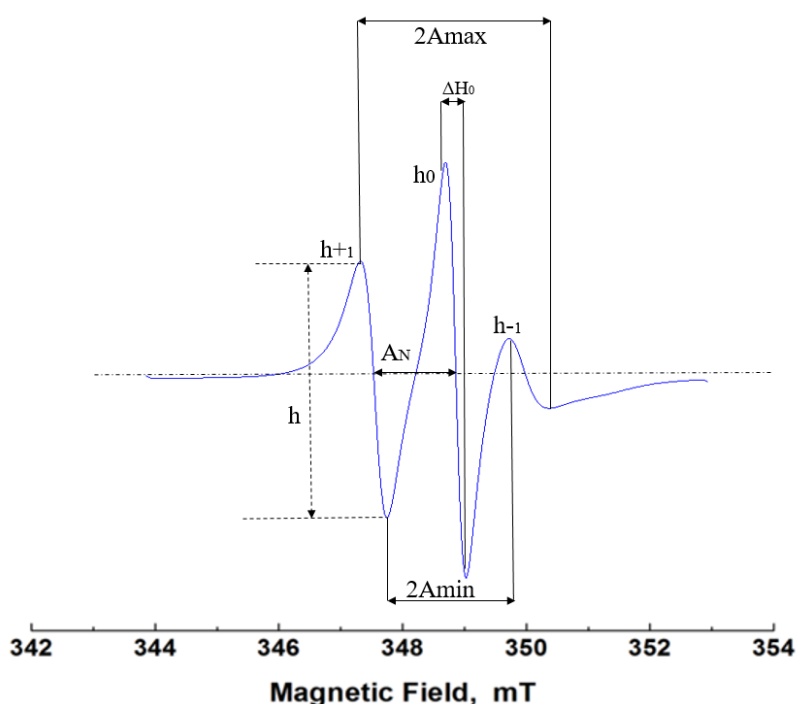
$$a_0 = (A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ}) / 3$$

$$a_0' = (A_{\parallel} + 2A_{\perp})/3$$

Οι τιμές a_0' είναι ευαίσθητες στην πολικότητα του περιβάλλοντος του ιχνηθέτη και αυξάνονται όταν η πολικότητα του μέσου αυξάνεται.

Οι τιμές A_{XX} , A_{YY} και A_{ZZ} είναι οι τιμές του ιχνηθέτη 5-DSA στην κρυσταλλική μορφή και ισούνται με $A_{XX}=6.3G$, $A_{YY}=5.8G$, και $A_{ZZ}=33.6G$, αντιστοίχως (Griffith & Jost, 1976).

Ο λόγος των υπέρλεπτων σταθερών σύζευξης του 5-DSA σε κρυσταλλική μορφή (a_0) και στη μεσεπιφάνεια (a_0'), αναφέρεται αλλιώς ως συντελεστής $k=a_0/a_0'$ και εκφράζει τον παράγοντα διόρθωσης πολικότητας.



Εικόνα 1.13: Ενδεικτική εικόνα φάσματος EPR. Το μαγνητικό πεδίο μετριέται σε mT, ενώ απεικονίζονται τα ύψη των κορυφών $h+1$, h_0 και $h-1$, από το χαμηλό στο υψηλό πεδίο, αντίστοιχα, το πλάτος της κεντρικής κορυφής ΔH_0 , η απόσταση της εξωτερικής μέγιστης υπέρλεπτης διάσπασης $2A_{max}$ και της εσωτερικής ελάχιστης $2A_{min}$.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η βελτιστοποίηση βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων τύπου W/O με την προσθήκη αιθέριων ελαίων. Τα συστήματα αυτά μελετήθηκαν ως προς τον εγκλωβισμό και την αποτελεσματική μεταφορά της αντιμικροβιακής ένωσης νισίνης, καθώς και τον έλεγχο της δράσης τους έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων. Απώτερος στόχος αποτελεί η εφαρμογή αυτών των συστημάτων σε τρόφιμα, ως μέσα αναστολής επικίνδυνων μικροοργανισμών και αύξησης του χρόνου ζωής των τροφίμων, δηλαδή, χρήσης τους ως συντηρητικά τροφίμων.

Η συμπεριφορά των συστημάτων ανάλογα με τη σύσταση περιγράφηκε από τα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα, ενώ η αντιμικροβιακή τους δράση εξετάστηκε με τη μέθοδο Well Diffusion Assay. Ο χαρακτηρισμός της δομής τους πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους/τεχνικές Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός (DLS) και Φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1.1 Αντιδραστήρια για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων αναφέρονται συγκεντρωτικά παρακάτω:

Αιθέρια Έλαια

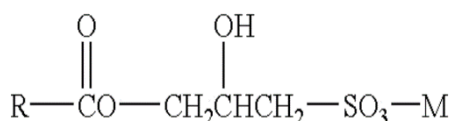
- ❖ **Δεντρολίβανο:** *Rosmarinus officinalis* (1,8 cineol) της εταιρείας PRANAROM INTERNATIONAL, Avenue des Artisans, 37-B-7822 Ghislenghien.
- ❖ **Θυμάρι:** *Thymus vulgaris* (thymol, p-cymene,) της εταιρείας PRANAROM INTERNATIONAL, Avenue des Artisans, 37-B- 7822 Ghislenghien.
- ❖ **Ρίγανη:** *Origanum vulgare* (carvacrol, thymol) της εταιρείας PRANAROM INTERNATIONAL, Avenue des Artisans, 37-B- 7822 Ghislenghien.

- ❖ **Δίκταμος: *Origanum dictamnus* (carvacrol, p-cymene)** της εταιρίας Bioaroma, Αμμούδα Ξηροκάμπου, Άγιος Νικόλαος Κρήτης

Σημειώνεται ότι όλα τα αιθέρια έλαια είναι βιοχημικά πιστοποιημένα, CT, Ιατρικής κατηγορίας **medical grade** και από το Ινστιτούτο Ελέγχου Βιολογικών Προϊόντων **Bio Hellas**.

Επιφανειοενεργές ουσίες (surfactants)

Μονογλυκερίδια (DMG 0295, Distilled Monoglycerides) της εταιρίας Palsgaard, DK-7130 Juelsminde, Denmark. Το DMG, πρόσθετο τροφίμων με τον κωδικό (E471), προκύπτει από μοριακή απόσταξη των μονογλυκεριδίων, με σκοπό να ενισχυθεί η λειτουργικότητα του μορίου. Η συγκεκριμένη επιφανειοενεργή ένωση επιλέχθηκε στην παρούσα μελέτη για το σχηματισμό μικρογαλακτωμάτων τύπου W/O με βάση την εμπειρική τιμή HLB που κυμαίνεται μεταξύ 3.8-5.3. Ο χημικός τύπος της απεικονίζεται στην Εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Γενικός τύπος απεσταγμένων μονογλυκεριδίων.

Συνεπιφανειοενεργές ουσίες (co-surfactants)

Προπυλενογλυκόλη (PG, Propylene Glycol ή 1,2 προπανοδιόλη, propan-1,2-diol) της εταιρίας Sigma Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim. Σύμφωνα με την EFSA (European Food Safety Authority) και την SCF (Scientific Committee on Food), η προπυλενογλυκόλη είναι ασφαλής για κατανάλωση χωρίς τοξικολογικές δράσεις (EFSA, 2011), με ADI (Acceptable Daily Intakes) που ορίστηκε από την JECFA σε 0-25mg/kg κατά βάρος ανά ημέρα (SCF, 1997). Η προπυλενογλυκόλη σήμερα είναι εγκεκριμένο πρόσθετο τροφίμων με τον κωδικό E1520.

Βιοδραστική ένωση: Νισίνη

Η **νισίνη** ή αλλιώς **E234** (Cotter et al., 2005) όπως είναι ευρέως γνωστή στο χώρο των τροφίμων, εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση και είναι η ενεργή ένωση που εγκλωβίστηκε στα μικρογαλακτώματα και απελευθερώθηκε υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η νισίνη που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν της εταιρίας Sigma-Aldrich και χρειάστηκε πρώτα η διαλυτοποίησή της σε υπερκάθαρο νερό, σύμφωνα με το αντίστοιχο Πρωτόκολλο,

πριν εισαχθεί στο εκάστοτε μικρογαλάκτωμα. Σύμφωνα με την SCF (Scientific Committee on Food), η αποδεκτή ημερήσια ποσότητα νισίνης προς κατανάλωση ανέρχεται σε τιμές ADI (Acceptable Daily Intakes) 0-13mg/kg κατά βάρος ανά ημέρα (SCF, 1997).

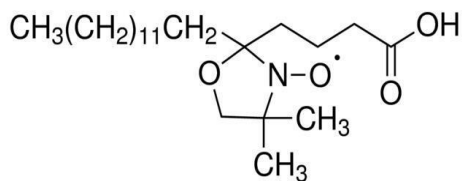
Άλλα υλικά και αντιδραστήρια

Ελαιόλαδο ραφινέ (ROO): εξευγενισμένο ελαιόλαδο της εταιρίας Ελαις. Το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της συνεχούς φάσης των μικρογαλακτωμάτων ήταν ελαιόλαδο ραφινέ, δηλαδή εξευγενισμένο ελαιόλαδο το οποίο λαμβάνεται από παρθένα ελαιόλαδα που έχουν υψηλά επίπεδα οξύτητας ή / και οργανοληπτικά ελαττώματα με μεθόδους διύλισης (είτε φυσικών είτε χημικών διεργασιών). Μετά τη διύλιση, οι ισχυρές γεύσεις εξαλείφονται και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα εξουδετερώνονται. Στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο δεν περιέχονται ελεύθερα λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες και όλα τα δευτερεύοντα συστατικά που υπάρχουν στο παρθένο ελαιόλαδο που θεωρούνται ως φυσικά ενδογενή αμφίφυλα (Papadimitriou et al., 2007).

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 τη μελέτη της διεπιφάνειας του μικρογαλακτώματος

Για τη μελέτη της δυναμικής της διεπιφάνειας των μικρογαλακτωμάτων με τη φασματοσκοπική τεχνική EPR χρησιμοποιήθηκε το νιτροξειδίο **5-DSA** (*5-(1-oxyl-2,2-dimethyl-oxazolidine)-stearic acid*) ή (*5-(1-οξυλ-2,2-διμεθυλο-οξαζολιδινο)-στεατικό οξύ*), ως ιχνηθέτης του σπιν (*spin probe*). Το 5-DSA είναι ένα μακρύ, αμφίφιλο μόριο, αποτελούμενο από στεατικό οξύ το οποίο φέρει στη θέση C5 την ομάδα doxyl που περιέχει αζύζευκτο ηλεκτρόνιο (Εικόνα 3.2). Το προϊόν είναι της εταιρείας Sigma–Aldrich.



Εικόνα 3.2: Χημική δομή του 5-DSA.

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, France.

- **Θρεπτικό υλικό GM17 M17** (Oxoid, Glucose 0.5% w/v): M17 BROTH και γλυκόζη.
 - ❖ *Μέσο ανάπτυξης: M17 BROTH* της εταιρείας Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England.
 - ❖ *Γλυκόζη: D(+)-Glucose monohydrate Molecular biology grade* της εταιρείας AppliChem GmbH, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Germany.

Το στέλεχος, το οποίο αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα GM17, ήταν:

- ✓ *Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG1363

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

Τα στελέχη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη στόχοι στην ανίχνευση της βακτηριοσίνης που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI ήταν:

- ✓ *Staphylococcus aureus* FMCC B-95
- ✓ *Escherichia coli* DH5a
- ✓ *Listeria monocytogenes* FMCC B-128 και
- ✓ *Bacillus cereus* LMG 6923^T

Οι μικροοργανισμοί *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* παραχωρήθηκαν από τον Καθ. κ. Νυχά και το εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.2. ΌΡΓΑΝΑ

3.2.1 Διαθλασίμετρο (*Refractometer*)

Οι μετρήσεις του δείκτη διάθλασης (Refractive Index, **RI**) της εξωτερικής φάσης των μικρογαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκαν στο διαθλασίμετρο της εταιρείας Kern Optics. Σταγόνες της εξωτερικής φάσης από το εκάστοτε μικρογαλάκτωμα τοποθετήθηκαν με γυάλινη πιπέτα στην επιφάνεια του διαθλασίμετρου για τη μέτρηση της τιμής του δείκτη διάθλασης.



Εικόνα 3.3: Διαθλασίμετρο Kern Optics.

3.2.2 Ιξωδόμετρο

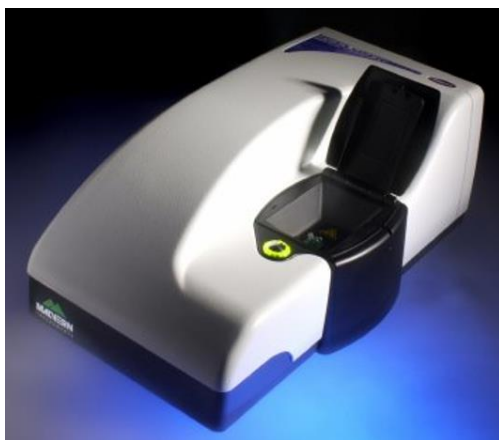


Οι μετρήσεις ιξώδους πραγματοποιήθηκαν με περιστροφικό ιξωδόμετρο DV-I Prime της Brookfield. Στην κεφαλή του μηχανήματος τοποθετήθηκαν 500μL του εκάστοτε μικρογαλακτώματος κι έπειτα η κεφαλή τοποθετήθηκε ξανά στο κύριο σώμα του οργάνου.

Εικόνα 3.4: Περιστροφικό Ιξωδόμετρο DV-I Prime της Brookfield

3.2.3 DLS (Dynamic light scattering)

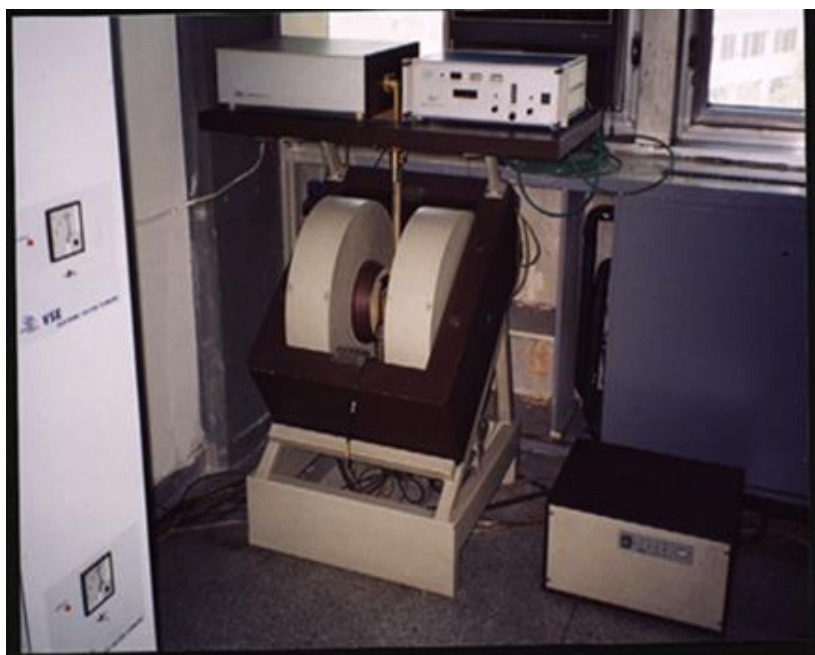
Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το μηχάνημα Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) από την Malvern Instruments (UK) το οποίο διαθέτει λέιζερ He-Ne (632.8nm).



Εικόνα 3.5: Συσκευή Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) από την Malvern Instruments (UK).

3.2.4 EPR (Electron Paramagnetic Resonance)

Τα φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο Bruker EMXmicro σε συχνότητα 9.75 GHz (X-band), το οποίο εκπέμπει μονοχρωματικά μικροκύματα.



Εικόνα 3.6: Φασματοφωτόμετρο ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού EPR. Παρατηρείται η πηγή της μικροκυματικής ακτινοβολίας ‘κλείστρον’ (των μικροκυμάτων) και ο μαγνήτης. Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλη κυψελίδα στο κέντρο ειδικής κοιλότητας (sample cavity) στην περιοχή του μέγιστου μικροκυματικού μαγνητικού πεδίου.

3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων και τον εγκλωβισμό της νισίνης, τον έλεγχο της αντιμικροβιακής τους δράσης και το δομικό χαρακτηρισμό τους με τις διάφορες τεχνικές, περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.3.1 Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων W/O

Στο παρελθόν, παρασκευάστηκαν μικρογαλακτώματα τόσο με αιθέρια έλαια όσο και με διάφορα είδη ελαίων με ή χωρίς αιθέρια έλαια, στα οποία μελετήθηκε η δομή τους και η αντιμικροβιακή τους δράση παρουσία νισίνης. Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε α) βελτιστοποίηση γνωστών συστημάτων τροποποιώντας είτε τη σύσταση ή τις αναλογίες των συστατικών τους, και β) δημιουργία νέων μικρογαλακτωμάτων βασισμένων σε νέα υστατικά. Με αυτό τον τρόπο εξετάστηκε αναλυτικότερα η δομή τους καθώς και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι μεγαλύτερου εύρους μικροοργανισμών.

Στην παρούσα εργασία, παρασκευάστηκαν πέντε διαφορετικά συστήματα τύπου νερού σε έλαιο (**W/O**) και μελετήθηκαν τόσο σε μορφή ‘*απλών μικρογαλακτωμάτων*’ (**Empty**), όσο και ‘*μικρογαλακτωμάτων στα οποία εγκλωβίστηκε νισίνη*’ (**Full**). Η επιλογή των συγκεντρώσεων και των αναλογιών των μικρογαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν, στηρίχτηκε σε αποτελέσματα παλαιότερων μελετών, επιλέγοντας τις βέλτιστες τιμές, βάσει της αντιμικροβιακή τους δράσης, καθώς και των τριγωνικών διαγραμμάτων φάσης.

Όλα τα συστήματα παρασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο κάθε φορά, με στόχο τη δημιουργία μικρογαλακτώματος ποσότητας 1g. Αρχικώς, χρησιμοποιήθηκε ραφινρισμένο ελαιόλαδο (ROO) σε σταθερή αναλογία (2:1) με το εκάστοτε αιθέριο έλαιο (το οποίο προστέθηκε τελευταίο πριν την υδατική φάση). Στη συνέχεια, προστέθηκαν με τη σειρά η επιφανειοενεργή ουσία που ήταν τα μονογλυκερίδια, (DMG), κι έπειτα η συνεπιφανειοενεργή ουσία προπυλενογλυκόλη (PG). Η αναλογία [(ROO-αιθέριο έλαιο) : PG] ήταν 5:1. Τέλος, προστέθηκε η υδατική φάση στην κατάλληλη ποσότητα και το μίγμα αναδεύτηκε ήπια. Διαύγεια μίγματος σήμαινε το σχηματισμό μικρογαλακτώματος. Ο έλεγχος για την επιτυχή δημιουργία μικρογαλακτώματος πραγματοποιούνταν εφόσον είχε επέλθει ισορροπία στο σύστημα, με οπτική παρατήρηση για τη διαύγειά του.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη δημιουργία μικρογαλακτωμάτων χωρίς αιθέριο έλαιο, προσθέτοντας τα συστατικά με την ίδια σειρά, χωρίς να προστεθεί το αιθέριο έλαιο. Η παρασκευή όλων των μικρογαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας (25°C).

Η υδατική φάση ήταν είτε μόνο υπερκάθαρο νερό (**Empty** μικρογαλάκτωμα), είτε νισίνη διαλυμένη σε νερό (**Full** μικρογαλάκτωμα), σύμφωνα με το αντίστοιχο Πρωτόκολλο. Η ποσότητα του νερού που προστέθηκε στο κάθε σύστημα, προέκυψε από τη μελέτη του εκάστοτε μικρογαλακτώματος με τη χρήση ψευδοτριγωνικού διαγράμματος. Η εκατοστιαία σύσταση των μικρογαλακτωμάτων παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 3.1: Εκατοστιαία σύσταση μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια.

Συστατικά wt.% /Σύστημα	Ελαιόλαδο (ROO)	Αιθέριο Έλαιο	Προπυλενογλυκόλη (PG)	Μονογλυκερίδια (DMG)	Νερό
Σ1 (Δενδρολίβανο)	31	16	10	38	5
Σ2 (Θυμάρι)	31	16	10	38	5
Σ3 (Ρίγανη)	32	16	10	38	4
Σ4 (Δίκταμο)	31	16	10	38	5
Σ2α (ROO)	56	-	12	28	4
Σ2β (ROO)	48	-	10	38	4

Τα τέσσερα πρώτα συστήματα περιέχουν αιθέριο έλαιο (Σ1→δενδρολίβανο, Σ2→θυμάρι, Σ3→ρίγανη, Σ4→δίκταμος) και το Σ2(α+β) πρόκειται για το ίδιο μικρογαλάκτωμα (χωρίς αιθέριο έλαιο) σε διαφορετική συγκέντρωση συστατικών.

Τα συστήματα που επιλέχθηκαν για παρασκευή και μελέτη περιέχουν ελαιώδη φάση-επιφανειοενεργή ουσία DMG σε σταθερή αναλογία 60%-40% ή 70%-30% (Σ2α).

- Να σημειωθεί πως στα μικρογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη δεν περιέχεται καθόλου αιθανόλη.
- Έγιναν προσπάθειες/πραγματοποιήθηκε έρευνα για τη δημιουργία μικρογαλακτωμάτων και με άλλα συστατικά, όπως Tween80 ως επιφανειοενεργή ουσία ή γλυκερόλη (Gly) ως συνεπιφανειοενεργή σε διάφορες αναλογίες και μίξεις, οι οποίες δεν είχαν επιτυχή αποτελέσματα, καθώς δεν δημιουργήθηκε μικρογαλάκτωμα. Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν τόσο στα συστήματα με το ελαιόλαδο και τα τέσσερα είδη αιθέριων ελαίων, όσο και σε συστήματα μόνο με το ελαιόλαδο, σε διάφορες συγκεντρώσεις και αναλογίες.

3.3.2 Πρωτόκολλο Διαλυτοποίησης Νισίνης

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

1. Διαλύονται 40mg νισίνη/mL σε απιονισμένο H₂O που οξυνίζεται πρώτα με 0.05% v/v οξικό οξύ.
2. Το pH ρυθμίζεται στο 5.5 χρησιμοποιώντας διάλυμα 10N NaOH.

3. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10min στις 13.000rpm σε θερμοκρασία 25°C.
4. Συλλέγεται προσεκτικά το υπερκείμενο. Θεωρείται ότι στο διάλυμα αυτό, η τελική συγκέντρωση είναι 1mg νισίνης/mL βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

3.3.3 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης

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

Πιο αναλυτικά, το θρεπτικό υλικό εμβολιασμένο με τον αντίστοιχο μικροοργανισμό-στόχο τοποθετείται σε τρυβλία και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Έπειτα, στο στερεοποιημένο υλικό δημιουργούνται, με αποστειρωμένη ανεστραμμένη πιπέτα παστέρ, οπές στις οποίες τοποθετείται το δείγμα (50μL). Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων σε κατάλληλες συνθήκες για τον μικροοργανισμό-στόχο (θερμοκρασία, χρόνος). Εάν το δείγμα είναι αποτελεσματικό έναντι του μικροοργανισμού, δημιουργείται ένας ομόκεντρος κύκλος γύρω από την οπή, που ονομάζεται **ζώνη διαύγασης** ή **παρεμπόδισης**. Οι ζώνες αυτές σχηματίζονται λόγω διάχυσης του δείγματος στο στερεοποιημένο υπόστρωμα και υποδεικνύουν αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Οι ζώνες παρεμπόδισης έχουν διαφορετικό μέγεθος και ένταση διαύγειας, ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το βαθμό παρεμπόδισης της ανάπτυξής του.

Όσον αφορά στη συγκεκριμένη μελέτη, στο θρεπτικό υπόστρωμα GM17 (1.3% w/v άγαρ) εμβολιάστηκε το στέλεχος *L. lactis* MG1363 (εμβόλιο 1% v/v), ενώ σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI (1.3% w/v άγαρ) εμβολιάστηκαν τα στελέχη *L. monocytogenes* FMCC B-128, *B. cereus* LMG 6923^T, *S. aureus* FMCC B-95 και *E. coli* DH5a (εμβόλιο 1% v/v σε όλα) κι έπειτα στρώθηκαν σε τρυβλία. Οι συνθήκες επώασης για τον κάθε μικροοργανισμό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2: Θρεπτικό μέσο, συνθήκες επώασης και βαθμός επικινδυνότητας μικροοργανισμών που μελετήθηκαν.

Strain	Growth medium	Temperature	Biohazard group
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	BHI	30°C	2
<i>Staphylococcus aureus</i> FMCC B-95	BHI	37°C	2
<i>Escherichia coli</i> DH5a	BHI	37°C	1
<i>Listeria monocytogenes</i> FMCC B-128	BHI	30°C	2
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	GM17 (M17 Oxoid, Glucose 0.5%)	30°C	1

Εκτός από τα μικρογαλακτώματα, εξετάστηκε και μεμονωμένα η δράση των αιθέριων ελαίων (δενδρολίβανο, θυμάρι, ρίγανη, δίκταμος), έναντι των μικροοργανισμών. Στα τρυβλία των πέντε διαφορετικών μικροοργανισμών τοποθετήθηκαν 50μL του εκάστοτε αιθέριου ελαίου και μετέπειτα ακολούθησε η επώαση τους στις κατάλληλες συνθήκες, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω.

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

3.3.4 Διάγραμμα Φάσης

Κατασκευάστηκαν ψευδο-τριγωνικά διαγράμματα φάσης για συστήματα αποτελούμενα από έλαια, επιφανειοενεργό, νερό και συνεπιφανειοενεργό και ορίστηκαν τα όρια της μονοφασικής περιοχής. Εφόσον πρόκειται για μικρογαλακτώματα W/O, η συνεχής φάση είναι η ελαιώδης και αποτελείται από ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο, ή μόνο ελαιόλαδο, ενώ ως επιφανειοενεργό χρησιμοποιείται αποκλειστικά το DMG.

Για την κατασκευή των ψευδο-τριγωνικών διαγραμμάτων χρησιμοποιείται η μέθοδος της τιτλοδότησης με υδατική φάση. Αρχικά, παρασκευάστηκαν δείγματα που περιείχαν ελαιώδη φάση σε ποσοστά 90-10% κ.β και DMG σε ποσοστά από 10 έως 90% κ.β. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 5μL (ανά ημέρα) υπερκάθαρου νερού (δισπαρμένη φάση). Μετά την προσθήκη της ποσότητας νερού το δείγμα αναδεύτηκε ήπια με σκοπό η υδατική φάση να μπορέσει να διασπαρεί, και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο, σε σταθερή θερμοκρασία 25°C για 24 ώρες, για να επέλθει ισορροπία στο σύστημα. Την επόμενη ημέρα και πριν προστεθεί η νέα ποσότητα νερού, τα δείγματα αναδεύτηκαν ξανά. Όσα δείγματα

παρέμειναν διαυγή, χαρακτηρίστηκαν ως μικρογαλακτώματα και έγινε περαιτέρω σταδιακή προσθήκη νερού. Προστέθηκε νερό μέχρις ότου το μικρογαλάκτωμα να θολώσει, καταγράφοντας πάντα την προστιθέμενη ποσότητα νερού.

Αφού εφαρμόστηκε η παραπάνω διαδικασία τιτλοδότησης για κάθε διαφορετική αναλογία ελαίου/επιφανειοενεργού, τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν και κατασκευάστηκε το αντίστοιχο ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσης. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας για τα τριγωνικά διαγράμματα φάσης αναλύθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ProSim Ternary Diagramme.

3.3.5 Μέθοδος DLS

Με τη μέθοδο DLS λαμβάνονται ποσοτικές πληροφορίες από τις διακυμάνσεις της έντασης της ακτινοβολίας στο χρόνο. Φως από την πηγή laser ακτινοβολεί το δείγμα το οποίο τοποθετείται σε ειδική κυψελίδα. Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου χαλαζία (*quartz type cuvette*). Το διαχεόμενο φως συλλέγεται από τον έναν από τους δύο ανιχνευτές, είτε στις 90° είτε στις 173°.

Αρχικώς, τα συστατικά των μικρογαλακτωμάτων επεξεργάστηκαν με ειδικά φίλτρα, υδρόφιλα ή λιπόφιλα (ανάλογα με τη σύστασή τους), διαμέτρου πόρων 0.45μm προτού μετρηθούν με τη μέθοδο DLS, για να απαλλαγούν από τη σκόνη, καθώς είναι μια τεχνική ιδιαίτερος ευαίσθητη. Όλα τα σκεύη και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν καθαριστεί προηγουμένως με φιλταρισμένη ισοπροπανόλη.

Η διαδικασία καθαρισμού είναι απαραίτητη και πολύ σημαντική, 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.

Οι μετρήσεις σε αυτήν την εργασία πραγματοποιήθηκαν σε γωνία σκέδασης 173° και σε σταθερή θερμοκρασία 25°C. Εξετάστηκαν το μέγεθος και η πολυδιασπορά των τεσσάρων μικρογαλακτωμάτων W/O με ραφινέ ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο (δενδρολίβανο, θυμάρι, ρίγανη, δίκταμος), τόσο παρουσία (Full μικρογαλάκτωμα) όσο και απουσία (Empty μικρογαλάκτωμα) της βιοδραστικής ένωσης νισίνης. Το μέγεθος των σταγονιδίων και η πολυδιασπορά της διεσπαρμένης υδατικής φάσης αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Malvern DTS.

3.3.6 Μέθοδος EPR

Για τεχνικούς λόγους, κάθε πηγή μικροκυμάτων (λυχνίες klystron, δίοδοι Gunn) έχει μέγιστη απόδοση σε μία πολύ στενή περιοχή συχνοτήτων π.χ. $9.00 \pm 0.05 \text{GHz}$. Έτσι, κάθε φασμαφωτόμετρο EPR χαρακτηρίζεται από τη συχνότητα λειτουργίας της πηγής μικροκυμάτων. Στο συγκεκριμένο όργανο, η πηγή ακτινοβολίας (της περιοχής των μικροκυμάτων) είναι μια λυχνία Klystron και η συχνότητα είναι 9.75GHz .

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση πεπλατυσμένης κυψελίδας WG- 813-Q, η οποία τοποθετείται σε μια μεταλλική κοιλότητα (sample cavity), ρόλος της οποίας είναι να ενισχύει το μέγεθος του πεδίου μικροκυμάτων και βρίσκεται ανάμεσα στους πόλους του μαγνήτη.

Το φάσμα EPR λαμβάνεται με την καταγραφή της απορρόφησης της ακτινοβολίας από το δείγμα, που είναι μέσα στην πεπλατυσμένη κυψελίδα από quartz, καθώς σαρώνεται το μαγνητικό πεδίο. Μετά, η ισχύς των μικροκυμάτων μετατρέπεται σε ηλεκτρικό ρεύμα που παράγει το χαρακτηριστικό φάσμα. Ένας υπολογιστής συνδέεται με τη συσκευή για την ανάλυση των δεδομένων με το σχετικό πρόγραμμα απόκτησης. Έτσι, μέσω των φασμάτων EPR λαμβάνονται πληροφορίες σχετικές με τη δυναμική της μεμβράνης και τις ιδιότητές της, σε συστήματα όπως τα μικρογαλακτώματα.

Για να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του 5-DSA στα μικρογαλακτώματα W/O, 1mL από το κάθε μικρογαλάκτωμα προστέθηκε σε erpendorf, εντός του οποίου είχε τοποθετηθεί προηγουμένως κατάλληλη ποσότητα 5-DSA. Πιο συγκεκριμένα, 5μL από stock διάλυμα 5-DSA σε αιθανόλη, συγκέντρωσης $7.8 \times 10^{-3} \text{M}$, τοποθετήθηκαν αρχικώς σε erpendorf και ακολούθησε περαιτέρω εξάτμιση της αιθανόλης.

Τα μικρογαλακτώματα παρασκευάστηκαν και παρέμειναν για 24 ώρες στο υδατόλουτρο σε σταθερή θερμοκρασία των 25°C , προκειμένου να επέλθει ισορροπία στα συστήματα. Μετά (το πέρας των 24 ωρών) τοποθετήθηκαν στα erpendorf (που περιείχαν το 5-DSA) όπου και πάλι παρέμειναν για 24 ώρες, προκειμένου να επέλθει ισορροπία.

Στη συνέχεια, το δείγμα αναδεύτηκε και ποσότητα ίση με 0.5mL τοποθετήθηκε στην κυψελίδα για να διεξαχθούν οι μετρήσεις. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τον συντονισμό του φασματόμετρου EPR και με την βοήθεια του προγράμματος *WinEPR Acquisition*. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στη θερμοκρασία των 25°C .

Πολύ σημαντικό στοιχείο για την λήψη φασμάτων απαλλαγμένων θορύβου είναι η ρύθμιση των παραμέτρων λειτουργίας του οργάνου, προτού ξεκινήσουν οι μετρήσεις. Οι παράμετροι λειτουργίας του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής:

Πίνακας 3.3: Παράμετροι λειτουργίας οργάνου EPR.

Παράμετροι EPR

<i>Center Field</i>	348.5G
<i>Sweep Width</i>	100G
<i>Receiver Gain</i>	5.64*10⁴ms
<i>Modulation Amplitude</i>	4G
<i>Conversion Time</i>	5ms
<i>Time Constant</i>	40.96ms
<i>Frequency</i>	9.75GHz

Μελετήθηκαν τα μικρογαλακτώματα με τα αιθέρια έλαια (Empty & Full) (συστήματα Σ1, Σ2, Σ3, Σ4), καθώς και τα συστατικά αυτών, προκειμένου να αποτυπωθεί φασματικά η πορεία σχηματισμού των μικρογαλακτωμάτων.

Με βάση την εικόνα των φασμάτων, αυτά ανήκουν στην λεγόμενη περιοχή ‘*αργής κίνησης*’ και γι’ αυτό το λόγο οι παράμετροι τ_R (χρόνος συσχέτισης) και S , δεν υπολογίζονται από τις εξισώσεις αλλά μέσω υπολογιστικών μοντέλων προσομοίωσης των φασμάτων, με τη βοήθεια του προγράμματος *Matlab*.

3.3.6.1 Ανάλυση Δεδομένων EPR - Matlab

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της σύστασης των μικρογαλακτωμάτων στη δυναμική της μεσεπιφάνειάς τους πραγματοποιήθηκαν μελέτες με την τεχνική του EPR και τον μεμβρανικό ιχνηθέτη του σπιν 5-DSA, χρησιμοποιώντας α) μεμονωμένα το ελαιόλαδο (ROO), β) μίγμα ελαιολάδου-αιθέριου ελαίου, γ) μίγμα ROO-αιθέριου ελαίου/PG/DMG και τέλος δ) το αντίστοιχο μικρογαλάκτωμα με και χωρίς νισίνη (Empty και Full).

Τα πειραματικά φάσματα του EPR επεξεργάστηκαν αρχικώς με το πρόγραμμα *Win-EPR Processing*. Η περεταίρω επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του *Matlab* και του προγράμματος *Origin 6.1*. Το πρόγραμμα προσομοίωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το *EasySpin*, έκδοσης (5.0.22), που αποτελεί μια εργαλειοθήκη του *Matlab*, έκδοσης 2008. Για τη μοντελοποίηση των εξισώσεων χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση ‘*chili*’, για την περιοχή ‘*αργής κίνησης*’, με στόχο την απόκτηση των βέλτιστων τιμών-αποτελεσμάτων.

Όλες οι αναφερόμενες τιμές των παραμέτρων υπέρλεπτης σύζευξης, της παραμέτρου S και του περιστροφικού χρόνου συσχέτισης τ_R , ελήφθησαν από την προσομοίωση των πειραματικών φασμάτων των μικρογαλακτωμάτων (Hemmelmann, 2012).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η επιλογή και η παρασκευή των συστημάτων της παρούσας μελέτης στηρίχτηκε σε βελτιστοποίηση συστημάτων προηγούμενων μελετών. Αρχικώς, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των συστημάτων προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της αντικατάστασης της ουσίας αιθανόλης με προπυλενογλυκόλη (PG). Τελικώς, παρασκευάστηκαν πέντε μικρογαλακτώματα τα οποία μελετήθηκαν σε όλους τους μικροοργανισμούς-στόχους κι εν συνέχεια εξετάστηκε αναλυτικότερα η δομή τους. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν για την εξακρίβωση της αντιμικροβιακής δράσης τους και παρουσίασαν όλα επαναλήψιμη συμπεριφορά και τα περισσότερα επιτυχημένη δράση έναντι στους μικροοργανισμούς *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus*. Τα συστήματα και οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Μελετήθηκε επίσης, η δράση των τεσσάρων αιθέριων ελαίων (Δενδρολίβανο, Θυμάρι, Ρίγανη, Δίκταμος) μεμονωμένα και στους πέντε μικροοργανισμούς.

Πίνακας 4.1: Συστήματα και μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν.

Συστήματα/ Μικροοργανισμοί	Σ1	Σ2	Σ3	Σ4	Σ2α	Σ2β
<i>Listeria monocytogenes</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Bacillus cereus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Escherichia coli</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Staphylococcus aureus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Lactococcus lactis</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων που μελετήθηκαν παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα:

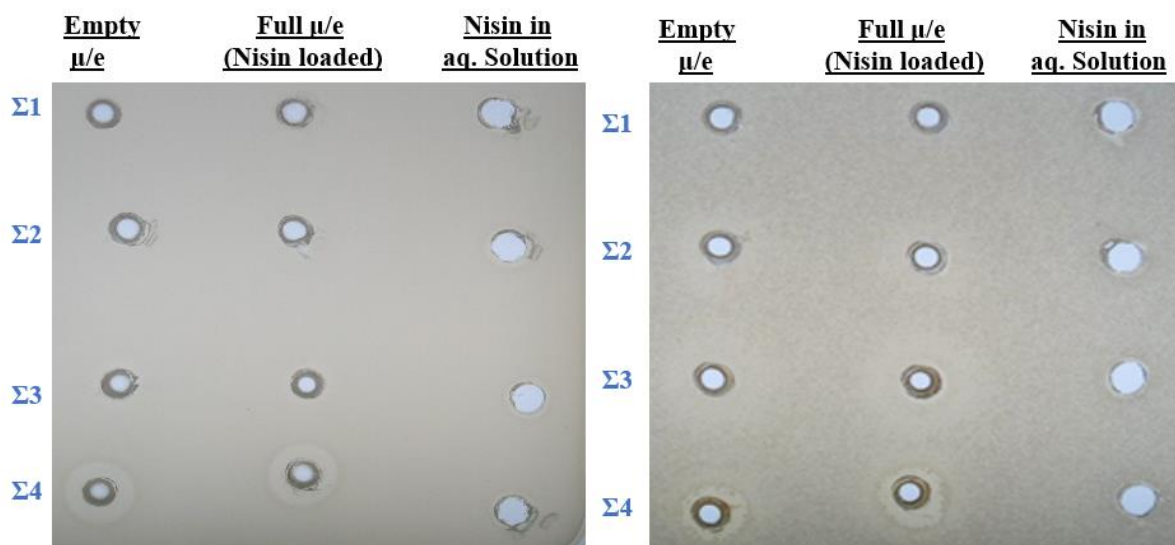
Πίνακας 4.2: Εκατοστιαία σύσταση μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια.

Συστατικά wt % /Σύστημα	Ελαιόλαδο (ROO)	Αιθέριο Έλαιο	Προπυλενογλυκόλη (PG)	Μονογλυκερίδια (DMG)	Νερό
Σ1 (Δενδρολίβανο)	31	16	10	38	5
Σ2 (Θυμάρι)	31	16	10	38	5
Σ3 (Ρίγανη)	32	16	10	38	4
Σ4 (Δίκταμο)	31	16	10	38	5
Σ2α (ROO)	56	-	12	28	4
Σ2β (ROO)	48	-	10	38	4

Στις ακόλουθες εικόνες φαίνεται η δράση των μικρογαλακτωμάτων και των αιθέριων ελαίων με τη μέθοδο WDA. Παρουσιάζονται τα τρυβλία με τα μικρογαλακτώματα με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια (Empty & Full) (συστήματα Σ1, Σ2, Σ3, Σ4) καθώς και με το ελαιόλαδο (Σ2α, Σ2β) και τα αιθέρια έλαια μεμονωμένα, που μελετήθηκαν κι εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών, οι οποίοι είναι οι *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Lactococcus lactis*. Συγκριτικά, (ως τυφλό δείγμα) χρησιμοποιείται νισίνη διαλυμένη σε νερό (ίδιας ποσότητας με αυτή στα δείγματα Full), προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η δράση των δειγμάτων είναι ισχυρότερη από αυτή της νισίνης και εάν υπάρχει συνεργιστική δράση νισίνης-αιθέριων ελαίων.

Listeria monocytogenes

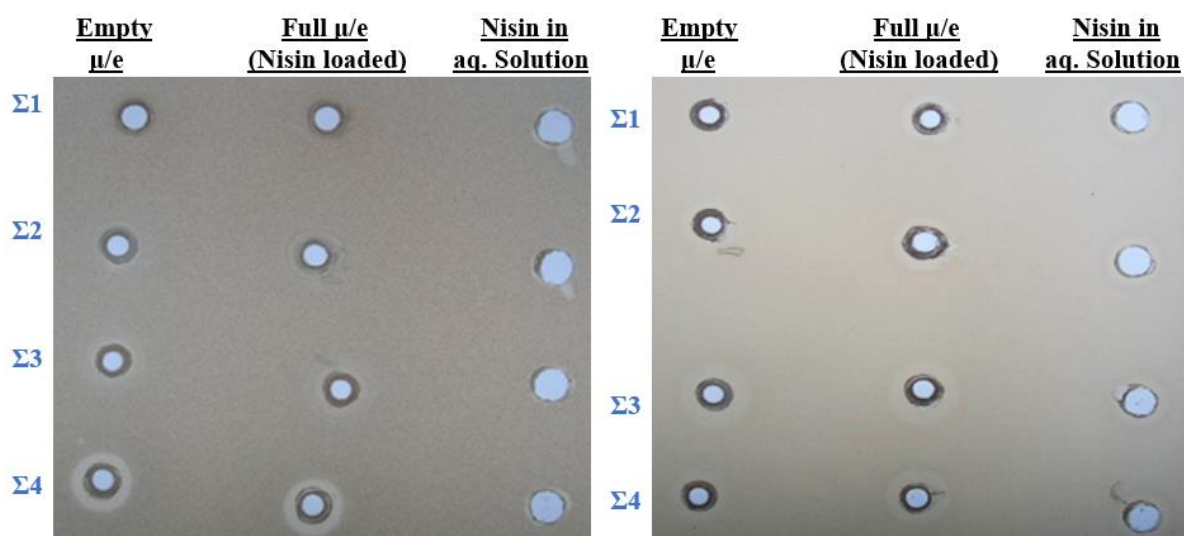
Bacillus cereus



Εικόνα 4.1.1: Απεικόνιση διάχυσης των συστημάτων με αιθέρια έλαια Σ1, Σ2, Σ3, Σ4 σε άγαρ, στα βακτήρια *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus*.

Staphylococcus aureus

Lactococcus lactis



Εικόνα 4.1.2: Απεικόνιση διάχυσης των συστημάτων με αιθέρια έλαια Σ1, Σ2, Σ3, Σ4 σε άγαρ, στα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Lactococcus lactis*.

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, οι διαστάσεις των ζωνών παρεμπόδισης μετρήθηκαν (κλίμακα mm) και παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.3. Όπου δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης, σημειώνεται με το σύμβολο X.

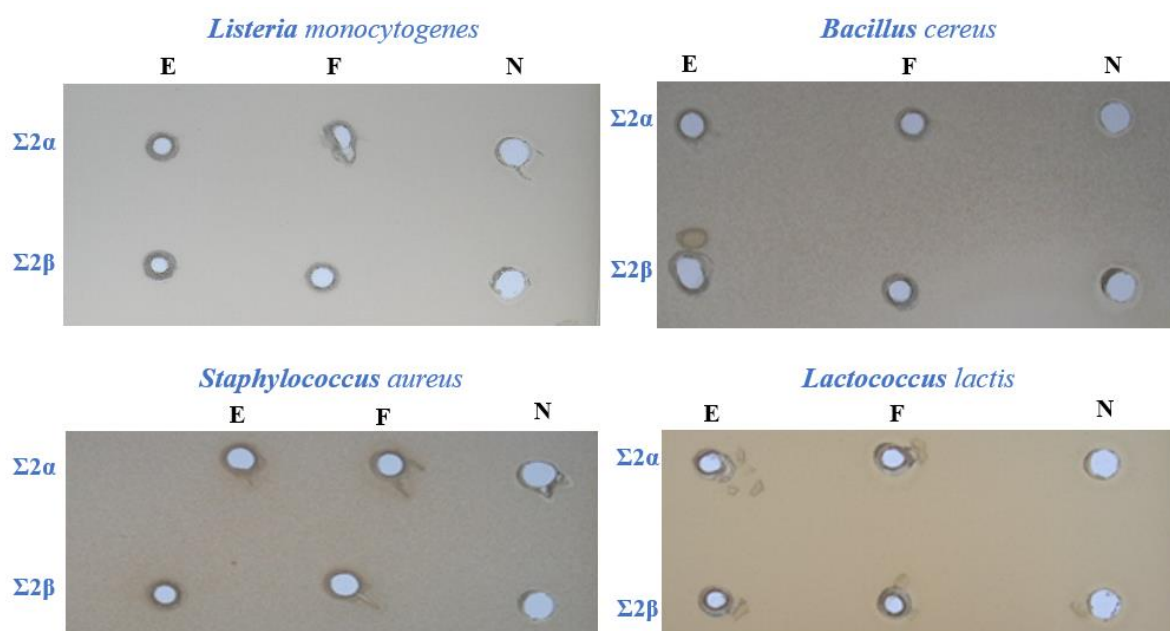
Πίνακας 4.3: Μέγεθος ζώνης παρεμπόδισης (mm) των συστημάτων Σ1, Σ2, Σ3, Σ4, Σ2α, Σ2β, Empty (E), Full (F) και νισίνης διαλυμένης σε νερό (N), καθώς και των αιθέριων ελαίων δενδρολίβανου, θυμαριού, ρίγανης και δικτάμου.

Μέγεθος ζώνης παρεμπόδισης (mm)						
Βακτήρια / Συστήματα		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Σ1	E	X	X	6	6	X
	F	11.5	X	6	6	X
	N	10.5	6.5	6.5	6	X
Σ2	E	7.5	6.5	6	15	X
	F	12.5	6.5	6	14	X
	N	10.5	6.5	6.5	6.5	X
Σ3	E	12.5	7	7.5	15	X
	F	14	7	7.5	15	X
	N	10	6.5	6.5	6.5	X
Σ4	E	10	11	13	11	X
	F	11.5	10	11	9	X
	N	10.5	6.5	6.5	6.5	X
Σ2α	E	x	X	X	x	X
	F	8	8	6	x	X
	N	7	7.5	6.5	6.5	X
Σ2β	E	x	X	X	x	X
	F	8	7	6	x	X
	N	7	6.5	6.5	6.6	X
Βακτήρια / Αιθέρια Έλαια		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Δενδρολίβανο		16.5	11	10	12	ασθενής
Θυμάρι		25.5	23.5	27.5	30	ασθενής /επικάλυψη
Ρίγανη		>35	21.5	25.5	>35	ασθενής /επικάλυψη
Δίκταμος		>35	21	33.5	>35	ασθενής /επικάλυψη

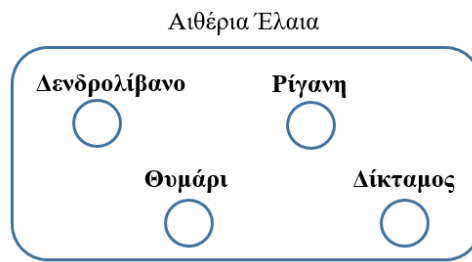
Από τις εικόνες συμπεραίνεται/παρατηρείται ότι:

- Σε όλους τους μικροοργανισμούς η νισίνη διαλυμένη σε νερό (τυφλό δείγμα) εμφάνισε διαυγή και σχετικά μικρή ζώνη παρεμπόδισης, με μεγαλύτερη έναντι του *L. lactis* (10.5mm).
- Οι μεγαλύτερες σε μέγεθος ζώνες της τάξης των 14-15mm παρατηρούνται για τον μικροοργανισμό *B. cereus* από τα μικρογαλακτώματα με αιθέριο έλαιο ρίγανης και θυμαριού. Οι ζώνες όμως, είναι πολύ ασθενείς σε ένταση και διαύγεια.
- Οι ζώνες με μεγαλύτερη διαύγεια και ένταση παρατηρούνται για τον *S. aureus*.
- Η πιο έντονη και διαυγής ζώνη παρεμπόδισης σχηματίζεται από το μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο *δικτάμου* (όχι η μεγαλύτερη) έναντι του μικροοργανισμού *S. aureus*, μεγέθους 10-12mm, μετά στον *B. cereus* και *L. monocytogenes* και τέλος η πιο ισχνή στον *L. lactis*. Η μεγαλύτερη ζώνη του συγκεκριμένου συστήματος παρατηρείται/σχηματίζεται έναντι του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (12-13mm). Το μέγεθος πάντως, των ζωνών του συγκεκριμένου συστήματος, κυμαίνεται σε παραπλήσια επίπεδα.

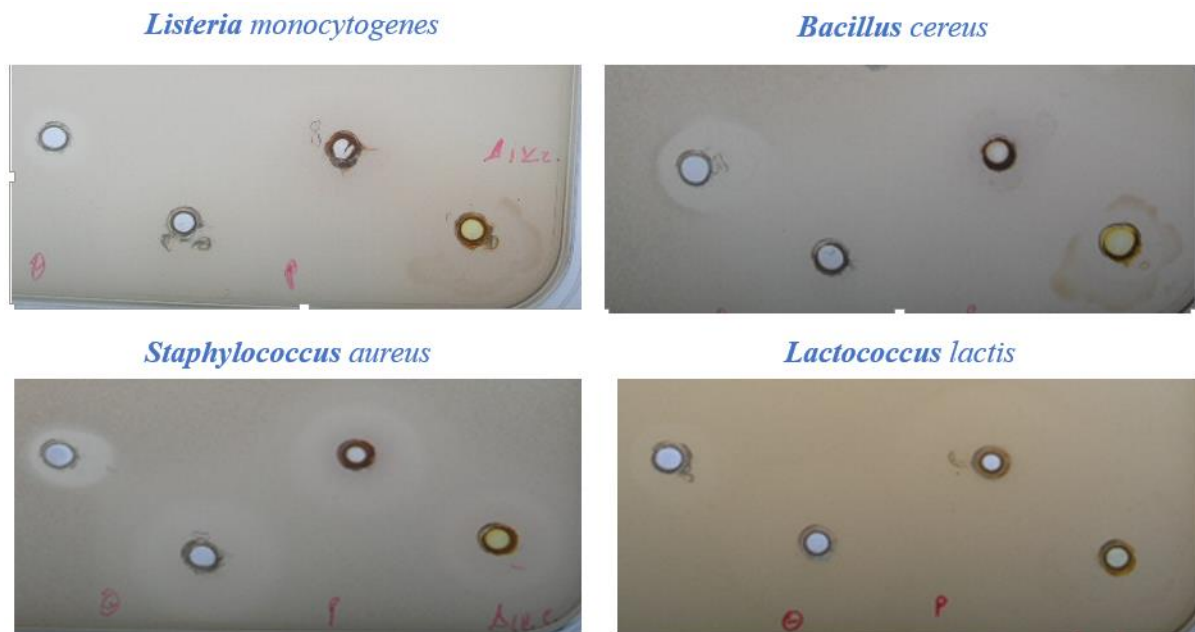
Ακολουθούν οι εικόνες για τα συστήματα με ελαιόλαδο και με τα αιθέρια έλαια μεμονωμένα.



Εικόνα 4.1.3: Απεικόνιση διάχυσης των συστημάτων με ελαιόλαδο Σ2α και Σ2β σε άγαρ, στα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Lactococcus lactis*.



Εικόνα 4.1.4: Σχηματική απεικόνιση της θέσης των αιθέριων ελαίων στα τρυβλία.



Εικόνα 4.1.5: Απεικόνιση διάχυσης των αιθέριων ελαίων σε άγαρ, στα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Lactococcus lactis*.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα, τα κύρια συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισαν τα μικρογαλακτώματα που περιείχαν αιθέριο έλαιο.
Από αυτά:
- ✓ Όλα τα μικρογαλακτώματα (με αιθέριο έλαιο) παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, εκτός του Gram-αρνητικού *Escherichia coli*.
- ✓ Τα μικρογαλακτώματα με δίκταμο εμφανίζουν τα καλύτερα αποτελέσματα, έχοντας πάντα τις πιο έντονες ζώνες και συνήθως και τις μεγαλύτερες. Ακολουθούν της ρίγανης και του θυμαριού. Τα μικρογαλακτώματα με δενδρολίβανο δεν εμφάνισαν πάντα αντιμικροβιακή δράση.

- ✓ Στους περισσότερους μικροοργανισμούς, στα μικρογαλακτώματα με **δίκταμο**, η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται κυρίως στο **αιθέριο έλαιο** (παρόμοιο μέγεθος ζώνης μεταξύ Empty-Full δειγμάτων ή και Empty μεγαλύτερο από Full), εκτός του *Lactococcus lactis*, όπου εκεί φαίνεται να υπάρχει **συνεργιστική** δράση* δικτάμου-νισίνης (μέγεθος ζώνης Empty μικρότερο από Full). Στα μικρογαλακτώματα με ρίγανη και θυμάρι, η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται επίσης στο αιθέριο έλαιο.
- ✓ Όλα τα αιθέρια έλαια μεμονωμένα εμφάνισαν πολύ μεγάλες (μεγαλύτερες από τα μικρογαλακτώματα) και ασθενείς ζώνες διαύγασης. Η μικρότερη ήταν πάντα του δενδρόλιβανου αλλά ήταν σε όλους τους μικροοργανισμούς η πιο έντονη.

***Συνεργιστική δράση** αιθέριου ελαίου-νισίνης υπάρχει στα μικρογαλακτώματα εφόσον το μέγεθος της ζώνης παρεμπόδισης των Full δειγμάτων είναι μεγαλύτερο από αυτό των Empty και φυσικά από της νισίνης διαλυμένης σε νερό (nisin in aqueous solution, τυφλό δείγμα).

Όπως αναφέρθηκε, μόνο στον μικροοργανισμό *Escherichia coli*, δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης, καθώς πρόκειται για ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, στο οποίο η νισίνη δεν είναι αποτελεσματική και πιθανόν η συγκέντρωση των αιθέρων ελαίων δεν επαρκεί για την αναστολή της ανάπτυξής του.

Άλλες μελέτες νανογαλακτωμάτων με αιθέρια έλαια και εγκλωβισμένη νισίνη έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη συνεργιστική δράση αιθέριου ελαίου-νισίνης, έναντι Gram-θετικών βακτηρίων, με πολύ θετικά αποτελέσματα συγκεκριμένα στον μικροοργανισμό *Staphylococcus aureus* και στελέχη του βακτηρίου *Bacillus* sp. (Zhang et al., 2014).

Σε παλαιότερες μελέτες (Chatzidaki et. al, unpublished data, Γαδ, διπλωματική, 2015) που πραγματοποιήθηκαν με μικρογαλακτώματα με ελαιόλαδο (ραφινέ) και που περιείχαν νισίνη, δημιουργήθηκε ζώνη παρεμπόδισης κυρίως στον μικροοργανισμό *L. lactis*, ενώ στον *S. aureus* ελάχιστα ή καθόλου. Στην παρούσα εργασία, στα συστήματα (Σ2α, Σ2β) χωρίς αιθέρια έλαια, δημιουργήθηκαν ζώνες στα μικρογαλακτώματα με νισίνη (Full) μόνο έναντι του *L. Lactis*, αλλά μικρότερου μεγέθους σε σχέση με τα αντίστοιχα παλιότερα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη χρήση διαφορετικής συνεπιφανειοενεργής ουσίας, καθώς στις παλιότερες μελέτες χρησιμοποιούνταν αιθανόλη, ενώ εδώ προπυλενογλυκόλη (PG). Η αιθανόλη έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τη νισίνη και συμβάλλει στην καλύτερη διάχυσή της στο άγαρ, ενισχύοντας παράλληλα τη δράση της (Xiao et al., 2010). Επιπλέον, η μικρότερη ποσότητα νισίνης που υπάρχει στα μικρογαλακτώματα, εξαιτίας λιγότερης ενσωμάτωσης νερού σε αυτά, συμβάλλει στον σχηματισμό ζώνης μικρότερου μεγέθους.

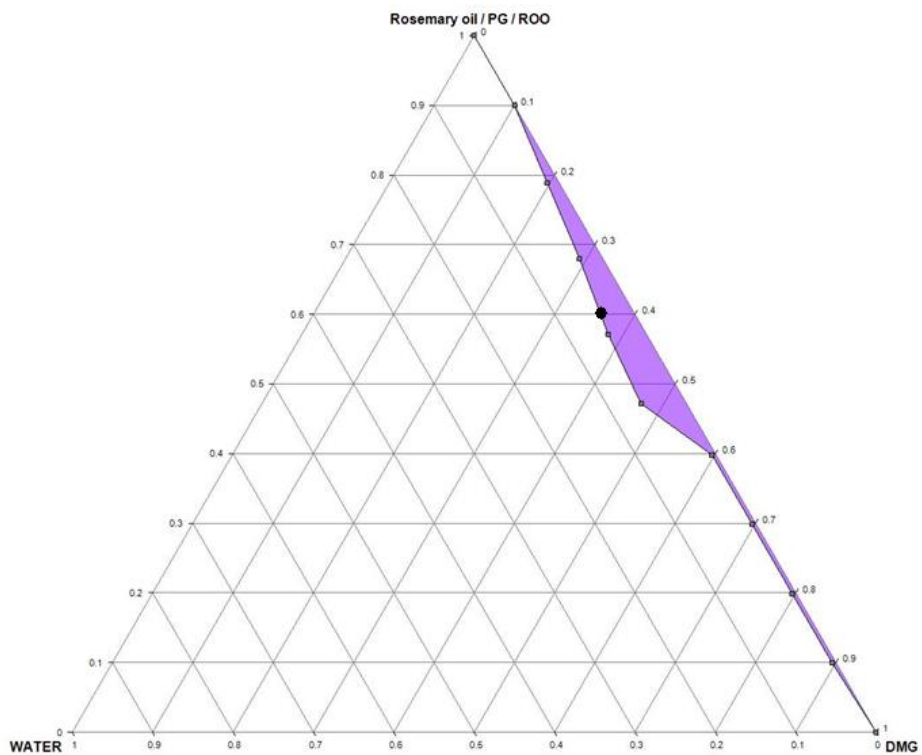
Στα συστήματα με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια (δενδρολίβανο, θυμάρι, ρίγανη) έναντι των ίδιων μικροοργανισμών (*L. lactis*, *S. aureus*), τόσο στις παλαιές όσο και σε αυτή τη μελέτη, η ρίγανη είχε τα καλύτερα αποτελέσματα. Και στις δύο περιπτώσεις, στον *S. aureus*, οι ζώνες ήταν μικρότερες αλλά πιο διαυγείς και έντονες από τον *L. lactis*, με τα δείγματα στην παρούσα εργασία να εμφανίζουν λίγο μικρότερη παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Αυτό οφείλεται στη χρήση προπυλενογλυκόλης αντί αιθανόλης, (όπως αναφέρεται και παραπάνω) και διαφορετικών αναλογιών και συγκεντρώσεων των συστατικών των μικρογαλακτώματων. Γενικότερα, η αιθανόλη συμβάλλει στην ενσωμάτωση μεγαλύτερης ποσότητας νερού στα μικρογαλακτώματα συγκριτικά με άλλες συνεπιφανειοενεργές ουσίες, όπως η προπυλενογλυκόλη που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη (Yaghmur et al., 2004). Γι' αυτό άλλωστε εδώ, τα μικρογαλακτώματα ενσωμάτωσαν μικρότερη ποσότητα νερού, άρα και η ποσότητα νισίνης ήταν λιγότερη, επομένως ήταν αναμενόμενο να εμφανίζουν μικρότερη ζώνη διαύγασης.

Η διαφορά με την προγενέστερη μελέτη, εντοπίζεται στα μικρογαλακτώματα με δενδρολίβανο, καθώς στην παρούσα εργασία δεν εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου *S. aureus*, ή εμφανίζουν πολύ ασθενέστερη ζώνη παρεμπόδισης συγκριτικά με τα άλλα αιθέρια έλαια στον αλλοιωγόνο οξυγαλακτικό *L. lactis*.

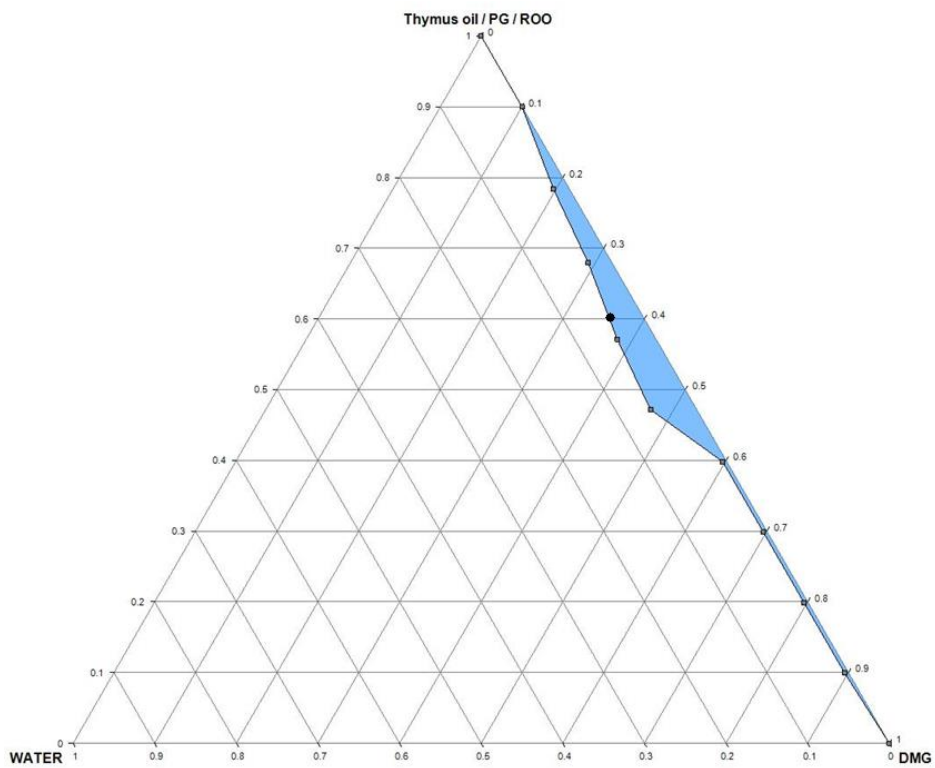
4.2 ΨΕΥΔΟΤΡΙΓΩΝΙΚΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΦΑΣΗΣ

Κατασκευάστηκαν ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσης μικρογαλακτώματων που αναπτύχθηκαν παρουσία και απουσία αιθέριου ελαίου, με άλλα λόγια μικρογαλακτώματα πέντε συστατικών (ελαιόλαδο ραφινέ - αιθέριο έλαιο/ προπυλενογλυκόλη/ DMG/ νερό) ή τεσσάρων συστατικών (ελαιόλαδο ραφινέ/ προπυλενογλυκόλη/ DMG/ νερό), προκειμένου να προσδιοριστεί η έκταση της μονοφασικής περιοχής που αντιστοιχεί σε μικρογαλακτώματα W/O.

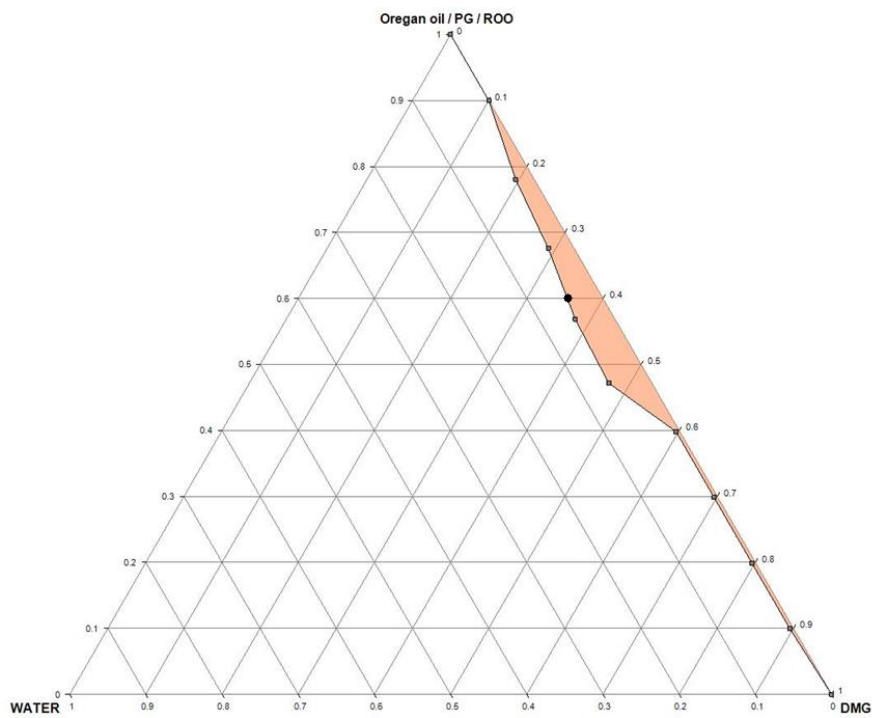
Σε όλες τις εικόνες, η **χρωματισμένη** περιοχή αντιστοιχεί στην **μονοφασική** περιοχή, δηλαδή στις συγκεντρώσεις συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν, με τις οποίες ήταν επιτυχής/εφικτός ο σχηματισμός μικρογαλακτώματος τύπου W/O. Η υπόλοιπη άσπρη περιοχή αντιστοιχεί σε πολυφασική περιοχή.



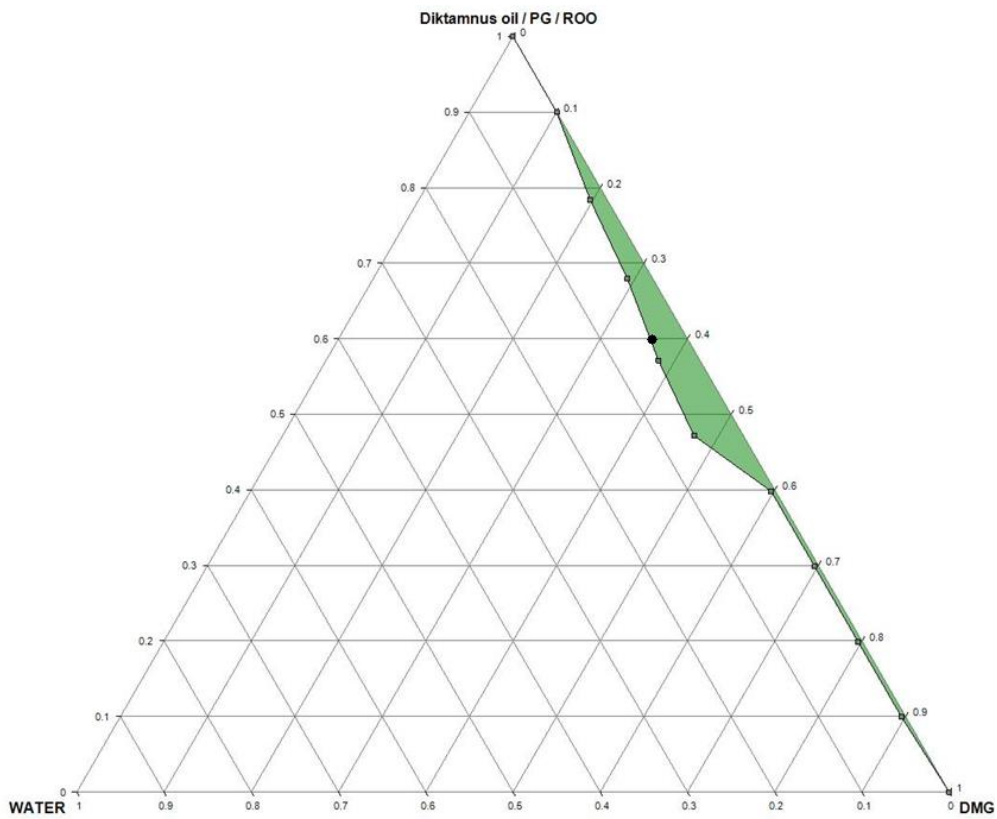
Εικόνα 4.2.1: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα συστήματος (Σ1) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου.



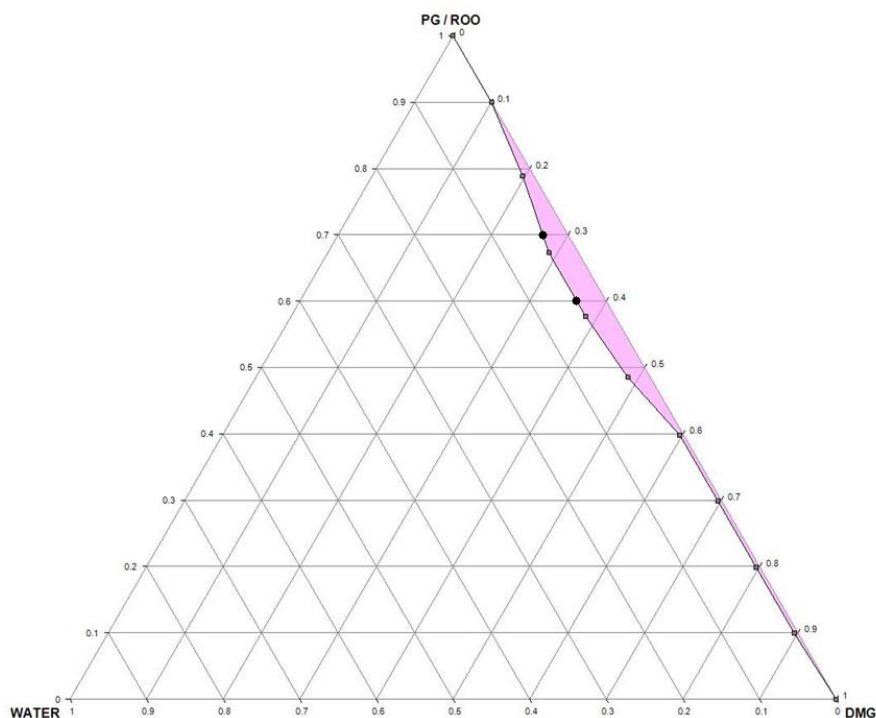
Εικόνα 4.2.2: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ2) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο θυμαριού.



Εικόνα 4.2.3: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ3) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο ρίγανης.



Εικόνα 4.2.4: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ4) - μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο δικτάμου.



Εικόνα 4.2.5: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος (Σ2α+β) - μικρογαλάκτωμα με ελαιόλαδο.

Υπάρχουν ελάχιστες διαφορές στις ποσότητες νερού που μπορεί να ενσωματώσει το κάθε μικρογαλάκτωμα (η συνολική ποσότητα νερού κυμαίνεται στο 4-5%). Μεγαλύτερη ποσότητα νερού φαίνεται να δέχονται τα συστήματα με αιθέριο έλαιο (Σ1, Σ2, Σ3, Σ4). Μικρότερη ανεκτικότητα/χωρητικότητα σε νερό εμφανίζει το σύστημα χωρίς αιθέριο έλαιο (μόνο με ελαιόλαδο, Σ2α+β).

Αρχικώς, όπως φαίνεται από τις εικόνες (Εικόνα 4.2.1 έως Εικόνα 4.2.5), τα μικρογαλακτώματα μπορούν να δημιουργηθούν σε ένα σχετικά μικρό εύρος συγκεντρώσεων. Αυτό είναι λογικό, καθώς η επιφανειοενεργή ουσία που χρησιμοποιήθηκε (DMG) είναι αρκετά λιπόφιλη κι έχει χαμηλή τιμή HLB, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η ενσωμάτωση μεγάλης ποσότητας νερού (Paradimitriou et al., 2008). Από την άλλη, η συνεπιφανειοενεργή ουσία (PG) αν και συγκριτικά έχει υψηλότερη τιμή HLB και είναι κατάλληλη για τη διαλυτοποίηση της υδατικής φάσης, αποτελεί μία από τις λιγότερο υδρόφιλες απλές πολυόλες, οι οποίες είναι διαλυτές στο νερό. Ταυτόχρονα, θεωρείται ελάχιστα διαλυτή στην ελαιώδη φάση (Garti et al., 2001). Άρα, η ποσότητα νερού που ενσωματώνεται στα μικρογαλακτώματα αναμένεται να μην είναι σχετικά πολύ μεγάλη.

Επίσης, όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα, για συγκεντρώσεις ελαιώδους φάσης μεγαλύτερες από 90% και μικρότερες από 30%, δεν διαμορφώνεται μικρογαλάκτωμα, αφού

στο σύστημα δεν ενσωματώνεται καθόλου νερό. Όσο αυξάνεται η ποσότητα του επιφανειοενεργού (DMG), ως ένα σημείο φυσικά, το μικρογαλάκτωμα δεσμεύει όλο και περισσότερο νερό, με τη μέγιστη ποσότητα στη συγκέντρωση 50%-50% (ελαιώδους φάσης-DMG). Η συγκεκριμένη παρατήρηση είναι συνήθης, καθώς οι επιφανειοενεργές ουσίες ελαττώνουν τη διεπιφανειακή τάση που σχηματίζεται μεταξύ ελαιώδους φάσης και υδατικής ενώ ταυτόχρονα, οι συνεπιφανειοενεργές αποσταθεροποιούν τις λυτότροπες υγρές κρυσταλλικές φάσεις προς ευκολότερο σχηματισμό ισότροπων μικκυλιακών διαλυμάτων (Chatzidaki et al., 2016).

Δεδομένου ότι είναι σημαντικό να κρατηθεί η συγκέντρωση του επιφανειοενεργού και του συνεπιφανειοενεργού χαμηλή (50% w/w ελαιόλαδο-αιθέριο έλαιο και 50% w/w DMG-PG μέγιστη δυνατή ποσότητα) για κάθε δυναμική/(πιθανή πρακτική) εφαρμογή του συστήματος σε προϊόντα τροφίμων, επιλέχθηκε ως σύστημα προς μελέτη, η συγκέντρωση ελαιώδους φάση 60% - DMG 40%, η οποία πληρεί τις προϋποθέσεις και ενσωματώνει περίπου 5% νερό, μια αρκετά ικανοποιητική ποσότητα (Chatzidaki et al., 2016). Η τελεία (●) υποδηλώνει το σύστημα που επελέγη για περαιτέρω μελέτη.

Βασιζόμενοι τόσο στα θετικά αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μικρογαλακτωμάτων όσο και σε αυτά των ψευδοτριγωνικών διαγραμμάτων, τα συγκεκριμένα συστήματα μελετήθηκαν σε δομικό επίπεδο. Όσον αφορά στα διαγράμματα φάσης, η επιλογή των συστημάτων, στηρίχτηκε στην ενσωμάτωση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας νερού και στη χρήση όσο το δυνατόν μικρότερης ποσότητας επιφανειοενεργού.

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ DLS

4.3.1. Μέτρηση Δείκτη Διάθλασης (*Refractive Index, RI*)

Για τη δομική μελέτη ενός δείγματος με την τεχνική DLS είναι απαραίτητη η γνώση του δείκτη διάθλασης της συνεχούς φάσης καθώς και του ιξώδους των μικρογαλακτωμάτων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα μικρογαλακτώματα που μετρήθηκαν είχαν ως εξωτερική/συνεχή φάση είτε μόνο ελαιόλαδο ραφινέ (ROO), είτε μίγμα ελαιόλαδου με το εκάστοτε αιθέριο έλαιο (ROO:δενδρολίβανο, θυμάρι, δίκταμο) σταθερής αναλογίας (2:1). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία στους 25°C και οι τιμές του δείκτη διάθλασης (RI) είναι οι εξής:

Δείκτης διάθλασης (RI)

ROO → 1.47

ROO - Δενδρολίβανο → 1.468

ROO - Θυμάρι → 1.481

ROO - Ρίγανη → 1.481

ROO - Δίκταμος → 1.479

4.3.2 Μέτρηση Ιξώδους (*Viscosity*)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η τιμή του μέσου όρου του ιξώδους της συνεχούς φάσης μικρογαλακτωμάτων.

Πίνακας 4.4: Τιμές μέσου όρου ιξώδους συνεχούς φάσης συστημάτων (Σ1, Σ2, Σ3, Σ4, Σ2α, Σ2β).

Συστήματα	Ιξώδες (cP)
Σ1	60.66
Σ2	63.47
Σ3	73.06
Σ4	66.67
Σ2α	106.23
Σ2β	109.65

4.3.3 Μετρήσεις DLS

Προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος και η πολυδιασπορά των υδατικών δομών των μικρογαλακτωμάτων, διεξήχθησαν μετρήσεις με την τεχνική DLS (Papadimitriou et al., 2008). Σε αυτή την τεχνική γίνεται η παραδοχή ότι τα σταγονίδια έχουν σφαιρική δομή χωρίς, ωστόσο να γνωρίζουμε την ακριβή δομή τους και αν το δείγμα είναι αραιό.

Μετρήθηκαν τα συστήματα (Σ1, Σ2, Σ3, Σ4) στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις που παρασκευάστηκαν, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά είτε λόγω απόκλισης από το σφαιρικό σχήμα είτε λόγω μεγάλης συγκέντρωσης. Γι' αυτό το λόγο, αποφασίστηκε να παρασκευαστούν και να μετρηθούν τα ίδια μικρογαλακτώματα με διαφορετική συγκέντρωση (λιγότερη ποσότητα επιφανειοενεργού, DMG 30% – ελαιώδης φάση 70%), με βάση το

διάγραμμα φάσης. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να έχουμε μια αρχική εικόνα/εκτίμηση της δομής των συστημάτων.

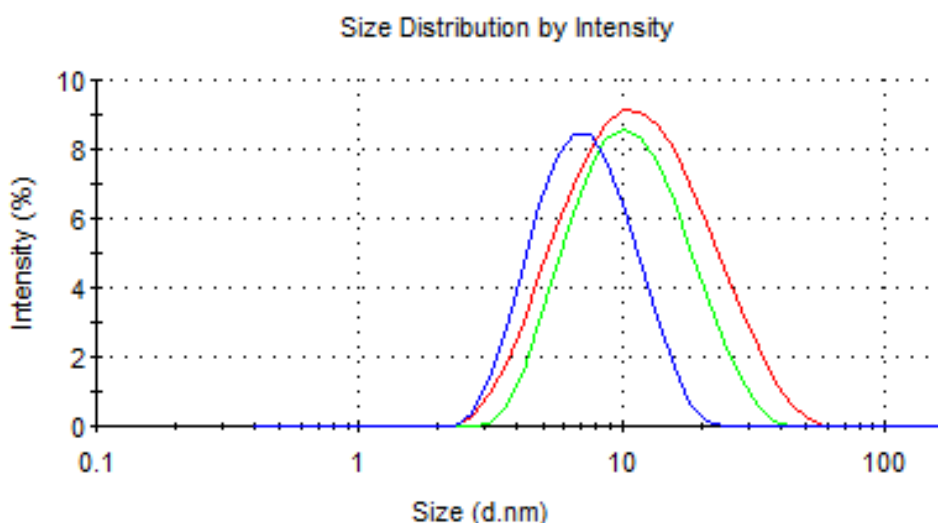
Τα μικρογαλακτώματα μετρήθηκαν απουσία της δραστικής ουσίας νισίνης (Empty) και παρουσία αυτής (Full). Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε τρία ανεξάρτητα πειράματα. Από τη μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών με την τεχνική DLS προσδιορίστηκε το μέγεθος (μέση διάμετρος, d_h) των σταγονιδίων του νερού, αλλά και η ομοιογένεια της δομής τους (δείκτης πολυδιασποράς, PDI). Ο μέσος όρος της υδροδυναμικής διαμέτρου και η μέση τιμή του δείκτη PDI από τις μετρήσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4.5: Τιμές μέσου όρου υδροδυναμικής διαμέτρου d_h και δείκτη πολυδιασποράς, PDI.

Σύστημα	ακτίνα d_h (nm)	δείκτης PDI
Σ1 - Δενδρολίβανο - Empty	13.4 ± 0.1	0.39 ± 0.02
Σ1 - Δενδρολίβανο - Full	16.0 ± 0.4	0.41 ± 0.03
Σ2 - Θυμάρι - Empty	9.0 ± 0.1	0.26 ± 0.02
Σ2 - Θυμάρι - Full	15.6 ± 0.1	0.52 ± 0.01
Σ3 - Ρίγανη - Empty	17.6 ± 1.4	0.73 ± 0.02
Σ3 - Ρίγανη - Full	22.2 ± 0.5	0.72 ± 0.03
Σ4 - Δίκταμο - Empty	11.0 ± 0.4	0.44 ± 0.02
Σ4 - Δίκταμο - Full	12.8 ± 0.4	0.32 ± 0.02

Ο δείκτης πολυδιασποράς (*Polydispersity Index, PDI*) εκφράζει το βαθμό ομοιογένειας των σωματιδίων και κυμαίνεται από 0 έως 1, όσο πιο κοντά η τιμή του PDI στο μηδέν τόσο πιο ομοιογενές είναι το σύστημα (Kalaitzaki et al., 2013). Παρόλα αυτά έχει κάποια όρια τιμών στα οποία τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικά, τα οποία κυμαίνονται μεταξύ $0.1 < PDI < 0.7$.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα διαγράμματα των συστημάτων (Σ1, Σ2, Σ4), χωρίς νισίνη (Empty), με την οποία αποτυπώνεται μια αίσθηση για το μέγεθος των σταγονιδίων τους συγκριτικά.



Εικόνα 4.3.1: Διαγράμματα DLS (Empty) μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια θυμαριού (μπλε γραμμή---), δικτάμου (πράσινη γραμμή---) και δενδρολίβανου (κόκκινη γραμμή---). Μέγεθος υδροδυναμικής διαμέτρου d_h (nm).

Γενικά, το μέγεθος των δομών των σωματιδίων όλων των συστημάτων δεν διαφέρει σημαντικά. Όπως συμπεραίνεται από τον πίνακα, το μέγεθος των (Empty) μικρογαλακτωμάτων (χωρίς νισίνη), είναι μικρότερο συγκριτικά με τα (Full) συστήματα, στα οποία έχει εγκλωβιστεί η βιοδραστική ένωση νισίνη. Το μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων εμφανίζει το μικρογαλάκτωμα με το αιθέριο έλαιο ρίγανης, ακολουθώντας αυτό του δενδρολίβανου, έπειτα του δικτάμου και τέλος του θυμαριού.

Σε όλα τα συστήματα ο δείκτης πολυδιασποράς PdI κυμαίνεται μεταξύ 0.1 έως 0.7, εκτός της ρίγανης, που τον υπερβαίνει ελάχιστα.

Όσον αφορά στα συστήματα που μελετήθηκαν και δεν εμφάνισαν ικανοποιητικά αποτελέσματα (ελαιώδης φάση 60% – DMG 40%), τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στα συγκεκριμένα μικρογαλακτώματα είναι πολύ πιθανή η διασωματιδιακή αλληλεπίδραση. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη ποσότητα επιφανειοενεργής ουσίας, καθώς πραγματοποιούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντίστροφων μικκυλίων, οι οποίες γίνονται αντιληπτές από το μηχάνημα ως διαφορετικές δομές. Γι' αυτό το λόγο, με μεγάλη ποσότητα επιφανειοενεργών ουσιών δεν μπορούμε να εξάγουμε ακριβές συμπέρασμα (Glatter et al, 2001). Επίσης, το μέγεθος των σφαιρικών σταγονιδίων μπορεί να ποικίλλει, με αποτέλεσμα τα μεγαλύτερα σωματίδια πιθανώς να σκεδάζουν περισσότερο καλύπτοντας τα μικρότερα.

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ EPR

Για να μελετηθεί η δυναμική της διεπιφάνειας και οι ιδιότητές της στα μικρογαλακτώματα W/O με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο (Empty & Full), έγιναν μετρήσεις με τη φασματοσκοπική μέθοδο EPR, χρησιμοποιώντας την τεχνική *spin-probing* (Papadimitriou et al., 2008, Chatzidaki et al., 2015).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου του χρόνου συσχέτισης τ_R , της παραμέτρου S , του μέτρου πολικότητας A_N των συστημάτων (Σ1, Σ2, Σ3, Σ4), οι οποίες προέκυψαν από τις προσομοιώσεις των υπολογιστικών προγραμμάτων, καθώς και το αντίστοιχο ιξώδες.

Πίνακας 4.6: Τιμές μέσου όρου του χρόνου συσχέτισης τ_R της παραμέτρου S , και του μέτρου πολικότητας A_N των μικρογαλακτωμάτων με ελαιόλαδο και αιθέρια έλαια (Empty & Full), οι οποίες προέκυψαν από τις προσομοιώσεις των υπολογιστικών προγραμμάτων.

Σύστημα	χρόνος τ_R (ns)	παραμέτρος S	μέτρο πολικότητας A_N
Σ1 - Δενδρολίβανο - Empty	3.79 ± 0.18	0.33 ± 0.05	14.24
Σ1 - Δενδρολίβανο - Full	4.21 ± 0.22	0.34 ± 0.00	14.30
Σ2 - Θυμάρι - Empty	3.73 ± 0.07	0.37 ± 0.00	14.55
Σ2 - Θυμάρι - Full	4.30 ± 0.12	0.38 ± 0.01	14.61
Σ3 - Ρίγανη - Empty	4.21 ± 0.24	0.42 ± 0.01	14.53
Σ3 - Ρίγανη - Full	4.22 ± 0.06	0.42 ± 0.01	14.70
Σ4 - Δίκταμο - Empty	3.81 ± 0.27	0.40 ± 0.03	14.51
Σ4 - Δίκταμο - Full	3.88 ± 0.09	0.38 ± 0.01	14.63

Ακολουθεί ο αντίστοιχος πίνακας με τις τιμές του μέσου όρου του τ_R και του ιξώδους μ , των συστατικών των μικρογαλακτωμάτων, προκειμένου να αποτυπωθεί και αριθμητικά η φασματική πορεία κατασκευής των συστημάτων.

Πίνακας 4.7: Τιμές μέσου όρου του χρόνου συσχέτισης τ_R του μέτρου πολικότητας A_N και του ιξώδους μ , των δειγμάτων (μίγμα: M1, M2, M3, M4), τα οποία περιέχουν (ROO:αιθέριο έλαιο/PG/DMG), των δειγμάτων (R1, R2, R3), τα οποία περιέχουν (ROO:αιθέριο έλαιο) και του ελαιόλαδου (ROO), όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις των υπολογιστικών προγραμμάτων.

<i>Δείγμα</i>	χρόνος τ_R (ns)	μέτρο πολικότητας A_N	Ιξώδες μ (cP)
ROO	4.05 ± 0.04	14.21	67.0
R1 - Δενδρολίβανο	2.06 ± 0.13	15.03	29.9
R2 - Θυμάρι	3.41 ± 0.30	14.90	35.5
R4 - Δίκταμος	2.17 ± 0.00	15.47	34.2
M1 - Δενδρολίβανο	4.88 ± 0.35	14.32	64.1
M2 - Θυμάρι	4.32 ± 0.08	14.72	61.2
M3 - Ρίγανη	4.49 ± 0,43	14.74	66.5
M4 - Δίκταμο	4.42 ± 0,06	14.44	73.3

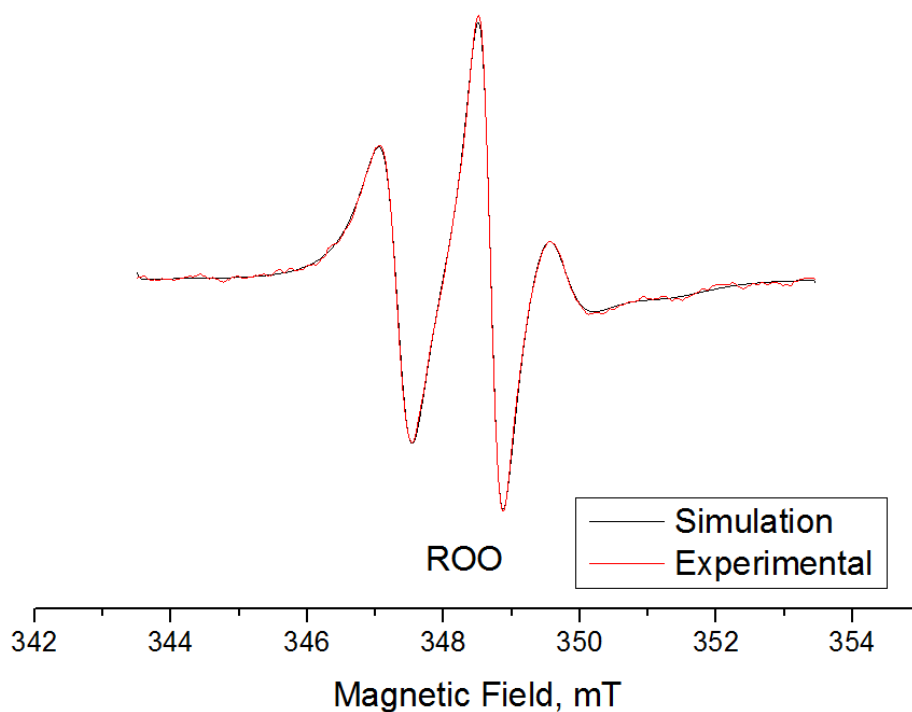
Όπως είναι γνωστό, η κινητικότητα του ανιχνευτή αντανακλάται από τον χρόνο περιστροφικού συσχετισμού τ_R (Kommareddi et al., 1994), ενώ η ελαστικότητα/ακαμψία της μεμβράνης εκφράζεται με την παράμετρο S, όπου για S=0 η κίνηση είναι εντελώς ελεύθερη και για S=1 πλήρως ακινητοποιημένη (Papadimitriou et al., 2008, Kalaitzaki et al., 2013).

Στις παρακάτω εικόνες αποτυπώνεται η φασματική πορεία που ακολουθήθηκε μέχρι το τελικό δείγμα (το μικρογαλάκτωμα), παρουσιάζοντας ενδεικτικά τα φάσματα του συστήματος (Σ1) με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου, απουσία (Empty) και παρουσία νισίνης (Full), καθώς και τα φάσματα των συστατικών του, όπως αναλύθηκαν και αποκτήθηκαν από τα προγράμματα Matlab και Origin 6.1

Αρχικώς, όπως παρατηρείται από τη μορφή των φασμάτων, βρισκόμαστε στην περιοχή “*αργής κίνησης*”, που αφορά σε χρόνους συσχέτισης μεγαλύτερους από $3 \times 10^{-9} \text{s}$ ($\tau_R > 3 \text{ns}$) (Berliner).

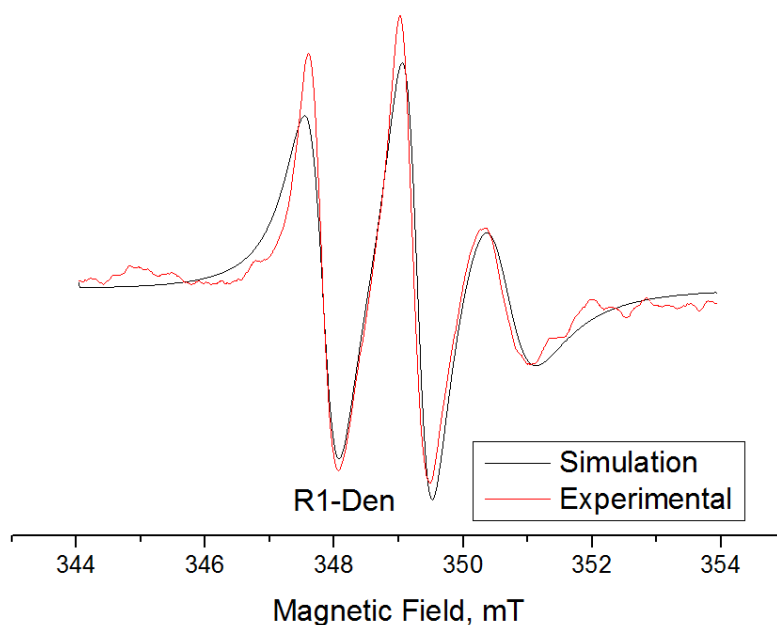
Η ανάλυση της φασματικής πορείας των συστατικών των συστημάτων, μαρτυρά τη συμβολή του καθενός μεμονωμένα για την κατάληξη και εξήγηση της τελικής εικόνας-

φάσματος των μικρογαλακτωμάτων. Στην Εικόνα 4.4.1 απεικονίζεται το φάσμα του ελαιόλαδου (ραφινέ), όπου σύμφωνα και με τον χρόνο τ_R από τον Πίνακα 4.8 πρόκειται για ένα συστατικό που καθυστερεί την κίνηση του ιχνηθέτη 5-DSA.



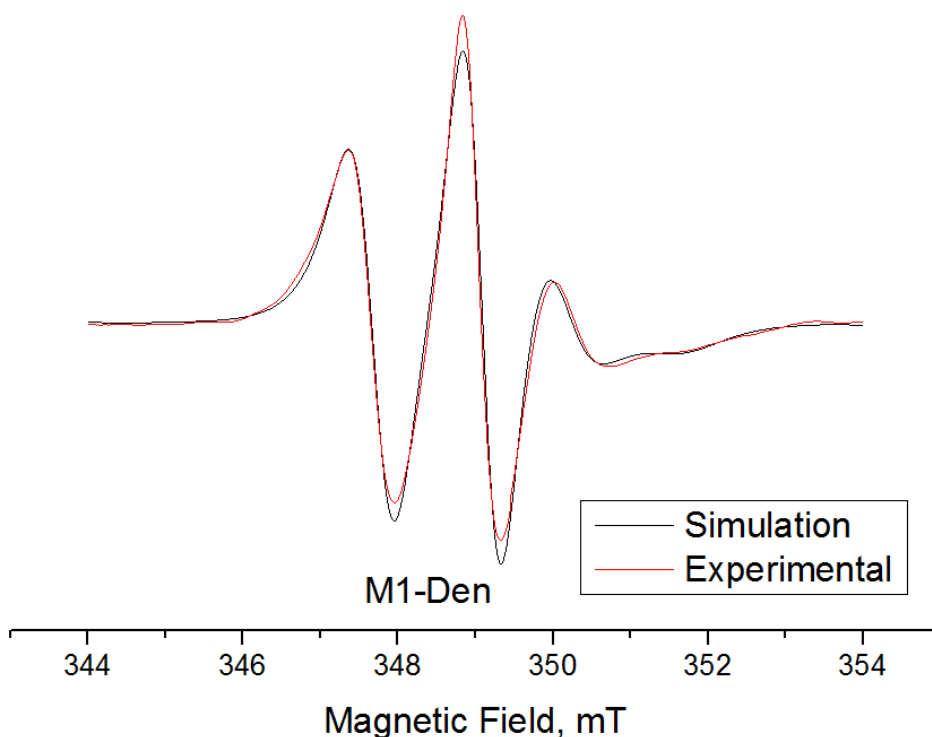
Εικόνα 4.4.1: Φάσμα EPR για το ελαιόλαδο.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου (Εικόνα 4.4.2), ο χρόνος περιστροφής μειώνεται εμφανώς και κυμαίνεται μάλιστα σε τιμές που αντιστοιχούν στην περιοχή ‘*γρήγορης κίνησης*’.



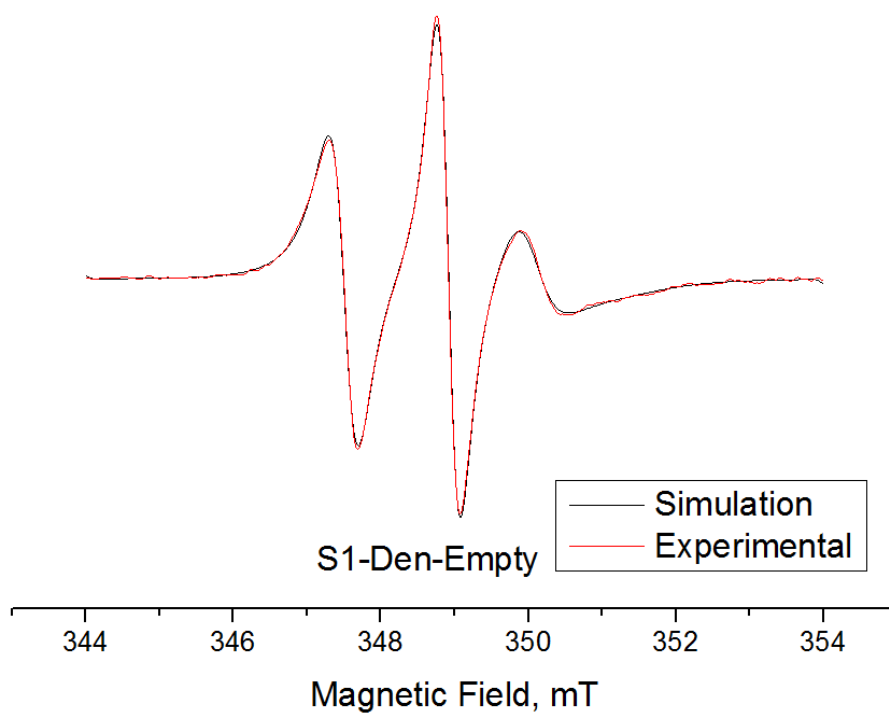
Εικόνα 4.4.2: Φάσμα EPR δείγματος (R1) ελαιόλαδου-δενδρολίβανου.

Με την προσθήκη των επιφανειοενεργών και συνεπιφανειοενεργών ουσιών (Εικόνα 4.4.3), παρατηρείται χαρακτηριστική αλλαγή στον χρόνο αυξάνοντας κατά πολύ την τιμή του. Γενικότερα, όταν οι ουσίες που χρησιμοποιούνται δυσχεραίνουν την κίνηση του ιχνηθέτη, με αποτέλεσμα η τιμή του χρόνου τ_R να μεγαλώνει, παρατηρείται ένα χαρακτηριστικό ‘‘σπάσιμο’’ στη δεξιά πλευρά της καμπύλης του φάσματος. Αυτό είναι ευκρινές τόσο στο φάσμα του ελαιόλαδου (Εικόνα 4.4.1), όσο και στο φάσμα του μίγματος (Εικόνα 4.4.3).

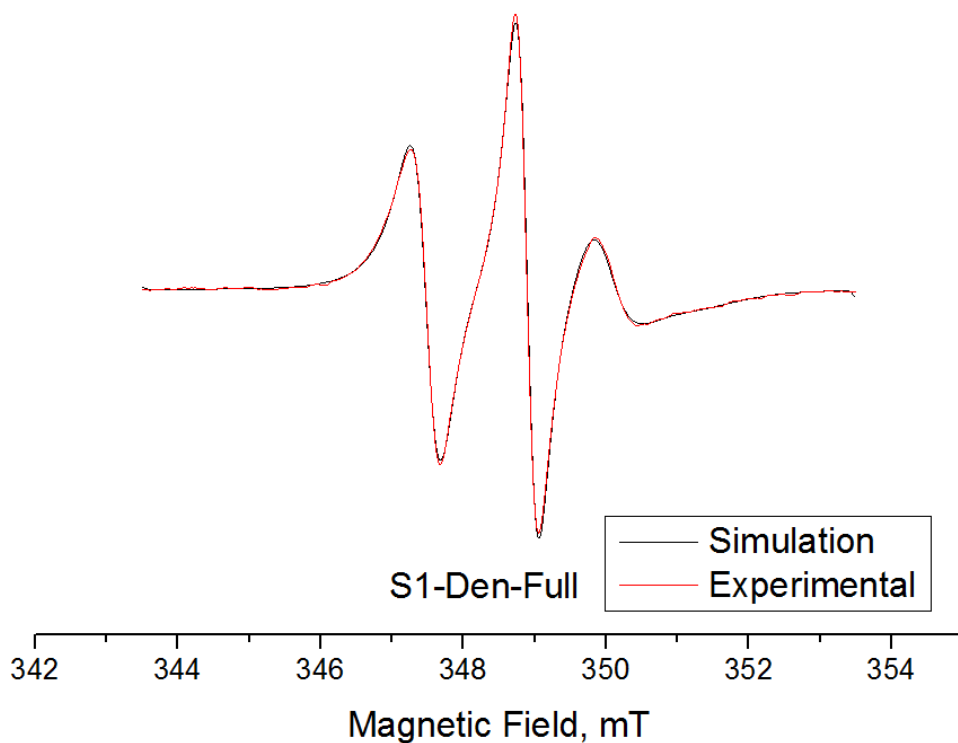


Εικόνα 4.4.3: Φάσμα EPR μίγματος (M1) ελαιόλαδου-δενδρολίβανου/PG/DMG.

Τέλος, η Εικόνα 4.4.4 του φάσματος του μικρογαλακτώματος (Empty) δείχνει την ευκολότερη περιστροφή του 5-DSA, παρουσία νερού.



Εικόνα 4.4.4 Φάσμα EPR (Empty) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (σύστημα Σ1).



Εικόνα 4.4.5 Φάσμα EPR (Full) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (σύστημα Σ1).

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.7, σε όλα τα μικρογαλακτώματα ο χρόνος συσχέτισης τ_R είναι μικρότερος στα Empty δείγματα απ' ό,τι στα Full, πράγμα που σημαίνει ότι ο ιχνηθέτης 5-DSA κινείται/περιστρέφεται ευκολότερα και πιο γρήγορα απουσία νισίνης. Παράλληλα, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του χρόνου τ_R , η τιμή της παραμέτρου S είναι μεγαλύτερη στα Full μικρογαλακτώματα, συγκριτικά με τα Empty, άρα η ακαμψία (λιγότερη/μικρότερη ελαστικότητα) της μεμβράνης των Full μικρογαλακτωμάτων είναι μεγαλύτερη.

Αντίθετα, σε αποτελέσματα παλιότερων μελετών (Γαδ, διπλωματική 2015) μόνο με αιθέρια έλαια (χωρίς ελαιόλαδο) και τη βιοδραστική ένωση νισίνη, η νισίνη έδειχνε να διευκολύνει την κίνηση του ιχνηθέτη (μικρότερη τιμή τ_R) και να συμβάλλει στη μεγαλύτερη ελαστικότητα της μεμβράνης (μικρότερη τιμή S), συγκριτικά με τα συστήματα χωρίς νισίνη (Empty μικρογαλακτώματα). Αυτή η διαφορά, μπορεί να οφείλεται είτε στην προσθήκη νέων/επιπλέον συστατικών (ελαιόλαδο ραφινέ) ή χρήση άλλων (προπυλενογλυκόλη αντί αιθανόλης), στα συστήματα της παρούσας μελέτης.

Η αιθανόλη είναι γνωστό ότι διαχέεται στη μεμβράνη των μικρογαλακτωμάτων και αυξάνει την ελαστικότητά της (Yaghmur et al., 2004), ενώ παράλληλα αλληλεπιδρά και με την νισίνη (Xiao et al., 2010). Επίσης, ένα μέρος της εισέρχεται στην υδατική φάση, συμβάλλοντας έτσι στην ενσωμάτωση περισσότερης ποσότητας νερού (Yaghmur et al., 2004). Μάλιστα, όσο αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του ελαίου που χρησιμοποιείται, τόσο μειώνεται η συγκέντρωσή της στην ελαιώδη φάση και τείνει προς τη διεπιφάνεια και την υδατική φάση (Yaghmur et al., 2002). Αντιθέτως, η προπυλενογλυκόλη φαίνεται να είναι λιγότερο αποτελεσματική στη μείωση της ακαμψίας (αύξηση ελαστικότητας) της μεμβράνης (Garti et al., 2001). Επίσης, η προπυλενογλυκόλη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι μια από τις λιγότερο υδρόφιλες συνεπιφανειοενεργές ουσίες και για αυτό τον λόγο τα μικρογαλακτώματα ενσωματώνουν μικρότερη ποσότητα νερού. Σε αυτό παίζει ρόλο και η προσθήκη νέας ουσίας, του ελαιόλαδου. Το νερό γενικότερα, φαίνεται να καθιστά πιο ελαστική την μεμβράνη, και να διευκολύνει την κίνηση του ιχνηθέτη.

Επίσης, η ανάγκη προσθήκης ελαιολάδου έγγυται στο στόχο της παρούσας εργασίας να δημιουργηθούν εδωδιμοι φορείς της νισίνης. Είναι γνωστό ότι παρ' ό,τι τα αιθέρια έλαια είναι βρώσιμα έως ένα ποσοστό, σε μεγάλες ποσότητες είναι τοξικά για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Τέλος, πιθανολογείται πως η νισίνη ως αμφίφιλη διεισδύει και αυτή στη μεσεπιφάνεια, περιορίζοντας έτσι την κινητικότητά του 5-DSA και καθιστώντας την δομή της μεμβράνης πιο διευθετημένη.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά στα πλαίσια της παρούσας μελέτης η βελτιστοποίηση των συστημάτων οδήγησε στην παρασκευή μικρογαλακτωμάτων τύπου W/O με έλαιο (ελαιόλαδο ραφινέ) και με αιθέρια έλαια (δενδρολίβανο, θυμάρι, ρίγανη, δίκταμο), χρησιμοποιώντας κατά κύριο λόγο συστατικά τα οποία είναι GRAS (Generally Recognized As Safe) και δεν υπόκεινται σε χαμηλούς περιορισμούς στη χρήση τους (επιφανειοενεργή και συνεπιφανειοενεργή ουσία). Σε γενικότερο πλαίσιο, τα μικρογαλακτώματα με αιθέρια έλαια εμφάνισαν καλύτερα αποτελέσματα, συγκριτικά με τα συστήματα μόνο με ελαιόλαδο.

Από τα τριγωνικά διαγράμματα φάσης προέκυψε ότι τα μικρογαλακτώματα μπορούν να ενσωματώσουν παραπλήσια και σχετικά μικρή ποσότητα νερού (4-5% κατά βάρος). Κατάλληλη συγκέντρωση συστατικών που επιλέχθηκε για την παρασκευή τους είναι ελαιώδης φάση 60% - επιφανειοενεργό (DMG) 40%.

Από τη μέθοδο DLS συμπεραίνεται ότι τα συστήματα (ελαιώδης φάση 70% - επιφανειοενεργό 30%) εμφάνισαν ομοιογένεια στη δομή τους. Μάλιστα, τα δείγματα χωρίς νισίνη ήταν κατά κύριο λόγο πιο ομοιογενή συγκριτικά με αυτά που περιέχουν την βιοδραστική ένωση. Επίσης, η υδροδυναμική διάμετρος (d_h) των σταγονιδίων ήταν μικρότερη στα μικρογαλακτώματα χωρίς νισίνη. Οι μικρότερες τιμές d_h παρατηρήθηκαν στο μικρογαλάκτωμα το οποίο περιείχε αιθέριο έλαιο θυμαριού ($d_h=9.0\text{nm}$). Ακολούθησαν τα συστήματα με δίκταμο, μετά με δενδρολίβανο και τέλος με ρίγανη, με αύξουσα σειρά.

Με τη μέθοδο EPR και την τεχνική spin probing, συμπεραίνεται ότι η κίνηση του ιχνηθέτη 5-DSA που χρησιμοποιήθηκε στα μικρογαλακτώματα βρίσκεται στην περιοχή της αργής κίνησης ($\tau_R > 3 \times 10^{-9}\text{s}$). Η περιστροφή του ιχνηθέτη γύρω από τον εαυτό του δυσχεραίνεται παρουσία νισίνης, ενώ ταυτόχρονα η μεμβράνη είναι λιγότερο ελαστική. Άρα, τα συστήματα στα οποία έχει εγκλωβιστεί η βιοδραστική ένωση εμφανίζουν πιο διευθετημένη δομή.

Η κατασκευή της φασματικής πορείας των μικρογαλακτωμάτων από τα συστατικά που αποτελούνται, έδειξε πώς η προσθήκη αιθέριων ελαίων στην ελαιώδη φάση διευκολύνει την περιστροφή του ιχνηθέτη. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ουσία PG σε συνδυασμό με το επιφανειοενεργό DMG ευθυνόταν για τους μεγαλύτερους χρόνους περιστροφής του ιχνηθέτη.

Από την αντιμικροβιακή μελέτη με τη μέθοδο Well Diffusion Assay (WDA), προέκυψε ότι τα μικρογαλακτώματα κυρίως με αιθέρια έλαια, εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα έναντι των βακτηρίων που μελετήθηκαν. Τα συστήματα αποτέλεσαν ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης των θετικών κατά Gram-βακτηρίων *Listeria*

monocytogenes, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Lactococcus lactis*, εκτός του μικροοργανισμού *Escherichia coli*, ο οποίος αποτελεί Gram-αρνητικό βακτήριο. Το μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο δικτάμου εμφάνισε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Η δράση των συστημάτων έναντι των περισσότερων βακτηρίων οφειλόταν κυρίως στο αιθέριο έλαιο που χρησιμοποιήθηκε, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις για τη συνεργιστική δράση νισίνης-αιθέριου ελαίου, κυρίως έναντι του μικροοργανισμού *L. lactis*.

Επομένως, συμπερασματικά θα μπορούσε κανείς να πει ότι τα μικρογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα μεταφοράς, χορήγησης και απελευθέρωσης βιοδραστικών ενώσεων όπως η νισίνη και άλλων αντιμικροβιακών συστατικών όπως τα αιθέρια έλαια, για την εφαρμογή τους σε τρόφιμα, με στόχο την καθυστέρηση της αλλοίωσης τους ή και την παρεμπόδιση ανάπτυξης επικίνδυνων τροφιμογενών μικροοργανισμών. Άλλωστε, τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτές επιζητούν όλο και περισσότερο «φυσικά» τρόφιμα, με χαμηλές συγκεντρώσεις χημικών προσθέτων και λιγότερο επεξεργασμένα, παράλληλα με μεγάλη χρονική διάρκεια, αναδεικνύοντας συστήματα όπως της παρούσας μελέτης ως ιδανικές επιλογές.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Για την ακριβέστερη περιγραφή της δομής των συστημάτων προτείνεται η διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων, χρησιμοποιώντας περισσότερες μεθόδους, όπως ο Προσδιορισμός Ελάχιστης Συγκέντρωσης Παρεμπόδισης (*Determination of minimal inhibitory concentration, MIC*), η Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Σάρωσης (*Scanning electron microscopy, SEM*) για την παρατήρηση των μορφολογικών αλλαγών των χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών κ.α..

Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε η χρήση κι άλλων βιοδραστικών ενώσεων, όπως η βακτηριοσίνη πεδιοσίνη, προκειμένου να διαπιστωθεί αν θα υπάρχουν παρόμοια αποτελέσματα.

Βέβαια, μεγάλη πρόκληση αποτελεί η διαμόρφωση μικρογαλακτωμάτων σε μεγαλύτερους όγκους και ο εγκλωβισμός των βιοδραστικών ενώσεων σε αυτά, με απώτερο στόχο τη μελέτη της συμπεριφοράς των συστημάτων σε “ενεργά” προϊόντα.

Βασική προϋπόθεση για επιτυχή εφαρμογή των συστημάτων που παρασκευάστηκαν με αιθέρια έλαια στη βιομηχανία τροφίμων (γρήγορα γεύματα τύπου ready-to-eat, ήπιας

επεξεργασίας τρόφιμα), είναι η χρήση των μικρογαλακτωμάτων ως μέσα προστασίας, μεταφοράς κι ενίσχυσης βιοδραστικών ενώσεων.

Φυσικά, θετικό βήμα θα είναι η επιλογή των συστημάτων αυτών ως μέσα εγκλωβισμού κατάλληλων δραστικών ενώσεων και σε άλλες εφαρμογές (βιομηχανία φαρμάκων, ιατρική, κτηνιατρική).

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aly S., Flourey J., Piot M., Lortal S., Jeanson S., (2012), The efficacy of nisin can drastically vary when produced in situ in model cheeses, *Food Microbiology*, Volume 32, pp.185-190
- Amadei D., Chatzidaki M.D, Devienne J., Monteil J., Cansell M., Xenakis A., Leal-Calderon F., (2014), Low shear-rate process to obtain transparent W/O fine emulsions as functional foods, *Food Research International*, 62, 533–540
- Avramiotis S., Cazianis C., Xenakis A., (1999), Interfacial properties of lecithin microemulsions in the presence of lipase, A membrane spin-probe study, *Langmuir*, 15, 2375-2379.
- Avramiotis S., Papadimitriou V., Hatzara E., Bekiari V., Lianos P., Xenakis A., (2007), Lecithin organogels used as bioactive compounds carriers, A microdomain properties investigation, *Langmuir*, 23, 4438-47
- Axelsson L. & Ahrne S., (2000), Food and medicine: Lactic acid bacteria (13), *F. G. Priest and M Goodfellow (eds.), Applied Microbial Systematics*, 13, 367-388, 2000 Kluwer Academic Publishers.
- Belle V., Rouger S., Costanzo S., Liquiere E., Strancar J., Guigliarelli B., Fournel A., Longhi S., (2008), Mapping α -helical induced folding within the intrinsically disordered C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein by site-directed spin-labeling EPR spectroscopy, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73, 973-988.
- Benichou A., Aserin A., Gardi N., (2001), Polyols, High Pressure, and Refractive Indices Equalization for Improved Stability of W/O Emulsions for Food Applications, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 22, 269-280
- Berliner L. & Reuben J., Spin labeling: theory and applications, *Springer Science & 676 Business Media* 2012, 8
- Burt S., (2004), Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253
- Carrington A., & McLachlan A., (1967), Introduction to magnetic resonance with applications to chemistry and chemical physics. *New York*.
- Chatzidaki M.D., Arik N., Monteil J., Papadimitriou V., Leal-Calderon F., Xenakis A., (2016), Microemulsion versus emulsion as effective carrier of hydroxytyrosol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 137, 146
- Chatzidaki M.D., Mitsou E., Yagmur A., Xenakis A., Papadimitriou V., (2015), Formulation and characterization of food-grade microemulsions as carriers of natural phenolic antioxidants,

Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 483, 130

- Chorianopoulos N.G., Nychas G.J.E., Haroutounian S.A., (2007), Essential Oils of *Lamiaceae* Family Taxa as Natural Preservatives of Food Preparations, *Food, 2007 Global Science Books*
- Constantinides P.P. & Scalart J.P, (1997), Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long-versus medium-chain glycerides, *International Journal of Pharmaceutics*, 158, 57-68
- Constantinides P.P., (1995), Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects, *Pharmaceutical research*, 12, 1561-1572
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P., (2005), Bacteriocins: Developing innate immunity for food, *Nature Reviews, Microbiology*, 3, 777-788
- Danielsson I. & Lindman B., (1981), The Definition of amicroemulsion, *Colloids and Surfaces*, 3, 391-392
- Di Meglio J.M., Dvolaitzky M., Taupin C., (1985), Determination of the rigidity constant of the amphiphilic film in " birefringent microemulsions": the role of the cosurfactant, *The Journal of Physical Chemistry*, 89, 871-874.
- Embuscado M.E., (2015), Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review, *Journal of functional foods*, 18, 811-819
- Fanun M., Papadimitriou V., Xenakis A., (2011), Characterization of cephalixin loaded nonionic microemulsions, *J Colloid Interface Sci*, 361, 115-121.
- Flanagan J. & Singh H., (2006), Microemulsions: A Potential Delivery System for Bioactives in Food, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 221-237
- Fleisher A. & Sneer N., (1982), Oregano spices and *Origanum* chemotypes, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33, 441-446
- Fonseca-Santos B., Gremiao M.P., Chorilli M., (), Nanotechnology-based delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease, *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4981-5003
- Gao F.H., Abee T., Konigs W.N., (1991), Mechanism of Action of the Peptide Antibiotic Nisin in Liposomes and Cytochrome c Oxidase-Containing Proteoliposomes, *American Society for Microbiology*, 57, 2164-2170
- Garti N., (2003), Microemulsions as microreactors for food applications, *Current opinion in colloid & interface science*, 8, 197-211
- Garti N., Yaghmur A., Leser M.E, Clement V., Watzke H.J., (2001), Improved Oil Solubilization in Oil/Water Food Grade Microemulsions in the Presence of Polyols and Ethanol, *Journal of Argicultural and food Chemistr*, 49, 2552- 2562

- Gillor O., Etzion A., Riley M.A., (2008), The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics, *Appl Microbiol Biotechnol*, 81, 591–606
- Glatter O., Orthaber D., Stradner A., Scherf G., Fanun M., Garti N., Clement V., Leser M.E., (2001), Sugar-Ester Nonionic Microemulsion: Structural Characterization, *J Colloid Interface Sci*, 241, 215-225
- Gratia A., (1925), Sur un remarquable exemple d'antagonisme entredeux souches de coilbacille, *Comp Rend Soc Biol*, 93, 1040–1041
- Griffin C., (1949), Calcul de l'indice HLB des surfactifs non ioniques, *J. Soc. Cosm. Chemist*, 1, 311-325.
- Griffith O.H. & Jost, P.C., (1976), In: Spin Labeling, Theory and Applications, *Lipid Spin Labels in Biological Membrane*, 454-523. L.J. Berliner, Academic press, New York
- Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maguin E., (2002), Stress responses in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 187-216
- Gulik-Krzywicki T. & Larsson K., (1984), An electron microscopy study of the L2 phase (microemulsion) in a ternary system: triglyceride/monoglyceride/water, *Chemistry and physics of lipids*, 35, 127-132.
- Hansen J.N., (1994), Nisin as a Model Food Preservative, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 1, 69-93
- Harzallah D. & Belhadj H., (2013), Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Humanm GI Muccosal Barrier, *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Genetics and Molecular Biology, Biochemistry, 8, 197-213
- Hassan P.A., Rana S., Verma G., (2014), Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering, *Langmuir*, 31, 3-12.
- Hemmelmann M., Kurzbach D., Koynov K., Hinderberger D., Zentel R., (2012), Aggregation Behavior of Amphiphilic p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymers Studied by FCS and EPR Spectroscopy, *Biomacromolecules* 2012, 13, 4065–4074, (American Chemical Society)
- Kalaitzaki A., Papanikolaou N.E., Karamaouna F., Dourtoglou V., Xenakis A., Papadimitriou V., (2015), Biocompatible colloidal dispersions as potential formulations of natural pyrethrins: A structural and efficacy study, *Langmuir* 31, 5722-5730
- Kalaitzaki A., Pouloupoulou M., Xenakis A., Papadimitriou V., (2013), Surfactant-rich biocompatible microemulsions as effective carriers of methylxanthine drugs. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 80-87

- Klaenhammer Todd R., (1988), Bacteriosins of lactic acid bacteria, *Biochimie*, Volume 70, 337-349
- Kogan A., Rozner S., Mehta S., Somasundaran P., Aserin A., Garti N., Ottaviani M.F., (2009), Characterization of the Nonionic Microemulsions by EPR. I. Effect of Solubilized Drug on Nanostructure, *J. Phys. Chem. B*, 113, 691–699
- Kokkini S., Karousou R., Dardioti A., Krigas N., Lanaras T., (1997), Autumn essential oils of Greek oregano, *Phytochemistry*, 44, 883–886
- Kokkini S., Karousou R., Vokkou D., (1994), Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece, *Bioch. System. Ecol.*, 22, 517-528
- Kommareddi N.S., O'Connor K.C., John V.T., (1994), EPR characterizations of α -chymotrypsin active site dynamics in reversed micelles at enhanced gas pressures and after subjection to clathrate formation conditions, *Biotechnology and bioengineering*, 43, 215-224.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Cooteand P.J., Nychas G.J.E., (2001), A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462
- Lawrence M.J. & Rees G.D., (2012), Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 175-193
- Lawrence M.J., Rees G.D., (2000), Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45, 89-121
- Leal-Calderon F., Schmitt V., Bibette J., (2007), *Emulsion science: basic principles*, Springer Science & Business Media
- Lee K.L., Applications and Use of Microemulsions, (2010), London
- McClements D.J., (2010), Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance, *The Royal Society of Chemistry*, 7, 2297–2316
- McClements D.J., (2012), Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8, 1719–1729
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V., (2013), Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria, *Pharmaceuticals*, 6, 1451-1474
- Nychas G.J.E., (1995), Natural antimicrobials from plants, In *New Methods of Food Preservation*, ed. Gould, G.W., London: Blackie Academic Professional, pp. 58–89.
- Papadimitriou V., Pispas S., Syriou S., Pournara A., Zoumpanioti M., Sotiroudis T.G., Xenakis A., (2008), Biocompatible microemulsions based on limonene: formulation, structure, and applications, *Langmuir*, 24, 3380-3386

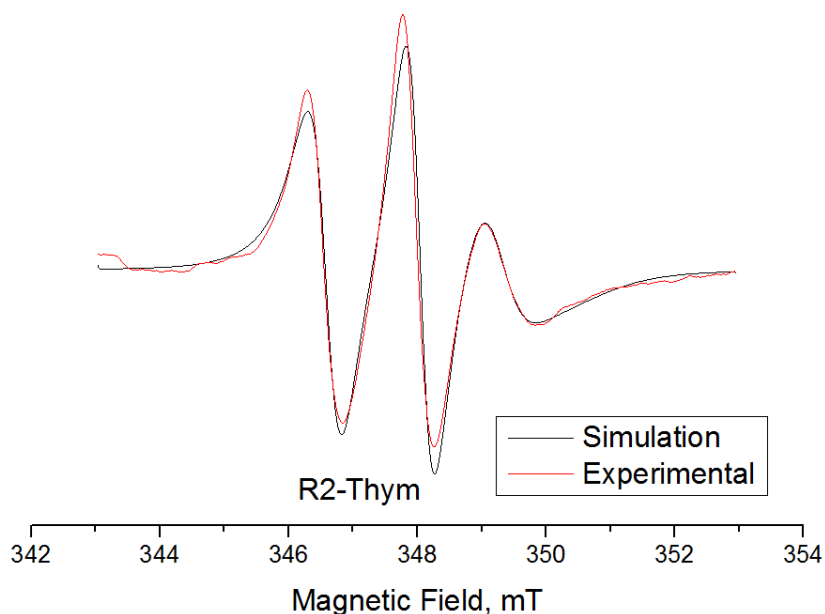
- Papadimitriou V., Sotiroidis T.G., Xenakis A., (2007), Olive oil microemulsions: enzymatic activities and structural characteristics, *Langmuir*, 23, 2071-2077.
- Papageorgiou V., Gardeli C., Mallouchos A., Papaioannou M., Komaitis M., (2008), Variation of the Chemical Profile and Antioxidant Behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7254–7264
- Perez R.H., Perez M.T.M., Elegado F.B., (2015), Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses and Prospects, *International Journal of Philippine Science and Technology*, 8, 61-67
- Rao J. & McClements D.J., (2011), Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil, *Food Hydrocolloids*, 25, 1413-1423.
- Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A., Rezaei M.B., (2008), Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils, *International Journal of Food Microbiology*, 122, 135–139
- Rogers L.A. & Whittier E.O., (1928), Limiting factors in the lactic fermentation, *J Bacteriol*, 16, 211.
- Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A., (2004), Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3^d Edition, *Revised and Expanded, Food Science and Technology*
- Schulman J. H., Stoeckenius W., Prince L.M., (1959), Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *The Journal of Physical Chemistry*, 63, 1677-1680
- Senatore F., (1996), Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44,1327-1332
- Shah P., Bhalodia D., Shelat P., (2010), Nanoemulsion: a pharmaceutical review, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1, 24–32.
- Sharma R.K., (2014), Surfactants: Basics and Versatility in Food Industries, *PharmaTutor*, 2, 3
- Shi C., Zhang X., Zhao X., Meng R., Liu Z., Chen X., Guo N., (2017), Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk, *Food Control*, 71, 10-16
- Shin J.M., Gwak J.W., Kamarajan P., Fenno J.C., Rickard A.H., Kapila Y.L., (2015), Review Article: Biomedical applications of nisin, *Journal of Applied Microbiology*

- Skandamis P., Tsigarida E., Nychas G.J.E., (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*, 16, 31-35
- Skandamis P., Tsigarida E., Nychas G.J.E., (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*, 19, 97-103
- Skoutas D., Haralabopoulos D., Avramiotis S., Sotiroidis T.G., Xenakis A., (2001), Virgin olive oil: Free radical production studied with spin-trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 1121-1125.
- Stamatis H., Xenakis A., Kolisis F.N., (1999), Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. *Biotechnology Advances*, 17, 293-318
- Stefanaki A., Cook M.C., Lanaras T., Kokkini S., (2015), The Oregano plants of Chios Island (Greece): Essential oils of *Origanum onites L.* growing wild in different habitats, *Industrial Crops and Products*
- Tassou C.C., Chorianopoulos N.G., Skandamis P.N., Nychas G.J.E., (2012), Herbs, spices and their active components as natural antimicrobials in foods, *Woodhead Publishing Limited*
- Teather R.M., Kalmokoff M.L., Whitford M.F., (1999), The Role of Bacteriocins in Rumen Microbial Ecology, *The Rumen Microbial Ecosystem Microbial Biosystems: New Frontiers*
- Tzika E.D., Christoforou M., Pispas S., Zervou M., Papadimitriou V., T.G., Sotiroidis, Leontidis E., Xenakis A., (2011), Influence of Nanoreactor Environment and Substrate Location on the Activity of Horseradish Peroxidase in Olive Oil Based Water-in-Oil Microemulsions, *Langmuir*, 27, 2692-2700
- Ultee A., Kets E.P.W., Alberda M., Hoekstra F.A., Smid E.J., (2000), Adaptation of the food borne pathogen *Bacillus cereus*, to carvacrol, *Archives of Microbiology*, 174, 233-238
- Vilela J., Martinsa D., Monteiro-Silva F., González-Aguilar G., de Almeida J.M.M.M., Saraiva C., (2016), Antimicrobial effect of essential oils of *Laurus nobilis L.* and *Rosmarinus officinalis L.* on shelf-life of minced “Maronesa” beef stored under different packaging conditions, *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 71–80
- Wells J.M., Robinson K., Chamberlain L.M., Schofield K.M., Le Page R.W., (1996), Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 317–330
- Wu C., Huang J., Zhou R., (2013), Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol*
- Xenakis A., & Cazianis C., (1988), Solubilization of phosphorylase into microemulsion droplets. An ESR study, *Progress in Colloid and Interface Science*, 76, 159-164

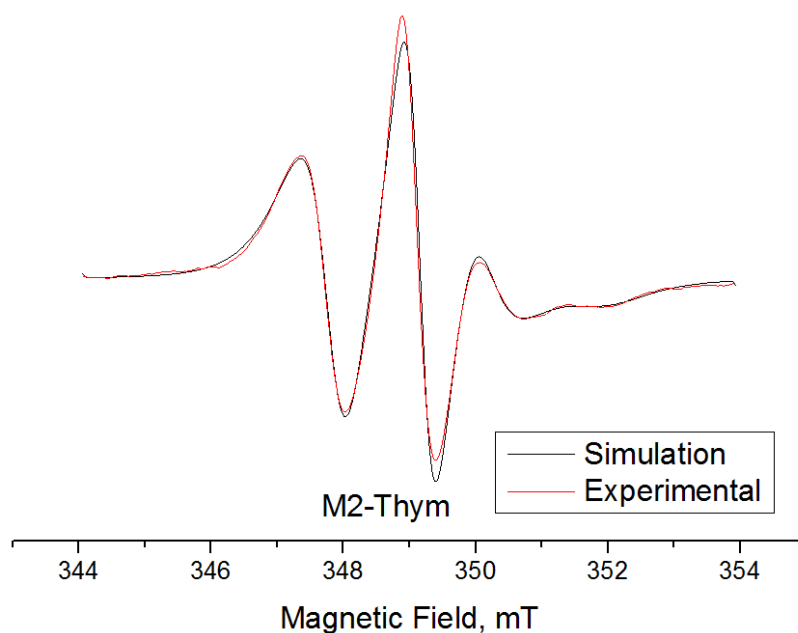
- Xiao D., Davidson P.M., D'Souza D.H., Lin J., Zhong Q., (2010), Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2.5% preparation, *Journal of Food Engineering*, 100, 194-200
- Yaghmur A., Aserin A., Garti N., (2002), Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chain alcohols, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 209, 71-81
- Yaghmur A., De Campo L., Aserin A., Garti N., Glatter O., (2004), Structural characterization of five-component food grade oil-in-water nonionic microemulsions, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6, 1524-1533
- Zhang Z., Vriesekoop F., Yuan Q., Liang H., (2014), Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion, *Food Chemistry*, 150, 307–312
- Zoumpantioti M., Stamatis H., Papadimitriou V, Xenakis, A., (2006), Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane–1-propanol–water surfactantless microemulsion systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 47, 1-9
- Δεληγιαννάκης Γ., Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού EPR, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Φυσικής
- Κατσιώτης Θ.Σ. & Χατζοπούλου Π.Σ., (2010), Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια, *Παραγωγή, Επεξεργασία, Μεταποίηση, Αξιοποίηση, Διεθνείς Αγορές, Αρωματοποιία, Αρωματοθεραπεία*, Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη
- Κουτσός Θ.Β., (2007), Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, *Αναφορά στη Βιολογική και Βιοδυναμική Γεωργία*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη
- Παναγιώτου Κ., Διεπιφανειακά Φαινόμενα και Κolloειδή Συστήματα, (1998), Β' έκδοση, Θεσσαλονίκη
- Σαρλής Γ.Π., (1994), Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Αθήνα
- Σκουμπής Β., (1985), Αρωματικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια, Θεσσαλονίκη
- Στεφανάκη-Νικηφοράκη Μ., (1999), Συστηματική Βοτανική, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
- EFSA (European Food Safety Authority), 2011
- FAO (Food & Agricultural Organization), 2002
- FDA (Food & Drug Organization), 1988
- SCF (Scientific Committee on Food), 1997
- WHO (World Health Organization), 1997

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

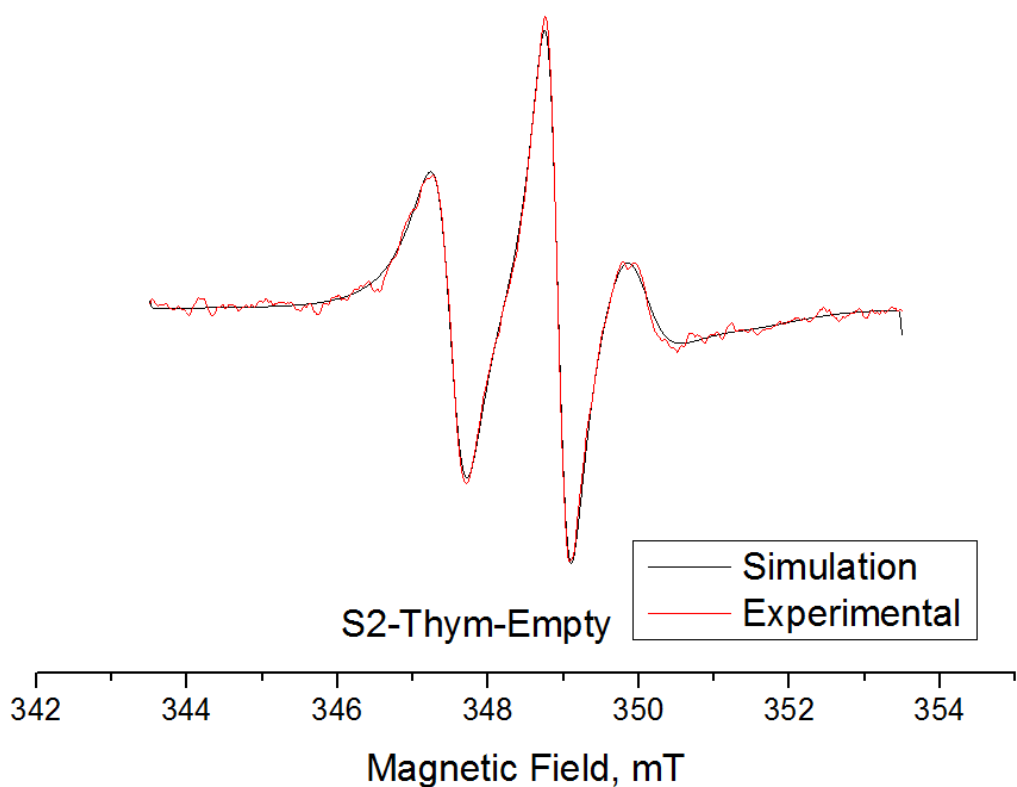
Παρουσιάζονται οι υπόλοιπες εικόνες των φασμάτων EPR, όπως προέκυψαν από τα υπολογιστικά προγράμματα προσομοίωσης, για τα μικρογαλακτώματα με αιθέριο έλαιο θυμαριού, ρίγανης και δικτάμου (συστήματα Σ2, Σ3, Σ4), απουσία (Empty) και παρουσία νισίνης (Full), καθώς και των δειγμάτων (R2, R4) ελαιόλαδου-αιθέριου ελαίου και (M2, M3, M4) ROO-αιθέριου ελαίου PG/ DMG.



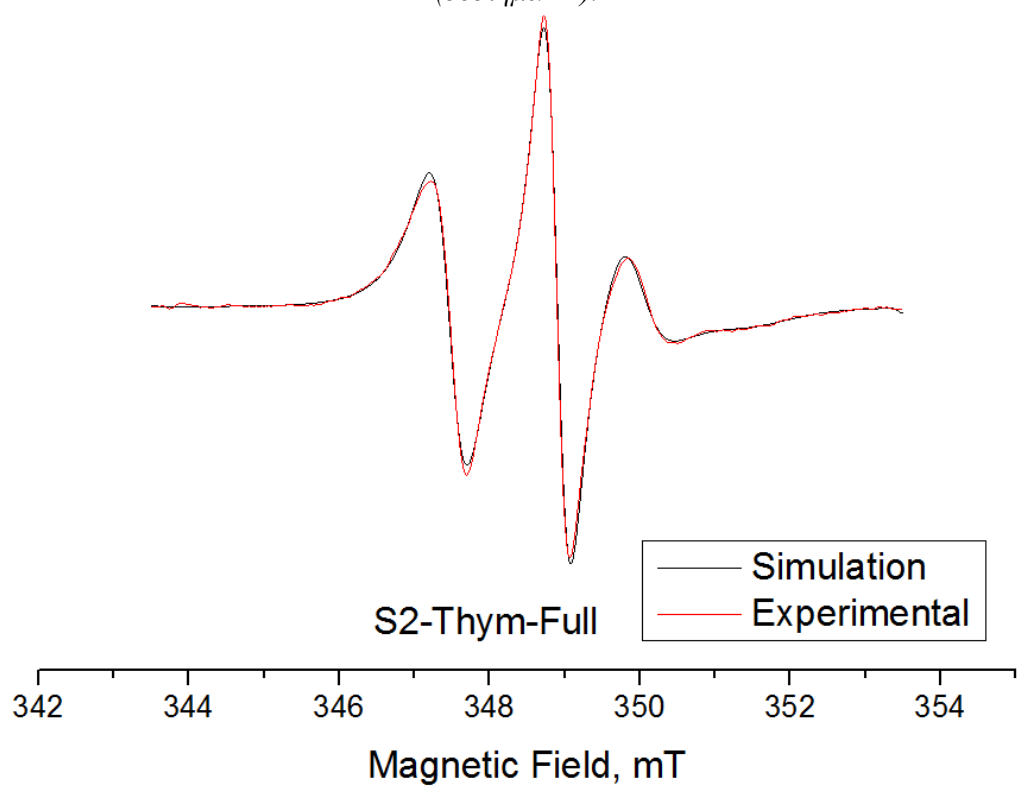
Εικόνα 1: Φάσμα EPR δείγματος (R2) ελαιόλαδου-θυμαριού.



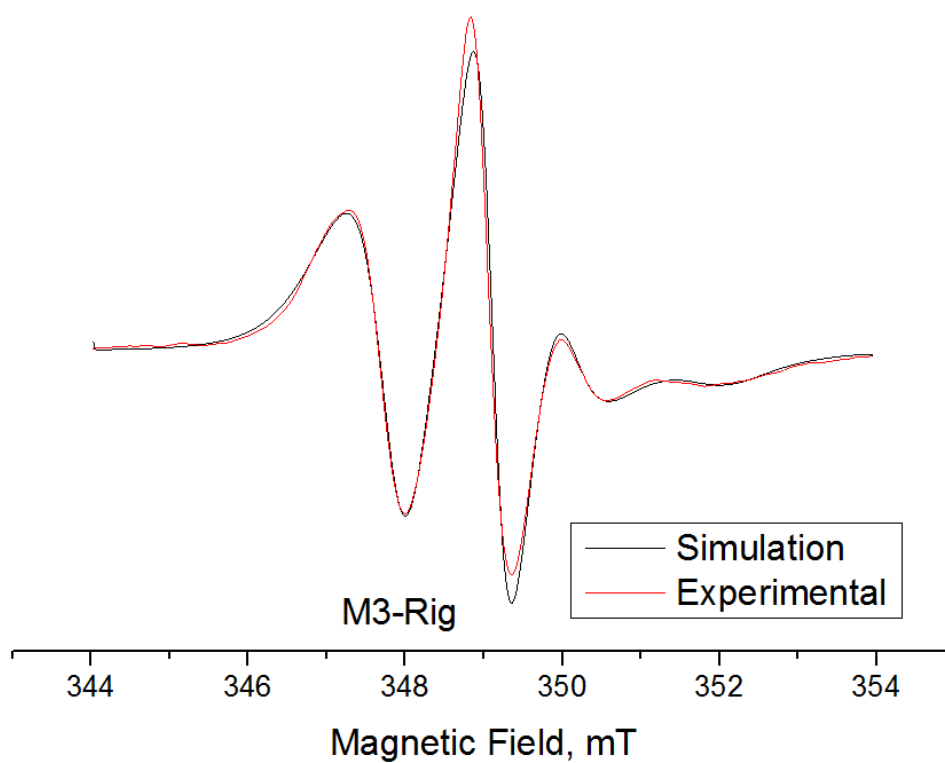
Εικόνα 2: Φάσμα EPR μίγματος (M2) ελαιόλαδου-θυμαριού/PG/DMG.



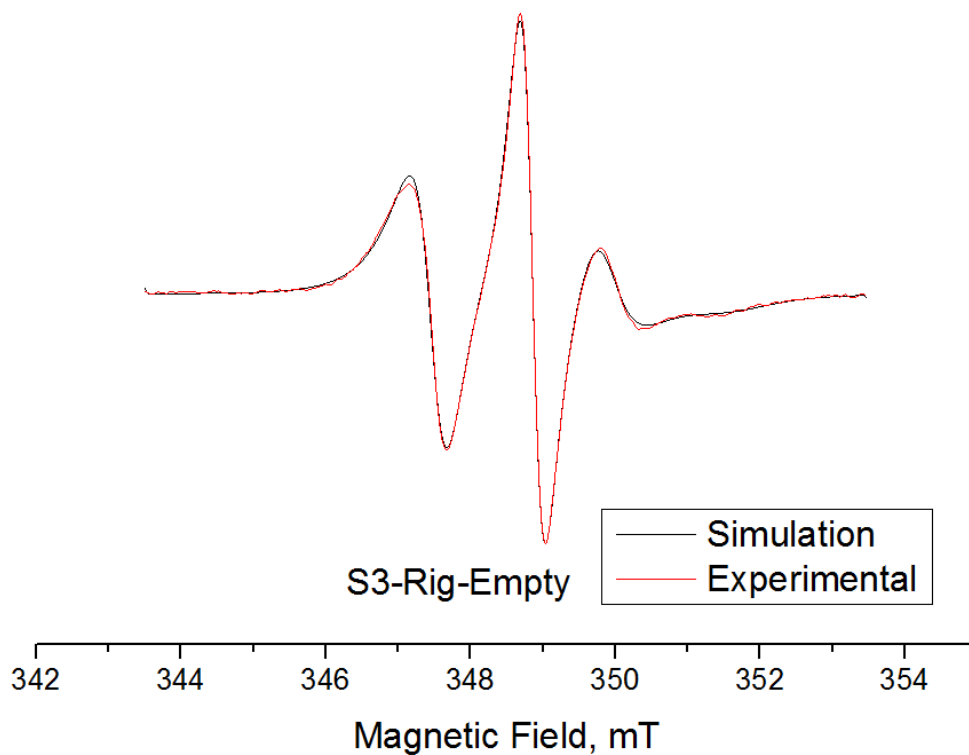
Εικόνα 3: Φάσμα EPR (Empty) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο θυμαριού (σύστημα Σ2).



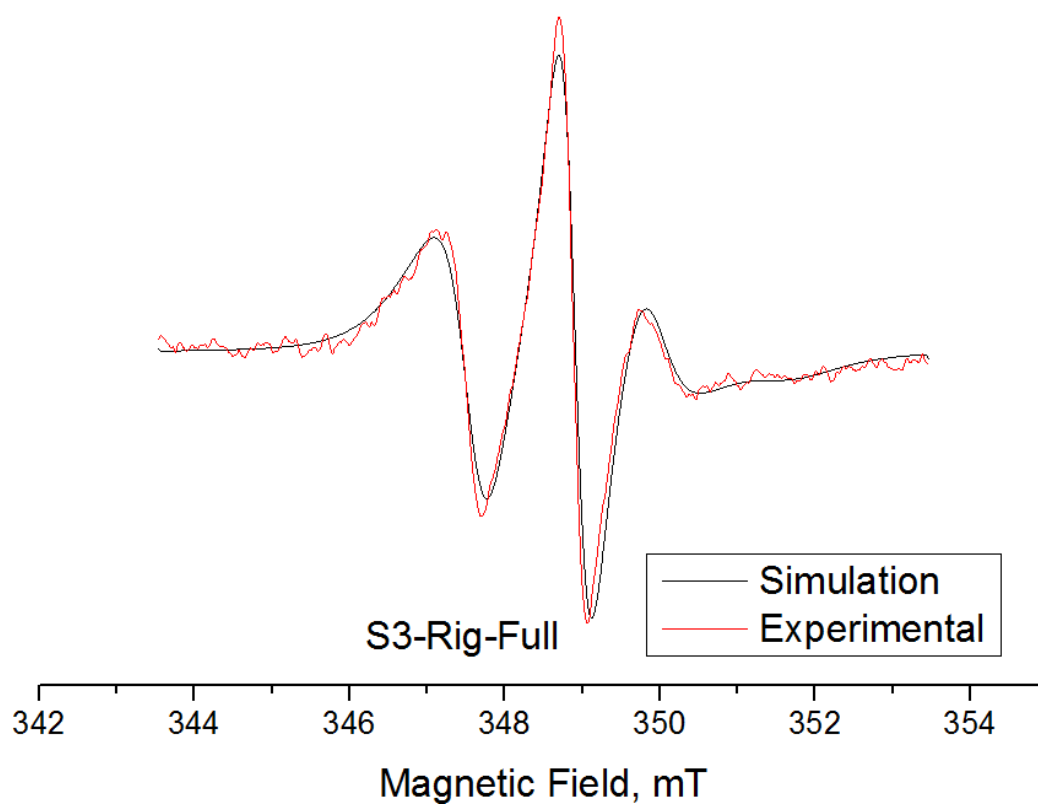
Εικόνα 4: Φάσμα EPR (Full) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο θυμαριού (σύστημα Σ2).



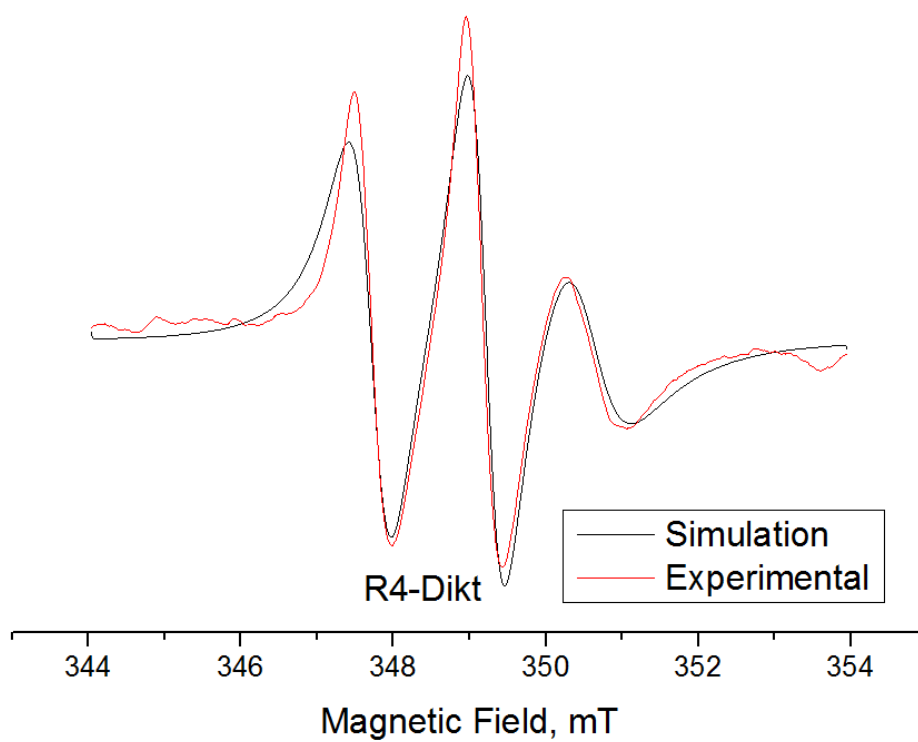
Εικόνα 5: Φάσμα EPR μίγματος (M3) ελαιόλαδου-ρίγανης/PG/DMG.



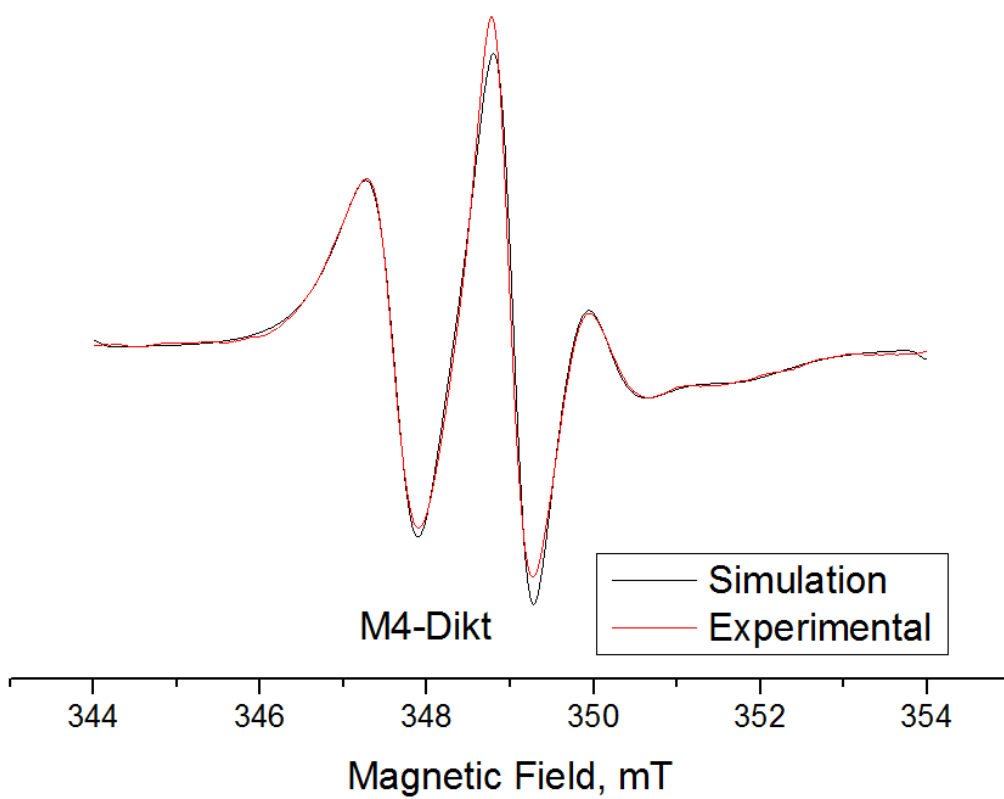
Εικόνα 6: Φάσμα EPR (Empty) μικρογαλακτόματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο ρίγανης (σύστημα Σ3).



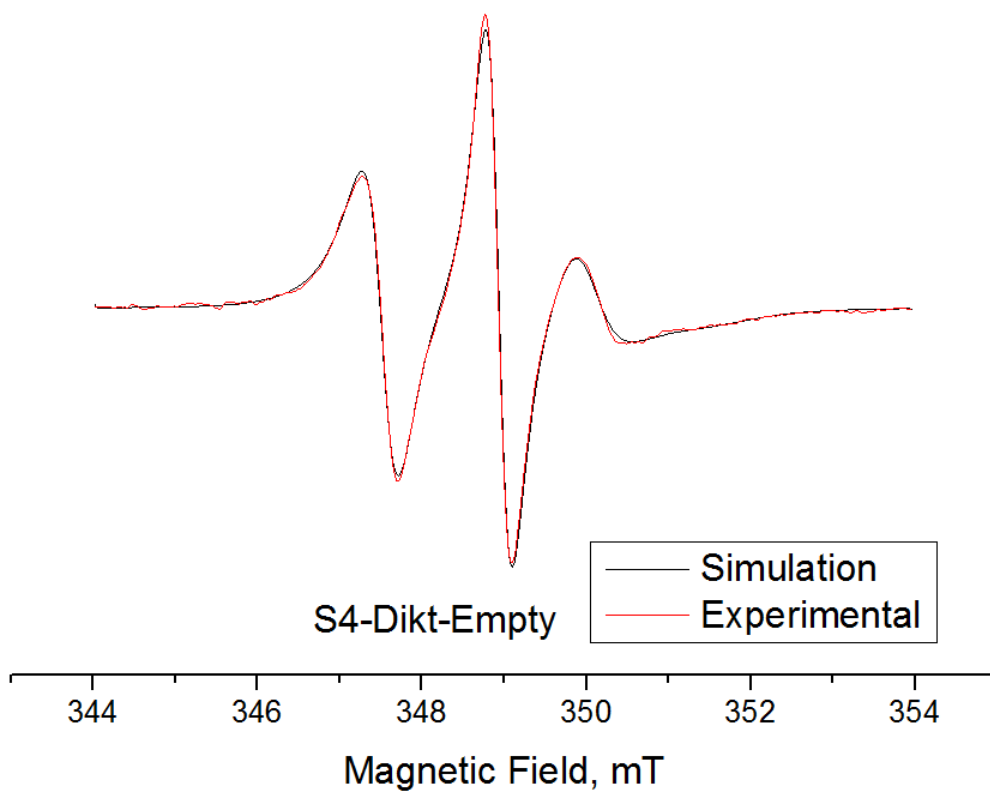
Εικόνα 7: Φάσμα EPR (Full) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο ρίγανης (σύστημα Σ3).



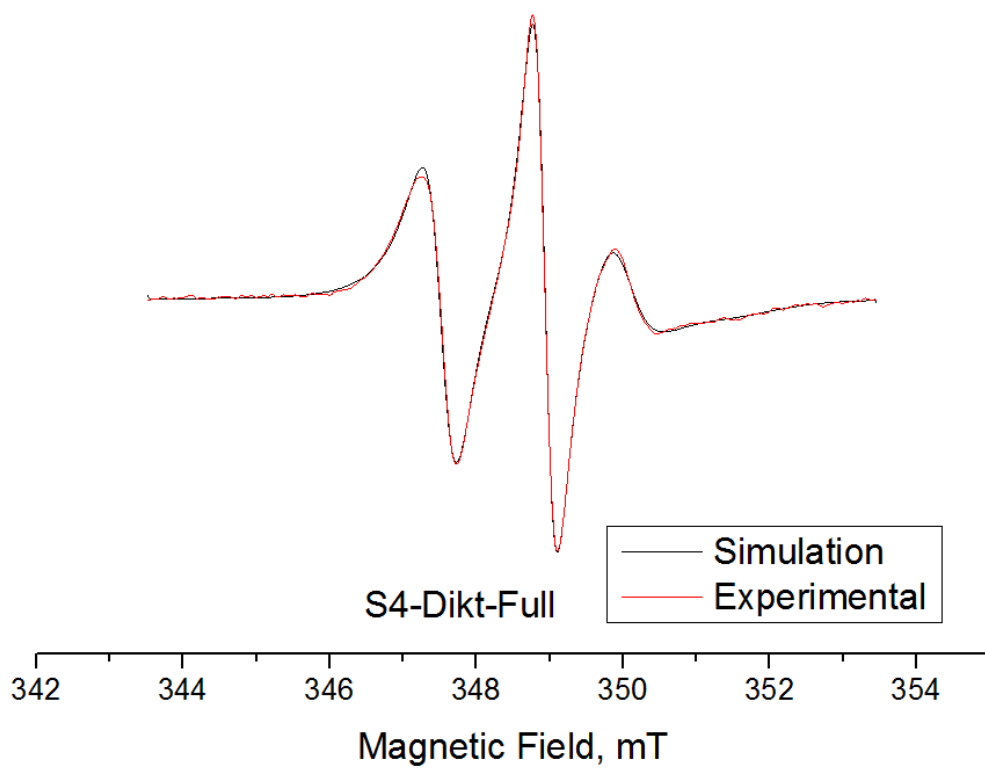
Εικόνα 8: Φάσμα EPR δείγματος (R4) ελαιόλαδου-δικτάμου.



Εικόνα 9: Φάσμα EPR μίγματος (M4) ελαιόλαδου-δικτάμου/PG/DMG.



Εικόνα 10: Φάσμα EPR (Empty) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο δικτάμου (σύστημα Σ4).



Εικόνα 11: Φάσμα EPR (Full) μικρογαλακτώματος με ελαιόλαδο και αιθέριο έλαιο δικτάμου (σύστημα Σ4).