

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής Του Ανθρώπου

&

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών

Δ.Π.Μ.Σ

**«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών
Προϊόντων»**

**«Διερεύνηση της δυνατότητας εμπλουτισμού των λιπαρών του
γάλακτος με βακτηριοσίνες ενεργές έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων
μικροοργανισμών των τροφίμων»**

Γεωργία Γ. Κορδαλή

Επιβλέπων Μέλος ΔΕΠ: Καθ. Τσακαλίδου Ε.

Αθήνα, Νοέμβριος 2013

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής Του Ανθρώπου
&
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών
Δ.Π.Μ.Σ
«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών
Προϊόντων»

«Διερεύνηση της δυνατότητας εμπλουτισμού των λιπαρών του γάλακτος με βακτηριοσίνες ενεργές έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων»

Γεωργία Γ. Κορδαλή

Επιβλέπων Μέλος ΔΕΠ: Καθ. Τσακαλίδου Ε.

Εξεταστική επιτροπή: Καθ. Τσακαλίδου Ε. ΓΠΑ

Αναπ. Καθ. Χαδιώ Σ. ΓΠΑ

Ερευνητής Α΄ Δρ. Ξενάκης Α ΕΙΕ

Αθήνα, Νοέμβριος 2013

Περίληψη

Λέξεις κλειδιά: μασεδοσίνη, νισίνη, βιοσυμβατό μικρογαλάκτωμα, *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό.

Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικής φύσεως ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, παράγονται από βακτήρια και σκοτώνουν ή περιορίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Οι βακτηριοσίνες παράγονται και από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στα τρόφιμα ζύμωσης, και έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω του ασφαλούς χαρακτήρα που παρουσιάζουν τα παραγωγά στελέχη τους. Η Νισίνη για παράδειγμα, η οποία χρησιμοποιείται στα τρόφιμα σαν πρόσθετο πάνω από 50 χρόνια, είναι μια βακτηριοσίνη με παραγωγό στέλεχος τον *Lactococcus lactis*. Η νισίνη παρουσιάζει ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, είναι δραστική έναντι αρκετών αλλοιώσεων των τροφίμων και των τροφογενών παθογόνων βακτηρίων. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η Μασεδοσίνη, βακτηριοσίνη η οποία παράγεται από το στέλεχος *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. Η Μασεδοσίνη έχει αποδειχθεί ως ένας ισχυρός αντικλωστριδιακός παράγοντας. Η άμεση προσθήκη βακτηριοσινών σε τρόφιμα δεν είναι πάντα μια απλή διαδικασία, καθώς οι βακτηριοσίνες είναι ευαίσθητες στα πρωτεολυτικά ένζυμα που περιέχονται στα τρόφιμα.

Στην παρούσα μελέτη, ως στόχο είχαμε την παρασκευή βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων με Νισίνη και Μασεδοσίνη προκειμένου να μελετηθούν ως το μέσο παράδοσης της βακτηριοσίνης στα τρόφιμα. Για το σκοπό αυτό, τα φυτικά έλαια όπως ελαιόλαδο, σογιέλαιο και ηλιέλαιο, και αιθέρια έλαια όπως το λιμονένιο χρησιμοποιήθηκαν σαν συνεχή φάση των μικρογαλακτωμάτων. Επιφανειοενεργά μπορεί να είναι φωσφολιπίδια όπως η λεκιθίνη, χρησιμοποιήθηκαν επίσης αλκοόλες προκειμένου να διευκολυνθεί η γαλακτωματοποίηση του φυτικού ελαίου. Η συμπεριφορά των συστημάτων περιγράφηκε από τα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα στους 25°C. Οι μετρήσεις του μεγέθους των σωματιδίων πραγματοποιήθηκαν με την Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS). Με την τεχνική του EPR μελετήθηκε μεμβρανική μονοστοιβάδα που σχηματίζεται από τα επιφανειοενεργά όσο αφορά τη ρευστότητα. Τέλος, η αποτελεσματικότητα των βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων εξετάστηκε ως προς αντιμικροβιακή δραστηριότητα τους.

Abstract.

Key-words: macedocin, nisin, food grade microemulsion, *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, microemulsion W/O

Bacteriocins are antimicrobial peptides or proteins produced by bacteria that kill or inhibit the growth of other bacteria. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria used in food fermentations have attracted much attention due to the safe nature of the producer strains. For example, nisin is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* that has been used as a food preservative for over 50 years now. In contrast to most bacteriocins, nisin has a relatively broad antimicrobial spectrum being active against several food spoilage and food borne pathogenic bacteria. Another example is macedocin, a bacteriocin produced by *Streptococcus macedonicus* that has been shown to be a particularly potent anti-clostridial agent. The direct addition of purified or semi-purified preparations of bacteriocins in complex food matrices is not always a straightforward procedure. Bacteriocins are frequently sequestered by a variety of food ingredients and they are prone to proteolytic degradation. In this study, we aim to produce food grade microemulsions enriched with nisin or macedocin in order to be tested as the delivery medium of the bacteriocin in foods. In order to assure a long term stability of the ingredient it should be preferably located into the dispersed phase, whereas the continuous one could act as protective “buffer” area, in which various necessary additives could also be present. For this purpose, vegetable oils like olive oil and essential oils like limonene were examined as the continuous oil phase of the microemulsions. Food grade surfactants can be either natural phospholipids, such as lecithin or polyoxyethylene sorbitan esters. Food grade alcohols were also used in some systems to facilitate emulsification of the vegetable oil. The phase behaviour of these systems was described by pseudo-ternary phase diagrams, which were determined at 25 °C. The effect of the presence of bacteriocins on the extent of the monophasic region was also examined. Particle size measurements of the bacteriocin containing microemulsions were performed using Dynamic Light Scattering (DLS) to ensure the formation of aqueous droplets at the nanoscale. Finally, the efficacy of the microemulsions enriched in bacteriocins to exert antimicrobial activity is tested by (WDA).

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	3
Abstract	4
1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	7
1.1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτηριοσίνες	8
1.1.2 Ταξινόμηση βακτηριοσινών	9
1.1.2. Τρόπος δράσης των βακτηριοσινών	9
1.1.3. Τα λαντιβιοτικά Νισίνη και Μασεδοσίνη	11
1.1.4 Εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων	13
1.2. Γαλακτώματα-Μικρογαλακτώματα.....	14
1.2.1. Ορισμός μικρογαλακτώματος.....	14
1.2.2. Είδη μικρογαλακτωμάτων	14
1.2.3. Επιφανειενεργά και συν-επιφανειενεργά μόρια.....	16
1.2.5 Δομική μελέτη και χαρακτηρισμός μικρογαλακτωμάτων.....	21
1.2.6 Εφαρμογές μικρογαλακτωμάτων.....	21
2. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης.....	23
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	24
3.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης.....	24
3.2 Πρωτόκολλα καθαρισμού της Μασεδοσίνης.....	24
3.2.1 Πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού.....	24
3.2.2 Δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού.....	27
3.3 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης.....	28
3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης.....	29
3.5 Ανάπτυξη βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων - Ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσεων.....	30
3.6 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με EPR.....	32
3.7 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με DLS.....	36
4 Αποτελέσματα και Συζήτηση	37
4.1 Καθαρισμός Μασεδοσίνης	37
4.2 Ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσεων	40
4.3 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με την τεχνική EPR.....	49
4.4 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με DLS.....	54
4.5 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των ενεργών βακτηριοσινών όταν είναι ενσωματωμένες στο μικρογαλάκτωμα.....	57
5.Συμπεράσματα.....	63
Βιβλιογραφία.....	65

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Έφη Τσακαλίδου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας και να συνεργαστώ με αξιόλογους ανθρώπους και να αποκτήσω πολύτιμες εμπειρίες. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη βοήθεια της, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος αυτής της εργασίας, πιο πολύ όμως θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τις φορές που χρειάστηκε να είναι αυστηρή μαζί μου καθώς και για τις υποδείξεις και τις συμβουλές της.

Μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στην Ομάδα Βιομηχανικής και Νανοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας τους Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ-ΙΒΕΒ) κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Ερευνητή Α' Δρ. Ξενάκη Άρη για τις πολύτιμες συμβουλές και το ενδιαφέρον που έδειξε για την εργασία μου. Ευχαριστώ θερμά την Ερευνήτρια Γ' Παπαδημητρίου Βασιλική για την καθοδήγησή της και τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί όποτε χρειάστηκα τη βοήθεια της η πόρτα του γραφείου της ήταν πάντα ανοικτή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις Υποψήφιες Διδάκτορες Καλαϊτζάκη Αργυρώ και Χατζηδάκη Μαρία, για την άψογη συνεργασία μαζί τους, για την στήριξη και την βοήθεια τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας για την πολύ καλή συνεργασία που είχα μαζί τους. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κώστα Παπαδημητρίου για την αρχική ιδέα της πραγματοποίησης αυτής της εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας και τον σωστό σχεδιασμό ενός πειράματος. Οφείλω να ευχαριστήσω την Δρ.. Μαρίνα Γεωργαλάκη για την βοήθεια που μου πρόσφερε στο εργαστήριο, μου έμαθε πως πρέπει να εργάζομαι σε αυτό. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις συμβουλές και την συμπαράσταση της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Ράνια Αναστασίου για τη γλυκύτητα της, όποτε χρειάστηκα τη βοήθεια της ήταν πάντα πρόθυμη να μου την προσφέρει.

Τέλος ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, ιδιαίτερα στους γονείς μου τόσο για την ηθική όσο και για την οικονομική συμπαράσταση τους. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ σε δυο πολύ σημαντικούς ανθρώπους της ζωής μου, τις αδερφές μου Πηνελόπη και Ελπίδα.

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν μια πληθώρα μικροβιακών γενών και ειδών και κατέχουν ένα σημαντικό οικονομικό ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων, σύμφωνα με τους Stiles & Holzapfel (1997). Αποτελούν αναπόσπαστο μέρος πολλών διαδικασιών ζύμωσης που συμβάλλουν στην συντήρηση αλλά και ενίοτε στην αλλοίωση των τροφίμων.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μια ομάδα θετικών κατά Gram, μη σπορογόνων, αρνητικών στην καταλάση βακτηρίων. Σύμφωνα με τους Klein et al. (1998) και Axelsson (2004) στερούνται κυτοχρωμάτων, χαρακτηρίζονται ως αερόαντοχα αλλά όχι αερόβια, είναι οξυάντοχα και απαιτητικά σε θρεπτικά συστατικά. Πρόκειται για αυστηρώς ζυμωτικά βακτήρια με κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης το γαλακτικό οξύ. Τα διάφορα γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων διαφέρουν ως προς τον τρόπο ζύμωσης των σακχάρων και τη φύση των προϊόντων που σχηματίζονται κατά τη ζύμωση αυτών, δημιουργώντας δύο μεγάλες ομάδες. Οι μικροοργανισμοί της πρώτης ομάδας παράγουν ως τελικό προϊόν ζύμωσης σχεδόν μόνο γαλακτικό οξύ και ονομάζονται ομοζυμωτικοί (ομοζυμωτική γαλακτική ζύμωση), ενώ οι μικροοργανισμοί της δεύτερης ομάδας παράγουν και άλλα προϊόντα όπως αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και ονομάζονται ετεροζυμωτικοί (ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση). Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι τα ομοζυμωτικά βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο αλδολάση, ενώ τα ετεροζυμωτικά όχι, αδυνατώντας έτσι να διασπάσουν την δις-φωσφορική φρουκτόζη προς δύο τριόζες (Narvhus & Axelsson, 2003). Τα γένη τα οποία σχετίζονται άμεσα με τα τρόφιμα είναι *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται σε μια ποικιλία οικολογικών θόκων, όπως το ανθρώπινο σώμα, το σώμα των ζώων, τα φυτά και τα ζυμωμένα τρόφιμα. Αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων η οποία ευθύνεται για μια σειρά από ζυμούμενα προϊόντα καθώς χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ζύμωσης, είτε ζωικής είτε φυτικής προέλευσης. Προκαλούν ταχεία όξυνση του φρέσκου υλικού, μέσω της παραγωγής γαλακτικού και ενίοτε και οξικού οξέος. Αξίζει να σημειωθεί ότι με την παραγωγή του γαλακτικού οξέος και του οξικού οξέος, της αιθανόλης, του CO₂, του H₂O₂, και των βακτηριοσινών συμβάλλουν στη συντήρηση και στην αύξηση του χρόνου ζωής των τροφίμων αυτών. Επιπλέον, διαμορφώνουν και κατά κανόνα βελτιώνουν την ποιότητα των τροφίμων, μέσω της συμβολής τους στο άρωμα, στη γεύση και στην υφή (Carlice &

Fitzgerald, 1999). Ο Hansen (2002) επισημαίνει πως τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν κατά κύριο λόγο στην πλειοψηφία τους τις εναρκτήριες καλλιέργειες πολλών ζυμούμενων προϊόντων και κυρίως των γαλακτοκομικών.

Με την εντατική έρευνα των τελευταίων ετών έχουν αναπτυχθεί νέες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηριών, όπως προϊόντα με φαρμακευτικές ιδιότητες ακόμα και εμβολίων σύμφωνα με τους Wells et al. (1996) και Mercenier et al. (2000), επίσης μια από τις γνωστότερες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι παρασκευή προβιοτικών προϊόντων όπως αναφέρουν οι Schiffrin et al. (2001). Τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση τα γαλακτοκομικά προϊόντα να εμπλουτίζονται και με προβιοτικές καλλιέργειες, οι οποίες μπορούν είτε να περιληφθούν άμεσα στη διαδικασία ζύμωσης, είτε να προστεθούν στο τελικό προϊόν ως πρόσθετα.

1.1. 1 Οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτηριοσίνες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατέχουν παγκοσμίως σημαντική θέση ανάμεσα στις εμπορικές εναρκτήριες καλλιέργειες και πρωτίστως σε αυτές που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων μιας και τα φυσιολογικά και μεταβολικά τους χαρακτηριστικά τα καθιστούν ιδανικά σε τέτοιες εφαρμογές. Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητά τους να παράγουν πλήθος διαφορετικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σύμφωνα με τον Roos et al. (2002) μια από τις ενώσεις αυτές είναι και οι βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες είναι ενώσεις πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες συντίθεται ριβοσωμικά, κωδικοποιούνται δηλαδή από δομικά γονίδια (Dufour et al. 2006). Οι βακτηριοσίνες διαιρούνται σε τρεις κλάσεις ανάλογα με τις γενετικές και βιοχημικές τους ιδιότητες. Οι Nettles & Barefoot, (1993) και Ennahar et al. (2000) αναφέρουν πως αρκετές βακτηριοσίνες είναι δραστικές έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων όπως είναι το *Clostridium spp.*, ο *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes*.

Η πιο διαδεδομένη βακτηριοσίνη ως φυσικό συντηρητικό είναι η νισίνη, η οποία παράγεται από το είδος *Lactococcus Lactis subsp. lactis* και δρα εναντίον Gram θετικών βακτηρίων. Η νισίνη είναι η πιο μελετημένη από όλες τις βακτηριοσίνες και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό (E234) στα τρόφιμα σε περισσότερες από 50 χώρες συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ και της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την εμπορική ονομασία “nisaplin”..

1.1.2 Ταξινόμηση βακτηριοσινών

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα Gram θετικά βακτήρια, όπως προαναφέρθηκε διαιρούνται σε τρεις κλάσεις ανάλογα με τις γενετικές και βιοχημικές τους ιδιότητες (Klaenhammer 1993).

Κλάση I. Η πρώτη κλάση περιλαμβάνει την ομάδα των λαντιβιοτικών. Πρόκειται για μικρής μοριακής μάζας πεπτίδια (<5 k Da) τα οποία περιέχουν αμινοξέα όπως η λανθειονίνη και η μεθυλο-λανθειονίνη. Σε αυτή την τάξη βακτηριοσινών ανήκουν η Νισίνη, η Λακτασίνη, η Καρνοσίνη U-149, η Λακτοσίνη S. Εκτενής αναφορά γίνεται για τη δομή, τη βιοσύνθεση και τον τρόπο δράσης των λαντιβιοτικών πραγματοποιείται σε ξεχωριστή ενότητα, καθώς οι υπό μελέτες βακτηριοσίνες Μασεδοσίνη και Νισίνη ανήκουν σε αυτή την κατηγορία.

Κλάση II. Η δεύτερη κλάση αποτελείται από πεπτίδια μοριακής μάζας (< 10 kDa) Το πρόδρομο μόριο των πεπτιδίων περιέχει την αλληλουχία Gly-Gly-Xaa, στο σημείο στο οποίο το πρόδρομο μόριο υφίσταται τροποποίηση ώστε να παραχθεί η ώριμη μόριο. Τα ώριμα μόρια των βακτηριοσινών σχηματίζουν αμφίφιλες β-έλικες, με μεγάλα ποσοστά υδροφοβίας. Οι βακτηριοσίνες αυτής της κλάσης παρουσιάζουν από μέτρια έως υψηλή σταθερότητα στη θέρμανση.

Κλάση III. Η τρίτη κλάση περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μεγάλη μοριακή μάζα (>30 kDa) οι οποίες είναι ασταθείς στις υψηλές θερμοκρασίες. Βακτηριοσίνες της ομάδας αυτής είναι η Ελβετισίνη J και V, η Ασιδοφιλισίνη.

1.1.2. Τρόπος δράσης των βακτηριοσινών

Ο μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών σύμφωνα με τους Tagg et al. (1976) αποτελεί μια διαδικασία που μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια.

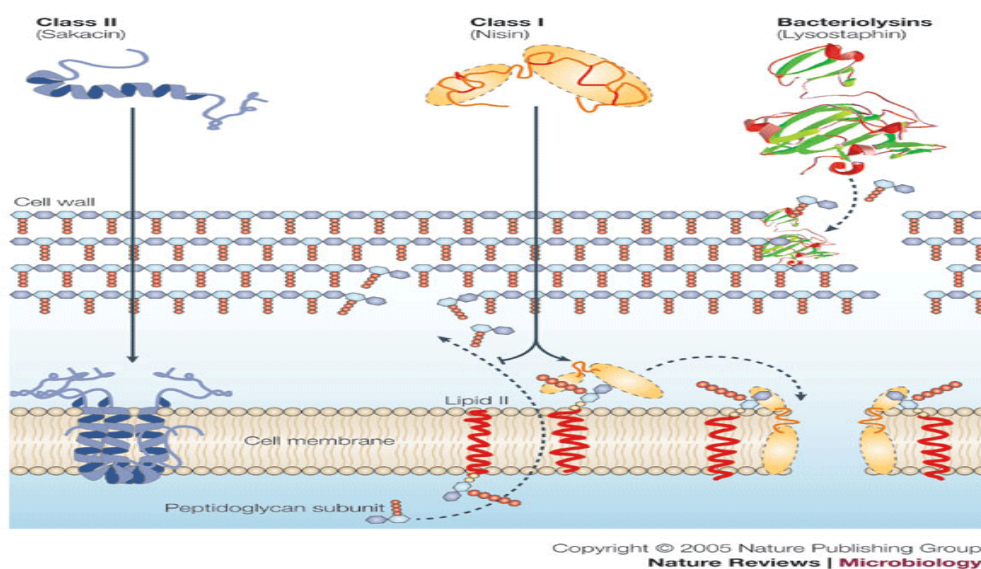
Η πρώτη φάση συνίσταται στην προσρόφηση της βακτηριοσίνης πάνω σε εξειδικευμένους ή μη υποδοχείς, που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των ευαίσθητων στελεχών. Στο στάδιο αυτό οι βακτηριοσίνες δεν προκαλούν καμία αλλοίωση στο κύτταρο. Πρόκειται για αντιστρεπτή φάση και η απομάκρυνση της βακτηριοσίνης κατά την διάρκεια του σταδίου αυτού, έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της δομής της μεμβράνης χωρίς να προκληθούν βλάβες στα βακτηριακά κύτταρα.

Η δεύτερη φάση είναι μη αντιστρεπτή και περιλαμβάνει αλλοιώσεις στα ευαίσθητα

κύτταρα οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε βακτηριοσίνη. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων είναι ο στόχος δράσης των βακτηριοσινών. Το αποτέλεσμα είναι η απώλεια ATP, ιόντων και άλλων σημαντικών κυτταρικών συστατικών, παραδείγματος χάριν αμινοξέων τα οποία περιέχονται μέσα στο κύτταρο και την παρεμπόδιση μεταφοράς των αμινοξέων μέσα στα βακτηριακά κύτταρα (Abee et al. 1995).

Δύο μοντέλα έχουν προταθεί για τον τρόπο δράσης των λαντιβιοτικών τύπου A. Κατά το πρώτο μοντέλο τα λαντιβιοτικά προσδένονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και σχηματίζουν πόρους καταλαμβάνοντας κάθετη θέση ως προς την μεμβράνη σύμφωνα με τον Sahl (1991). Στο δεύτερο μοντέλο, τα μόρια του λαντιβιοτικού προσδένονται παράλληλα στην κυτταρική μεμβράνη και αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια μέσω ιοντικών και πάλι δυνάμεων δημιουργώντας δομή διπλοστοιβάδας με το υδρόφοβο μέρος του πεπτιδίου να προσανατολίζεται προς το εσωτερικό της μεμβράνης. Σαν αποτέλεσμα έχουμε και πάλι την δημιουργία πόρων (Van de Hooven et al. 1996).

Γενικά η δραστηριότητα των βακτηριοσινών σύμφωνα με τον (Ennahar et al. 2000) είναι αποτέλεσμα των υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των αμφίφιλων, θετικά φορτισμένων πεπτιδίων με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στο Σχήμα 1.1 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση του μηχανισμού δημιουργίας πόρων πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ευαίσθητων κυττάρων.



Σχήμα 1.1. Σχηματισμός πόρων πάνω στην κυτταρική μεμβράνη κατά την δράση των βακτηριοσινών.

1.1.3. Τα λαντιβιοτικά Νισίνη και Μασεδοσίνη

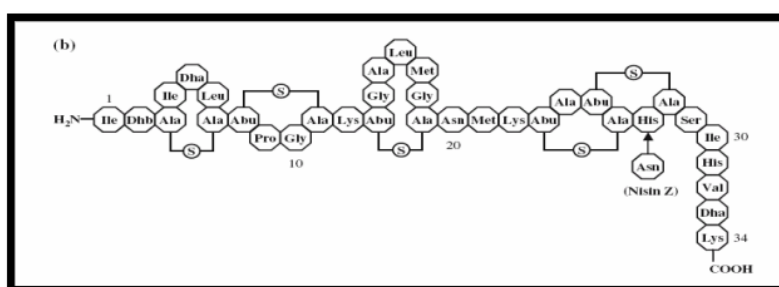
Τα λαντιβιοτικά παράγονται από τα Gram θετικά βακτήρια, όπως αναφέρουν οι Draper et al. (2008), αποτελούν μια ομάδα αντιμικροβιακών πεπτιδίων, δηλαδή δρουν έναντι άλλων βακτηρίων, ενώ το στέλεχος που τα παράγει είναι ανθεκτικό στη δράση των δικών του πεπτιδίων. Τα βασικά δομικά μόρια είναι τα θειοαιθερικά αμινοξέα λανθειονίνη και μεθυλολανθειονίνη και στη αρχή παράγονται ως πρόδρομα, ανενεργά. Η βιοσύνθεση των λαντιβιοτικών πραγματοποιείται στα ριβοσώματα των βακτηριακών κυττάρων.

Τα περισσότερα λαντιβιοτικά παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία είναι ασφαλή για τον άνθρωπο, χαρακτηρίζονται δηλαδή ως GRAS (Generally Recognized As Safe). Οι Cotter et al. (2005), επισημάνουν πως τα λαντιβιοτικά είναι ενεργά απέναντι σε αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς και ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Staphylococcus aureus* και βακτήρια του γένους *Enterococcus*. Για τον λόγο αυτό η έρευνα σήμερα έχει στραφεί προς τη χρήση των λαντιβιοτικών, στη συντήρηση των τροφίμων.

Η πρώτη αναφορά για την παραγωγή βακτηριοσίνης από οξυγαλακτικά βακτήρια έγινε από τον Roger (1928). Η βακτηριοσίνη αυτή χαρακτηρίστηκε ως πολυπεπτίδιο από τον Whitehead (1933), ενώ το 1947 και 1981, ονομάστηκε νισίνη (Matticke & Hirsch, 1947, Hurst, 1981). Πρόκειται για ένα πεπτίδιο με 34 αμινοξέα (Σχήμα 1.2) οι Sen et al. (1999), αναφέρουν ότι περιλαμβάνει δυο ασυνήθη αμινοξέα, τη λανθειονίνη και τη β-μεθυλο-λανθειονίνη. Παράγεται με ζύμωση από το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactococcus lactis*. Υπάρχουν δυο μορφές Νισίνης, η Νισίνη Α και η Νισίνη Ζ σύμφωνα με τους Schliefer et al. (1985), Buchman et al. (1988), Bauer & Dick (2005). Οι δύο μορφές διαφέρουν ως προς την δομή τους στο αμινοξύ της θέσης 27, το οποίο είναι η ιστιδίνη στην Νισίνη Α και η ασπασραγίνη στην Νισίνη Ζ. Η μοριακή μάζα της Νισίνης είναι 3354,07 Daltons. Είναι διαλυτή στο νερό και σε πολικούς διαλύτες και ουσιαστικά αδιάλυτη σε μη-πολικούς διαλύτες. Σύμφωνα με τον FDA η ημερήσια συνιστώμενη δόση είναι 100-200 mg/kg. Στην βιομηχανία τροφίμων συνήθως λαμβάνεται από την καλλιέργεια *Lactococcus lactis* σε φυσικά υποστρώματα, όπως το γάλα και η δεξτρόζη και δεν συντίθεται χημικά. Η νισίνη όπως έχει ήδη αναφερθεί προστίθεται στα τρόφιμα ως προσθετικό (E234) σχεδόν 40 χρόνια, ιδιαίτερα στα γαλακτοκομικά προϊόντα και συγκεκριμένα σε επεξεργασμένο τυρί για την παρεμπόδιση πιθανής αλλοίωσης από βακτήρια του γένους *Clostridium*. Συνήθως η κλωστριδιακή αλλοίωση των τυριών αντιμετωπίζεται με την προσθήκη νιτροδών και νιτρικών αλάτων, επειδή όμως υπάρχει ο κίνδυνος παραγωγής νιτροζαμινών, οι οποίες

είναι καρκινογόνες, οι Rilla et al. (2003), πρότειναν την χρήση βακτηριοσινών, όπως η Νισίνη, ως μια εναλλακτική λύση έναντι στην χρήση των νιτρικών αλάτων.

Ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, απομονώθηκε από το Ελληνικό τυρί Κασσέρι (Tsakalidou et al. (1998) Είναι θερμοφίλος με βέλτιστη συνθήκες ανάπτυξης τους 42,3 °C και pH 6.4. το συγκεκριμένο οξυφαλακτικό βακτήριο παράγει τα λαντιβιοτικά Μασεδοσίνη (Georgalaki et al. 2002) και τη Μασεδοβισίνη (Georgalaki et al. 2013). Ένα κύριο πλεονέκτημα του λαντιβιοτικού αυτού είναι ότι παράγεται από μικροοργανισμό που δεν έχει χαρακτηριστικά παθογόνου μικροοργανισμού. Η Μασεδοσίνη έχει μοριακή μάζα 2795.76 0.42 Da, είναι ενεργή σε pH 4.0 εως 9.0, είναι θερμοάνθεκτικό πεπτίδιο καθώς παραμένει ενεργό μετά από θέρμανση στους 121 °C σε πίεση 1 atm για 20 min. Το χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου λαντιβιοτικού είναι το γεγονός ότι παράγεται μόνο κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε άπαχο γάλα ή σε γάλα ενισχυμένο με πηγές αζώτου και σύμφωνα με τους Georgalaki et al. (2002), δεν παρατηρείται παραγωγή της Μασεδοσίνης σε άλλα θρεπτικά υποστρώματα, παρά το γεγονός ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου είναι κανονική. Το ώριμο πεπτίδιο αποτελείται από 26 αμινοξέα, όπως προσδιορίστηκε από τον προσδιορισμό της αμινοξικής αλληλουχίας της N-τελικής περιοχής (22 θέσεις αμινοξέων) και από την μοριακή ανάλυση μάζας. Η ακολουθία των αμινοξέων παρουσιάζει ομολογία με τα λαντιβιοτικά *Streptococcin* SA-FF22 και SA-M49, τα οποία έχουν απομονωθεί από το παθογόνο *S.pyogenes*, υποδηλώνοντας την παρουσία μιας λανθειονίνης και δύο β-μεθυλο-λανθειονίων στην πρωτατοταγή δομή της Μασεδοσίνης (Georgalaki et al. 2002).



Σχήμα 1.2. Σχηματική δομή της Νισίνης-A, με την αντικατάσταση του His27 με Asn27 είναι η Νισίνη-Z. Το Dha είναι η δεϋδροαλανίνη, Dhb δεϋδροβουτυρίνη, Ala-S-Ala είναι η λανθειονίνη και Abu-S-Ala η β-μεθυλο-λανθειονίνη (Cheigh&Pyun, 2005).

1.1.4 Εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται συστηματική μελέτη και έρευνα για τη δυνατότητα χρήσης των βακτηριοσινών ως βιοσυντηρητικά τροφίμων (Twomey et al. 2002, Balciunas et al. 2013). Οι τρόποι ενσωμάτωσης των βακτηριοσινών στα τρόφιμα είναι δύο, στον ένα τρόπο πραγματοποιείται η παραγωγή και στη συνέχεια η προσθήκη της βακτηριοσίνης στο τρόφιμο (*ex situ*). Δηλαδή η βακτηριοσίνη παράγεται έξω από το τρόφιμο και προστίθεται σε αυτό σαν συστατικό. Στον δεύτερο τρόπο πραγματοποιείται απευθείας η προσθήκη της βακτηριοσίνης στο τρόφιμο (*in situ*). Ουσιαστικά στον δεύτερο τρόπο προστίθεται η καλλιέργεια του παραγωγού στέλεχος, το οποίο παράγει την βακτηριοσίνη μέσα στο σύστημα του τροφίμου.

Η χρήση των βακτηριοσινών μπορεί να συμβάλει στην μείωση της χρήσης χημικών συστατικών για την συντήρηση των τροφίμων. Καθώς μέχρι τώρα για τη συντήρηση των τροφίμων χρησιμοποιούνταν σε μεγάλη κλίμακα χημικά πρόσθετα, όπως νιτρώδη, νιτρικά και θειώδη άλατα, προπιονικό, σορβικό και βενζοϊκό οξύ (Leroy & De Vuyst, 2004).

Τελευταία, οι βακτηριοσίνες εφαρμόζονται στην τεχνολογία των εμποδίων, η οποία αξιοποιεί τη συνεργιστική δράση πολλών παραγόντων ώστε να επιτευχθεί η αποτελεσματικότερη συντήρηση των τροφίμων μέσω του ελέγχου της μικροβιακής ανάπτυξης. Αναλυτικότερα, συνδυάζονται διαφορετικές μέθοδοι συντήρησης, όπως η θέρμανση σε χαμηλή θερμοκρασία, η χρήση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (*modified atmosphere packaging*, MAP), η εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης (*high hydrostatic pressure*, HHP) και η χρήση φυσικών φαινολικών ενώσεων, με στόχο τον έλεγχο ή/και την αναστολή της μικροβιακής αύξησης καθώς επίσης και η χρήση αιθέριων ελαίων (Deegan et al. 2006, Galvez et al. 2007).

1.2. Γαλακτώματα-Μικρογαλακτώματα

Τα κολλοειδή διαλύματα που προκύπτουν από την διασπορά ενός υγρού (δισπαρμένη ή ασυνεχής φάση) σε ένα άλλο υγρό (συνεχής ή εξωτερική φάση), μη αναμειγνύομενο με το πρώτο, ονομάζονται γαλακτώματα. Τα γαλακτώματα λοιπόν είναι συστήματα αποτελούμενα από δύο φάσεις, μια που αποτελείται από νερό ή ένα υδατικό διάλυμα (υδατική φάση) και μια που αποτελείται από έλαιο (λιπαρή φάση).

1.2.1. Ορισμός μικρογαλακτώματος

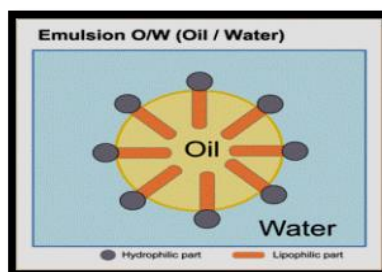
Τα μικρογαλακτώματα είναι διαφανείς νανοδιασπορές νερού και ελαίου, ακόμη και σε ίση αναλογία, οι οποίες σταθεροποιούνται με μια ποσότητα κατάλληλων επιφανειοενεργών. Χαρακτηρίζονται ως μικρογαλακτώματα λόγω του μικρού μεγέθους των εν διασπορά σωματιδίων, η ακτίνα των οποίων μπορεί να κυμαίνεται από 5-50 nm. Οι διασπορές αυτές είναι χαμηλού ιξώδους, θερμοδυναμικά σταθερές, καθώς σχηματίζονται αυθόρμητα και εμφανίζουν μία μακροχρόνια σταθερότητα. Σύμφωνα με τους Danielson & Lidman (1981), τα μικρογαλακτώματα είναι συστήματα νερού, ελαίου και επιφανειοενεργών που σχηματίζουν ένα υγρό διάλυμα, οπτικά ισότροπο και θερμοδυναμικά σταθερό. Ο ορισμός αυτός βρίσκει σύμφωνους τους Nagarajan & Ruckenstein (2000), οι οποίοι θεωρούν ότι τα συστήματα αυτά είναι θερμοδυναμικώς σταθερά, οπτικώς διαυγή, με την ικανότητα να διαμορφώνονται αυθόρμητα. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των μικρογαλακτωμάτων είναι η διαφάνεια τους, αποτελεί κριτήριο για τον διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα γαλακτώματα και εξηγείται από το γεγονός ότι η μια από τις δυο φάσεις του μικρογαλακτώματος είναι λεπτότατα δισπαρμένη μέσα στην άλλη υπό την μορφή νανοσταγονιδίων.

1.2.2. Είδη μικρογαλακτωμάτων

Τα είδη των μικρογαλακτωμάτων που προκύπτουν εξαρτώνται από τη φύση και από την αναλογία των επιμέρους συστατικών, δηλαδή την αναλογία του ελαίου, του νερού, των επιφανειοενεργών και, συν-επιφανειοενεργών, από την θερμοκρασία, καθώς επίσης από την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

I. Μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό (O/W)

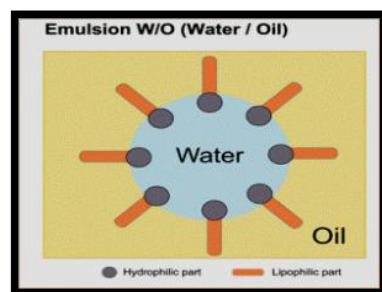
Τα σφαιρικού σχήματος νανοσταγονίδια του ελαίου περιβάλλονται από την μονοστοιβάδα επιφανειοενεργών μορίων και αποτελούν την ασυνεχή φάση, ενώ το νερό αποτελεί την συνεχή φάση. Τα επιφανειοενεργά μόρια στην επιφάνεια των νανομικροσταγονιδίων είναι προσανατολισμένα με τις υδρόφιλες κεφαλές προς την εξωτερική (συνεχή) φάση δηλαδή τη φάση του νερού. Έτσι προκύπτει ο σχηματισμός των μικκυλίων, όπως χαρακτηριστικά παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.3.



Σχήμα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μικρογαλακτώματος ελαίου σε νερό (o/w), δομή μικκυλίου.

II. Μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο (W/O).

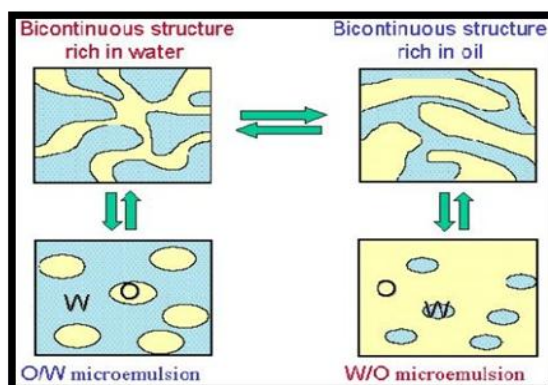
Τα νανοσταγονίδια του νερού περιβάλλονται από την μονοστοιβάδα επιφανειοενεργών μορίων και αποτελούν την ασυνεχή φάση, ενώ το έλαιο αποτελεί την συνεχή φάση. Τα επιφανειοενεργά μόρια στην επιφάνεια των μικροσταγονιδίων, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.4, είναι προσανατολισμένα με τις υδρόφοβες κεφαλές προς την εξωτερική (συνεχή) δηλαδή τη φάση του ελαίου. Έτσι προκύπτει ο σχηματισμός των αντίστροφων μικκυλίων.



Σχήμα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μικρογαλακτώματος νερού σε έλαιο (w/o), δομή ανάστροφου μικκυλίου.

III. Μικρογαλάκτωμα μεσόφασης ή δισυνεχείς φάσεις

Κατά μία άποψη, πρόκειται για μικρογαλάκτωμα με συγκρίσιμες ποσότητες νερού και ελαίου, η δομή του οποίου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Μια δεύτερη άποψη που επικρατεί είναι ότι στην φάση αυτή υπάρχει η συνύπαρξη των δύο παραπάνω μικρογαλακτωμάτων.



Σχήμα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση όλων των πιθανών δομών που μπορεί να λαβει ένα μικρογαλάκτωμα.

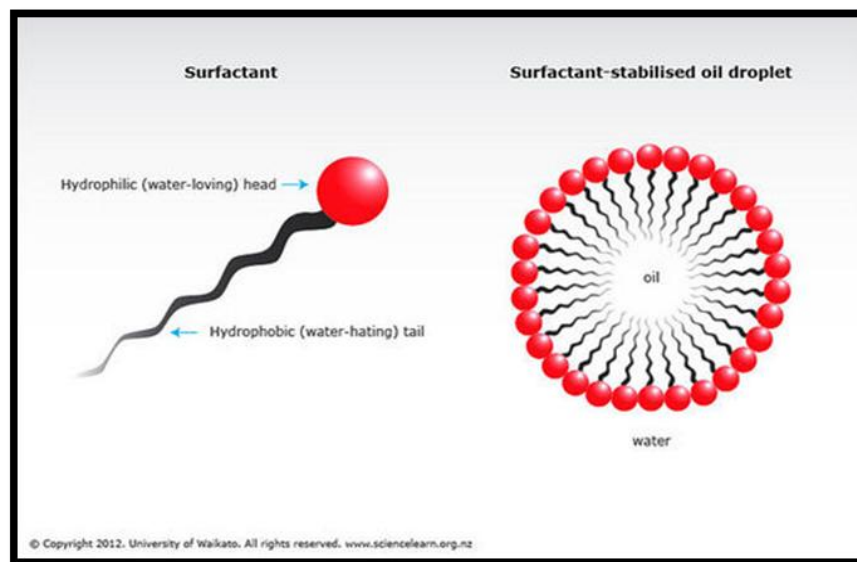
1.2.3. Επιφανειοενεργά και συν-επιφανειοενεργά μόρια

Η παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων απαιτεί την χρήση επιφανειοενεργών και συν-επιφανειοενεργών μορίων. Σύμφωνα με τους Kotlarchyk et al. (1985) και Kadam (1986), οι επιφανειοενεργές ενώσεις είναι μόρια που παρουσιάζουν αμφίφιλο χαρακτήρα καθώς αποτελούνται από δύο περιοχές διαφορετικής πολικότητας. Η μια περιοχή καλείται πολική κεφαλή λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της και η άλλη περιοχή καλείται μη πολική και παρουσιάζει υδρόφοβο χαρακτήρα αποτελούμενη από μία ή περισσότερες αλκύλικές ομάδες. Συνεπώς, τα επιφανειοενεργά μόρια λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους εντοπίζονται μεταξύ των μορίων του νερού και των μορίων του ελαίου έχοντας στραμμένες τις πολικές κεφαλές προς την υδατική φάση και τις μη πολικές κεφαλές προς την λιπαρή φάση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το Σχήμα 1.6 στο οποίο παρουσιάζεται η δομή ενός επιφανειοενεργού μορίου και η διάταξη του μέσα στο μικρογαλάκτωμα.

Οι επιφανειοενεργές ουσίες, οι οποίες προσροφημένες στη διεπιφάνεια ελαίου/νερού, εκτός από τη μείωση της διεπιφανειακής ενέργειας, δημιουργούν ηλεκτρικά, μηχανικά και στερεοχημικά «φράγματα» στην συνένωση των σταγόνων.

Τα προσροφημένα επιφανειοενεργά μόρια στη διεπιφάνεια ελαίου/νερού δρουν προστατευτικά με τους εξής τρόπους:

- Μειώνουν τη διεπιφανειακή ενέργεια του συστήματος
- Δημιουργούν ένα ανθεκτικό, πολύ ιξώδες φράγμα στη διεπιφάνεια το οποίο εμποδίζει την συνένωση κατά τη σύγκρουση των σταγόνων
- Τα ιονικά επιφανειοενεργά μόρια προσδίδουν ένα φορτίο στη διεπιφάνεια οπότε τα σταγονίδια, ως ομώνυμα φορτισμένα απωθούνται ενισχύοντας έτσι τη σταθερότητά τους.



Σχήμα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση δομής ενός επιφανειοενεργού,. Διακρίνονται η πολική και η μη πολική κεφαλή καθώς επίσης η διάταξη στο μικρογαλάκτωμα.

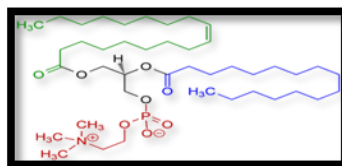
Για τη μείωση της διεπιφανειακής ενέργειας του συστήματος, σε αρκετές περιπτώσεις απαιτείται όχι μόνο η παρουσία των επιφανειοενεργών μορίων αλλά κρίνεται αναγκαία και η προσθήκη ενώσεων μικρής πολικότητας οι οποίες καλούνται συν-επιφανειοενεργά. Πρόκειται για αλειφατικές αλκοόλες ή αμίνες με 4 έως 6 άτομα άνθρακα και σπανιότερα με 7 έως 8. Ο Moulík (1990), θεωρεί ότι η παρουσία τους στην διεπιφάνεια μεταξύ της υδατικής και της λιπαρής φάσης προσφέρει ελαστικότητα με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται πιο εύκολη κάμψη της διεπιφάνειας με ευνοϊκότερη ενεργειακή διασπορά.

Όταν πρόκειται να παρασκευάσουμε μικρογαλακτώματα προκύπτει πάντα το ερώτημα ποια είναι κατάλληλη επιλογή επιφανειοενεργού; καθώς υπάρχουν αρκετοί τύποι αυτών. Για τον λόγο αυτό συχνά χρησιμοποιείται η εμπειρική παράμετρος υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία (HLB Hydrophilic-Lipophilic Balance) η οποία χαρακτηρίζει τα

επιφανειοενεργά και χρησιμοποιείται ως κριτήριο καταλληλότητας του επιφανειοενεργού με τα συστατικά του μικρογαλακτώματος και το τύπο του μικρογαλακτώματος. Η τιμή HLB σύμφωνα με τους Lawrence & Rees (2000), λαμβάνει υπόψη την αναλογία της υδρόφιλης προς τη λιπόφιλη περιοχή ενός επιφανειοενεργού, όπως αυτή υπολογίζεται από τα μοριακά βάρη της κάθε περιοχής. Όταν οι τιμές HLB του επιφανειοενεργού και του ελαίου είναι ίδιες ή τείνουν να συμπίπτουν τότε αυξάνεται η επιτυχία της παρασκευής του μικρογαλακτώματος. Γενικά, τα μικρογαλακτώματα του τύπου W/O σχηματίζονται με επιφανειοενεργά με χαμηλή τιμή HLB εύρους 4-6, όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 1.1, ενώ τα μικρογαλακτώματα του τύπου O/W σχηματίζονται με επιφανειοενεργά που έχουν τιμή HLB μεταξύ 8-18.

Οι Kile & Chiou (1989), αναφέρουν πως για κάθε ζεύγος επιφανειοενεργού/διαλύτη υπάρχει μια χαρακτηριστική τιμή που ονομάζεται CMC Critical Micellar Concentration (κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση). Όταν η συγκέντρωση των επιφανειοενεργών μορίων υπερβεί τη τιμή CMC οι διαλυτόφοβες περιοχές των μορίων συσπειρώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η ανεπιθύμητη επαφή με τον διαλύτη. Η τιμή της CMC εξαρτάται από την πίεση και την θερμοκρασία του συστήματος καθώς επίσης από τη φύση του διαλύτη, όπως αναφέρουν οι Kotlarchyk et al. (1985), και κυμαίνεται μεταξύ 0,2-2 mM.

Στην παρούσα εργασία σαν επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν η λεκιθίνη σόγιας και το πολυσορβικό 20 (Μονολαυρικός εστέρας της πολυοξυαιθυλενο(20)σορβιτάνης) και 80 (Μονοελαϊκός εστέρας της πολυοξυαιθυλενο(20)σορβιτάνης). Η λεκιθίνη ή η φωσφατιδυχολίνη ή 1,2-διακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη είναι το κυριότερο συστατικό των μεμβρανών και ο συντακτικός τύπος της παρουσιάζεται το παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1.7. Συντακτικός τύπος της 1,2-διακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης, κοινή ονομασία λεκιθίνη.

Η λεκιθίνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό, αμφίφιλο μόριο και λαμβάνεται από διάφορες πηγές, όπως το αυγό και η σόγια. Στο μόριο της περιέχει μια λιπόφιλη περιοχή, και μια ισχυρά υδρόφιλη περιοχή. Οι δύο περιοχές είναι σχεδόν ισοσταθμισμένες αλλά με λίγο περισσότερο ενισχυμένο τον λιπόφιλο χαρακτήρα (Xenakis et al. 2007). Οι Gruner et

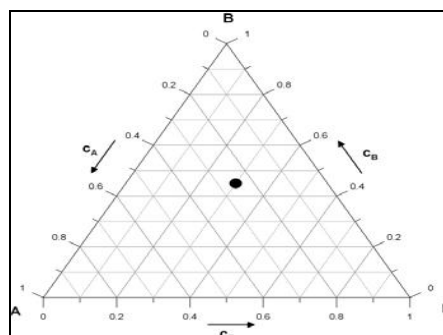
al. (1985) αναφέρουν πως το μόριο της τείνει να έχει κυλινδρικό σχήμα και πως η μέση καμπυλότητα του μεσεπιφανειακού υμένα είναι σχεδόν μηδενική. Για το λόγο αυτό τα συσώματά της έχουν προτίμηση στον σχηματισμό διαστρωματώσεων και κρίνεται απαραίτητη η παρουσία συνεπιφανειοενεργών για τον σχηματισμό μικρογαλακτώματος. Θεωρείται ότι η παρουσία τους στην μεσεπιφάνεια μεταξύ νερού και ελαίου προσφέρει ελαστικότητα, καθώς επίσης και μείωση της μεσεπιφανειακής τάσης, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται πιο εύκολη κάμψη της μεσεπιφάνειας με πιο ευνοϊκή ενεργειακά διασπορά (Moulik 1998).

Πίνακας 1.1. Τιμές HLB και τύποι μικρογαλακτωμάτων.

Table III: HLB Number vs. Solution Function	
HLB Range	Application
4–6	Water/oil emulsifiers
7–9	Wetting agents
8–18	Oil/water emulsifiers
13–15	Detergents
10–18	Solubilizers

1.2.4 Τριγωνικό διάγραμμα φάσεων

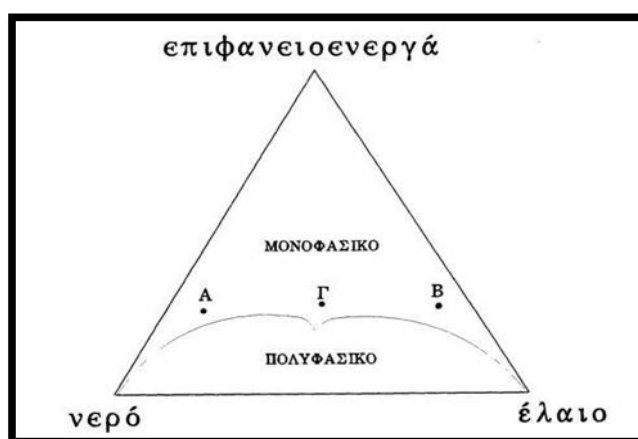
Για την παράσταση ενός συστήματος το οποίο αποτελείται από τρία συστατικά χρησιμοποιούνται τα τριγωνικά διαγράμματα σταθερής θερμοκρασίας και πίεσης όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.8. Πρόκειται για ένα ισόπλευρο τρίγωνο, όπου η κάθε μια από τις κορυφές του τριγώνου αντιστοιχεί σε καθαρά συστατικά. Το τρίγωνο διαιρείται σε μικρότερα ισόπλευρα τρίγωνα με ευθύγραμμα τμήματα παράλληλα προς τις πλευρές του.



Σχήμα 1.8. Διάγραμμα φάσεων τριών συστατικών (τριγωνικό διάγραμμα).

Το κάθε σημείο που βρίσκεται σε κάθε πλευρά του τριγώνου αντιστοιχεί σε μίγμα δύο εκ των τριών συστατικών ορισμένης αναλογίας, ενώ τα σημεία που βρίσκονται εντός του τριγώνου αντιστοιχούν σε μίγμα και των τριών συστατικών ορισμένης αναλογίας επίσης. Σύμφωνα με τον Campbell 2012, όταν το σύστημα του μικρογαλακτώματος αποτελείται από περισσότερα των τεσσάρων συστατικών το διάγραμμα φάσεων καλείται πλέον ψευδοτριγωνικό διάγραμμα. Στην περίπτωση αυτή η κάθε κορυφή του τριγώνου παριστάνει μίγμα δύο ή περισσότερων συστατικών η αναλογία των οποίων είναι σταθερή.

Στην περίπτωση ενός μικρογαλακτώματος νερού σε έλαιο (W/O) τα συστατικά είναι το έλαιο, το νερό και το επιφανειοενεργό συνεπώς κάθε μία κορυφή αντιστοιχεί σε κάθε ένα από τα παραπάνω συστατικά. Στην περίπτωση όπου υπάρχουν άνω των τεσσάρων συστατικών όπως μίγμα ελαίων, μίγμα επιφανειοενεργών χρησιμοποιείται το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα, και αντίστοιχα οι κορυφές του τριγώνου παριστάνουν των μίγμα των συστατικών σε σταθερή αναλογία. Στο παρακάτω σχήμα, παρουσιάζεται το τριγωνικό διάγραμμα ιδανικού συστήματος νερού, ελαίου και επιφανειοενεργού. Επιλέγοντας τα σημεία για τα οποία το σύστημα είναι μονοφασικό δημιουργούνται δυο διακριτές περιοχές στο διάγραμμα. Η μια είναι η περιοχή που το σύστημα είναι μονοφασικό και δεύτερη είναι η περιοχή που το σύστημα είναι πολυφασικό. Τα μικρογαλακτώματα εντοπίζονται στην μονοφασική περιοχή. Επίσης στην μονοφασική περιοχή του τριγωνικού διαγράμματος διακρίνονται μικρογαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό σημείο (Α), μικρογαλακτώματα τύπου νερού σε έλαιο σημείο (Β), και τέλος τα δισυνεχή μικρογαλακτώματα σημείο (Γ).



Σχήμα 1.9. Τριγωνικό διάγραμμα ιδανικού συστήματος νερού-ελαίου-επιφανειοενεργών

1.2.5 Δομική μελέτη και χαρακτηρισμός μικρογαλακτωμάτων

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικώς σταθερά, διαφανή και σχηματίζονται αυθόρμητα. Είναι ομοιογενή μακροσκοπικά αλλά αν εξετασθούν μικροσκοπικά διακρίνονται καλά καθορισμένες περιοχές ελαίου και νερού. Η μια φάση διασπείρεται μέσα στην άλλη με μορφή νανοσταγονιδίων με διάμετρο που κυμαίνεται από 10-100 nm. Συνήθως τα μικκύλια που σχηματίζονται λαμβάνουν σχήματα, είτε σφαιρικά, είτε ραβδοειδή αν και συχνά προκύπτει ο σχηματισμός ελλειψοειδούς ή πεπλατυσμένης μορφής. Το ιξώδες των μικρογαλακτωμάτων συνήθως διαφοροποιείται ανάλογα με την σύσταση του συστήματος. Συγκεκριμένα εξαρτάται από τον όγκο της διεσπαρμένης φάσης και από την φύση της συνεχούς φάσης.

Η δομική μελέτη των μικρογαλακτωμάτων πραγματοποιείται από έναν αριθμό τεχνικών οι οποίες όμως δρουν συμπληρωματικά καθώς δίνουν διαφορετικές πληροφορίες η καθεμία για το υπό μελέτη σύστημα. Κάποιες από τις τεχνικές αυτές βασίζονται στην σκέδαση όπως για παράδειγμα η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS Dynamic Light Scattering) καθώς επίσης και η σκέδαση ακτινών-X σε μικρές γωνίες (SAXS Small Angle X-ray Scattering). Κάποιες από τις μεθόδους βασίζονται σε φασματοσκοπικές τεχνικές όπως ο Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός (EPR Electron Paramagnetic Resonance), και ο Πυρηνικός Συντονισμός (NMR Nuclear Magnetic Resonance). Τέλος, υπάρχουν και οι τεχνικές που βασίζονται στην μέτρηση ιδιοτήτων μεταφοράς όπως η αγωγιμότητα και το ιξώδες (Papadimitriou et al. 2011, Pramanik et al. 2011).

Στην παρούσα εργασία η δομική μελέτη των μικρογαλακτωμάτων έγινε με την φασματοσκοπία EPR και με την τεχνική DLS. Με την τεχνική του EPR παρέχονται πληροφορίες για την μεμβρανική μονοστοιβάδα που σχηματίζεται από τα επιφανειονεργά όσο αφορά τη ρευστότητα. Η τεχνική του DLS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του προφίλ κατανομής μεγέθους μικρών σωματιδίων σε εναιώρημα ή σε διάλυμα πολυμερών (Berne & Pecora, 2000). Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της πολυδιασποράς των σχηματιζόμενων μικκυλίων.

1.2.6 Εφαρμογές μικρογαλακτωμάτων

Παρότι έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σχετικά με μικρογαλακτώματα, ελάχιστες μόνο αναφορές έχουν παρουσιαστεί σε συστήματα τροφίμων, λόγω του περιορισμένου αριθμού των επιφανειοδραστικών ουσιών που είναι κατάλληλες για τρόφιμα. Πολλές επιφανειοδραστικές ουσίες είναι μη επιτρεπόμενες σε τρόφιμα, ενώ άλλες

μπορούν να προστεθούν μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα τελευταία χρόνια σύμφωνα με τους Flanagan & Singh, (2006) παρουσιάζεται έντονο ενδιαφέρον για τα βιοσυμβατά μικρογαλακτώματα από τις βιομηχανίες τροφίμων, λόγω των μεγάλων δυνατοτήτων και προσδοκιών ως προς την εφαρμογή τους. Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί μια νέα προσέγγιση λοιπόν για τον σχεδιασμό τροφίμων, δηλαδή μικρογαλακτώματων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς χρωστικών ουσιών, βιοενεργών πεπτιδίων, αντιοξειδωτικών, συντηρητικών και αντιμικροβιακών παραγόντων, επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα ενζυμικών αντιδράσεων όπως η υδρόλυση λιπαρών γάλακτος (Mc Clements et al. 2007, Mc Clements et al. 2009, Singh et al. 2009). Η χρήση μικρογαλακτωμάτων ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών στην βιομηχανία φαρμάκων, σύμφωνα με τον Lawrence (1996), δείχνει να αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, και κυρίως να διευκολύνει την χορήγηση των μη υδατοδιαλυτών ουσιών (Garti et al. 2000, Chen&Pai. 1991). Οι Dungan et al. (1997) αναφέρουν επίσης πως η δυνατότητα ενίσχυσης της διαλυτότητας των υδρόφοβων βιταμινών, του αρώματος και άλλων θρεπτικών συστατικών σε συστήματα μικρογαλακτώματος παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς έχει την δυνατότητα να παρέχει ελεγχόμενη και σταθερή αποδέσμευση αυτών των συστατικών. Υπάρχει επίσης ένας μεγάλος αριθμός λιπιδίων που επωφελούνται από την ενθυλάκωση εντός αυτού του νέου τύπου τροφίμου, κάποια από αυτά τα συστατικά είναι τα ω-3 λιπαρά οξέα, το συζευμένο λινελαϊκό οξύ, το βουτυρικό οξύ, οι φυτοστερόλες, τα καριτονοειδή, τα αντιοξειδωτικά, και οι βιταμίνες A και D (Mc Clements et al. 2009). Επίσης προστατεύονται με αυτό τον τρόπο τα διαλυτοποιημένα συστατικά από τυχόν ανεπιθύμητες αντιδράσεις αποικοδόμησης. Οι Al-Adham et al. (2000) και Al-Adham et al. (2003), αναφέρουν πως ένα μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό για φαρμακευτική εφαρμογή έχει την δυνατότητα να μειώσει κατά 5-λογαριθμικούς κύκλους το πληθυσμό του *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* σε μόλις 45 s, καθώς επίσης ότι αποτελεί ιδιαίτερα αποτελεσματικό αντιμικροβιακό παράγοντα.

2. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης ήταν η παρασκευή νέων βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων με την ενσωμάτωση ενεργών βακτηριοσινών. Οι βακτηριοσίνες που ενσωματώθηκαν στα συστήματα των μικρογαλακτωμάτων ήταν η Νισίνη και η Μασεδοσίνη. Η Μασεδοσίνη είναι η αντιμικροβιακή ουσία η οποία απομονώθηκε και καθαρίστηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, όταν ο *Streptococcus macedonicus* αναπτύσσεται σε γάλα.

Τα βιοσυμβατά μικρογαλακτωματα που παρασκευάστηκαν στην συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους ενεργότητα, πραγματοποιήθηκε επίσης η δομική μελέτη αυτών με την τεχνική του EPR και DLS.

Πρόκειται για την πρώτη προσπάθεια εγκλωβισμού βακτηριοσινών σε μικρογαλακτώματα καθώς κάτι τέτοιο δεν έχει ξαναγίνει στο παρελθόν.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα μελέτη ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, χρησιμοποιήθηκε ως το παραγωγό στέλεχος της Μασεδοσίνης. Ο μικροοργανισμός ανανεώθηκε σε άπαχο γάλα 10% (w/v) (OXOID, Hampshir, England) με προσθήκη τρυπτόνης 0,3% (w/v) (Dushefa, Haarlem, The Netherlands). Η επώαση του έγινε στους 37 °C για 24 h, ενώ όπου χρειάστηκε η ανάπτυξη του έγινε σε θρεπτικό υλικό M17 (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Το ευαίσθητο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363, αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα M17, εμπλουτισμένο με 1% (w/v) γλυκόζη (Appllichem, Darmstadt, Germany) (GM17) στους 30 °C για 24 h.

3.2 Πρωτόκολλα καθαρισμού της Μασεδοσίνης

Όλα τα στάδια καθαρισμού της Μασεδοσίνης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20 °C. Επιπλέον, από κάθε βήμα καθαρισμού μία μικρή ποσότητα δείγματος τοποθετήθηκε σε μικροσωλήνες τύπου Eppendorf και διατηρήθηκε στους -20 °C. Τα δύο πρωτόκολλα έχουν κοινά στάδια για τον λόγο αυτό θα περιγραφούν αναλυτικά μια φορά, και στην συνέχεια θα γίνεται απλή αναφορά.

3.2.1 Πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού

Το πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό κατακρήμνισης των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο, χρωματογραφίας ανοιχτού τύπου και Υγρής Χρωματογραφίας Γρήγορης Απόδοσης (Fast Liquid Chromatography, FPLC).

Για τον καθαρισμό της αντιμικροβιακής ένωσης αρχικά πραγματοποιήθηκε η ανανέωση του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.1. Μετά το πέρας των 24 h ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 εμβολιάστηκε σε 1 l άπαχου γάλακτος με εκχύλισμα ζύμης 0,3% (w/v) και ακολούθησε η επώαση του για 24 h στους 37 °C για την τελική ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η φυγοκέντρηση του δείγματος στα 6812 g σε θερμοκρασία 20 °C για

20 min. Παραλήφθηκε το υπερκείμενο από τη φυγοκέντρηση της καλλιέργειας και έγινε ρύθμιση του pH στο 7,0 με χρήση διαλύματος 1 N NaOH. Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση με τις ίδιες συνθήκες της πρώτης για την απομάκρυνση των καζεϊνών. Το υπερκείμενο παραλήφθηκε και μετρήθηκε ο όγκος του. Το δείγμα αυτό αντιστοιχεί στο πρώτο στάδιο καθαρισμού της Μασεδοσίνης (**δείγμα Crude**).

Στη συνέχεια για τη συμπύκνωση της Μασεδοσίνης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κατακρήμνισης με θειικό αμμώνιο. Με την προσθήκη άλατος σε ένα διάλυμα πρωτεϊνών βελτιώνεται η διαλυτότητα τους, έτσι με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος αυξάνεται και η διαλυτότητα. Όταν όμως η συγκέντρωση του άλατος αυξηθεί περισσότερο παρατηρείται αφυδάτωση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την κατακρήμνισή τους. Πρόκειται για απλή και πολύ καλή μέθοδο συγκέντρωσης και ενός πρώτου διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Το άλας που χρησιμοποιείται στη μέθοδο αυτή, όπως και στην παρούσα μελέτη είναι το θειικό αμμώνιο και η συγκέντρωση αυτού που προστίθεται εκφράζεται σε βαθμός κορεσμού % του διαλύματος στο άλας. Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας, ο επιθυμητός βαθμός κορεσμού σε θειικό αμμώνιο ήταν 50% και αντιστοιχεί σε 313 g θειικού αμμωνίου/1 διάλυματος.

Στο δείγμα Crude προστέθηκε σταδιακά θειικό αμμώνιο και το δείγμα παρέμεινε στους 4 °C υπό ανάδευση για 18 h. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 6812 g σε θερμοκρασία 4 °C για 40 min. Το ίζημα συλλέχθηκε και επαναιωρήθηκε σε 90 ml απιονισμένου H₂O. Το δείγμα αυτό αντιστοιχεί στο δεύτερο στάδιο καθαρισμού της Μασεδοσίνης (**δείγμα Cr-ASP**, Ammonium Sulfate Precipitate). Για τον έλεγχο αντιμικροβιακής δράσης στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης συλλέχθηκε και ελέγχθηκε 1 ml δείγματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η διήθηση του δείγματος υπό κενό με ηθμό Regenerated Cellulose με πόρους διαμέτρου 0.22 μm (Whatman, Dassen, Germany).

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η Χρωματογραφία ανοιχτού τύπου με τη χρήση του υλικού Amberlite XAD-2 (SUPELCO, Bellefonte, USA). Πρόκειται για προσροφητική ρητίνη, η οποία όταν εκλουστεί με οργανικό διαλύτη διογκώνεται. Αρχικό στάδιο πριν τη χρήση του υλικού XAD-2, ήταν η ενεργοποίηση του σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα 20 g του υλικού XAD-2 τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 500 ml και στη συνέχεια προστέθηκαν 100 ml διαλύματος 95% MeOH v/v και υπό ανάδευση παρέμειναν για 15 min. Μετά από ηρεμία 25 min, αφαιρέθηκε το διάλυμα 95% MeOH v/v, και προστέθηκαν 100 ml απιονισμένου H₂O υπό ανάδευση για 10 min και απόχυση αυτού. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 2 φορές. Μετά την ενεργοποίηση του υλικού, προστέθηκαν τα 90 ml του δείγματος και υπό ανάδευση παρέμειναν έτσι για 30

min. Μετά το πέρας των 30 min το μη κατακρατηθέν δείγμα αφαιρέθηκε, και φυλάχθηκε σε φιάλες τύπου duran (**NR-δείγμα**). Ανάμεσα σε κάθε βήμα πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα του υλικού με H₂O. Στη συνέχεια προστέθηκαν 150 ml 50% MeOH v/v και παρέμειναν υπό ανάδευση για 15 min. Το διάλυμα αφαιρέθηκε μετά από ηρεμία 15 min και φυλάχθηκε σε φιάλη τύπου duran (**NR-50%**). Στο επόμενο βήμα προστέθηκε 150 ml διαλύματος 70% MeOH v/v και ακολουθήθηκε ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται πιο πάνω. Το δείγμα που φυλάσσεται είναι το (**NR-70%**). Το τελευταίο διάλυμα που προστίθεται ήταν 150 ml 95% MeOH v/v και παρέμεινε υπό ανάδευση για 30 min. Το δείγμα που παραλήφθηκε (**NR-95%**) εξετάστηκε ως προς την αντιμικροβιακή δράση του όπως επίσης έγινε και για τα προηγούμενα δείγματα ASP, Crude, NR-50%, NR-70%. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 2 φορές.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η εξάτμιση του δείγματος σε συσκευή flash evaporator και η επαναιώρησή του σε υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (TFA) 0,1% v/v. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της Μασεδοσίνης, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός με τη στήλη αντίστροφης φάσης Resource RPC (Reversed Phase Chromatography) . Χρησιμοποιήθηκε σύστημα Χρωματογραφίας Γρήγορης Απόδοσης (Fast Performance Liquid Chromatography, FPLC) (συσκευή 650^E Advanced Protein Purification System). Το σύστημα της FPLC είναι συνδεδεμένο με φωτόμετρο τύπου WatersTM486 Tunable Absorbance Detector. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με το ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 TFA 0,1 %. Το μόριο της Μασεδοσίνης λόγω της έντονης υδροφοβίας του προσδένεται στο υλικό της στήλης. Αφού το δείγμα διοχετεύθηκε στη στήλη το μη κατακρατηθέν μέρος της κινητής φάσης (**Non Retained, NR**) παραλήφθηκε με το ίδιο διάλυμα. Η έκλυση των συστατικών που προσδέθηκαν στο υλικό της στήλης, έγινε με ροή 2 ml/ min με γραμμική βαθμίδωση συγκέντρωσης από 25 σε 80% διαλύματος 0,1 %v/v TFA σε ακετονιτρώλιο (RPC-ACN) και παραλήφθηκαν 60 κλάσματα. Μετά το τέλος της έκλυσης με γραμμική βαθμίδωση συγκέντρωσης, από το διάλυμα (RPC CAN) λήφθηκε δείγμα για να ελεγχθεί ως προς την αντιμικροβιακή του δράση. Το δείγμα αυτό θα αναφέρεται ως **Flow Throw (FT)**.

Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν εξετάστηκαν ως προς την ενεργότητα. Τα ενεργά κλάσματα από τον πρώτο και τον δεύτερο καθαρισμό ενοποιήθηκαν και στην συνέχεια λυοφιλιώθηκαν.

Η λυοφιλίωση είναι μια μέθοδος αφυδάτωσης, η αρχή της μεθόδου είναι η εξάχνωση του νερού χωρίς να προηγηθεί τήξη. Ο Jennings (1999), αναφέρει ότι κατά την εξάχνωση λαμβάνουν χώρα δύο διαδικασίες, η πρώτη είναι η εξάχνωση των κρυστάλλων που αποτελεί

τον κύριο μηχανισμό ξήρανσης και η εκρρόφιση που αποτελεί δευτερεύοντα μηχανισμό ξήρανσης.

Για να καταλυθούν γρήγορα τα ενοποιημένα κλάσματα βυθίστηκαν σε 100% v/v μεθανόλη θερμοκρασίας -80 °C. Οι φιάλες λυοφιλίωσης τοποθετήθηκαν στις ειδικές θέσεις του λυοφιλιωτή (Ehrst Alpha I – 12) μέχρι να αφυδατωθούν πλήρως. Το τελικό προϊόν που παραλήφθηκε ήταν πορώδες, με εύθρυπτη δομή και μεγάλη ευκολία στην ενυδάτωση. Η επαναιώρηση των λυοφιλιωμένων δειγμάτων έγινε σε απιονισμένο νερό.

3.2.2 Δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού

Το δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό κατακρήμνισης των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο και FPLC.

Τα πρώτα στάδια των δύο πρωτοκόλλων είναι κοινά, αναλυτικά έχουν αναφερθεί και περιγραφεί στην παράγραφο 3.2.1. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της Μασεδοσίνης, χρησιμοποιήθηκε σύστημα Χρωματογραφίας FPLC. Όλα τα διαλύματα της στήλης παρασκευάστηκαν με υπερκάθαρο νερό και πριν την χρήση τους διηθηθήκαν υπό κενό με ηθμό με πόρους διαμέτρου 0.22 μm. Πριν την εισαγωγή του δείγματος, πραγματοποιήθηκε η εξισορρόπηση της στήλης με το διάλυμα MeOH 95% v/v για 4.5 min και στη συνέχεια γίνεται η εισαγωγή απιονισμένου H₂O με γραμμική αύξηση για 3 min και επιπλέον παραμονή για 15 min. Στη συνέχεια το διηθημένο δείγμα εισήχθη και η ροή της στήλης ορίστηκε 2ml/min. Το μη κατακρατηθέν (Non Retained, NR) μέρος του δείγματος, της κινητής φάσης δηλαδή, συλλέχθηκε σε φιάλες τύπου duran. Το προσδεμένο δείγμα στη μήτρα της στήλης παραλήφθηκε μετά την έκλυση με διάλυμα 95% MeOH v/v και συλλέχθηκε σε φιάλη τύπου duran. Το διάλυμα έκλυσης της στήλης κρατήθηκε και αυτό σαν δείγμα για έλεγχο τυχόν αντιμικροβιακής δράσης. Το κατακρατηθέν δείγμα που συλλέχθηκε, εξετάστηκε ως προς την αντιμικροβιακή του ενεργότητα με την μέθοδο WDA πραγματοποιώντας δυαδικές αραιώσεις (Well Diffusion Assay). Αναλυτικά η μέθοδος περιγράφεται στην παράγραφο 3.4. Τα επόμενα στάδια του δεύτερου πρωτοκόλλου ήταν κοινά με του πρώτου και έχουν περιγραφεί διεξοδικά στην παράγραφο 3.2.1.

3.3 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στηρίζονται στην διαύγαση του θρεπτικού υποστρώματος γύρω από τα σημεία που είχε τοποθετηθεί η βακτηριοσίνη λόγω της διάχυσης της ουσίας στο στερεοποιημένο υπόστρωμα.

Μέθοδος WDA (Well Diffusion Assay)

Σε θρεπτικό υπόστρωμα GM17 (1,3 % w/v άγαρ) (Agar Bacteriologique type E, Biokar Daignostic, Beauvais France), εμβολιάστηκε το ευαίσθητο στέλεχος *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (εμβόλιο 0.1% v/v) και στρώθηκαν τρυβλία. Στο στερεοποιημένο υπόστρωμα ανοίχτηκαν οπές με ανεστραμμένες πιπέτες Pasteur. Από κάθε δείγμα 50 μl τοποθετήθηκαν στις οπές του τρυβλίου και ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 18 h. Μετά την επώαση έγινε παρατήρηση των τρυβλίων και η εμφάνιση διαυγής ζώνης γύρω από τις οπές..

Μέθοδος ενσωμάτωσης (spot on lawn).

Σε θρεπτικό υπόστρωμα GM17, εμβολιάστηκε το ευαίσθητο στέλεχος και στρώθηκαν τρυβλία. Στην επιφάνεια του σταθεροποιημένου υποστρώματος τοποθετήθηκαν 50 μl από κάθε δείγμα σε προκαθορισμένες θέσεις και ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 18 h..

Μέθοδος εξάπλωσης (spot on lawn)

Σε τρυβλία εξεπλώθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα. Στην επιφάνεια του στερεοποιημένου υποστρώματος εξεπλώθηκε το ευαίσθητο στέλεχος και τοποθετήθηκαν επιφανειακά 50 μl από κάθε δείγμα σε προκαθορισμένες θέσεις στο τρυβλίο. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 18 h. Αντίστοιχα μετά την επώαση έγινε παρατήρηση των τρυβλίων. Διαυγής ζώνη υποδηλώνει την ύπαρξη βακτηριοσίνης.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της ενεργότητας είναι η μέθοδος της διάχυσης σε τρυβλία (Well Diffusion Assay (WDA), (Tagg & McGiven, 1971). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενεργότητας της ουσίας πραγματοποιήθηκαν για κάθε δείγμα δυαδικές διαδοχικές αραιώσεις με αποιονισμένο νερό και για κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκε WDA. Η ενεργότητα εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, AU) και υπολογίστηκε από τον τύπο.

$$AU/ml = 2^n \times 20$$

Όπου n, η τελευταία αραίωση, στην οποία διακρίθηκε ζώνη παρεμπόδισης.

3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Για κάθε στάδιο καθαρισμού πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad) δημιουργώντας ένα σύμπλοκο, το οποίο απορροφά στα 595 nm. Η αλλαγή του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του δείγματος, η οποία υπολογίζεται με βάση μία καμπύλη αναφοράς. Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα αλβουμίνη βοείου ορού BSA (Bovine Serum Albumin) σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,2 – 0,9 mg/ml (περιοχή που διατηρείται η γραμμικότητα της αντίδρασης). Η διαδικασία που ακολουθείται στην παρούσα πτυχιακή μελέτη είναι αυτή που περιγράφεται από την εταιρία Bio-Rad. Ένα μέρος του πυκνού αντιδραστηρίου Bradford αραιώνεται με πέντε μέρη απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, 100 μl από κάθε δείγμα αναμειγνύονται με 5 ml αραιωμένου αντιδραστηρίου και μετά από 5 min και σε διάστημα μίας ώρας μετράται φασματοφωτομετρικά η απορρόφηση στα 595 nm με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-3200 Spectrophotometer. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

3.5 Ανάπτυξη βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων - Ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσεων

Πίνακας 3.1 Συστατικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων.

Φυτικά-Αιθέρια Έλαια	Επιφανειοενεργές Ουσίες	Βακτηριοσίνη
Παρθένο ελαιόλαδο	Λεκιθίνη Σόγιας	Συμπύκνωμα Νισίνης (εμπορικό σκεύασμα)
Ηλιέλαιο	Πολυσορβικό 80 (Tween 80)	Συμπύκνωμα Μασεδοσίνης (εργαστηριακός καθαρισμός)
Σογιέλαιο	Πολυσορβικό 20 (Tween 20)	
Λιμονένιο		

Αρχικά παρασκευάστηκαν μίγματα επιφανειοενεργής ουσίας με έλαιο σε σταθερές επί τις εκατό % αναλογίες και τιτλοδοτήθηκαν με υδατική φάση. Συνολικά παρασκευάζονται 9 μίγματα, όπου το επιφανειοενεργό κυμαίνεται από 90% έως και 10% για κάθε σύστημα. π.χ 90% w/w επιφανειοενεργό και 10% έλαιο, 80% w/w επιφανειοενεργό και 20% w/w έλαιο. Η κάθε αναλογία για κάθε σύστημα αποτελεί μια γραμμή διαλυτότητας. Δηλαδή η γραμμή διαλυτότητας Δ73 αντιστοιχεί σε μίγμα επιφανειοενεργού-ελαίου αναλογίας 70% w/w επιφανειοενεργό και 30% w/w έλαιο. Το τελικό βάρος του κάθε δείγματος ήταν 1g. Για κάθε ένα από τα εννέα μίγματα προστέθηκε υδατική φάση, στην οποία ήταν διαλυτοποιημένη η βακτηριοσίνη. Οι βακτηριοσίνες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν συμπύκνωμα νισίνης σε συγκέντρωση 1mg/ml με ενεργότητα 40960 AU και συμπύκνωμα μασεδοσίνης ενεργότητας 332800AU. Κάθε εργαστηριακή ημέρα προστίθενται 5 μl από την υδατική φάση που περιείχε την βακτηριοσίνη, σε κάθε σύστημα. Στην συνέχεια πραγματοποιούνταν μηχανική ανάδευση με το χέρι και παραμονή σε υδατόλουτρο στο 25 °C για 24 h. Το κριτήριο για την επιτυχή δημιουργία μικρογαλακτώματος ήταν η διαύγεια του τελικού δείγματος. Δείγματα, τα οποία θόλωναν με την προσθήκη υδατικής φάσης απορρίπτονται ως ανεπιτυχή.

Με βάση τα αποτελέσματα των πιο πάνω τιτλοδοτήσεων πραγματοποιήθηκε η κατασκευή των ψευδοτριγωνικών διαγραμμάτων φάσεων λαμβάνοντας υπόψη την μέγιστη τιμή υδατικής φάσης που μπόρεσε να ενσωματωθεί σε κάθε σειρά, σε κάθε σύστημα και το δείγμα παρέμεινε διαυγές. Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζονται όλα τα συστήματα

μικρογαλακτώματος που κατασκευάστηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης. Κάποια από αυτά ήταν επιτυχή και κάποια άλλα όχι. Τα επιτυχή συστήματα μικρογαλακτώματος όπου και αναπτύχθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 και είναι τα τέσσερα πρώτα.

Πίνακας 3.2. Συγκεντρωτικός Πίνακας, με όλα τα συστήματα που αναπτύχθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος.

α/α	Συστατικά μικρογαλακτώματος
1	Λιμονένιο:Αιθανόλη(1:1)/Tween 80
2	Ελαιόλαδο/Λεκιθίνη:1-Προπανόλη
3	Ηλιέλαιο:Λιμονένιο (3:2) /Λεκιθίνη:1-Προπανόλη
4	Σογιέλαιο:Λιμονένιο (3:2) /Λεκιθίνη:1-Προπανόλη
5	Ελαιόλαδο/ Tween 20:Γλυκερόλη
6	Ελαιόλαδο/Λεκιθίνη:Γλυκερόλη
7	Ελαιόλαδο/ Tween 20
8	Ελαιόλαδο/ Tween 40:Γλυκερόλη
9	Ελαιόλαδο/ Tween 20:Λεκιθίνη
10	Ελαιόλαδο/Λεκιθίνη
11	Ελαιόλαδο/ Tween 40:Γλυκερόλη
12	Ελαιόλαδο/Λεκιθίνη:Ισοβουτανόλη

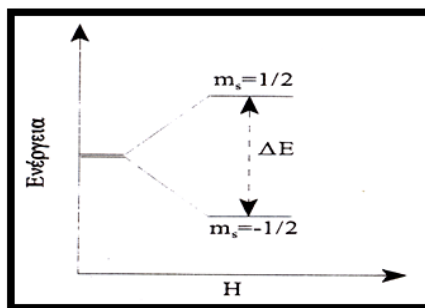
Η μη επιτυχημένη ανάπτυξη μικρογαλακτωμάτων στα συστήματα 5 έως 12 του Πίνακα 3.2 οφείλεται είτε στην μη αναμιξιμότητα του ελαίου με τα επιφανειοενεργά ή/και στην αδυναμία ενσωμάτωσης υδατικής φάσης.

3.6 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με EPR

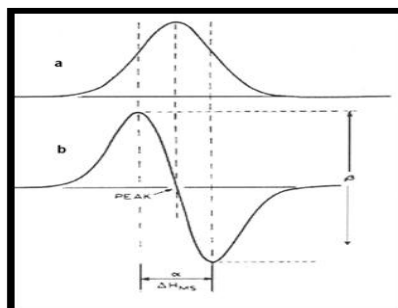
Με την τεχνική EPR και τη χρήση κατάλληλου ιχνηθέτη spin πραγματοποιήθηκε η μελέτη της δυναμικής της μονοστιβάδας των επιφανειοενεργών για τα συστήματα που αναπτύχθηκαν. Οι μετρήσεις έγιναν με φασματόμετρο Bruker EMX EPR που λειτουργεί στην X-Band. Οι ρυθμίσεις του οργάνου ήταν ως εξής: κέντρο πεδίου 3480 G, εύρος σάρωσης 100 G, πολλαπλασιαστής $2,83 \times 10^{-3}$, σταθερά χρόνου 168,84 ms, εύρος ρύθμισης 5 G, μικροκυματική ισχύς 2,4 mW, συχνότητα 9,78 GHz. Τα φάσματα καταγράφηκαν και επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Bruker WinEPR acquisition and processing. Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των δειγμάτων ήταν επίπεδη κυψελίδα τύπου WG-813-Q Wilmad (Buena, NJ) Suprasil.

Πρόκειται για μέθοδο φασματοσκοπίας απορρόφησης κατά την οποία το φάσμα παράγεται από το συντονισμό του ηλεκτρονικού spin μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο με την επίδραση ακτινοβολίας μικροκυμάτων. Κάθε φορτισμένο σωματίδιο που περιστρέφεται γύρω από τον εαυτό του ή περιστρέφεται γύρω από ένα κεντρικό σημείο συμπεριφέρεται ως ένας μικροσκοπικός μαγνήτης με τους πόλους τους κατά μήκος του άξονα περιστροφής του. Το ηλεκτρόνιο ως αποτέλεσμα της περιστροφής του γύρω από τον άξονα του παρουσιάζει άνυσμα μαγνητικής ροπής και το spin του χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό s . Σύμφωνα με την θεωρία της κβαντομηχανικής το spin του ηλεκτρονίου μπορεί να λάβει δύο προσανατολισμούς, α και β , σε σχέση με μια επιλεγμένη κατεύθυνση. Οι δύο αυτοί προσανατολισμοί αφορούν τα ανύσματα στροφορμής του $m_s \hbar$ ($\hbar = h/2\pi$) του, όπου $m_s = \pm \frac{1}{2}$. Αυτό σημαίνει ότι η μαγνητική ροπή του spin (αυτοστροφορμή) έχει την δυνατότητα να λάβει μόνο δύο προσανατολισμούς σε σχέση με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.1.

Το EPR φάσμα μπορεί να παρασταθεί, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.2 με γραφική παράσταση της εντάσεως του σήματος έναντι του μαγνητικού πεδίου H , όπως τα φάσματα NMR, αλλά συνήθως παρίστανται ως διαφορικές καμπύλες, δηλαδή παριστάνεται η πρώτη παράγωγος του φάσματος απορρόφησης έναντι του H . Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ευαισθησία, ιδιαιτέρως σε περιπτώσεις ευρέων γραμμών.

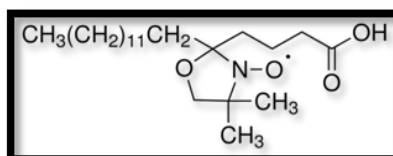


Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση διαχωρισμού ενεργειακών καταστάσεων ηλεκτρονικού spin παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.



Σχήμα 3.2. Σχηματική απεικόνιση α) ζώνη απορρόφηση EPR, β) πρώτη παράγωγος ζώνης απορρόφησης EPR.

Στην παρούσα εργασία ως ιχνηθέτης του spin (spin probe) χρησιμοποιήθηκε το 5-DSA (5-Doxyl Stearic Acid) σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 10^{-2} M, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο.



Σχήμα 3.3. Μοριακός τύπος του 5-DSA

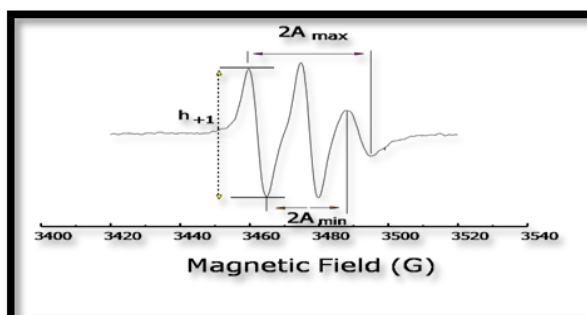
Το 5-DSA είναι ένα λιπίδιο που φέρει στην θέση C5 ομάδα νιτροξειδίου, πρόκειται για αμφίφιλο μόριο καθώς έχει μια πολική κεφαλή και μια υδρόφοβη ανθρακική ουρά. Με την διαλυτοποίησή του στο μικρογαλάκτωμα εντοπίζεται στην μεσεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί μεταξύ του ελαίου και του νερού και αποτελείται από επιφανειοενεργά μόρια. Η πολική κεφαλή είναι προσανατολισμένη προς το νερό (πολική φάση), ενώ η υδρόφοβη ανθρακική ουρά είναι προσανατολισμένη προς το έλαιο (οργανική φάση). Ο παραμαγνητικός δακτύλιος εντοπίζεται ανάμεσα στις ανθρακικές αλυσίδες του

επιφανειοενεργού. Από την μελέτη των φασμάτων λαμβάνονται πληροφορίες για την συνεκτικότητα και την ρευστότητα της μεμβράνης.

Ο ιχνηθέτης διαλύεται σε αιθανόλη (10^{-2} M) και αφήνεται στην κατάψυξη. Για κάθε δείγμα, 10 μ L αυτού προστίθενται σε φιαλίδια τύπου erpendorf και αφήνονται για 1h στον πάγκο για την εξάτμιση της αιθανόλης. Στην συνέχεια 1 g του μικρογαλακτώματος μεταφέρεται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf, όπου αναμιγνύεται με το spin probe. Για την ομοιογένεια του διαλύματος πραγματοποιείται ήπια ανάδευση. Στην συνέχεια, το δείγμα προστίθεται στην ειδική κυψελίδα για φασματοσκοπία EPR η οποία τοποθετείται στην ειδική κοιλότητα (cavity) του οργάνου όπου υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου το περιεχόμενο στο δείγμα spin probe, απορροφά ακτινοβολία μικροκυματικής συχνότητας 9,75 GHz δίνοντας το χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης για τα νιτροξειδία. Η εφαρμογή της μεθόδου EPR στην παρούσα εργασία ήταν η μελέτη της ρευστότητας της μεμβρανικής μονοστοιβάδας των μικρογαλακτωμάτων (Howe 1982). Η ελεύθερη περιστροφή του spin probe επηρεάζεται από το μεμβρανικό του μικροπεριβάλλον. Μια ρευστή μεμβράνη επιτρέπει περισσότερο την περιστροφή του spin probe απ' ότι μια συμπαγής και λιγότερο ρευστή μεμβράνη στην οποία η περιστροφή παρεμποδίζεται. Φάσματα EPR που χαρακτηρίζονται από ισουψείς οξείες και μικρού εύρους κορυφές, μαρτυρούν υψηλή κινητικότητα του spin probe ενώ ανισουψείς αμβλείες και μεγάλου εύρους κορυφές μαρτυρούν παρεμπόδιση στην ελεύθερη κίνηση του ιχνηθέτη.

3.6.1 Επεξεργασία φασμάτων EPR

Από το EPR φάσμα του 5-DSA μετρώνται οι τιμές διαφόρων παραμέτρων. Το ύψος h , η ένταση δηλαδή, κάθε κορυφής, και το εύρος (ΔH). Το κάθε φάσμα αποτελείται από τρεις κορυφές με σχεδόν ίδιο ύψος και πλάτος σε αραιά διαλύματα, ενώ όταν παρουσιάζεται ασυμμετρία στις κορυφές οφείλεται στην ακινητοποίηση ή στον περιορισμό περιστροφής του ιχνηθέτη. Από τα χαρακτηριστικά του φάσματος (Σχήμα 3.4) προκύπτουν δύο παράμετροι: α) rotational correlation time τ_R , β) order parameter S .



Σχήμα 3.4. Σχηματική απεικόνιση EPR φάσματος του 5-DSA.

- *Παράμετρος S.* Λαμβάνονται πληροφορίες για την ελαστικότητα της μεσεπιφάνειας. Παίρνει τιμές από 0 έως 1. Όταν ο παράγοντας S είναι ίσος με την μονάδα, το 5-DSA βρίσκεται πλήρως ακινητοποιημένο ενώ όταν είναι ίσος με μηδέν κινείται ελεύθερο. Με την αύξηση της τιμής του παράγοντα S, περιορίζεται η ελαστικότητα της μεμβράνης.

$$S=(A_{||}-A_{\perp})/[A_{ZZ}-1/2(A_{XX}+A_{YY})](\alpha_0'/\alpha_0) \quad [1]$$

όπου, το $A_{||}$ αντιστοιχεί στην μισή απόσταση του εξωτερικού μέγιστου διαχωρισμού $2A_{\max}$ και το A_{\perp} υπολογίζεται από τις επόμενες εξισώσεις

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4 (1-S^{\text{app}}) \quad [2]$$

$$S^{\text{app}} = (A_{\max} - A_{\min})/[A_{ZZ}-1/2(A_{XX}+A_{YY})] \quad [3]$$

Όπου, το A_{\min} ισοδυναμεί με την μισή απόσταση του εσωτερικού ελάχιστου διαχωρισμού και το α_0 αποτελεί την ισότροπη σταθερό υπέρλεπτου διαχωρισμού για την ρίζα νιτροξειδίου (5-DSA) στην κρυσταλλική μορφή.

$$\alpha_0 = (A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ})/3 \quad [4]$$

Η σταθερά α_0' , αποτελεί την ισότροπη σταθερά υπέρλεπτου διαχωρισμού για τη ρίζα νιτροξειδίου (5-DSA) όταν αυτή βρίσκεται εντοπισμένη στη μεσεπιφάνεια και φανερώνει την πολικότητα στο μικροπεριβάλλον του 5-DSA

$$\alpha_0' = (A_{||} - 2A_{\perp})/3 \quad [5]$$

Οι τιμές A_{XX} , A_{YY} και A_{ZZ} αναφέρονται στην κρυσταλλική μορφή του 5-DSA και είναι σταθερές των οποίων οι τιμές είναι:

$$A_{XX} = 6,3 \quad A_{YY} = 5,8 \quad A_{ZZ} = 33,6 \text{ (Gauss)}$$

- *Παράμετρος τ_R .* Η συγκεκριμένη παράμετρος έχει σχέση με την ταχύτητα περιστροφής του spin probe από την θέση στην οποία βρίσκεται μέσα στην μονοστοιβάδα των επιφανειοενεργών και είναι ενδεικτική της δυναμικής της μονοστοιβάδας.

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

Όπου ΔH είναι το πλάτος της κεντρικής κορυφής (Gauss), οι τιμές h_0 , h_{+1} και h_{-1} είναι η ένταση της χαμηλότερης, της υψηλότερης και της κεντρικής κορυφής.

3.7 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με DLS

Με την τεχνική της DLS πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του μεγέθους και της πολυδιασποράς των σχηματιζόμενων μικκυλίων των μικρογαλακτωμάτων που αναπτύχθηκαν. Η αρχή της σκέδασης του φωτός στηρίζεται στην προσπίπτουσα μονοχρωματική ακτινοβολία που πέφτει στο δείγμα. Η ένταση της σκεδασμένης ακτινοβολίας μετράται ως συνάρτηση της γωνίας σκέδασης που σχηματίζεται. Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός, χρησιμοποιείται για σωματίδια μεγέθους μέχρι και 0.01 μm, και βασίζεται στο γεγονός ότι τα διεσπαρμένα σωματίδια κινούνται με διάχυση.

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της πολυδιασποράς των αντίστροφων μικκυλίων των μικρογαλακτωμάτων που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκε η συσκευή DLS. Η συσκευή DLS ήταν Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) της εταιρείας Malvern Instruments (UK) εξοπλισμένη λέιζερ με He-Ne (632.8 nm) και χρησιμοποιώντας τεχνολογία Non-Invasive Back Scatter (NIBS). Οι μετρήσεις διεξήχθησαν υπό γωνία σκέδασης 173°. Η μέση διάμετρος υπολογίστηκε μέσω της υδροδυναμικής ακτίνας από τον νόμο Stokes-Einstein

$$R_H = k_B T / (6\pi\eta D) \quad [7]$$

Όπου οι τιμές R_H , k_B , T , η και D είναι αντίστοιχα η υδροδυναμική ακτίνα του σταγονιδίου, η σταθερά Boltzmann's, η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin, το ιξώδες του μικρογαλακτώματος και η σταθερά διάχυσης. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν διηθήθηκαν μέσω ηθμού με διάμετρο πόρου 0,45 μm και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στην ειδική γυάλινη κυψελίδα που διαθέτει η συσκευή. Η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε η μέτρηση ήταν 25 °C.

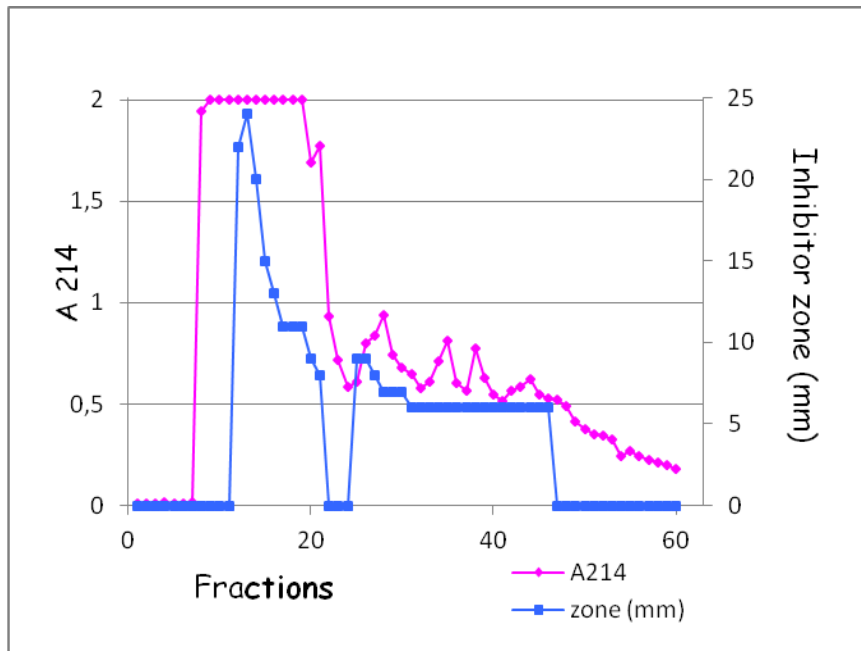
4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Καθαρισμός Μασεδοσίνης

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός της Μασεδοσίνης από το παραγωγό στέλεχος *Streptococcus macedonius* ACA-DC 198. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα καθαρισμού σύμφωνα με την δημοσίευση των Georgalaki et al. (2002) με κάποιες παραλλαγές όμως. Τα πρώτα στάδια των δύο πρωτοκόλλων ήταν κοινά και αφορούσαν την παραλαβή του ακαθάριστου κυτταρικού εκχυλίσματος και την κατακρίμνηση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο.

Στο πρώτο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε αρχικά χρωματογραφία ανοιχτού τύπου με την χρήση του υλικού XAD-2. Διαπιστώθηκε ότι η Μασεδοσίνη λόγω της υψηλής υδροφοβίας της δεν παραλήφθηκε ούτε με το διάλυμα 50% MeOH v/v ούτε με το διάλυμα 70 % MeOH v/v. Δεδομένου ότι πρόκειται για ένα αρκετά υδρόφοβο μόριο, παραλήφθηκε μόνο με την έκλουση του υλικού με 95 % MeOH v/v. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης FPLC όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1. Τα ενεργά κλάσματα ήταν μεταξύ 12-21 και παραλήφθηκαν από συγκέντρωση ακετονυτριλίου 35, 92 % μέχρι 44.11 %, καθώς πραγματοποιήθηκε γραμμική βαθμίδωση συγκέντρωσης από 25-80 % RPC-CAN. Με το πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού διαπιστώνεται βαθμός απόδοσης που ανέρχεται σε 40 % και βαθμός καθαρισμού 7,85 %. Τα ενεργά κλάσματα 12-21 είχαν ολική ενεργότητα 102400 και συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 9,50 mg.

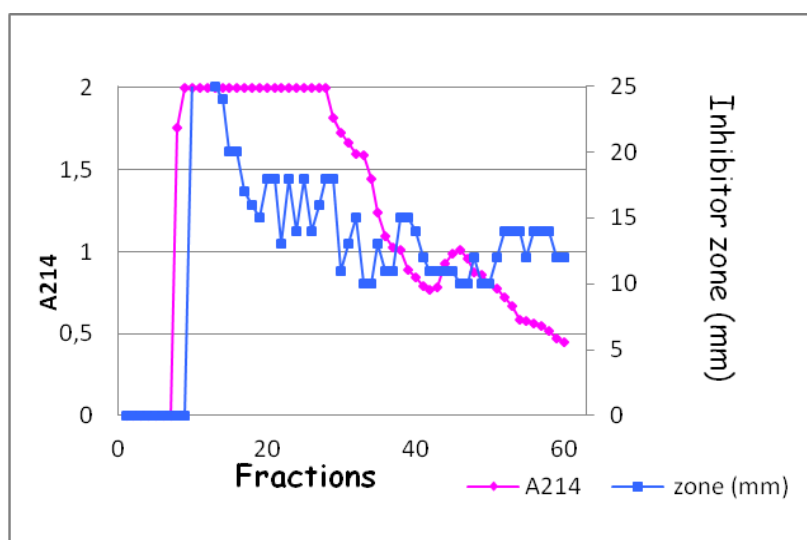
Στο δεύτερο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία FPLC με διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες, αναλυτικά η μέθοδος έχει περιγραφεί στην παράγραφο 3.2.2. Όπως και στην περίπτωση του πρώτου πρωτοκόλλου το μόριο της Μασεδοσίνης παραλήφθηκε όταν έγινε έκλουση της στήλης με 95 % v/v οργανικό διαλύτη και συγκεκριμένα MeOH. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία FPLC περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.1. Τα ενεργά κλάσματα που λάβαμε ήταν μεταξύ 10-41, επειδή και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε γραμμική βαθμίδωση συγκέντρωσης, τα κλάσματα παραλήφθηκαν από συγκέντρωση ακετονυτριλίου που κυμαινόταν 34,1 % έως 62,31 %. Στην περίπτωση του δεύτερου πρωτοκόλλου ο βαθμός απόδοσης ανέρχεται στο 55 % ενώ ο βαθμός καθαρισμού είναι στο 3,51. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης και η ολική ενεργότητα των ενεργών κλασμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.



Σχήμα 4.1. Χρωματογράφημα της στήλης RPC της Μασεδοσίνης και η αντιμικροβιακή ενεργότητα ως προς τον *Lactococcus lactis ssp. cremoris MG1363*.

Πίνακας 4.1. Πρώτο πρωτόκολλο καθαρίσμού της Μασεδοσίνης.

Purification Step	V (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (AU/ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (AU)	Specific Activity (AU/mg)	Yield (%)	Purification Fold
Crude	800	0,233	320	186,40	256000	1373	100,00	1,00
ASP	90	1,650	2560	148,50	230400	1552	90,00	1,13
XAD-MeOH 95%	200	0,000	320	0,00	64000	-	25,00	-
RPC-ACN fractions 12-21	10	0,950	10240	9,50	102400	10779	40,00	7,85



Σχήμα 4.2. Χρωματογράφημα της στήλης RPC της Μασεδοσίνης και η αντιμικροβιακή ενεργότητα ως προς τον *Lactococcus lactis ssp. cremoris MG1363*.

Πίνακας 4.2. Δεύτερο πρωτόκολλο καθαρίσμού της Μασεδοσίνης.

Purification Step	V (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (AU/ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (AU)	Specific Activity (AU/mg)	Yield (%)	Purification Fold
Crude	800	0,228	320	182,40	256000	1404	100,00	1,00
ASP	90	1,730	2560	155,70	230400	1480	90,00	1,05
RPC-MeOH 95%	150	0,226	1280	33,90	192000	5664	75,00	4,04
RPC-ACN Fr. 10-41	55	0,520	2560	28,60	140800	4923	55,00	3,51

Τα ενοποιημένα κλάσματα 12-21 και 10-41, των δύο πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν, όπως ήδη έχει αναφερθεί στην παράγραφο 3.2.1 λυοφιλιώθηκαν. Η συνολική ενεργότητα των κλασμάτων αυτών καθώς και η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3. Τα λυοφιλωμένα κλάσματα από τα δύο πρωτόκολλα καθαρίσμού χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων. Η επαναιώρησή τους έγινε σε απιονισμένο νερό, και η ενεργότητα της Μασεδοσίνης ήταν συναλικά 332800 AU.

Πίνακας 4.3 Συγκεντρωτικός πίνακας συνολικής πρωτεΐνης και ενεργότητας για τα κλάσματα που παραλέφθηκαν και λυοφιλιώθηκαν από τον πρώτο και δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού.

Purification Step	V (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (AU/ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (AU)	Specific Activity (AU/mg)	Yield (%)	Purification Fold
Lyophilisation Md ₇ 12-21 + Md ₈ 10-41	65	0,585	5120	38,03	332800	8752	130,00	6,24

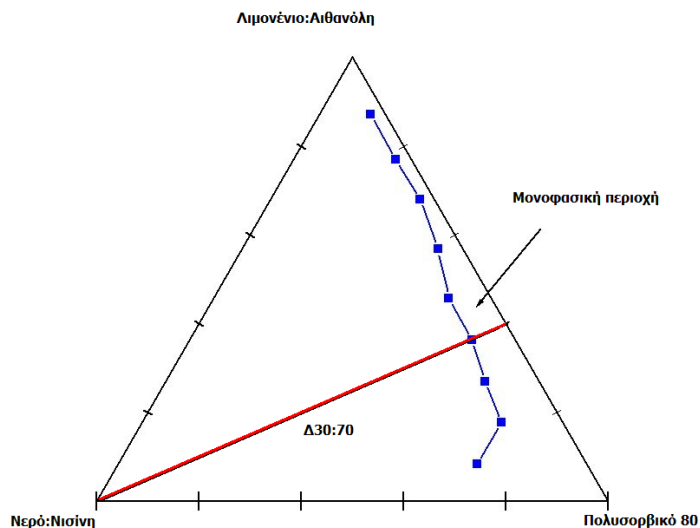
4.2 Ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσεων

Κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα φάσεων για τα συστήματα που αναπτύχθηκαν με σκοπό να καθοριστεί η έκταση της μονοφασικής περιοχής που αντιστοιχεί σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων. Παρακάτω παρατίθενται τα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα φάσεων για κάθε σύστημα που αναπτύχθηκε παρουσία και απουσία της βακτηριοσίνης.

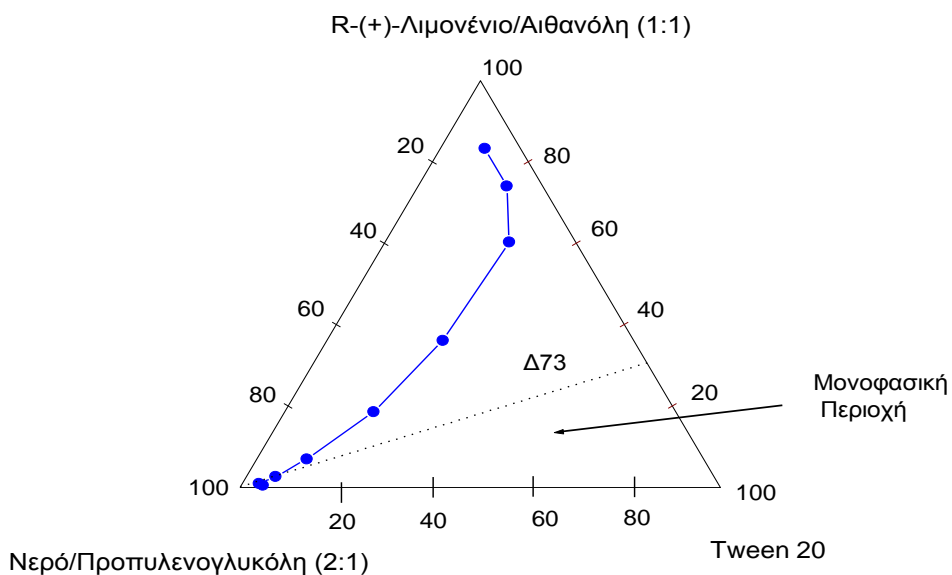
4.2.1 Νισίνη

Αρχικά παρουσιάζονται τα συστήματα όπου στην υδατική φάση είχε διαλυτοποιηθεί το συμπύκνωμα της Νισίνης και χαρακτηρίζεται ως γεμάτο. Για κάθε σύστημα παρατίθεται επίσης το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα χωρίς την παρουσία της Νισίνης και χαρακτηρίζεται ως άδειο.

Από το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων που παρατίθεται στο Σχήμα 4.3 για το σύστημα Λιμονένιο: Αιθανόλη (1:1)/ Πολυσορβικό 80/H₂O/Νισίνη παρατηρείται μια σχετικά διευρυμένη μονοφασική περιοχή με μέγιστη περιεκτικότητα υδατικής φάσης 28 % w/w στην γραμμή διαλυτότητας Δ73. Το άδειο, χωρίς την παρουσία της νισίνης, ψευδοτριγωνικό διάγραμμα ενός παρόμοιου συστήματος από δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιομηχανικής παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.3. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος πέντε συστατικών Λιμονένιο: Αιθανόλη (1:1)/Tween 80/ H₂O/Νισίνη. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στον 25°C.

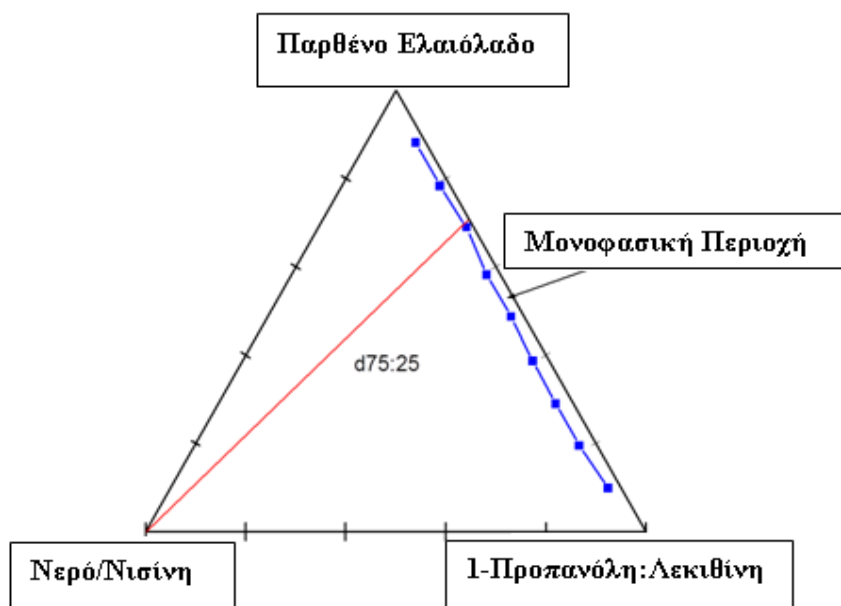


Σχήμα 4.4: Άδειο ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος πέντε συστατικών Λιμονένιο:Αιθανόλη(1:1)/Tween 20/ H₂O:Προπυλενογλυκόλη(2:1). Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στον 25°C.

Από το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων του άδειου συστήματος που παρατίθεται στο Σχήμα 4.4 παρατηρήθηκε μια μεγάλη μονοφασική περιοχή η οποία επιτρέπει πλήρη ανάμιξη με την υδατική φάση για συγκεκριμένες αναλογίες ελαίων-επιφανειοενεργού. Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω σχήματα των ψευδοτριγωνικών διαγραμμάτων (4.3 και 4.4) η αντικατάσταση του μίγματος νερού/ προπυλενογλυκόλης

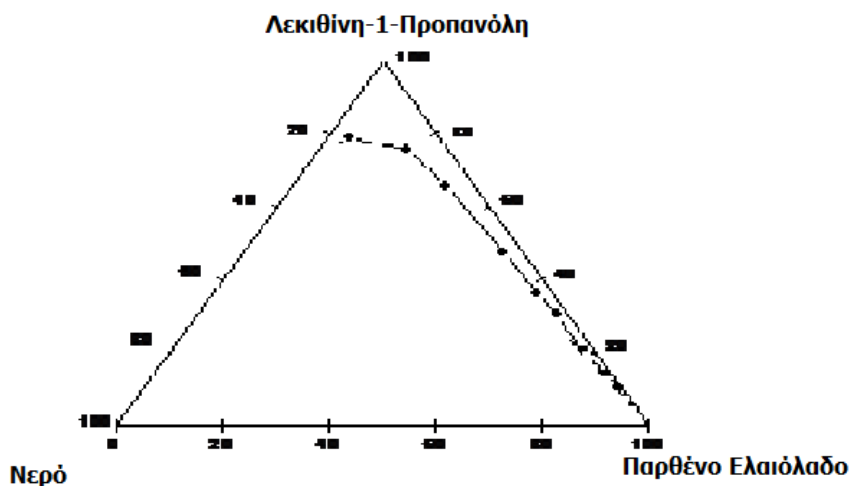
από υδατικό συμπύκνωμα νισίνης έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας του συστήματος να δέχεται νερό. Με άλλα λόγια παρατηρείται μείωση της μονοφασικής περιοχής των μικρογαλακτωμάτων παρουσία της νισίνης.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων που αναπτύχθηκαν σε φυτικά έλαια (τριγλυκερίδια). Σαν φυτικά έλαια χρησιμοποιήθηκαν ελαιόλαδο, σογιέλαιο και ηλιέλαιο. Η αναλογία του διαλύματος λεκιθίνης/1-προπανόλης ήταν (3:2).



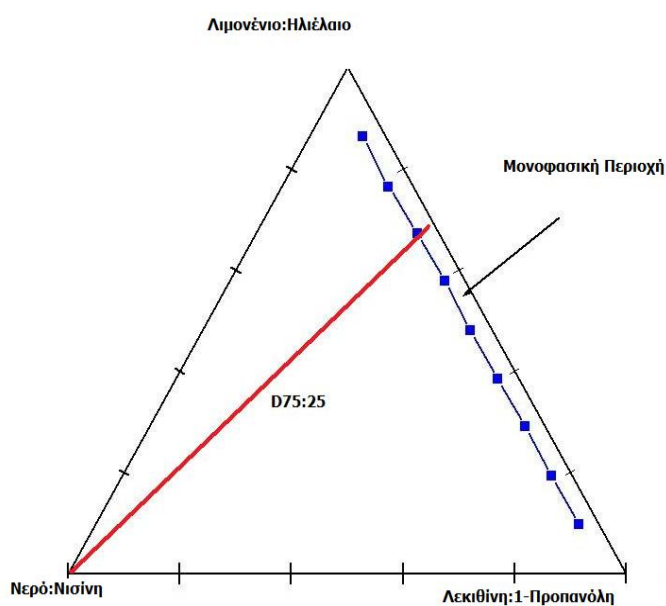
Σχήμα 4.5: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος πέντε συστατικών Παρθένο Ελαιόλαδο /Λεκιθίνη:1-Προπανόλη/H₂O:Νισίνη. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.

Από το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων που παρουσιάζεται στο πιο πάνω σχήμα για το σύστημα Ελαιόλαδο/Λεκιθίνης :1-Προπανόλη/H₂O:Νισίνη παρατηρείται μια αρκετά μικρή μονοφασική περιοχή με μέγιστη περιεκτικότητα υδατικής φάσης 1,4 % w/w στην γραμμή διαλυτότητας Δ75:25. Το άδειο, χωρίς την παρουσία της νισίνης, ψευδοτριγωνικό διάγραμμα ενός παρόμοιου συστήματος από δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιομιμικής παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα 4.6(Papadimitriou et al. 2007).

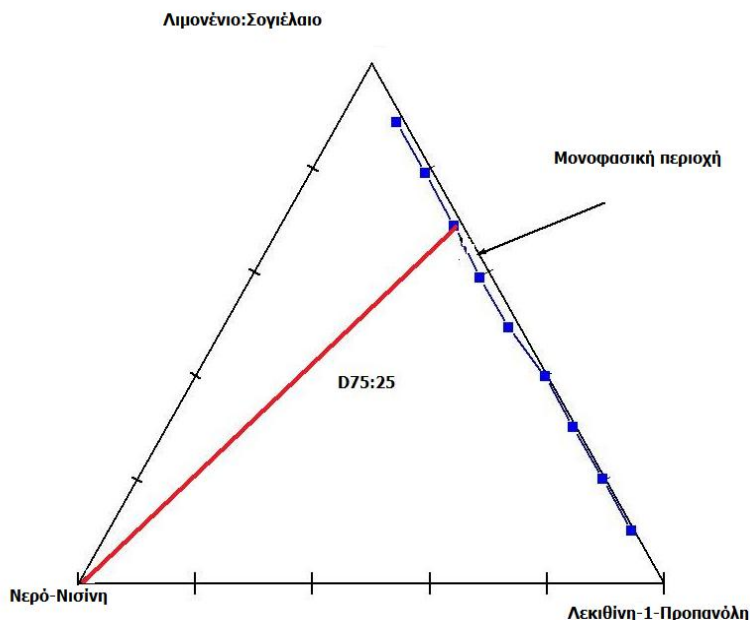


Σχήμα 4.6. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος τεσσάρων συστατικών Παρθένο Ελαιόλαδο / Λεκιθίνη :1-Προπανόλη / Νερό. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.

Από το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων του άδειου συστήματος που παρατίθεται στο Σχήμα 4.6 παρατηρείται μια σχετικά μεγαλύτερη μονοφασική περιοχή. Συγκεκριμένα οι αναλογίες αυτές αφορούν γραμμή διαλυτότητας Δ80:20, Δ70:30 και Δ90:10. Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω σχήματα των ψευδοτριγωνικών διαγραμμάτων (4.5 και 4.6) η αντικατάσταση της υδατικής φάσης από υδατικό συμπύκνωμα νισίνης έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας του συστήματος να δέχεται νερό. Με άλλα λόγια παρατηρείται μείωση της μονοφασικής περιοχής των μικρογαλακτωμάτων παρουσία της νισίνης.



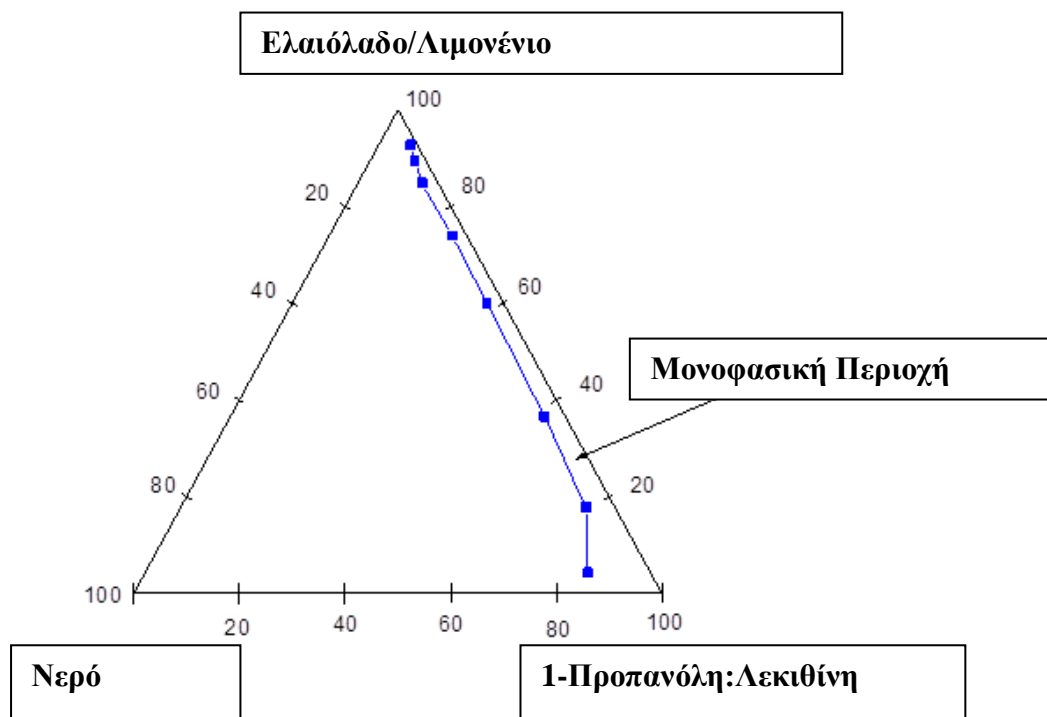
Σχήμα 4.7 Α. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος έξι συστατικών Λιμονένιο:Ηλιέλαιο (2:3)/ Λεκιθίνη :1-Προπανόλη. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.



Σχήμα 4.7.B. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος έξι συστατικών A) Λιμονένιο: Σογιέλαιο (2:3) / Λεκιθίνη :1- Προπανόλη / H₂O:Νισίνη και B) Ηλιέλαιο (2:3)/ Λεκιθίνη :1- Προπανόλη. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.

Το Σχήμα 4.7.A παρουσιάζει το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων του συστήματος Λιμονένιο/Ηλιέλαιο (2:3) / Λεκιθίνη:1-Προπανόλη / H₂O:Νισίνη. Στην προκειμένη περίπτωση παρατηρείται μια πολύ στενή μονοφασική περιοχή, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς σύμφωνα με τους Paradimitriou et al.(2007), τα φυτικά έλαια, τα τριγλυκερίδια δηλαδή, γαλακτωματοποιούνται πολύ δύσκολα και δέχονται πολύ μικρό ποσοστό υδατικής φάσης που κυμαίνεται μεταξύ 2-5% w/w. Η μέγιστη περιεκτικότητα της υδατικής φάσης εντοπίζεται στο 1% w/w στην γραμμής διαλυτότητας Δ75:25. Σε παρόμοια προσπάθεια οι Kyriazi et al. 2013, κατάφεραν να πετύχουν ποσοστό υδατικής φάσης στο 3% w/w σε σύστημα Ελαιόλαδου/Λεκιθίνης:1-Προπανόλης διαφορετικής αναλογίας ελαίου/επιφανειοενεργών.

Παρόμοιο ψευδοτριγωνικό διάγραμμα, που αφορά το σύστημα Λιμονένιο/ Σογιέλαιο (2:3)/ Λεκιθίνη:1-Προπανόλη / H₂O: Νισίνη παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.7B, η μέγιστη περιεκτικότητα σε υδατική φάση κυμάνθηκε σε ποσοστό κάτω του 1% w/w, κατα. Για τα συγκεκριμένα συστήματα στο Σχήμα 4.8 παρουσιάζεται το άδειο σύστημα Λιμονένιο: Ελαιόλαδο(2:3)/ Λεκιθίνη:1-Προπανόλη /H₂O και είναι από μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιομημητικής.



Σχήμα 4.8. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος 5 συστατικών Λιμονενίου/Ελαιολάδου Oil (2:3)/ Λεκιθίνη :1-Προπανάλης / H₂O. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.

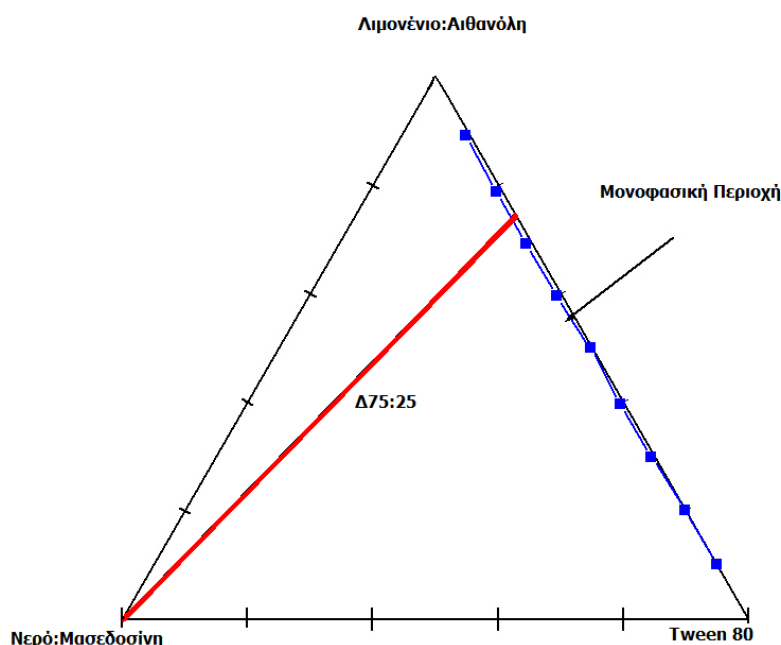
Από το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων του άδειου συστήματος που παρατίθεται στο Σχήμα 4.8 παρατηρείται μια σχετικά μεγαλύτερη μονοφασική περιοχή. Οι αναλογίες αφορούν γραμμή διαλυτότητας Δ80:20, Δ70:30 και Δ90:10. Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω σχήματα των ψευδοτριγωνικών διαγραμμάτων (4.7^A, 4.7.B και 4.8) η αντικατάσταση της υδατικής φάσης από υδατικό συμπύκνωμα νισίνης έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας του συστήματος να δέχεται νερό. Με άλλα λόγια παρατηρείται μείωση της μονοφασικής περιοχής των μικρογαλακτωμάτων παρουσία της νισίνης.

4.2.2 Μασεδοσίνη

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα των συστημάτων, στα οποία έγινε η αντικατάσταση της Νισίνης με την Μασεδοσίνη.

Από το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων που παρατίθεται στο Σχήμα 4.9 για το σύστημα Λιμονένιο :Αιθανόλη (1:1)/Tween 80/ H₂O:Μασεδοσίνη παρατηρείται μια σχετικά μικρή περιοχή με μέγιστη περιεκτικότητα υδατικής φάσης κάτω του 1 % w/w τόσο στην γραμμή διαλυτότητας Δ75:25 όσο και στις άλλες γραμμές διαλυτότητας. Το άδειο,

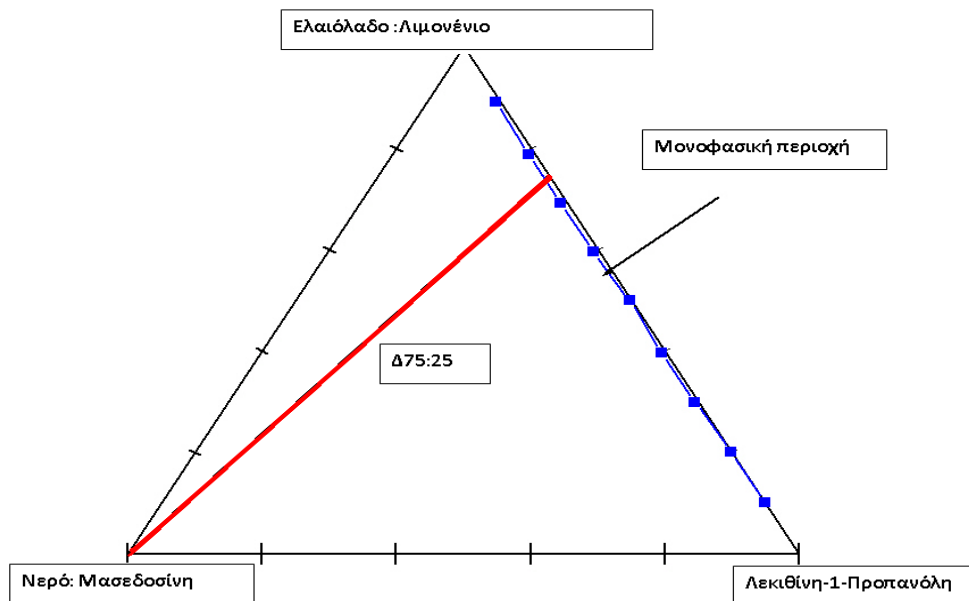
χωρίς την παρουσία της βακτηριοσίνης, είναι το ίδιο με αυτό που παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4 και αποτελεί μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιομημητικής.



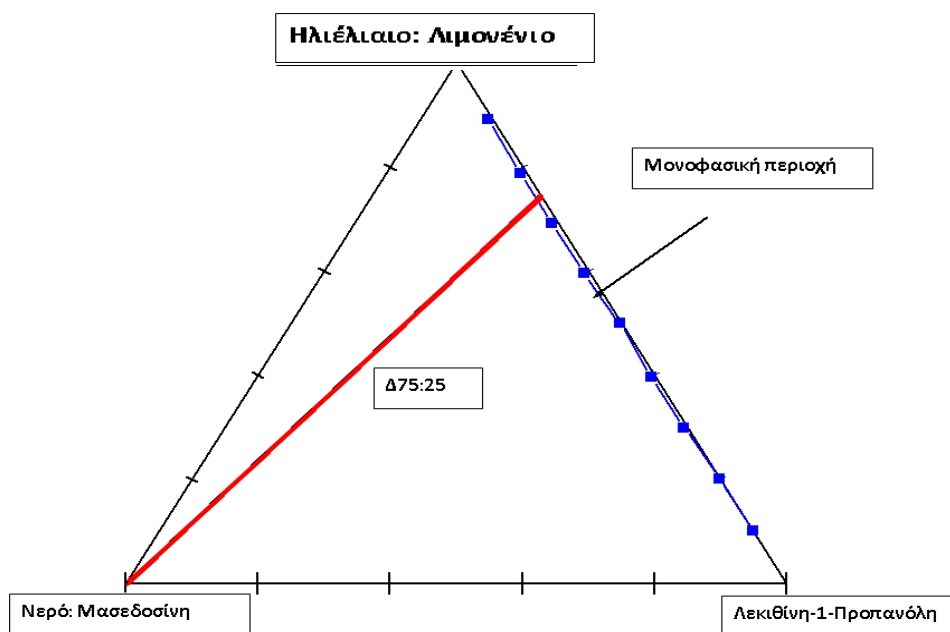
Σχήμα 4.9. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος πέντε συστατικών Λιμονένιο: Αιθανόλη (1:1)/ Tween 80/ H₂O:Μασεδοσίνη. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.

Συγκρίνοντας το άδειο με το γεμάτο σύστημα (Σχήμα 4.9 και 4.5) παρατηρείται ότι η αντικατάσταση της υδατικής φάσης με υδατικό συμπυκνώματο Μασεδοσίνης μειώνει ιδιαίτερα την ικανότητα του συστήματος να δέχεται νερό. Συγκεκριμένα παρατηρείται μια αρκετά έντονη μείωση της μονοφασικής περιοχής των μικρογαλακτωμάτων παρουσία της Μασεδοσίνης.

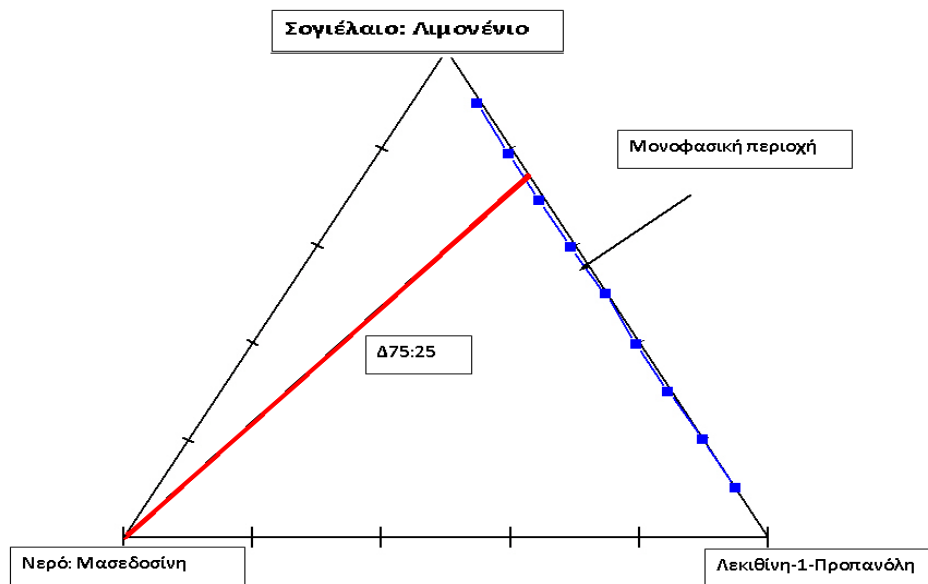
Το Σχήμα 4.10 παρουσιάζει το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσεων του συστήματος Λιμονένιο/Ελαιολάδου (2:3)/ Λεκιθίνη :1-Προπανόλη / H₂O:Μασεδοσίνη. Παρατηρείται επίσης μια πολύ στενή μονοφασική περιοχή όπου η μέγιστη περιεκτικότητα της υδατικής φάσης εντοπίζεται πάλι κάτω του 1% w/w. Παρόμοια ψευδοτριγωνικά διαγράμματα παρουσίασαν τα σύστημα στα οποία σαν φυτικό έλαιο στην μία περίπτωση ήταν το σογιέλαιο και στην άλλη το ηλιέλαιο, και παραθέτονται στα σχήματα 4.11 και 4.12.



Σχήμα 4.10. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος 5 συστατικών Λιμονενίου: Ελαιολάδου(2:3)/ Λεκιθίνης :1-Προπανόλης / H₂O:Μασεδοσίνης. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.



Σχήμα 4.11. Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος 5 συστατικών Λιμονενίου: Ηλιέλαιο (2:3)/ Λεκιθίνη :Ισοπροπανόλη / H₂O:Μασεδοσίνη. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.



Σχήμα 4.12: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος 5 συστατικών Λιμονένιο: Σογιέλαιο (2:3)/ Λεκιθίνη :1-Προαπανόλη (1:3) / H₂O:Μασεδοσίνη. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αναλογία % w/w. Η θερμοκρασία καθορίζεται στους 25°C.

Σε όλα τα Σχήματα (4.10, 4.11 και 4.12) που αφορούν τα φυτικά έλαια ελαιόλαδο, σογιέλαιο και ηλιέλαιο διαπιστώνεται ότι η αντικατάσταση της υδατικής φάσης από υδατικό συμπύκνωμα Μασεδοσίνης έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας του συστημάτων να δέχονται νερό.

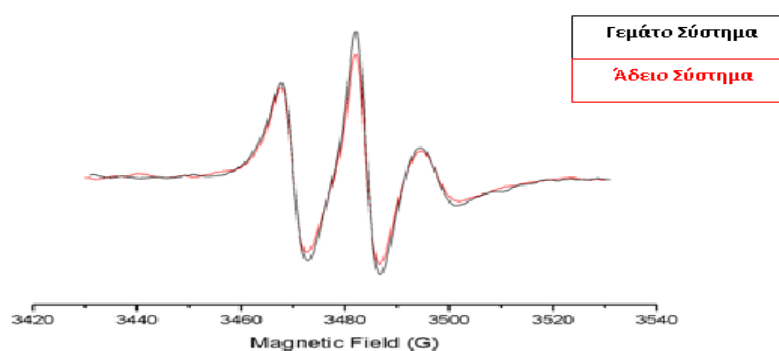
Συγκρίνοντας τα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα των συστημάτων της Νισίνης και της Μασεδοσίνης διαπιστώθηκαν τα εξής. Αρχικά η παρουσία της Μασεδοσίνης στα ίδια συστήματα με αυτά που εγκλωβίσαμε την Νισίνη, μειώνει την ικανότητα τους να δέχονται νερό. Πιθανοί λόγοι για την συμπεριφορά αυτή μπορεί να οφείλονται στο γεγονός πως η Νισίνη είναι εμπορικό σκεύασμα ενώ η Μασεδοσίνη προέρχεται από τον καθαρισμό που πραγματοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη. Οι συγκεκριμένες βακτηριοσίνες ανήκουν όπως έχει αναφερθεί ήδη στην εισαγωγή στην πρώτη κλάση των βακτηριοσινών και συγκεκριμένα στα Λαντιβιοτικά, πάραυτα μεταξύ τους υπάρχουν αρκετές διαφορές.

4.3 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με την τεχνική EPR

Η δυναμική της μονοστιβάδας των επιφανειενεργών στα συστήματα που παρατίθενται παρακάτω, μελετήθηκε με EPR χρησιμοποιώντας σαν ιχνηθέτη του spin το 5-doxyl stearic acid (5-DSA), απουσία και παρουσίας της αντιμικροβιακής ουσίας. Η μελέτη για όλα τα συστήματα, έγινε στην γραμμή διαλυτότητας Δ75:25, καθώς σε αυτή την αναλογία συναντάται η μέγιστη ποσότητα υδατικής φάσης. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται EPR φάσματα του 5-DSA για τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων που μελετήθηκαν.

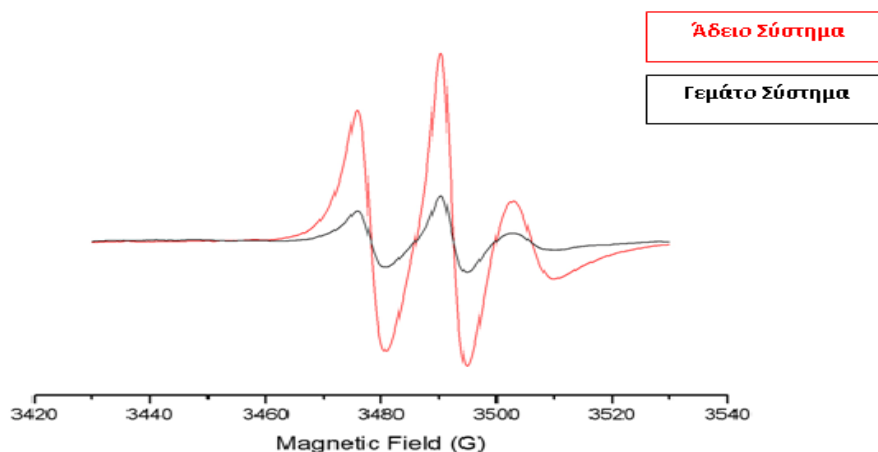
4.3.1 Νισίνη

Σύστημα Λιμονένιο/Σογιέλαιο (2:3) / Λεκιθίνη:1-Προπανόλη/Υδατική φάση



Σχήμα 4.13. Φάσμα EPR.

Σύστημα Λιμονένιο:Ηλιέλαιο/Λεκιθίνη-1-Προπανόλη/Υδατική φάση



Σχήμα 4.14 Φάσμα EPR.

Στα δύο παραπάνω σχήματα που παρατίθενται παρουσιάζονται ενδεικτικά τα φάσματα EPR για τα συστήματα, Λιμονένιο: Ηλιέλαιο (2:3) / Λεκιθίνη:1-Προπανόλη/ H₂O H₂O:Νισίνη και Λιμονένιο: Σογιέλαιο (2:3)/ Λεκιθίνη:1-Προπανόλη H₂O:Νισίνη, και

αφορούν άδεια και γεμάτα συστήματα. Για μια πιο σαφή εικόνα των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις EPR υπολογίζονται πάντα οι παράμετροι τ_R και S καθώς μας δίνουν αντιπροσωπευτικότερες πληροφορίες για την μεσεπιφάνεια. Όπως έχει αναφερθεί η παράμετρος S μας πληροφορεί για την ελαστικότητα της μεσεπιφάνειας και η τιμή κυμαίνεται από 0 μέχρι 1 ενώ η παράμετρος τ_R μας δίνει πληροφορία για την ταχύτητα περιστροφής του ιχνηθέτη. Αναλυτικά η τιμές που έλαβαν οι παράμετροι S και τα τ_R παρουσιάζονται στους Πίνακες (4.4, 4.5 και 4.6) και αφορούν τα συστήματα που αναπτύχθηκαν.

Πίνακας 4.4. Παράμετρος S .

Σύσταση Μικρογαλακτώματος		Παράμετρος S
Ελαιόλαδο	73.8%	0,20
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό	1,4%	
Ελαιόλαδο	73.8%	0,22
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό: Νισίνη	1,4%	

Σύμφωνα με τις τιμές του Πίνακα 4.4 που αφορούν την παράμετρο S διαπιστώνουμε ότι παρουσία της Νισίνης στο σύστημα προκαλεί μια ελάχιστη αύξηση της τιμής από 0,20 σε 0,22. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η παράμετρος τ_R μειώνεται όταν η υδατική φάση αντικαθίσταται με υδατικό συμπικνωμα Νισίνης, καθώς μείωση της τιμής συνεπάγεται και με λιγότερο χρόνο που απαιτείται για την περιστροφή του ιχνηθέτη.

Πίνακας 4.5. Παράμετρος S .

Σύσταση Μικρογαλακτώματος		Παράμετρος S
Λιμονένιο/Ηλιέλαιο(2:3)	73.8%	0,20
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό	1,4%	
Λιμονένιο/Ηλιέλαιο(2:3)	73.8%	0,20
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό:Νισίνη	1,4%	

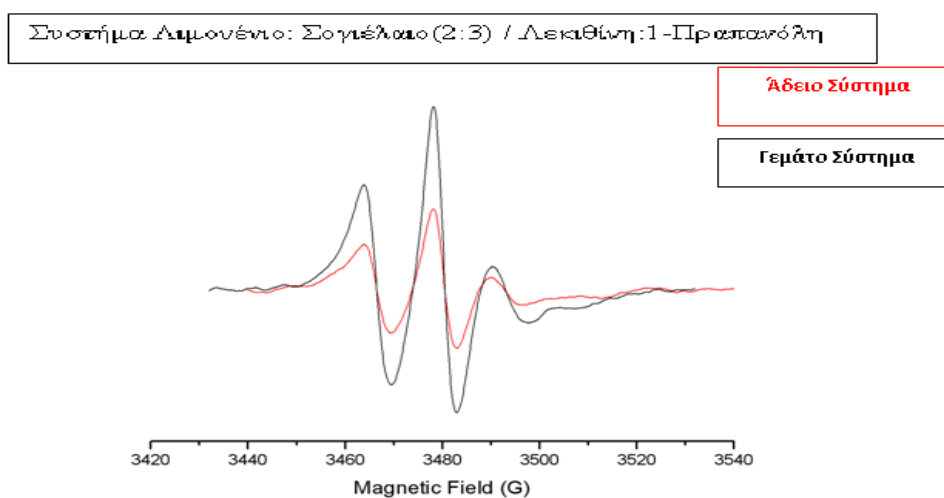
4.6. Παράμετρος S.

Σύσταση Μικρογαλακτώματος		Παράμετρος S
Λιμονένιο/Σογιέλαιο(2:3)	73,8%	0,19
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό	1,4%	
Λιμονένιο/Σογιέλαιο (2:3)	73,8%	0,20
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό:Νισίνη	1,4%	

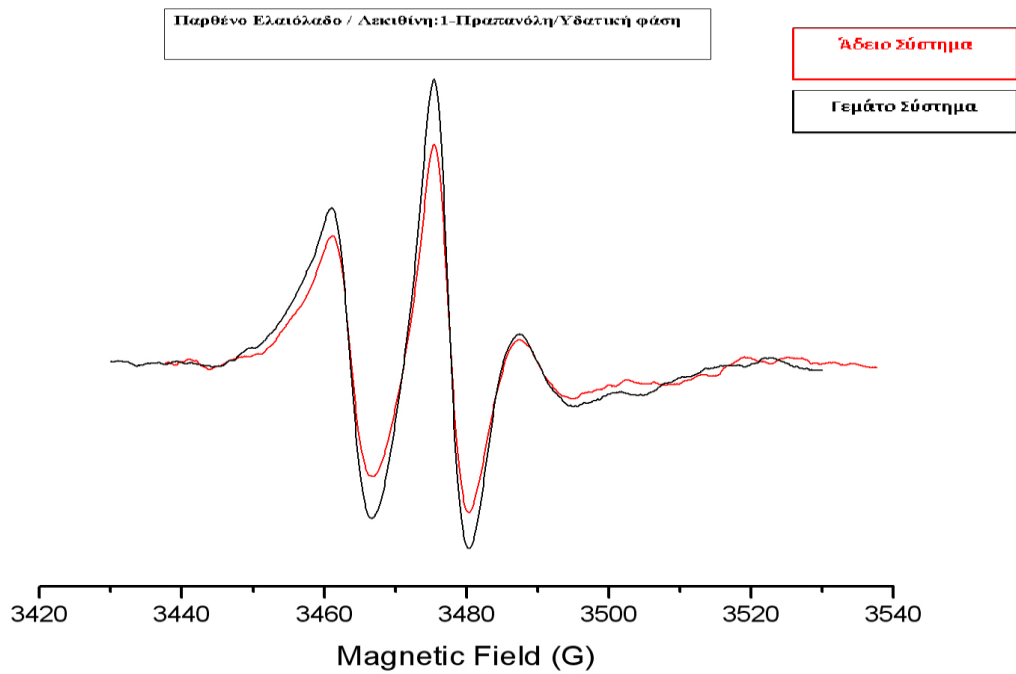
Στον Πίνακα 4.5 παρατηρείται ότι όταν στο σύστημα η υδατική φάση έχει αντικατασταθεί με υδατικό συμπύκνωμα Νισίνης η τιμή της παραμέτρου S δεν παρουσιάζει κάποια αύξηση αλλά παραμένει σταθερή. Ωστόσο η τιμή της παραμέτρου τ_R αυξάνεται από 3.1 στα 3.5 ns, δηλαδή ο χρόνος περιστροφής του ιχνηθέτη αυξάνεται άρα μειώνεται η ταχύτητα περιστροφής του. Στην περίπτωση που το σύστημα αποτελείται από Λιμονένιο:Σογιέλαιο (2:3)/Λεκιθίνη-1-Προπανόλη/Υδατική φάση, παρατηρείται τόσο η αύξηση της παραμέτρου S όσο και της παραμέτρου τ_R , τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.6.

4.3.2. Μασεδοσίνη

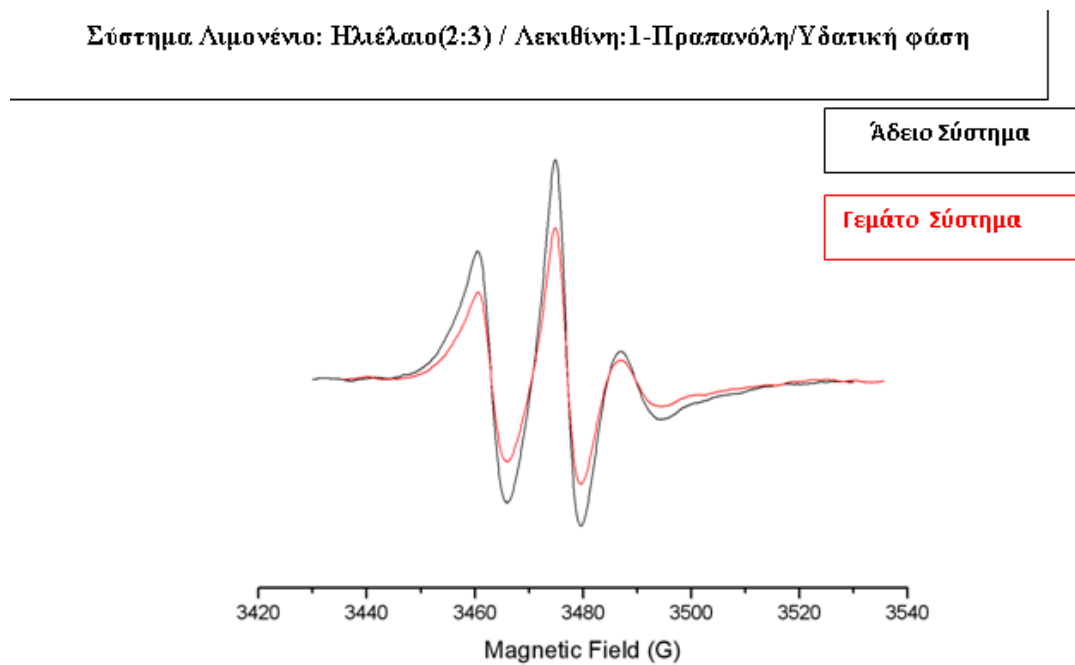
Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα φάσματα EPR των συστημάτων που αναπτύχθηκαν, η υδατικής φάση σε αυτή την περίπτωση έχει αντικατασταθεί από υδατικό συμπύκνωμα Μασεδοσίνης.



Σχήμα 4.15. Φάσμα EPR.



Σχήμα 4.16. Φάσμα EPR.



Σχήμα 4.17. Φάσμα EPR.

Για να υπάρχει μια πιο σαφή και αντιπροσωπευτική εικόνα για την δυναμική της μεσεπιφάνειας υπολογίστηκε η παράμετρος S και η τιμή που έλαβε για κάθε σύστημα παρουσιάζεται στους Πίνακες (4/7, 4.8 και 4.9). Οι τιμές της παραμέτρου S ήταν πάνω από

0,3 σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν και αυξήθηκε με την παρουσία της Μασεδοσίνης σε σχέση με το άδειο σύστημα. Από το γεγονός αυτό πληροφορούμαστε ότι η μεσεπιφάνεια είναι ιδιαίτερα σφικτή. Ο παράγοντας τ_R δεν λήφθηκε υπόψη καθώς η τιμή που λάβαμε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν εκτός των ορίων, δεδομένου ότι τα όρια είναι $\tau_R < 3$ ns.

Πίνακας 4.7. Παράμετρος S.

Σύσταση Μικρογαλακτώματος		Παράμετρος S
Ελαιόλαδο	73.8%	0,35
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό	< 1%	
Ελαιόλαδο	73.8%	0,37
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό:Μασεδοσίνη	<1%	

Πίνακας 4.8. Παράμετρος S.

Σύσταση Μικρογαλακτώματος		Παράμετρος S
Λιμονένιο/Σογιέλαιο (2:3)	73.8%	0,36
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό	<1%	
Λιμονένιο/Σογιέλαιο (2:3)	73.8%	0,39
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό:Μασεδοσίνη	<1%	

Πίνακας 4.9. Παράμετρος S.

Σύσταση Μικρογαλακτώματος		Παράμετρος S
Λιμονένιο/Ηλιέλαιο(2:3)	73.8%	0,33
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό	<1%	
Λιμονένιο/Ηλιέλαιο(2:3)	73.8%	0,44
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	24,6%	
Νερό:Μασεδοσίνη	<1%	

Με βάση τις παραπάνω τιμές, η μεγαλύτερη αύξηση της τιμής της παραμέτρου S εντοπίζεται στο σύστημα Λιμονενίου: Ηλιέλαιου (2:3)/Λεκιθίνης:1-Προπανόλης, ιδιαίτερα όταν στην υδατική φάση υπάρχει η παρουσία της Μασεδοσίνης. Στο άδειο σύστημα η

τιμής της παραμέτρου S είναι 0,33 και με την προσθήκη στην υδατική φάση της Μασεδοσίνης έχουμε αύξηση της τιμής σε 0,44. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αύξηση της τιμής της παραμέτρου S σημαίνει μη ελαστική μεσεπιφάνεια της μονοστιβάδας των επιφανειοενεργών. Σε όλα τα συστήματα με την αντικατάσταση της υδατικής φάσης από υδατικό συμπύκνωμα Μασεδοσίνης έχουμε αύξηση της τιμής. Η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός πως τα συγκεκριμένα συστήματα δέχτηκαν οριακή ποσότητα υδατικής φάσης.

Συγκρίνοντας την συμπεριφορά των συστημάτων όταν η υδατική φάση αντικαθίσταται είτε από υδατικό συμπύκνωμα Νισίνης είτε από υδατικό συμπύκνωμα Μασεδοσίνη διαπιστώθηκε πως η παρουσία της Μασεδοσίνης μειώνει ιδιαίτερα την ελαστικότητα της μεσεπιφάνειας. Η τιμή δε που λαμβάνει η παράμετρος τ_R είναι εκτός ορίων και δεν λαμβάνεται καθόλου υπόψη.

4.4 Δομική μελέτη μικρογαλακτωμάτων με DLS

Για να προσδιοριστεί το μέγεθος και η πολυδιασπορά των σχηματιζόμενων μικκυλίων των συστημάτων που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική DLS, διεξοδικά η τεχνική έχει αναπτυχθεί σε πιο πάνω παράγραφο. Στον Πίνακα 4.10.A παρουσιάζεται η τιμή της διαμέτρου που σχηματίστηκε κατά την ανάπτυξη των μικρογαλακτωμάτων των φυτικών ελαίων και αφορούν πάντα άδειο και γεμάτο σύστημα, παρουσία δηλαδή της αντιμικροβιακής ουσίας και απουσία. Έτσι στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται οι τιμές του μεγέθους των μικυλίων και της πολυδιασποράς όταν αντικαταστήθηκε η υδατική φάση με υδατικό συμπύκνωμα Νισίνης.

4.4.1 Νισίνη

Πίνακας 4.10 Α: Ο μέσος όρος της διαμέτρου των μικκυλίων σε (nm) και της πολυδιασποράς.

Σύστημα Μικρογαλακτώματος	Υδατική φάση	Μέγεθος D (nm)	Πολυδιασπορά
Λιμονένιο/Ηλιέλαιο(2:3) 73.8% Λεκιθίνη:1-Προπανόλη 24,6% Νερό	1,40%	11,3±0,27	0,156±0,018
Λιμονένιο/Ηλιέλαιο(2:3) 73.8% Λεκιθίνη:1-Προπανόλη 24,6% Νερό:Νισίνη	1,40%	13,3±0,72	0,292±0,024

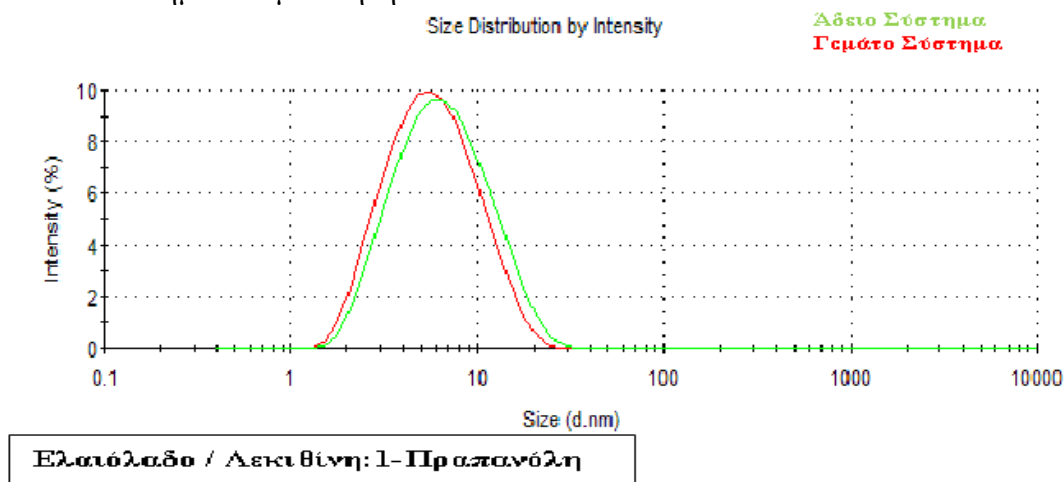
Πίνακας 4.10 Β: Ο μέσος όρος της διαμέτρου των μικκυλίων σε (nm) και της πολυδιασποράς.

Σύστημα Μικρογαλακτώματος	Υδατική φάση	Μέγεθος D (nm)	Πολυδιασπορά
Λιμονένιο/Σογιέλαιο (2:3) 73.8% Λεκιθίνη:1-Προπανόλη 24,6% Νερό	1,40%	7,6±0,56	0,388±0,05
Λιμονένιο/Σογιέλαιο(2:3) 73.8% Λεκιθίνη:1-Προπανόλη 24,6% Νερό:Νισίνη	1,40%	8,8±0,52	0,402±0,024

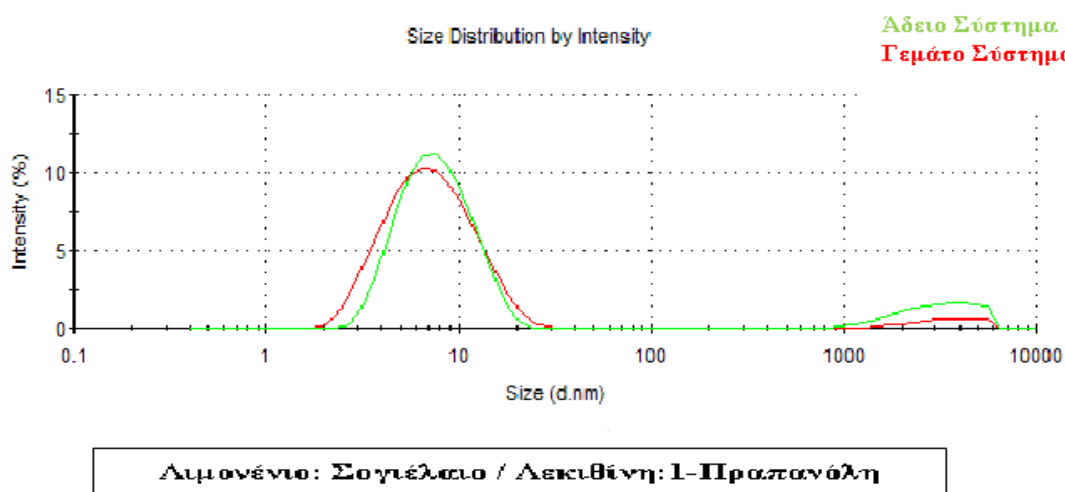
Πίνακας 4.10 Γ: Ο μέσος όρος της διαμέτρου των μικκυλίων σε (nm) και της πολυδιασποράς.

Σύστημα Μικρογαλακτώματος	Υδατική φάση	Μέγεθος D (nm)	Πολυδιασπορά
Ελαιόλαδο (2:3) 73.8% Λεκιθίνη:1-Προπανόλη 24,6% Νερό	1,40%	6,4±0,17	0,281±0,043
Ελαιόλαδο(2:3) 73.8% Λεκιθίνη:1-Προπανόλη 24,6% Νερό:Νισίνη	1,40%	7,5±0,52	0,312±0,075

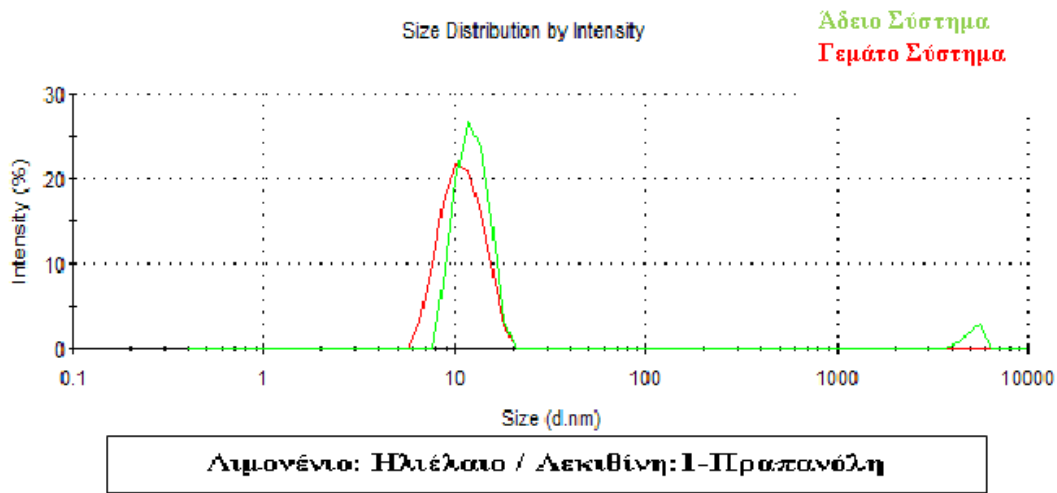
Με βάση τις τιμές που παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.10^A, 4.10^B, 4.10^Γ διαπιστώνεται και στις τρεις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ότι με τη προσθήκη της Νισίνης στην υδατική φάση παρουσιάζεται μια αύξηση της διαμέτρου του μικκυλίου και της πολυδιασποράς γεγονός το οποίο θεωρείται φυσιολογικό. Ανάλογη αύξηση παρατήρησαν και η Kygiazi et al. (2013) σε εργασία τους, διαπίστωσαν πως σε μικρογαλάκτωμα νερού/ ελαίου με την προσθήκη θρυψίνης και αλκαλικής φωσφατάσης στην υδατική φάση υπάρχει μια αύξηση της διαμέτρου και της πολυδιασποράς. Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζονται συγκριτικά το άδειο και γεμάτο σύστημα για το κάθε σύστημα που μελετήθηκε.



Σχήμα 4.18: Συγκριτικό γράφημα της διαμέτρου των μικκυλίων.



Σχήμα 4.19: Συγκριτικό γράφημα της διαμέτρου των μικκυλίων.



Σχήμα 4.20 Συγκριτικό γράφημα της διαμέτρου των μικκυλίων.

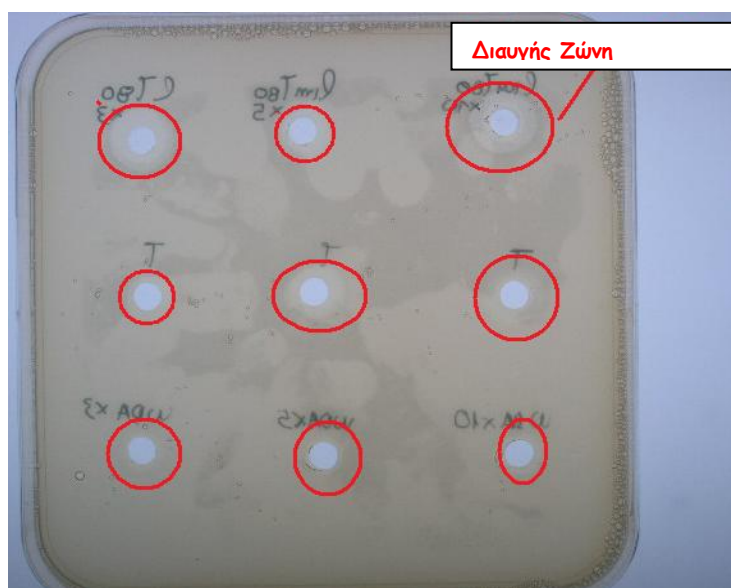
4.5. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των ενεργών βακτηριοσινών όταν είναι ενσωματωμένες στο μικρογαλάκτωμα

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των ενεργών βακτηριοσινών που ενσωματώθηκαν στην υδατική φάση των συστημάτων που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι ανίχνευσης βακτηριοσινών (παράγραφος 3.3). Μετά την κατασκευή του ψευδοτριγωνικού διαγράμματος των συστημάτων και τον δομικό χαρακτηρισμό πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης. Για την ασφαλέστερη προσέγγιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις πριν την έναρξη της διαδικασίας, για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των διαλυμάτων και συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.11.

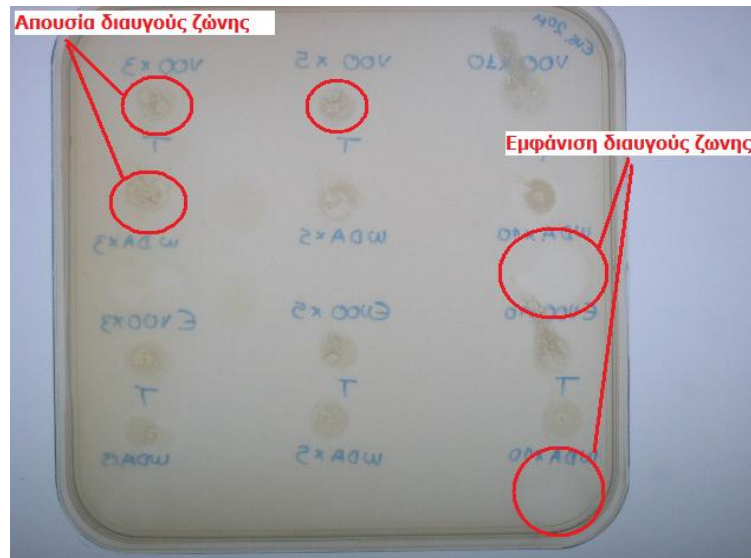
Πίνακας 4.11. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης.

Τυφλό	Ζώνη (mm)	Ζώνη (mm)
Πολύσορβικό 80	14 θολή	12 θολή
Λιμονένιο:Αιθανόλη	11 διαυγής	11 διαυγής
Λεκιθίνη:1-Προπανόλη	13 θολή	14 θολή
Λιμονένιο	10 διαυγής	10 διαυγής
Ελαιόλαδο	0	Nt
Αιθανόλη	nt	0
Ισοβουτανόλη	nt	0
1-Προπανόλη	nt	0

Διαπιστώθηκε μία διαυγής ζώνη στην περίπτωση του Λιμονενίου και του διαλύματος που συμμετείχε, αλλά είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα αιθέρια έλαια και στην προκειμένη περίπτωση το Λιμονένιο, έχουν αντιμυκητιακή δράση (Shigeharu et al. 2001). Για την ασφαλέστερη προσέγγιση πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα μια σειρά από ελέγχους, 1) το μικρογαλάκτωμα με την βακτηριοσίνη, 2) τυφλό και τέλος, 3) υδατικό διάλυμα Νισίνης. Θετικά ήταν τα συστήματα στα οποία μετά από 24 h επώαση στους 30 °C παρουσίασαν διαυγής ζώνη. Ακριβώς ο ίδιος χειρισμός πραγματοποιήθηκε και για τα συστήματα με την Μασεδοσίνη. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά τρυβλία ανίχνευσης για τα συστήματα με την Νισίνη και αφορούν και τις τρεις μεθόδους.



Εικόνα 4.1. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράση Νισίνης. Μέθοδος WDA 1) παρουσία νισίνης στην υδατική φάση, 2) τυφλό και 3) υδατικό διάλυμα Νισίνης.



Εικόνα 4.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης Νισίνης. Τεχνική επίστρωσης spot on lawn.
 1) παρουσία νισίνης στην υδατική φάση, 2) τυφλό και 3) υδατικό διάλυμα Νισίνης.



Εικόνα 4.3. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης. Τεχνική εξάπλωσης spot on lawn. 1) παρουσία νισίνης στην υδατική φάση, 2) τυφλό και 3) υδατικό διάλυμα Νισίνης.

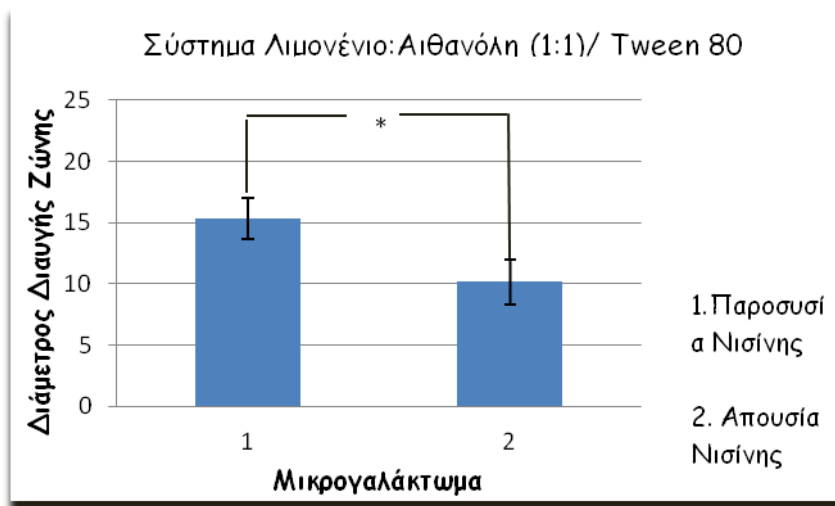
Τα αποτελέσματα του ελέγχου της αντιμικροβιακής δράσης των βακτηριοσινών οι οποίες εγκλωβίστηκαν στα συστήματα που αναπτύχθηκαν παρουσίασαν, θετικά αποτελέσματα όταν το σύστημα ήταν το Λιμονένιο: Αιθανόλη (1:1)/Tween 80, δίνοντας μια μέγιστη διάμετρο 15mm κατά μέσο όρο. Τα αιθέρια έλαια έχουν αναγνωρισθεί για τις αντιμικροβιακές, αντικές, αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους, αυτός είναι ο λόγος άλλωστε που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων (Bassole & Kuliani 2012). Το συγκεκριμένο σύστημα όπως διαπιστώθηκε από τη δομική μελέτη του

καθώς και από το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα, που παρατέθηκε πιο πάνω δέχτηκε ποσότητα υδατικής φάσης 28%). Επιπλέον διαπιστώθηκε μια συνεργιστική δράση του λιμονενίου με την Νισίνη καθώς παρουσία της νισίνης η διάμετρος της διαηγούς ζώνης αυξανόταν. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μια σειρά επαναλήψεων για να διαπιστωθεί αν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 4.12. Ελέγχος αντιμικροβιακής δράσης.

	Λιμονένιο:Αιθανόλη (22 %) Tween 80 (50 %) Υδατική Φάση (28 %)	
Επανάληψεις	Νισίνη	Τυφλό
(3 mg/ml)	13	10
(1)	14	12
(2)	15	11
(3)	13	8
(4)	15	8
(5)	17	10
(6)	17	10
(7)	18	14
(8)	17	11
(9)	15	10
(10)	15	8

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με την μέθοδο 2-sample test. Όπως προέκυψε από την τιμή $p = 0.028$ η οποία είναι $p < 0,05$ υπάρχει στατιστική σημαντικότητα, δηλαδή υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ του Λιμονενίου και τη Νισίνης στο μικρογαλάκτωμα. Τα υπόλοιπα συστήματα που αναπτύχθηκαν αλλά λόγω της σύστασης των τρυγλικεριδίων δεν δέχονται μεγάλη ποσότητα υδατικής φάσης και γαλακτωματοποιούνται δύσκολα, δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση. Συγκεντρωτικά παρουσιάζονται όλα τα αποτελέσματα στον παρακάτω πίνακα. Ο λόγος απουσία δράσης της βακτηριοσίνης όταν είναι εγκλωβισμένη στο μικρογαλάκτωμα, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν μπορεί να διαχυθεί στο στερεό υπόστρωμα. Σύμφωνα με τη δομική μελέτη των συστημάτων διαπιστώθηκε μη ελαστικότητα της μεσεπιφάνειας, γεγονός που εξηγεί την απελευθέρωση της Νισίνης, καθώς όσο πιο σφιχτή είναι η μεμβράνη τόσο πιο δύσκολα διαχέεται η ουσία προς τα έξω.



Γράφημα 4.1. Συνεργιστική δράση Λιμονενίου και Νισίνης σε σύστημα μικρογαλακτώματος.

Πίνακας 4.13. Αντιμικροβιακή δράσης με WDA.

όγκος (μL)	Σύστημα Μικραγαλακτώματος Επαναλήψεις	Ελαιόλαδο (73,8 %) Λεκ.- 1-Προπ (24,6 %) Νερό (1,33 %)			Σογιέλαο (67,9 %) Λεκ.- 1-Προ (29,1 %) Νερό (2,99 %)		
		Νισίνη (mm)	Τυφλό (mm)	Τυφλο Νισίνης	Νισίνη (mm)	Τυφλό (mm)	Τυφλό Νισίνης
5	(1mg/ml)	0	0	0	0	0	0
10	(1mg/ml)	0	0	0	0	0	0
20	(1mg/ml)	0	0	7	0	0	5
40	(1mg/ml)	0	0	0	0	0	9
5	(2mg/ml)	0	0	0	0	0	0
10	(2mg/ml)	0	0	0	0	0	0
20	(2mg/ml)	0	0	7	0	0	7
40	(2mg/ml)	0	0	2	0	0	11
5	(3mg/ml)	0	0	8	0	0	6
10	(3mg/ml)	0	0	0	0	0	10
20	(3mg/ml)	0	0	3	0	0	13
40	(3mg/ml)	0	0	5	0	0	14
5	(3mg/ml)	11	0	0	0	0	4
10	(3mg/ml)	0	0	0	0	0	6
20	(3mg/ml)	0	0	0	0	0	8
40	(3mg/ml)	0	0	0	0	0	0
5	(5mg/ml)	0	0	0	0	0	0
10	(5mg/ml)	0	0	0	0	0	0
20	(5mg/ml)	0	0	0	0	0	0
40	(5mg/ml)	0	0	0	0	0	0

5	(10mg/ml)	0	0	8	0	0	6
10	(10mg/ml)	0	0	0	0	0	10
20	(10mg/ml)	0	0	13	0	0	13
40	(10mg/ml)	0	0	15	0	0	12

Η Μασεδοσίνη εγκλωβίστηκε επιτυχώς στα ίδια συστήματα με τη διαφορά ότι το ποσοστό της υδατικής φάσης κυμάνθηκε κάτω του 1%. Ο προσδιορισμός του μεγέθους και της πολυδιασποράς των μικκυλίων δεν ήταν εύκολο να υπολογισθεί καθώς το μαθηματικό μοντέλο της συσκευή του εργαστηρίου δεν ταιρίαζε για τη συγκεκριμένη περίπτωση. Τα συστήματα τα οποία περιείχαν λιμονένιο και φυτικό έλαιο, παρουσίασαν μια αντιμικροβιακή ζώνη η οποία πιθανώς οφείλεται στη ύπαρξη του λιμονενίου. Μόνο το σύστημα Λιμονένιο: Αιθανόλη/ Tween 80 που δέχτηκε συνολικά 28% ποσότητα, παρουσίασε συνεργιστική δράση όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 4.5.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα, στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός μια αντιμικροβιακής ουσίας που παράγεται από τον *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 όταν αναπτύσσεται σε γάλα με την χρήση χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως. Τα ενεργά κλάσματα της αντιμικροβιακής ουσίας, της Μασεδοσίνης και συμπύκνωμα Νισίνης εγκλωβίστηκαν επιτυχώς σε συστήματα μικρογαλακτώματος. Για τα συστήματα πραγματοποιήθηκε η δομική μελέτη με τις τεχνικές DLS και EPR. Επίσης πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των βακτηριοσινών όταν αυτές είναι εγκλωβισμένες.

5.Συμπεράσματα

Ο στόχος της μελέτης ήταν η ανάπτυξη βιοσυμβατών μικρογαλακτώματων που να ενσωματώνουν βακτηριοσίνες Νισίνη και Μασεδοσίνη. Η Νισίνη παράγεται από το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactococcus lactis*, ενώ η Μασεδοσίνη παράγεται από τον *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. Πραγματοποιήθηκε επιτυχής ενσωμάτωση και των δύο βακτηριοσινών σε μικρογαλάκτωμα W/O και κατασκευάστηκαν ψευδοτριγωνικά διαγράμματα σε κάθε περίπτωση.

Η Νισίνη, ενσωματώθηκε σε μέγιστη υδατική φάση στο σύστημα Λιμονένιο: Αιθανόλη (1:1)/ Πολυσορβικό 80 (28% w/w H₂O). Το ποσοστό της υδατικής φάσης που ενσωματώθηκε αντίστοιχα στα φυτικά έλαια ήταν 1,4 % w/w H₂O. Γενικά, τα φυτικά έλαια δέχονται ποσοστό υδατικής φάσης μεταξύ 2-4% w/w H₂O. Από τις μετρήσεις EPR που διεξήχθησαν στα μικρογαλακτώματα απουσία και παρουσία της Νισίνης παρατηρήθηκε μια οριακή μόνο αύξηση του παράγοντα S γεγονός που συνδέεται με μη σημαντική συμμετοχή της βακτηριοσίνης στη μεσεπιφάνεια των μικρογαλακτωμάτων W/O. Αντίστοιχα οι μετρήσεις DLS για το μέγεθος και την πολυδιασπορά των μικκυλίων έδειξαν ότι η παρουσία της Νισίνης αυξάνει τόσο την διάμετρο του μικκυλίου όσο και της πολυδιασποράς. Η Μασεδοσίνη, ενσωματώθηκε στα ίδια συστήματα με αυτά της Νισίνης. Η διαφορά είναι ότι το ποσοστό της υδατικής φάσης σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αρκετά χαμηλό με περισσότερες φορές να λαμβάνει τιμή κάτω <1%. Από τις μετρήσεις EPR για την μεσεπιφάνεια διαπιστώθηκε ότι με την παρουσία της Μασεδοσίνης στο σύστημα αυξάνεται αρκετά ο παράγοντας S Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης λόγω του ελάχιστου ποσοστού υδατικής φάσης, σε όλα τα συστήματα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός του μεγέθους και της πολυδιασποράς μικκυλίων.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί πρώτη προσέγγιση του εγκλωβισμού βακτηριοσινών σε μικρογαλακτώματα, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί κάτι αντίστοιχο παλαιότερα. Στην περίπτωση της Νισίνης παρασκευάστηκαν μικρογαλακτώματα στα οποία εντοπίστηκε αντιμικροβιακή δράση. Το λιμονένιο σαν αιθέριο έλαιο γνωρίζουμε ότι έχει αντιμικροβιακή δράση, όμως η προσθήκη της Νισίνης αύξησε σημαντικά την αντιμικροβιακή ενεργότητα υποδηλώνοντας συνέργεια μεταξύ των δύο συστατικών του μικρογαλακτώματος. Αντίθετα η προσθήκη Μασεδοσίνης δεν οδήγησε σε μικρογαλακτώματα με αντιμικροβιακή ενεργότητα, πιθανώς λόγω της ελάχιστης ποσότητας που ενσωματώθηκε στα μικρογαλακτώματα. Η διαφορετική συμπεριφορά των

βακτηριοσινών κατά την ενσωματώσή τους στα ίδια μικρογαλακτώματα παρουσιάζει ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω μελέτης λόγω των σημαντικών τεχνολογικών εφαρμογών που μπορεί να έχουν τα μικρογαλακτώματα με αντιμικροβιακή δράση.

Βιβλιογραφία

1. Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. (1995) Bacteriocins: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning, *International Journal of Food Microbiology* 28: 169-185
2. Al-Adham, I.S.I., Khalil, E., Al-Ahmoud, N.D., Kierans, M. and Collier, P.J. (2000) Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems, *Journal Applied Microbiology* 89:32–39.
3. Al-Adham, I.S.I., Al-Ahmoud, N.D., Khalil, E., Kierans, M. and Collier, P.J. (2003) Microemulsions are highly effective anti-biofilm agents, *Letters in Applied Microbiology* 36:97–100.
4. Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria, Classification and physiology. In: Salimen S, von Wright A, Ouwehand A, Lactic acid bacteria, Marcel Dekker
5. Balciunas E. M., Castillo Martinez F. A., Todorov S. D., Gombossy de Melo Franco B. D., Converti A. and Pinheiro de Souza Oliveira R. (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32: 134 – 142.
6. Bassole, I.H.N. and Juliani, R.H. (2012) Essential oils in combination and their antimicrobial properties, *Journal Molecule* 17:3989-4006
7. Bauer, R. and Dicks, L.M.T. (2005) Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics, *International Journal of Food Microbiology* 101:201-216.
8. Berne, B.J. and Pecora, R. (2000) *Dynamic Light Scattering*, Courier Dover Publications ISBN 0-486-41155-9
9. Buchman, G.W, Banerjee, S. and Hansen, J.N. (1988) Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic, *Journal of Biological Chemistry* 263:16260-16266
10. Chen, J. P. and Pai, H. (1991) Hydrolysis of milk fat with lipase in reversed micelles, *Journal of Food Science* 56:234-237.
11. Cheigh, C.I. and Pyun, Y.R. (2005) Nisin biosynthesis and its properties, *Biotechnology Letters* 27:1641-1648.
12. Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R.P. (2005) Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential, *Current Protein and Peptide Science* 6:61-75

13. Daniel, E., Kile, Cary and Chiou, T. (1989) 'Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration, *Environmental Science and Technology* 23:7 832–838
14. Danielsson, I. and Lindman, B. (1981) *Colloids Surfucrant A*, 3:391
15. Drapper, L. A., Ross, R. P., Hill, C. and Cotter, P. D. (2008) Lantibiotic immunity, *Current Protein and Peptide* 9:34-49
16. Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C and Ross P. (2006) Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Intrenational Dairy Journal* 16: 1058 – 1071
17. Dungan, S. R. Microemulsions in foods: properties and applications, *Industrial Applications of Microemulsions*;
18. Duxbury, D. D., (1988) *Food Processing*, 62-64.
19. Ennahar, S., Sashihara T., Sonomoto, K., and Ishizaki A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Reviews* 24:85-106
20. Flanagan, J. and Singh, H. (2006) Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food, *Critical Reviews in Food Science Nutrition* 46:221–237.
21. Galvez A., Abriouel H., Lopez R. L. and Omar N. B. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 51 – 70
22. Garti, N., Lichtenberg, D. and Siberstein, T. (1997) The hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase A2 in microemulsion as microreactor, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 128:17–25.
23. Garti, N., Clement, V., Fanun, M., and Leser, M.E. (2000) Some characteristics of sugar ester nonionic microemulsions in view of possible food applications, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:9 3945-3956
24. Georgalaki, M.D., Van de Berghe E., Kritikos, D., Devriese, B., Van Beeumen J., Kalatzopoulos, G., De Vuyst, L. and Tsakalidou, E. (2002) Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, *Applied and Environmental Microbiology* 65:5891-5903
25. Georgalaki M., Papadimitriou K., Anastasiou R., Pot B., Van Driessche G., Devreese B. and Tsakalidou E. (2013) Macedovicin, tha second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, *Food Microbiology*. 33: 124 – 130.

26. Hansen, E. B., (2002) Commercial bacterial starter for fermented food of the future, *International Journal of Food Microbiology* 78:119-131
27. Harrar, A., Zech, O., Klaus, A., Bauduin, P., and Kunz, W. (2011) Influence of surfactant amphiphilicity on the phase behavior of IL-based microemulsions, *Journal of Colloid and Interface Science* 362:2 423-429
28. Howe, R.F. (1982) EPR spectroscopy in surface chemistry: recent developments, *Advances in Colloid and Interface Science* 18:1-55
29. Hurst, A. (1981) *Advances in Applied Microbiology* 27:85-123
30. Kotlarchyk, M., Huang, J. S. And Chen, S.H. (1985) Structure of AOT determined by small angle neutron scattering, *Journal of Physical Chemistry* 89:4382-4386
31. Kunieda, H., and Shinoda, K. (1982) Phase behavior in systems of nonionic surfactant /water/oil, *Journal of Dispersion Science Technology* 3:233–244
32. Lawrence, J. (1996) Microemulsions as drug delivery vehicles, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 1:826-832
33. Lawrence, M.J., and Rees, G.D. (2000) Microemulsions -based media as novel drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 45:89–121
34. Leroy F. and De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 15: 67 – 78
35. Mattick, A.T.R., Hirsch, A. (1947) Further observations on an inhibitory substance (Nisin) from lactic streptococci, *Lancet* 2:7
36. McClements, D. J., Decker, E. A. and Park, Y. (2007) Designing food structure to control stability, digestion, release and absorption of lipophilic food components, 2nd International Symposium on Delivery of Functionality in Complex Food Systems Amherst MA.
37. McClements, D. J., Decker, E. A. and Park, Y. (2009) Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches, *Food Science and Nutrition* 49:48–67.
38. McClements, D. J., Decker, E. A. and Park, Y. (2009) Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods, *Food Science and Nutrition* 49:577-606
39. Mercenier, A., Muller-Alouf, H., and Grangette C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines, *Current Issues in Molecular Biology* 2:348-359

40. Morgado, M.A.P., Cabral, J.M.S. and Praseres, D.M.F. (1996) Phospholipase catalysed hydrolysis of lecithin in a continuous reversed-micellar membrane bioreactor, *Journal of the American Oil Chemists Society* 73:337–346.
41. Moulik, S.P. (1996) Micelles: Self-organized surfactant assemblies, *Current Science* Volume 71, Issue 5, Pages 368-376
42. Nagarajan, R. and Ruckenstein, E. (2000) Molecular theory of Microemulsions, *Langmuir* 6400-6415
43. Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria, *Journal of food Protection* 56:338-356
44. Papadimitriou, V., Sotiroudis G. T. and Xenakis A. (2007) Olive oil microemulsion: Enzymatic Activities and Structural Characteristic, *Langmuir* 23: 2071-2077
45. Papadimitriou, V., Tzika, E.D., Pispas, S., Sotiroudis, T.G. and Xenakis, A. (2011) Microemulsions based on virgin olive oil: A model biomimetic system for studying native oxidative enzymatic activities, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 382:1-3 232-237
46. Paul, B.K. and Moulik, S.P. (1997) Microemulsions: An overview, *Journal Dispersion Science and Technology* 18:301–367
47. Pramanik, R., Sarkar, S., Ghatak, C., Rao, V.G. and Sarkar, N. (2011) Ionic liquid containing microemulsions: Probe by conductance, dynamic light scattering, diffusion-ordered spectroscopy NMR measurements, and study of solvent relaxation dynamics, *Journal of Physical Chemistry B*. Volume 115:10 2322-2330
48. Phase Diagrams—Understanding the Basics. F.C. Campbell, editor. Copyright © 2012, ASM International®
49. Rilla, N., Martinez, B., Delgado, T. and Rodriguez, A. (2003) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* supsp. *Lactis* ILA 729, a nisin Z producer, *International Journal of Food Microbiology* 85:23-33
50. Roos, R. P., Morgan, S., and Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology* 79:3-16
51. Sahl, H.G. (1991) Pore formation in bacterial membranes by cationic lipopeptides, ESCOMS

52. Schiffrin, E.J., and Blum, S., (2001) Food processing: probiotic microorganism for beneficial foods, *Current Opinion in Biotechnology*. 12:499-502
53. Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Klipper-Balz, R., Collins, M.D. and Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen, *System Applied Microbiology* 6 183
54. Schulman, J.H., Staekenius, W. and Prince, L.M. (1959) Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy, *Journal of Physical Chemistry* 63:1677- 1680
55. Sen, A.K., Narbad, A., Horn, N., Dodd, H.M., Parr, A.J., Colquhoun, I. and Gasson, M.J. (1999) Post-translational modification of nisin. The involvement of NisB in the dehydration process, *European Journal of Biochemistry* 261:524-532
56. Shigeharu I., Takiwaza T. and Hideyo Y. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47:565-573
57. Singh, H., Ye, A. Q. and Horne, D. (2009) Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion, *Progress in Lipid Research* 48:92–100
58. Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology* 36:1-29
59. Svensson, M., Rees, G.D., Robinson, B.H. and Stephenson, G.R. (1996) Phospholipid-stabilised water-in-oil microemulsions: A study of ester synthesis by *Humicola lanuginosa* lipase, *Colloids Surfaces. B: Biointerfaces* 8:101–111
60. Solans, C., Kunieda, H., (1997) Dekker: New York.66:148-170.
61. Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria, *Bacteriology Review* 40:722-755
62. Tsakalidou, E., Zoidou, E, Pot, B., Wassil, L., Ludwig W., Dervriese, L.A., Kalatzopoulos G., Schleifer K.H. and Kersters K. (1998) Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:519-527
63. Twomey D, Ross R. P., Ryan M., Meaney B and Hill C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications, *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 165 – 185

64. Van de Hooven, H. W., Doeland, C.C.M., Van de Camp, M., Konings, R.H.N., Hilberts, C.W. and Van de Ven, F.J.M. (1996) Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate, *European Journal of Biochemistry* 235:382-393
65. Wells, J. M., Robinsin, K., Chamberlain, L. M., Schofield, K. M., and Le Page, R. W. (1996) Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles *Antoine Van Leeuwenhoek* 70:317-330
66. Winsor, P.A. (1948) Hydrotropy, solubilization, and related emulsification processes, *International Journal of Chemical Society Faraday Trans* 44, 376-382. ISSN 0956-5000
67. Winsor, P. A. (1984) *Transactions of the Faraday Society* 44:376
68. Wolf, P. A. and Havekotta, M. J. (1989) US Patent 4 835 002,