



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ**

ΚΡΙΣΙΛΙΑ ΣΟΦΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΑΜ: 22008

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ

ΚΟΝΤΕΛΕΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2024



FACULTY OF FOOD SCIENCE

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

STUDY OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NATURAL EXTRACTS

KRISILIA SOFIA EVANGELIA

SUPERVISORS:

BATRINOY ANTHIMIA

KONDELES SPYRIDON

ATHENS 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΙΤΡΟΠΗ

Μπατρίνου Ανθμία

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα
Επιστήμης και Τεχνολογίας
Τροφίμων, Σχολή Επιστημών
Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής
Αττικής

Χούχουλα Δήμητρα

Καθηγήτρια, Αντιπρόεδρος
Τμήματος Επιστήμης και
Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή
Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο
Δυτικής Αττικής

Κοντελές Σπυρίδων

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα
Επιστήμης και Τεχνολογίας
Τροφίμων, Σχολή Επιστημών
Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής
Αττικής

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κρίσιλια Σοφία Ευαγγελία του Παρασκευά, με αριθμό μητρώου 22008 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα,

Σοφία Ευαγγελία Κρίσιλια



ΔΗΛΩΣΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ/COPYRIGHT

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Κρίσιλια Σοφία Ευαγγελία



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ την τριμελή επιτροπή, την επίκουρη καθηγήτρια κυρία Μπατρίνου Ανθιμία, την καθηγήτρια κυρία Χούχουλα Δήμητρα και τον επίκουρο καθηγητή κύριο Σπυρίδωνα Κοντελέ, η οποία πρόκειται να εκτιμήσει το έργο που επιτελέστηκε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιβλέπουσα επίκουρη καθηγήτρια κυρία Μπατρίνου Ανθιμία, για τον χρόνο που αφιέρωσε και την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Η παρούσα εργασία δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό MDPI:

Letsiou, S., Pyrovolou, K., Konteles, S. J., Trapali, M., Krisilia, S., Kokla, V., ... & Batrinou, A. (2024). Exploring the Antifungal Activity of Various Natural Extracts in a Sustainable *Saccharomyces cerevisiae* Model Using Cell Viability, Spot Assay, and Turbidometric Microbial Assays. *Applied Sciences*, 14(5), 1899.

<https://www.mdpi.com/2076-3417/14/5/1899>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια του μαθήματος της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε μία εργαστηριακή μελέτη για τη χρήση ενός μοντέλου *Saccharomyces cerevisiae* που αποτελείται από τρία διαφορετικά βιομηχανικά στελέχη (ένα κρασί, μια μύρα και ένα στέλεχος αρτοποιίας) για την αξιολόγηση της αντιμυκητιακής δράσης τεσσάρων οργανικών φυτικών εκχυλισμάτων (*Hypericum perforatum* 10% w/w, *Pistacia lentiscus var. Chia* 20% w/w, *Rosmarinus officinalis* 6% w/w και *Origanum majorana*). Κατά τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι (διάχυση δίσκου άγαρ, προσδιορισμός κηλίδων και ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης). Από τα τέσσερα εκχυλίσματα, μόνο το εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* (6% w/w) εμφάνισε ανασταλτική δράση έναντι όλων των ελεγμένων στελεχών ζυμομύκητα στη μέθοδο διάχυσης δίσκου άγαρ. Στον προσδιορισμό κηλίδων, όλα τα εκχυλίσματα και τα έλαια-φορείς τους (ηλιέλαιο και καπρυλικό τριγλυκερίδιο) άσκησαν παρόμοια ήπια αντιμυκητιακή δράση. Τέλος, στην ανάλυση της καμπύλης ανάπτυξης, όλα τα εκχυλίσματα μείωσαν σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης των ζυμών, αλλά αυτό δεν παρατηρήθηκε για τα έλαια-φορείς. Τα αποτελέσματα τόνισαν ότι είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη περισσότερες από μία μέθοδοι για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης διαφορετικών ενώσεων. Επιλέον, τα τρία στελέχη ζύμης εμφάνισαν διαφορές στην ευαισθησία τους σε φαρμακευτικά αντιμυκητιακά, και οι ζύμες μύρας και αρτοποιίας ήταν ανθεκτικές στην ιτρακοναζόλη. Τα αποτελέσματά της έρευνας υποδηλώνουν ότι θα μπορούσαμε να εξετάσουμε την πολλαπλή χρήση αυτών των φυσικών εκχυλισμάτων στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα τροφίμων ή ακόμα και ως συντηρητικά για την καθυστέρηση της αλλοίωσης των τροφίμων.

ABSTRACT

During thesis course, a laboratory study was carried out using a *Saccharomyces cerevisiae* model consisting of from three different industrial strains (wine strain, beer strain and baker's strain) to evaluate the antifungal activity of four organic plant extracts (*Hypericum perforatum* 10% w/w, *Pistacia lentiscus* var. *Chia* 20% w/w and *Rosmarinus officinalis* 6% w/w, *Origanum majorana*). At this study, we used three different methods (agar disc diffusion, spot identification and growth curve analysis). Among the four extracts, only the extracts of *R. officinalis* showed inhibitory activity against all the tested yeast strains in the agar disc diffusion method. In spot assay method, every plant extract and their carrier oils (sunflower oil and caprylic triglyceride) exerted similar mild antifungal activity. Furthermore, in the growth curve analysis, all extracts significantly reduced the growth rate of the yeasts, but this was not observed for the carrier oils. The results highlighted that they are important to consider more than one method to control the antimicrobial activity of different compounds. Additionally, the three yeast strains showed differences in their susceptibility to medicinal antifungals, and the yeasts beer and bakery yeasts were resistant to itraconazole. The results of the study that we could look at the multiple use of these natural extracts in the food industry as food additives or even as preservatives to delay food spoilage.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΙΤΡΟΠΗ	ii
ΔΗΛΩΣΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ/COPYRIGHT	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	vi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	viii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xii
1 Εισαγωγή.....	1
2 Θεωρητικό μέρος.....	3
2.1 Χαρακτηριστικά ζυμών.....	3
2.2 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές	5
2.2.1 Ζύμες στην οινοποίηση.....	6
2.2.2 Ζύμες στην ζυθοποίηση	8
2.2.3 Ζύμες στην αρτοποιία.....	9
2.3 Αλλοίωση τροφίμων	10
2.4 Χημικά αντιμυκητιασικά.....	11
2.4.1 Αμφοτερικίνη Β	11
2.4.2 Κλοτριμαζόλη.....	12
2.4.3 Φλουκοναζόλη	13
2.4.4 Ιτρακοναζόλη	14
2.4.5 Κετοκοναζόλη	14
2.4.6 Νυστατίνη.....	15
2.5 Φυσικά εκχυλίσματα	16
2.5.1 <i>Hypericum perforatum</i>	16
2.5.2 <i>Pistacia lentiscus var. Chia</i>	18
2.5.3 <i>Rosmarinus officinalis, L.</i>	20

2.5.4	<i>Origanum majorana</i>	21
3	Μέθοδοι & Υλικά.....	23
3.1	Επιλεγμένες ζύμες.....	23
3.2	Φυσικά Εκχυλίσματα Ελεγμένα ως Αντιμικροβιακά Μέσα.....	23
3.3	Μέθοδος διάχυσης δίσκου άγαρ.....	24
3.4	Μέθοδος Spot Assay	26
3.5	Ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης.....	27
3.6	Στατιστική ανάλυση.....	29
4	Αποτελέσματα.....	30
4.1	Μέθοδος διάχυσης δίσκου άγαρ.....	30
4.2	Μέθοδος spot assay	34
4.3	Ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης.....	39
5	Συμπεράσματα	47
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1 Διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγής ενέργειας απο γλυκόζη μέσω των ζυμών	4
Εικόνα 2.2 Κύτταρα <i>S. cerevisiae</i>	4
Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων βιοχημικών μηχανισμών του μεταβολισμού της ζύμης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης	7
Εικόνα 2.4 Ζύμη οινοποιίας (<i>S. cerevisiae</i>).....	8
Εικόνα 2.5 Ζύμη ζυθοποιίας (<i>S. cerevisiae</i>).....	9
Εικόνα 2.6 Μαγιά αρτοποιίας	10
Εικόνα 2.7 Αμφοτερικήνη Β (AMB).....	12
Εικόνα 2.8 Κλοτριμαζόλη.....	13
Εικόνα 2.9 Φλουκοναζόλη.....	13
Εικόνα 2.10 Ιτρακοναζόλη	14
Εικόνα 2.11 Κετοκοναζόλη	15
Εικόνα 2.12 Νυστατίνη.....	15
Εικόνα 2.13 Χρήσεις του <i>H. perforatum</i> (Karoor et al., 2023)	17
Εικόνα 2.14 Άνθος <i>H. perforatum</i>	18
Εικόνα 2.15 Μαστίχα Χίου	20
Εικόνα 2.16 <i>Rosmarinus officinalis, L.</i>	21
Εικόνα 2.17 <i>Origanum majorana</i>	22
Εικόνα 3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
Εικόνα 3.2 Ποιετομασία τρυβλίων άγαρ για την μέθοδο διάχυσης δισκίων	24
Εικόνα 3.3 Τρυβλία άγαρ προς επώαση	25
Εικόνα 3.4 Δίσκοι φαρμακευτικών αντιμυκητιακών ενώσεων	25
Εικόνα 3.5 Θάλαμος βιολογικής ασφλαείας.....	26
Εικόνα 3.6 Συμπληρωμένη πλάκα Bioscreen προς μέτρηση	28

Εικόνα 3.7 Bioscreen C (Lab systems Helsinki, Vantaa, Finland)	28
Εικόνα 3.8 Plate counter	29
Εικόνα 4.1 Αντιμυκητιακή δράση των φυσικών εκχυλισμάτων (hypericum (<i>H. perforatum</i>), 10% w / w , υγρό εκχύλισμα μαστίχας (<i>Pistacia lentiscus var. Chia</i> , 20% w / w), και δενδρολίβανο (<i>Rosmarinus officinalis</i> , 6% w / w)) και διάφορες φαρμακευτικές ενώσεις που εκφράζονται σε mm ζωνών αναστολής στη μέθοδο διάχυσης με δίσκο άγαρ. Η μηδενική αναστολή θεωρείται όταν η διάμετρος είναι 6 mm (η διάμετρος του δίσκου, υποδεικνύεται με μια κόκκινη γραμμή). Οι μέσες τιμές και η SD συγκρίθηκαν με την ANOVA ακολουθούμενη από τη δοκιμή Duncan post hoc(Letsiou et al., 2024).....	33
Εικόνα 4.2 Αναστολή της ανάπτυξης με δίσκο άγαρ διάχυση της μαγιάς αρτοποιίας, χρησιμοποιώντας φαρμακευτικά αντιμυκητιασικά φάρμακα κλοτριμαζόλη (10mg), φλουκοναζόλη (25mg), ιτρακοναζόλη (10mg), κετοκοναζόλη (10mg), νυστατίνη (100 μονάδες), αμφοτερικίνη Β (100 μονάδες)	34
Εικόνα 4.3 Αναστολή της ανάπτυξης με δίσκο άγαρ διάχυση της μαγιάς μπύρας, χρησιμοποιώντας φαρμακευτικά αντιμυκητιασικά φάρμακα κλοτριμαζόλη (10mg), φλουκοναζόλη (25mg), ιτρακοναζόλη (10mg), κετοκοναζόλη (10mg), νυστατίνη (100 μονάδες), αμφοτερικίνη Β (100 μονάδες)	34
Εικόνα 4.4 Αναστολή της ανάπτυξης με δίσκο άγαρ διάχυση της μαγιάς κρασιού, χρησιμοποιώντας φαρμακευτικά αντιμυκητιασικά φάρμακα κλοτριμαζόλη (10mg), φλουκοναζόλη (25mg), ιτρακοναζόλη (10mg), κετοκοναζόλη (10mg), νυστατίνη (100 μονάδες), αμφοτερικίνη Β (100 μονάδες)	34
Εικόνα 4.5 Αναστολή της ανάπτυξης ζύμης μπύρας χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα δενδρολίβανου (R) (50μL) και μαστίχας (LM) (50μL) και αμφοτερικίνης Β (100 μονάδες).....	35
Εικόνα 4.6 Αναστολή της ανάπτυξης ζύμης αρτοποιίας χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα δενδρολίβανου (R) (50μL) και μαστίχας (LM) (50μL) και αμφοτερικίνης Β (100 μονάδες).....	35
Εικόνα 4.7 Spot assay- Wine yeast.....	37

Εικόνα 4.8 Spot assay- Beer yeast	37
Εικόνα 4.9 Spot assay- Baker's yeast	37
Εικόνα 4.10 Δοκιμές spot assay για τα τρία στελέχη <i>S. cerevisiae</i> που μελετήθηκαν. Η τρίτη αραιώση (1:25) των κηλίδων σε 24 ώρες επώασης χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση εικόνας. Οι μέσες τιμές του γκρι παρουσιάζονται στα γραφήματα ράβδων. Οι μέσες τιμές και η SD συγκρίθηκαν με την ANOVA ακολουθούμενη από τη δοκιμή Duncan post hoc. * Δηλώνει σημαντικά υψηλότερη ($p < 0,05$) από όλες τις άλλες καταστάσεις σε μοντέλα κυττάρων ζύμης (ζύμες κρασιού και μύρας). ** Δηλώνει σημαντικά υψηλότερο ($p < 0,05$) από το "μαγιά + Hypericum" (μαγιά αρτοποιίας) και τα λάδια μεταφοράς (Letsiou et al., 2024).	38
Εικόνα 4.11 Οι καμπύλες ανάπτυξης της ζύμης κρασιού στους 37 °C απουσία φυσικών εκχυλισμάτων (μόνο μαγιά, κόκκινη γραμμή) και παρουσία: εκχυλισμάτων υπερικού (<i>H. perforatum</i>), υγρής μαστίχας (<i>P. lentiscus var. Chia</i>), δενδρολίβανου (<i>R. Officinalis</i>) και ματζουράνας (<i>O. majorana</i>). Μια παρατεταμένη φάση υστέρησης και ένας βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης υποδεικνύει αντιμυκητιακή δράση.	41
Εικόνα 4.12 Οι καμπύλες ανάπτυξης της ζύμης μύρας στους 37 °C απουσία φυσικών εκχυλισμάτων (μόνο μαγιά, κόκκινη γραμμή) και παρουσία: εκχυλισμάτων υπερικού (<i>H. perforatum</i>), υγρής μαστίχας (<i>P. lentiscus var. Chia</i>), δενδρολίβανου (<i>R. Officinalis</i>) και ματζουράνας (<i>O. majorana</i>). Μια παρατεταμένη φάση υστέρησης και ένας βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης υποδεικνύει αντιμυκητιακή δράση.	42
Εικόνα 4.13 Οι καμπύλες ανάπτυξης των τριών στελεχών <i>S. cerevisiae</i> στους 37 °C απουσία φυσικών εκχυλισμάτων (μόνο μαγιά, κόκκινη γραμμή) και παρουσία: εκχυλισμάτων υπερικού (<i>H. perforatum</i>), υγρής μαστίχας (<i>P. lentiscus var. Chia</i>), δενδρολίβανου (<i>R. Officinalis</i>) και ματζουράνας (<i>O. majorana</i>). Μια παρατεταμένη φάση υστέρησης και ένας βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης υποδεικνύει αντιμυκητιακή δράση.	43
Εικόνα 4.14 Οι ρυθμοί ανάπτυξης των τριών στελεχών <i>S. cerevisiae</i> στους 37 °C. Οι μέσες τιμές και η SD συγκρίθηκαν με ANOVA ακολουθούμενη από Duncan post	

hoc test. * Υποδεικνύει σημαντικά χαμηλότερο ($p < 0,05$) από το «μόνο μαγιά» σε
κάθε μοντέλο κυττάρων ζύμης (αρτοποιός, κρασί, μύρα).44

Εικόνα 4.15 Baker's Yeast46

Εικόνα 4.16 Beer Yeast46

Εικόνα 4.17 Wine yeast46

1 Εισαγωγή

Η μικροβιακή ασφάλεια στον κλάδο των τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί μείζον μέλημα για τους καταναλωτές, τους ρυθμιστικούς φορείς και τις βιομηχανίες τροφίμων σε όλο τον κόσμο. Ενώ, πολλές στρατηγικές συντήρησης τροφίμων έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τον έλεγχο της μικροβιακής αλλοίωσης στα τρόφιμα, η μόλυνση των τροφίμων και η αλλοίωση από μικροοργανισμούς είναι ένα πρόβλημα που δεν έχει ακόμη ελεγχθεί επαρκώς (Davidson, Taylor and Schmidt, 2012). Η ασφάλεια και η διάρκεια ζωής των συστατικών τροφίμων μπορεί επίσης να βελτιωθεί με την εφαρμογή νέων τεχνολογιών για την αποφυγή ή την καθυστέρηση της μικροβιακής ανάπτυξης, όπως συσκευασία σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, ενεργοποιημένα φιλμ, μη θερμικές επεξεργασίες, ακτινοβόληση, συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας κ.λπ. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες μπορεί να προκαλέσουν απώλεια των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων και να μειώσουν την αποδοχή των καταναλωτών. Ως εκ τούτου, οι απαιτήσεις των καταναλωτών επικεντρώνονται όλο και περισσότερο σε ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, με λιγότερη χρήση συνθετικών προσθέτων και ταυτόχρονα χωρίς να διακυβεύεται η ασφάλεια των τροφίμων. Αν και τα συνθετικά αντιμικροβιακά είναι εγκεκριμένα σε πολλές χώρες, η πρόσφατη τάση ήταν η χρήση φυσικών συντηρητικών λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία των συνθετικών. Ως εκ τούτου, πρέπει να διερευνηθούν εναλλακτικές πηγές ασφαλών, αποτελεσματικών και αποδεκτών φυσικών συντηρητικών (Negi, 2012).

Πολύ πριν η ανθρωπότητα ανακαλύψει την ύπαρξη μικροβίων, η ιδέα ότι ορισμένα φυτά είχαν θεραπευτικές δυνατότητες, πράγματι, ότι περιείχαν αυτό που σήμερα θα χαρακτηρίζαμε ως αντιμικροβιακές αρχές, θερούταν πραγματικότητα. Από την αρχαιότητα, ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε φυτά για τη θεραπεία κοινών μολυσματικών ασθενειών και ορισμένα από αυτά τα παραδοσιακά φάρμακα εξακολουθούν να περιλαμβάνονται ως μέρος της συνήθους θεραπείας διαφόρων ασθενειών (Rios, 2005). Για παράδειγμα, η χρήση του του χυμού cranberry για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος.

Συνεπώς, αν και τα συνθετικά αντιμικροβιακά είναι εγκεκριμένα σε πολλές χώρες, η πρόσφατη τάση ήταν η χρήση φυσικών συντηρητικών, γεγονός που καθιστά αναγκαία την εξερεύνηση εναλλακτικών πηγών ασφαλών, αποτελεσματικών και αποδεκτών φυσικών συντηρητικών. Τα φυτικά εκχυλίσματα είτε ως τυποποιημένα εκχυλίσματα είτε ως πηγή καθαρών ενώσεων παρέχουν απεριόριστες ευκαιρίες για έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης λόγω της χημικής ποικιλομορφίας τους. Πολλά φυτικά εκχυλίσματα διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση έναντι μιας σειράς βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μούχλας, αλλά οι διακυμάνσεις στην ποιότητα και την ποσότητα των βιοδραστικών συστατικών τους είναι τα σημαντικότερα μειονεκτήματα στη χρήση τους στα τρόφιμα (Negi, 2012). Επομένως, η χρήση φυσικών αντιμικροβιακών όπως οργανικά οξέα, αιθέρια έλαια, φυτικά εκχυλίσματα και βακτηριοσίνες θα μπορούσε να είναι μια καλή εναλλακτική λύση για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, ωστόσο χρειάζεται να πραγματοποιηθούν περετέρω έρευνες για τη ασφαλή και αποτελεσματική χρήση τους (Tiwari *et al.*, 2009).

Η παρακάτω εργασία αναφέρεται βιβλιογραφικά στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ζυμών με τις οποίες μπορεί να αναβαθμιστεί ένα τρόφιμο ή ποτό, αλλά και στον τρόπο με τον οποίο μπορούν να αλλοιώσουν τα τρόφιμα καθιστώντας τα ακατάλληλα προς κατανάλωση. Επιπλέον, αναφέρεται στον τρόπο δράσης των συνθετικών αντιμυκητισιακών καθώς και στις αναφορές που έχουν γίνει για αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση μερικών φυτικών εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, παραθέτονται τα αποτελέσματα της εργαστηριακής έρευνας που πραγματοποιήθηκε, εξετάζοντας την αντιμυκητισιακή δράση των *Hypericum perforatum* 10% w/w, *Pistacia lentiscus var. Chia* 20% w/w και *Rosmarinus officinalis* 6% w/w, *Origanum majorana*, απέναντι στον *Saccharomyces cerevisiae*.

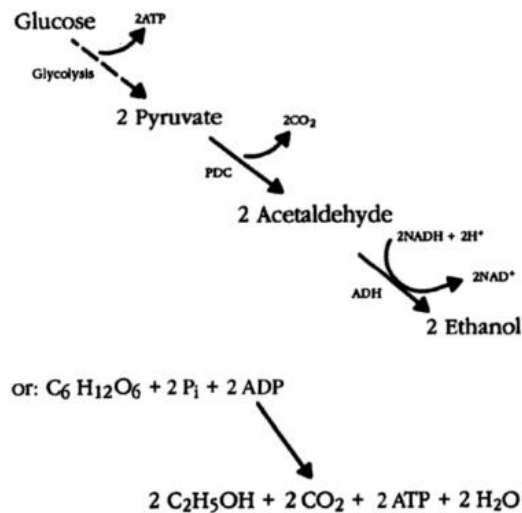
2 Θεωρητικό μέρος

2.1 Χαρακτηριστικά ζυμών

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μύκητες με σφαιρικό ή ωσειδές σχήμα ενώ ορισμένα στελέχη μπορούν να αναπτύξουν νηματοειδή σχήματα υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί αντιπροσωπεύουν μερικές από τις παλαιότερες βιοτεχνολογίες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται γενικά ως οργανισμοί βιοεπεξεργασίας, σε αντίθεση με τις καλλιέργειες και τα ζώα που καταναλώνονται απευθείας (Hittinger, Steele and Ryder, 2018). Το γεγονός αυτό εδραιώθηκε λόγω της ικανότητας των ζυμών να μεταβολίζουν τα σάκχαρα και να παράγουν αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ζύμωση ή αναερόβια αναπνοή. Πιο αναλυτικά, οι ζύμες μπορούν να αναπτύσσονται τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Σε αερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιούν οξυγόνο για την αναπνοή, ενώ σε αναερόβιες συνθήκες καταφεύγουν στη ζύμωση (Barnett, Payne and Yarrow, 1990).

Τα πιο σημαντικά θρεπτικά συστατικά για ζυμομύκητες είναι οι υδατάνθρακες που χρησιμεύουν τόσο για τον άνθρακα όσο και για πηγές ενέργειας. Μόνο μερικά σάκχαρα, κυρίως εξόζες και ολιγοσακχαρίτες, μπορούν να ζυμωθούν από ζυμομύκητες. Αντίθετα, το φάσμα των πηγών άνθρακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αερόβια είναι πολύ ευρύτερη και περιλαμβάνει εξόζες, πεντόζες, αλκοόλες, οργανικά οξέα και άλλες ενώσεις άνθρακα. Δεν είναι όλες οι ζύμες ικανές να μεταβολίσουν ορισμένους δι- και τρισακχαρίτες λόγω έλλειψης των απαραίτητων υδρολυτικών ενζύμων. Η ικανότητα των ζυμομυκήτων να μεταβολίζουν πολυσακχαρίτες και σύμπλοκα υδατάνθρακες περιορίζεται σε σχετικά λίγα είδη (Türker, 2014).

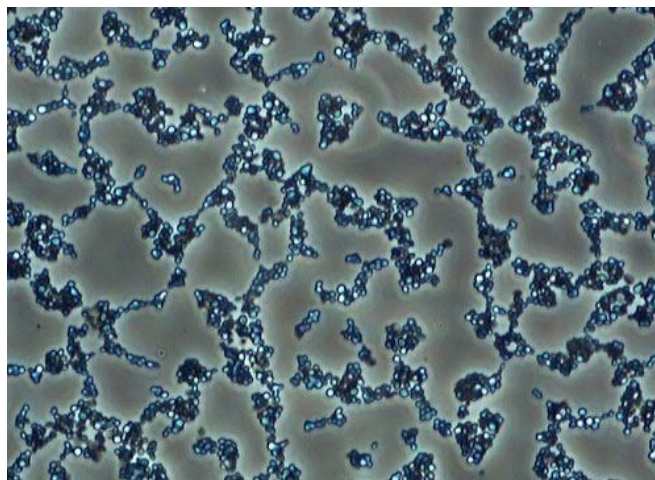
Οι ζυμομύκητες είναι συνήθως ανεκτικοί σε μεγάλα εύρη pH και συχνά βρίσκονται στο όξινο άκρο της κλίμακας όπου πολλά βακτήρια δεν είναι σε θέση να ανταγωνιστούν. Αντίθετα, σε πιο αλκαλικές συνθήκες η ανάπτυξη τους επιβραδύνεται ή και σταματά.



Εικόνα 2.1 Διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγής ενέργειας από γλυκόζη μέσω των ζυμών.

Παράλληλα, σχεδόν όλες οι γνωστές ζύμες είναι μεσόφιλες, και αναπτύσσονται καλύτερα μεταξύ 20°C και 30°C (Banat and Marchant, 1995). Σπάνια μπορούν να αναπτυχθούν πάνω από 42°C και αυτά που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται χρειάζονται συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, όπως αυτές του εντέρου των θερμόαιμων ζώων (Kurtzman *et al.*, 2011).

Σχετικά με τις συνθήκες υγρασίας, στις οποίες οι ζύμες έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν, χρειάζονται ένα σχετικά υγρό περιβάλλον περίπου 70-80% σχετική υγρασία. Ενώ, πολλά στελέχη ζυμών επηρεάζονται και από την παρουσία άλατος στο περιβάλλον.



Εικόνα 2.2 Κύτταρα *S. cerevisiae*

Οι ζύμες δεν είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί συνεπώς, ο φωτισμός δεν είναι ζωτικής σημασίας για την ύπαρξή τους. Ελάχιστες παρατηρήσεις αναφέρονται σε οποιαδήποτε επίδραση του φωτός σε αυτές, αλλά υποδεικνύουν την πιθανή θανατηφόρα επίδραση των υπεριωδών μηκών κύματος του ηλιακού φωτός. Αυτό μπορεί να εξηγήσει και τη σχετική αφθονία των χρωματισμένων ειδών (Deak, 2006).

2.2 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Οι ζύμες είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση. Είναι συνήθως γνωστές για τον θετικό τους ρόλο στη ζύμωση των τροφίμων, αλλά μπορεί επίσης να είναι μία από τις κύριες αιτίες αλλοίωσης των τροφίμων. Οι ζύμες υπάρχουν σε ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως η μπύρα, το κρασί και ο μηλίτης, καθώς και σε προϊόντα αρτοποιίας (Hittinger, Steele and Ryder, 2018). Παράλληλα, βρίσκουν χρήση σε βιομηχανίες βιοκαυσίμων, για την παραγωγή αιθανόλης. Οι ζύμες είναι πρότυπος οργανισμός για μελέτη γενετικής και κυτταρικής βιολογίας. Χρησιμοποιείται, ταυτόχρονα, στην παρασκευή βιολογικών, ενώ, μπορούν να βρουν πιθανή εφαρμογή στο τομέα της βιοαποκατάστασης (Phale, 2018).

Από τους πιο σημαντικούς μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Ένας σημαντικός λόγος για αυτό είναι ένα μέρος του τρόπου ζωής του, που ονομάζεται “make-accumulate-consume” (φτιάχνω – συσσωρεύω – καταναλώνω). Αυτό το χαρακτηριστικό βασίζεται στο φαινόμενο «Crabtree», το οποίο συνίσταται στο γεγονός ότι ο *S. cerevisiae*, ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες, δεν χρησιμοποιεί τον αναπνευστικό μηχανισμό για να μεταβολίσει σακχαρίτες και να προωθήσει την ανάπτυξη βιομάζας, αλλά παράγει αιθανόλη και άλλες ενώσεις άνθρακα, μέσω πυροσταφυλικού (Pronk, Yde Steensma and Van Dijken, 1996). Συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι ότι ο *S. cerevisiae* παράγει και συσσωρεύει αιθανόλη, η οποία είναι τοξική ή στατική, για τα περισσότερα μικροβιακά είδη που μπορούν να ανταγωνιστούν τον *S. cerevisiae* για τις ενώσεις σακχάρων, εξαλείφοντας, έτσι, τον ανταγωνισμό. Αφού ο *S. cerevisiae* έχει καθαρίσει τη συγκεκριμένη οικολογική θέση από τους περισσότερους ανταγωνιστές του, προχωρά στην κατανάλωση

της παραγόμενης αιθανόλης, προωθώντας έτσι τη δική της ανάπτυξη (Pararouli *et al.*, 2020).

Ο *S. cerevisiae* αποτελεί βασικό συστατικό του ανθρώπινου πολιτισμού λόγω της εκτεταμένης χρήσης του στη ζύμωση τροφίμων και ποτών, όπου έχει υψηλή εμπορική σημασία. Στην ευρωπαϊκή βιομηχανία ζύμης, παράγονται 1 εκατομμύριο τόνοι ετησίως, και περίπου το 30% των οποίων εξάγεται παγκοσμίως. Όσον αφορά τη βιομηχανία ποτών, ο *S. cerevisiae* συμμετέχει στην παραγωγή πολλών ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το κρασί, η μπίρα και ο μηλίτης. Ωστόσο, εμπλέκεται και σε αποσταγμένα ποτά, όπως ρούμι, βότκα, ούισκι, κονιάκ και σάκε, αλλά και σε άλλα αλκοολούχα ποτά παγκοσμίως. Η ζύμωση μπορεί να γίνει είτε από αυθόρμητη ανάπτυξη της μικροχλωρίδας της πρώτης ύλης, είτε από την προσθήκη καθαρής καλλιέργειας ζυμομύκητα (Hittinger, Steele and Ryder, 2018).

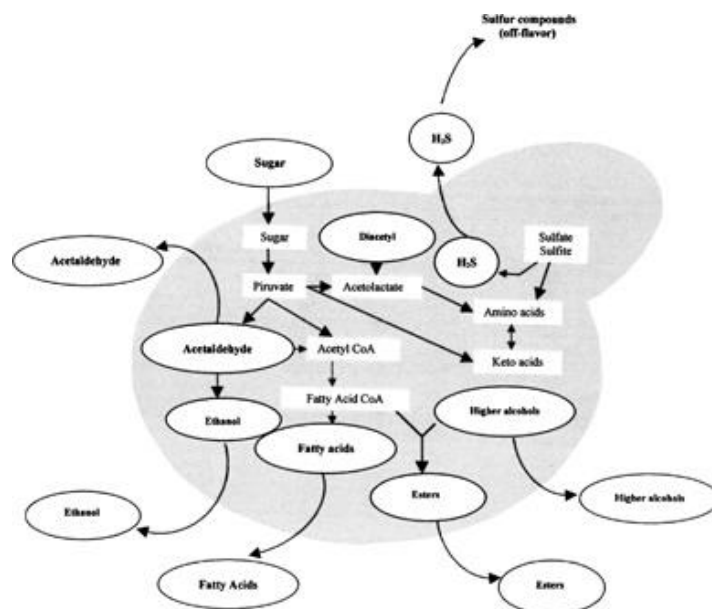
2.2.1 Ζύμες στην οινοποιία

Η ζύμωση του γλεύκους σταφυλιών και η παραγωγή οίνων εξαιρετικής ποιότητας είναι μια σύνθετη βιοχημική διαδικασία που περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις ενζύμων από πολλά διαφορετικά μικροβιακά είδη, αλλά κυρίως ζυμομύκητες και βακτήρια γαλακτικού οξέος. Οι ζύμες κυριαρχούν στο κρασί και πραγματοποιούν την αλκοολική ζύμωση, ενώ τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι υπεύθυνα για τη μηλογαλακτική ζύμωση (Moreno-Arribas and Polo, 2005).

Στην παραγωγή κρασιού, οι ζύμες έχουν τόσο ευεργετικές όσο και επιζήμιες δραστηριότητες. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο μικροοργανισμός που μετατρέπει το χυμό σταφυλιού σε κρασί, μαζί με μερικά άλλα είδη (Hernández *et al.*, 2018). Παράγοντες οινοποίησης, όπως η θερμοκρασία ζύμωσης, το pH και η συγκέντρωση σακχάρου του χυμού, μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη και τη μεταβολική ικανότητα της μαγιάς (Moreno-Arribas and Polo, 2005).

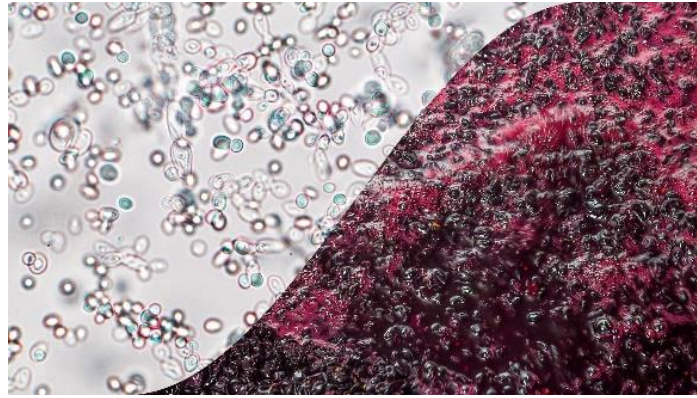
Το είδος της ζύμης που χρησιμοποιείται στην παραγωγή κρασιού είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη του αρώματος και του χρώματος του κρασιού μέσω της ζύμωσης και των μεταβολικών διαδικασιών που επιτελεί. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη ζύμωση, η ζύμη παράγει πολλών ειδών αρωματικές ενώσεις, που συμβάλλουν

στο άρωμα και τη γεύση του κρασιού. Μερικές από αυτές είναι αλκοόλες, εστέρες, οργανικά οξέα και θειολικές ενώσεις (Lambrechts and Pretorius, 2000). Παράλληλα, η αλληλεπίδραση με φαινολικές ενώσεις, καθώς και η αποσύνθεση χρωστικών ουσιών επηρεάζουν το χρώμα του κρασιού που παράγεται (Moreno-Arribas and Polo, 2005).



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων βιοχημικών μηχανισμών του μεταβολισμού της ζύμης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

Ειπλέον, κάποιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην οινοποιία μπορούν να αλλοιώσουν το κρασί. Η αλλοίωση μπορεί να εμφανιστεί μέσω περιεργων γεύσεων και οσμών που μπορούν να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας της ζύμωσης. Ειδικότερα, η αλλοίωση οφείλεται συνήθως στην παραγωγή υδρόθειου από το *S. cerevisiae* κατά τη ζύμωση (Hernández *et al.*, 2018). Ωστόσο, μπορούν να σχηματίσουν και αντιοξειδωτικές ουσίες, που βοηθούν στην σταθερότητα του κρασιού καθυστερώντας την οξείδωσή του (Moreno-Arribas and Polo, 2005).

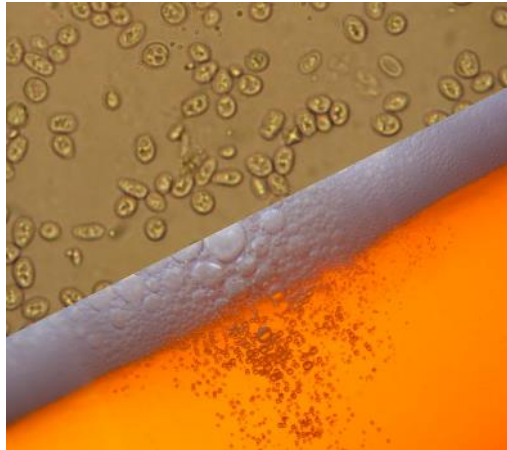


Εικόνα 2.4 Ζύμη οينوποιίας (*S. cerevisiae*)

2.2.2 Ζύμες στην ζυθοποιία

Η διαδικασία παραγωγής μύρας χωρίζεται σε δύο πολύ ευρείες κατηγορίες σύμφωνα με τις οποίες χρησιμοποιείται η μαγιά, lager και ale. Κατά τη διαδικασία παραγωγής lager μύρας πραγματοποιείται ζύμωση στον πυθμένα. Το είδος ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται σε αυτό το είδος ζύμωσης είναι γνωστό ως *Saccharomyces pastorianus* ή *Saccharomyces carlsbergensis*. Το συγκεκριμένο είδος εκτελεί τη ζύμωση σε ψυχρές θερμοκρασίες (8–15 °C) και σχηματίζει μια θολή μάζα στον πυθμένα του δοχείου (Bamforth, 2003). Οι μύρες Lager είναι οι πιο διαδεδομένοι τύποι μύρας σε όλο τον κόσμο (πάνω από 90%), εμφανίζουν καθαρότερα, πιο «κρύα» αρώματα, με λιγότερα φρουτώδη στοιχεία σε σύγκριση με τις μύρες Ale (White and Zainasheff, 2010).

Για την παραγωγή μύρας Ale, πραγματοποιείται ζύμωση στην επιφάνεια, από στελέχη *S. cerevisiae*, τα οποία έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν βέλτιστα στους 20-25 °C. Η ζύμωση αυτού του είδους είναι ταχύτερη και σε υψηλότερες θερμοκρασίες παράγει φαινόλες και εστέρες. Οι συγκεκριμένες ενώσεις προσδίδουν φρουτώδη και πικάντικα αρώματα, που είναι χαρακτηριστικά για αυτό το είδος μύρας (Gallone *et al.*, 2016).



Εικόνα 2.5 Ζύμη ζυθοποιίας (*S. cerevisiae*)

Σε πιο ιδιαίτερες μύρες, όπως lambic, gueuze και άλλες ξινές μύρες, χρησιμοποιείται το γένος *Brettanomyces*. Το γένος αυτό, παράγει μύρες υποβάλλοντάς τες σε αργή και δευτερογενή ζύμωση. Με αυτόν τον τρόπο παράγει ιδιαίτερα έντονα και πολύπλοκα αρώματα (White and Zainasheff, 2010).

2.2.3 Ζύμες στην αρτοποιία

Η χρήση ζυμών στην αρτοποιία είναι μια κρίσιμη διαδικασία που καθορίζει την ποιότητα, τη γεύση και την υφή των αρτοσκευασμάτων. Η ζύμωση σε αυτό τον κλάδο κυριαρχείται από τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae*, ο οποίος συχνά αναφέρεται και ως μαγιά της αρτοποιίας (Fleet, 2007).

Τα βασικά απαιτούμενα από μια μαγιά αρτοποιίας είναι να προκαλεί ομοιόμορφη διόγκωση ζύμης, να είναι καλός παραγωγός γεύσης και να αντέχει ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, pH, καθώς και συγκέντρωση ζάχαρης και αλατιού (Linko, Javanainen and Linko, 1997). Δεδομένων αυτών των απαιτούμενων, στην βιομηχανία οι νωπές και οι συμπυκνωμένες ζύμες χρησιμοποιούνται συχνότερα, δεδομένου ότι θεωρούνται οι πιο αξιόπιστες. Επιπρόσθετα, η φρέσκια μαγιά παράγει μεγαλύτερη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με αποτέλεσμα να έχει καλύτερη ικανότητα διόγκωσης της ζύμης (Heitmann, 2017). Δύο ακόμη είδη μαγιάς που χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία, είναι η ενεργή ξηρή μαγιά και η ξηρή μαγιά στιγμής. Συγκρίνοντας αυτά τα τέσσερα είδη μεταξύ τους, σχετικά με την ταχύτητα, με την οποία διογκώνουν την

ζύμη παρατηρείται το εξής: ταχύτερη είναι η νωπή μαγιά, διότι δεν χρειάζεται ενυδάτωση, ακολουθεί η συμπιεσμένη μαγιά, στη συνέχεια η ξηρή μαγιά στιγμής και τέλος η ενεργή ξηρή μαγιά (Hui *et al.*, 2008). Το μεγαλύτερο πρόβλημα της νωπής μαγιάς είναι η μικρή διάρκεια ζωής .

Επιπρόσθετα, η μαγιά που θα χρησιμοποιηθεί στην εκάστοτε παραγωγή ψωμιού, παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην υφή και την γεύση του τελικού προϊόντος. Ειδικότερα, κατά την ζύμωση παράγονται οργανικές ενώσεις, όπως αλκοόλες και αλδεΐδες, οι οποίες διαμορφώνουν το αρωματικό και γευστικό προφίλ του ψωμιού, ανάλογα με την ποικιλία και την ποσότητα τους (De Vuyst and Neysens, 2005). Σημαντικό ρόλο σε αυτά τα χαρακτηριστικά παίζει και η διάρκεια της ζύμωσης. Η μακρά ζύμωση για παράδειγμα προσδίδει, συνήθως, πιο πλούσιες και πολύπλοκες γεύσεις και αρώματα στο ψωμί (Hamelman, 2004).



Εικόνα 2.6 Μαγιά αρτοποιίας

2.3 Αλλοίωση τροφίμων

Η ζύμωση εκτός από τρόπο αναβάθμισης προϊόντων τροφίμων, είναι και ο βασικός μηχανισμός αλλοίωσης τροφίμων των ζυμών, απελευθερώνοντας κυρίως αέρια, οξέα και αλκοόλες. Τα προϊόντα της ζύμωσης προκαλούν στα τρόφιμα είτε δυσάρεστες οσμές, αλλαγή της γεύσης τους, της υφής και του χρώματος τους (Fleet, 1992).

Τα προϊόντα που, συνήθως αλλοιώνονται από ζύμες έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, τα οποία διευκολύνουν την ανάπτυξή τους. Ειδικότερα, η υψηλή υγρασία και οι θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος προάγουν

την ανάπτυξη ζυμών. Επιπλέον, το pH των τροφίμων που αλλοιώνονται συχνότερα είναι ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο. Ενώ, οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί προαιρετικά αναερόβιοι, επομένως μπορούν να αναπτύσσονται σε παρουσία αλλά και πλήρη απουσία οξυγόνου (Deak, 2006).

Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά, τα κοινά προσβληθέντα τρόφιμα είναι φρούτα και χυμοί, λόγω της περιεκτικότητάς τους σε σάκχαρα (Deak, 2007), αρτοσκευάσματα, διότι παράγονται με ζύμωση που μπορεί να ξεπεράσει χρονικά και γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το τυρί και το γιαούρτι (Suriyarachchi and Fleet, 1981).

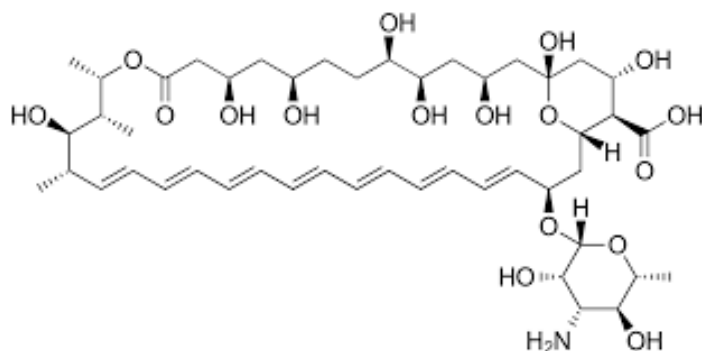
Συνεπώς, τα μέτρα πρόληψης της αλλοίωσης τροφίμων από ζύμες είναι ευρέως διαδεδομένα στη βιομηχανία τροφίμων. Αρχικά, η χρήση σωστής συσκευασίας σε συνδυασμό με την ψύξη των προϊόντων ελαττώνεται σε μεγάλο βαθμό η ανάπτυξή τους. Παράλληλα, κατά την παραγωγή των τροφίμων, αυτά που μπορούν να βοηθήσουν είναι τόσο η παστερίωση, καθώς οι θερμοκρασίες θανατώνουν τις ζύμες, όσο και τα συντηρητικά που βοηθούν στην επιμήκυνση της διάρκειας ζωής τους. Ωστόσο, το κυριότερο που πρέπει να τηρείται είναι οι κανόνες υγιεινής κατά την παρασκευή αλλά και την αποθήκευση των τροφίμων (Lowes *et al.*, 2000).

2.4 Χημικά αντιμυκητιασικά

2.4.1 Αμφοτερικίνη Β

Η αμφοτερικίνη Β (AMB) θεωρείται από καιρό το πιο αποτελεσματικό φάρμακο στη θεραπεία σοβαρών διηθητικών μυκητιασικών λοιμώξεων από μύκητες όπως η *Candida albicans* ή ο *Aspergillus fumigatus* (Lemke, Kiderlen and Kayser, 2005). Υπάρχουν, ωστόσο, σημαντικοί περιορισμοί στη χρήση του, λόγω πολλών ανεπιθύμητων ενεργειών, συμπεριλαμβανομένων των οξείων αντιδράσεων έγχυσης. Ένας λόγος αυτής της τοξικότητας είναι ο σχηματισμός αδρανών ως αποτέλεσμα της χαμηλής υδατοδιαλυτότητάς του (Benincasa *et al.*, 2011). Τις περισσότερες φορές, οι ασθενείς που χρειάζονται παρέμβαση με D-AMB είναι σοβαρά σε κίνδυνο λόγω των υποκείμενων ασθενειών και των συννοσηροτήτων τους, και ως εκ τούτου, καταλήγουν να γίνονται ευάλωτοι στις αναφερόμενες τοξικές επιδράσεις, ειδικά όταν συνδυάζονται με άλλα φάρμακα.

Το AMB δεν έχει μόνο ευρεία αντιμυκητιακή δράση, είναι επίσης ένας εξαιρετικά αποτελεσματικός αντιπαρασιτικός παράγοντας. Με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε ευάλωτους ξενιστές, λόγω του ευρέους φάσματος δράσης αλλά και των χαμηλών ποσοστών αντίστασης (Lemke, Kiderlen and Kayser, 2005).

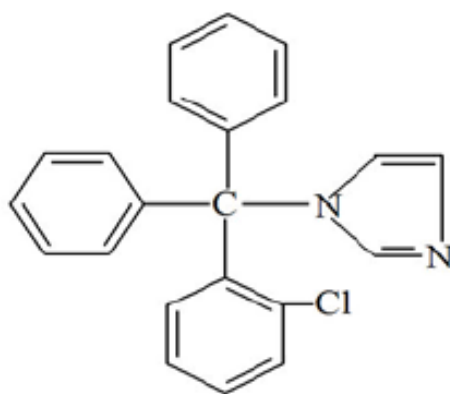


Εικόνα 2.7 Αμφοτερικίνη Β (AMB)

2.4.2 Κλοτριμαζόλη

Η κλοτριμαζόλη είναι ένα ευρέως φάσματος αντιμυκητιασικό φάρμακο που χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της *Candida albicans* και άλλων μυκητιασικών λοιμώξεων. Ένα συνθετικό, αζολικό αντιμυκητιασικό, η κλοτριμαζόλη χρησιμοποιείται κυρίως τοπικά για τη θεραπεία κολπικών και δερματικών λοιμώξεων που οφείλονται σε ζυμομύκητες και δερματόφυτα (Sawyer *et al.*, 1975). Εκτός από την αντιμυκητιασική της δράση, η κλοτριμαζόλη έχει γίνει ένα φάρμακο ενδιαφέροντος κατά πολλών άλλων ασθενειών όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η ελονοσία και ορισμένοι καρκίνοι (Crowley and Gallagher, 2014).

Ο τρόπος που δρα το συγκεκριμένο αντιμυκητιακό είναι με την παρέμβαση στην βιοσύνθεση της εργοστερόλης. Πιο αναλυτικά, η εργοστερόλη αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών. Συνεπώς, με την παρέμβαση της κλοτριμαζόλης, σε μικρές ή μεγάλες ποσότητες, προκλείνεται μερική ανασταλτική δράση ή και θανάτωση των οργανισμών, αντίστοιχα (Haller, 1985).

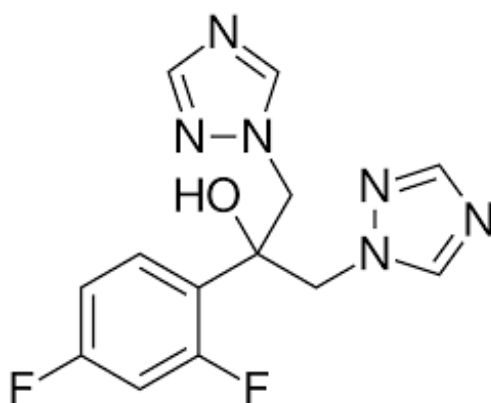


Εικόνα 2.8 Κλωτριμαζόλη

2.4.3 Φλουκοναζόλη

Η φλουκοναζόλη είναι ένας τριαζολικός αντιμυκητιακός παράγοντας που διατίθεται για από του στόματος ή ενδοφλέβια χρήση στη θεραπεία ενός αριθμού εντοπισμένων και διάσπαρτων μυκητιάσεων. Συνήθως καλείται να αντιμετωπίσει λοιμώξεις από *Candida spp.* και *Cryptococcus neoformans*. Όπως η κλωτριμαζόλη, έτσι και η φλουκοναζόλη δρα αναστέλλοντας την σύνθεση της εργοστερόλης (Galgiani, 1990).

Το φάρμακο είναι υδατοδιαλυτό, απορροφάται σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από του στόματος χορήγηση και διεισδύει στα σωματικά υγρά και στους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Ύστερα, απεκκρίνεται σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητο στα ούρα σε περίπου 30 ώρες, επιτρέποντας τη χορήγηση του μία φορά ημερησίως (Zervos and Meunier, 1993).

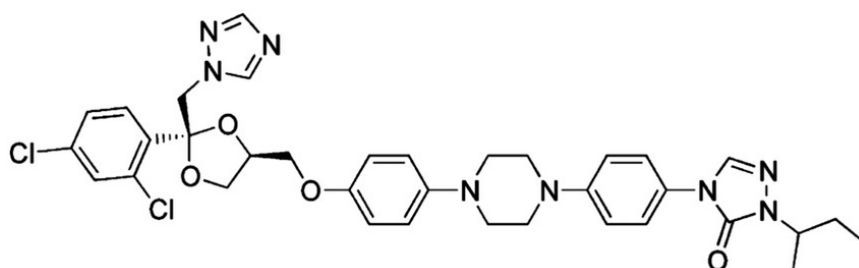


Εικόνα 2.9 Φλουκοναζόλη

2.4.4 Ιτρακοναζόλη

Η ιτρακοναζόλη είναι ένας τριαζολικός αντιμυκητιασικός παράγοντας που έχει ευρύ φάσμα δράσης. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, ιδίως επειδή ο κύριος μεταβολίτης της, η υδροξυ-ιτρακοναζόλη, έχει επίσης σημαντική αντιμυκητιασική δράση (De Beule and Van Gestel, 2001). Η ιτρακοναζόλη όπως και η φλουκοναζόλη, είναι ουσία που δρα με χορήγηση από το στόμα, έχει ευνοϊκή φαρμακοκινητική και διαθέτει δραστηριότητα έναντι διαφόρων συστηματικών μυκητολογικών παθογόνων. Επιπλέον, οι δύο αυτές αντιμυκητιακές ουσίες είναι σημαντικά λιγότερο τοξικές από άλλες διαθέσιμες ενώσεις αζόλης (Piérard, Arrese and Piérard-Franchimont, 2000).

Η φλουκοναζόλη και, σε μικρότερο βαθμό, η ιτρακοναζόλη έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικές για τη θεραπεία της κρυπτοκοκκικής μηνιγγίτιδας. Το ενδεχόμενο φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων είναι πολύ μικρότερο με αυτούς τους παράγοντες σε σύγκριση με φάρμακα όπως η κετοκοναζόλη (Bailey, Krakovsky and Rybak, 1990).

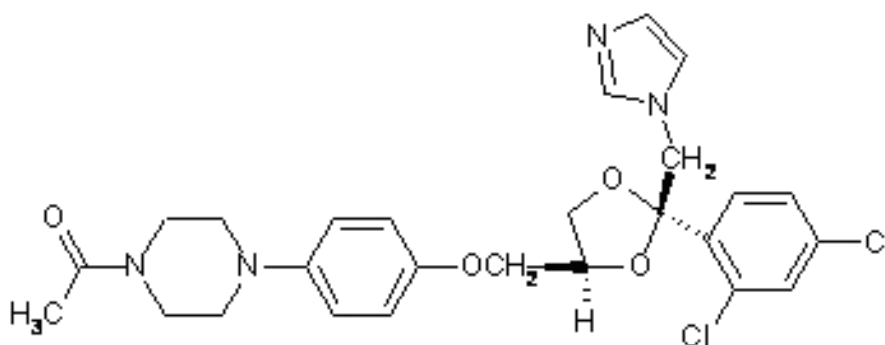


Εικόνα 2.10 Ιτρακοναζόλη

2.4.5 Κετοκοναζόλη

Η κετοκοναζόλη, ένα συνθετικό αντιμυκητιασικό ιμιδαζόλης, είναι αποτελεσματικό για επιφανειακές μυκητιασικές λοιμώξεις, καντιντίτιδα των γεννητικών οργάνων και χρόνια βλεννογονοδερματίτιδα και έχει χρησιμοποιηθεί σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και προχωρημένο καρκίνωμα προστάτη.

Η απορρόφηση της κετοκοναζόλης, μετά την χορήγηση από το στόμα, ποικίλει ανάλογα με τον ιστό του δείγματος. Ειδικότερα, η παρουσία αντιόξινων μειώνουν την απορρόφηση του φαρμάκου, όπως και η νεφρική ανεπάρκεια (Daneshmend and Warnock, 1988). Επιπρόσθετα ο χρόνος ημιζωής της κετοκοναζόλης είναι δύο με τρεις ώρες, υστερά ακολουθεί η αποβολή της από το σώμα (Brass *et al.*, 1982).

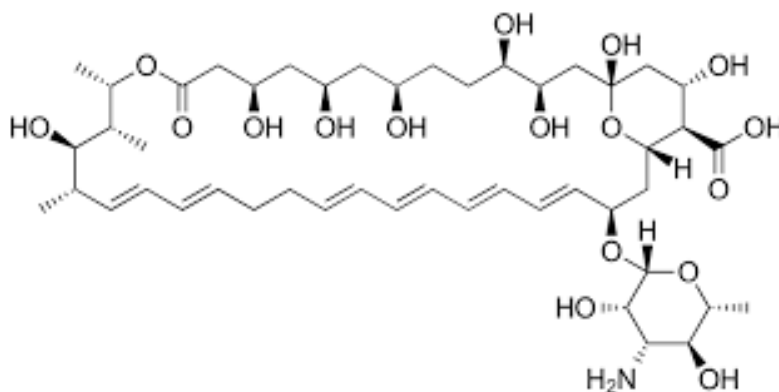


Εικόνα 2.11 Κετοκοναζόλη

2.4.6 Νυστατίνη

Η νυστατίνη είναι ένα πολυενικό αντιμυκητιασικό που διαθέτει εξαιρετική *in vitro* μυκητοκτόνο δράση κατά του *C. albicans spp.* και χρησιμοποιείται ευρέως για την καταπολέμηση της καντιντίασης (Melkoumon *et al.*, 2013). Ο μηχανισμός δράσης των αντιμυκητιασικών πολυενίων είναι διπλός. Πρώτον, τα πολυένια συνδέονται με την εργοστερόλη και την δεσμεύουν. Δεύτερον, η πρόκληση οξειδωτικού στρες και η βλάβη συμβάλλουν επίσης στην αντιμυκητιακή δράση του πολυενίου (Konacic and Cooksy, 2012).

Παρά την ευρεία αντιμυκητιασική δράση της νυστατίνης, περιορίζεται να χρησιμοποιείται μόνο για επιφανειακές λοιμώξεις του είδους *Candida*. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της συστηματικής τοξικότητάς του και της χαμηλής εντερικής διαπερατότητας. Τέλος, η δομή, η χημεία, ο μηχανισμός δράσης και η αντίσταση της νυστατίνης μοιάζουν με της αμφοτερικίνης Β (Sousa *et al.*, 2023).



Εικόνα 2.12 Νυστατίνη

2.5 Φυσικά εκχυλίσματα

Υπάρχει μια αυξανόμενη ζήτηση για μείωση της χρήσης χημικών ως αντιμικροβιακών παραγόντων τόσο στον τομέα της διατροφής όσο και για την καταπολέμηση διαφόρων λοιμώξεων. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των ολοένα και πιο επιθετικών μικροοργανισμών που είναι ανθεκτικοί στη χρήση χημικών αντιμικροβιακών. Παράλληλα, η υπερευαισθησία και η τοξικότητα στα φάρμακα, λόγω της ακατάλληλης και υπερβολικής εφαρμογής τους, αντιπροσωπεύουν μερικά από τα κύρια προβλήματα της συμβατικής ιατρικής. Ως εκ τούτου, η ευαισθητοποίηση του κοινού έχει δημιουργήσει ενδιαφέρον για την εφαρμογή φυσικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ήδη διαχρονικά για τη θεραπεία ορισμένων ασθενειών που μεταδίδονται από οργανισμούς.

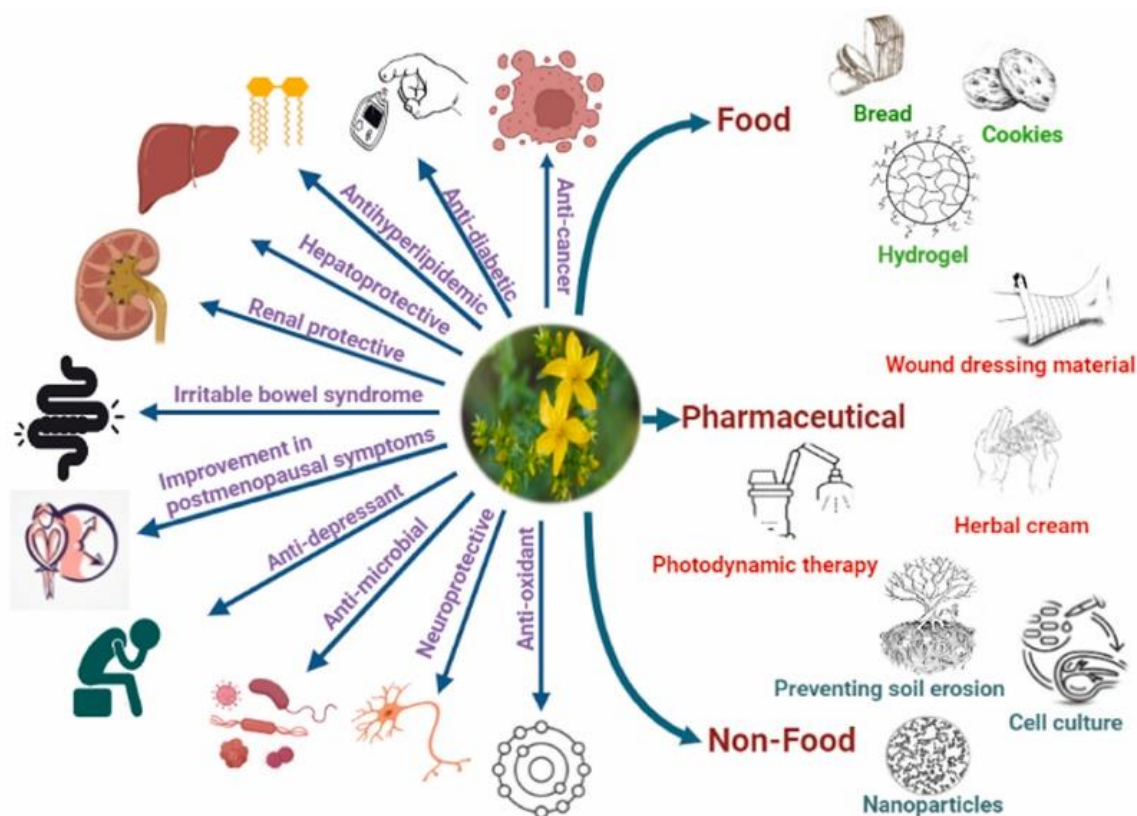
Προς αυτή την κατεύθυνση, παρατηρείται ότι ουσίες που προέρχονται από φυτά, όπως τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ή τα αιθέρια έλαια, μπορούν σίγουρα να παίξουν θεμελιώδη ρόλο. Η ευελιξία τέτοιων ουσιών είναι τεράστια. Πιο συγκεκριμένα, το ίδιο φυτό μπορεί να παρέχει μια ποικιλία ουσιών με πολύ ευρύ φάσμα δράσης λόγω της διαφορετικής χημικής τους δομής (Nazzaro *et al.*, 2017).

2.5.1 *Hypericum perforatum*

Τα φυτικά είδη του γένους *Hypericum* είναι πολύ γνωστά για τη χρήση τους στην παραδοσιακή ιατρική, λόγω της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας των πολλών διαφορετικών ειδών του. Ένα από τα πιο σημαντικά και αναγνωρισμένα είδη του γένους είναι το *Hypericum perforatum* (*H. perforatum*), το υπερικό, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στη βοτανοθεραπεία, εξωτερικά για τη θεραπεία δερματικών πληγών, εκζέματος και εγκαυμάτων και εσωτερικά για διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, το πεπτικό σύστημα και άλλους σκοπούς (Barnes, Anderson and Phillipson, 2001; Cervo *et al.*, 2002). Ταυτόχρονα το *H. perforatum* είναι το δεύτερο στην παγκόσμια κατάταξη χρήσης αντικαταθλιπτικών. Ενώ, οφείλει την ευρεία χρήση του στην παραδοσιακή και σύγχρονη ιατρική στην υψηλή περιεκτικότητα σε υπερικίνες και υπερφορίνες στα άνθη του (Gioti *et al.*, 2009).

Το *H. perforatum* οφείλει τις θεραπευτικές του ιδιότητες στην παρουσία φαινολικών και φλαβονοειδών σε διάφορα μέρη του φυτού. Εναέρια μέρη του *H.*

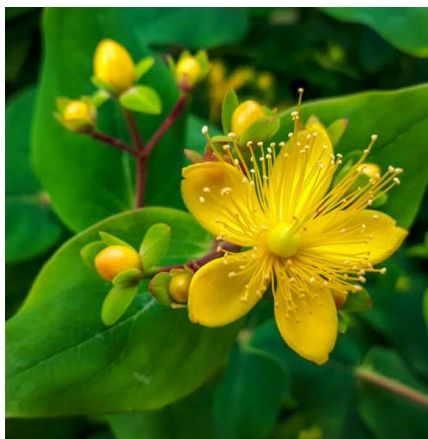
perforatum περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ουσιών όπως γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ αλλά και άλλες πολυάριθμες ενώσεις. Οι συγκεκριμένες ουσίες έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν οφέλη για την υγεία μέσω αντιοξειδωτικών, προβιοτικών, αντικαρκινικών, αντιυπερτασικών, αντιφλεγμονωδών, αντιπαχυσαρκικών και αντιδιαβητικών δραστηριοτήτων, καθώς και θετικές επιδράσεις σε ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Kim *et al.*, 2022). Παράλληλα, τα φλαβονοειδή είναι η πιο εξέχουσα ομάδα βιολογικά ενεργών μορίων του *H. perforatum* και απαντώνται κυρίως στα φύλλα και τα άνθη. Τα πιο ευρέως αναγνωρισμένα φλαβονοειδή στα είδη *Hypericum* είναι οι φλαβονοειδείς αγλυκόνες, φλαβονόλη, γλυκοσίδες, ρουτίνη κ.α. Αυτές οι ενώσεις έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω της συνεισφοράς τους στις καλλυντικές και φαρμακευτικές ιδιότητες (όπως αντικαταθλιπτικά, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητικά, αντιμυκητιακά, αντιοξειδωτικά κ.λπ.) (Dias, Pinto and Silva, 2021).



Εικόνα 2.13 Χρήσεις του *H. perforatum* (Kapoor *et al.*, 2023)

Τα βρώσιμα άνθη θεωρούνται ως λειτουργικές ενώσεις λόγω των πολυάριθμων προστατευτικών και ευνοϊκών χαρακτηριστικών τους. Το *H. perforatum* είναι μια πλούσια πηγή πολυάριθμων βιοδραστικών ενώσεων, που επιτρέπει τη χρήση του στην ανάπτυξη διαφορετικών προϊόντων διατροφής. Μπορεί να βρεθεί σε μια ποικιλία προϊόντων τροφίμων και ποτών, όπως τσάι από βότανα, προϊόντα αρτοποιίας, υδρογέλες, γιαούρτια, γάλα και ζυμαρικά. Η παρουσία του σε αυτά τα μετατρέπει σε λειτουργικά τρόφιμα με ιδιότητες όπως αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές κ.λπ. Το *H. perforatum* έχει, επίσης, την ικανότητα να προστατεύει τα τρόφιμα από ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια όπως το *B. mesentericus* και *B. subtilis* μαζί με βελτιωμένες οργανοληπτικές και ρεολογικές ιδιότητες (Dombrowskaya *et al.*, 2021). Πιο συγκεκριμένα, 0,5 g *H. perforatum* αναμειγμένο με 100 g αλεύρι σίτου ενισχύει τις βιοδραστικές ενώσεις των μπισκότων σίτου. Επιπλέον, το εκχύλισμα μελιού και νερού *H. perforatum* χρησιμοποιείται για να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του ψωμιού (Karoor *et al.*, 2023).

Κάθε μέρος του φυτού (φύλλα, ρίζες, στέλεχος, άνθη) μπορεί, ακόμα, να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανίες τροφίμων ως έχουν, καθώς και με μικροενθυλάκωση μέσω ξήρανσης με ψεκασμό (Estevinho *et al.*, 2021).



Εικόνα 2.14 Άνθος H. perforatum

2.5.2 *Pistacia lentiscus var. Chia*

Η Μαστίχα Χίου είναι η ρητίνη που λαμβάνεται από το *Pistacia lentiscus L. var. Chia* (δέντρο μαστίχας), το οποίο είναι ένα ενδημικό φυτό που καλλιεργείται αποκλειστικά στο νότιο τμήμα του ελληνικού νησιού της Χίου. Η Μαστίχα Χίου

είναι η πρώτη φυσική τσίχλα και χρησιμοποιείται ευρέως στην παραδοσιακή μεσογειακή μαγειρική και ροφήματα λόγω του ξεχωριστού αρώματος και της γεύσης της. Η μαστίχα είναι επίσης ένα σημαντικό συμπλήρωμα διατροφής, ειδικά σε περιπτώσεις έλλειψης ιχνοστοιχείων. Ενώ έχει και ευρεία εφαρμογή στην αρωματοποίηση, την οδοντιατρική και τα καλλυντικά (Kalousi *et al.*, 2023).

Η μαστίχα Χίου χρησιμοποιείται ως παραδοσιακό φάρμακο για τουλάχιστον δύο χιλιετίες. Οι ευεργετικές ιδιότητες της μαστίχας Χίου έχουν αποδειχθεί στη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών, στην επούλωση τραυμάτων, στις δερματικές φλεγμονές, στη μείωση των λιπιδίων του πλάσματος και στη μείωση του σακχάρου στο αίμα και στη στοματική φροντίδα. Αυτές οι ιδιότητες αποδίδονται στα τριτερπένια και στις πτητικές ενώσεις (Pachi *et al.*, 2020).

Το εκχύλισμα της μαστίχας χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη μαγειρική, τη ζαχαροπλαστική και την αρτοποιία. Σε ένα ευρύ φάσμα παραδοσιακών προϊόντων αρτοποιίας, γλυκών και γλυκών αποτελεί βασικό αρωματικό συστατικό. Ωστόσο, γίνονται προσπάθειες εκμετάλλευσης των ευεργετικών της ιδιοτήτων. Καθώς η βιομηχανία τροφίμων στρέφεται στη δημιουργία νέων προϊόντων με βελτιωμένα θρεπτικά συστατικά που θα βασίζονται στις λειτουργικές ιδιότητες της μαστίχας (Terrou *et al.*, 2018).

Η χρήση της μαστίχας είναι επίσης ευρέως διαδεδομένη στον τομέα των καλλυντικών και της υγιεινής. Πολλά προϊόντα περιποίησης σώματος, μαλλιών, προσώπου είναι διαθέσιμα στην αγορά. Ενώ, πολλά από αυτά τα προϊόντα προσφέρουν περιποίηση δέρματος και αντιγηραντική προστασία και συνίστανται για τη φροντίδα του φωτογηρασμένου δέρματος και την ενυδάτωση και παράλληλα είναι ευεργετικά για τους τύπους δέρματος με τάση για ακμή και μαύρες κηλίδες (Pachi *et al.*, 2020).



Εικόνα 2.15 Μαστίχα Χίου

2.5.3 *Rosmarinus officinalis*, L.

Το *Rosmarinus officinalis*, L. (δενδρολίβανο) με καταγωγή από την περιοχή της Μεσογείου είναι ένα αρωματικό φυτό από την οικογένεια Lamiaceae. Τα φρέσκα και αποξηραμένα φύλλα χρησιμοποιούνται συχνά στην παραδοσιακή μεσογειακή κουζίνα και στη λαϊκή ιατρική. Είναι ένα αρωματικό φυτό που έχει ερευνηθεί εκτενώς για τις βιολογικά ενεργές ενώσεις και την πολύτιμη χρήση του σε τρόφιμα, φάρμακα και αρωματοποιία. Πράγματι, μια μεγάλη ποικιλία χρήσιμων δευτερογενών μεταβολιτών έχει απομονωθεί από τα φυτά *Rosmarinus*, συμπεριλαμβανομένων των αιθέριων ελαίων, τερπενοειδή, флаβονοειδή και φαινολικά οξέα. Ωστόσο, η συσσώρευση βιοδραστικών ενώσεων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως οι κλιματικές συνθήκες, η ποικιλία, το μέρος του φυτού, η τεχνική εκχύλισης και πολλοί άλλοι (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη, το δενδρολίβανο είναι ένα μοναδικό μπαχαρικό που διατίθεται στο εμπόριο για χρήση ως αντιοξειδωτικό (Cuvelier, Richard and Berset, 1996). Τα εκχυλίσματα δενδρολίβανου έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ασθενειών, λόγω του ηπατοπροστατευτικού του δυναμικού, του θεραπευτικού δυναμικού για τη νόσο του Αλτσχάμερ και της αντιαγγειογενετικής του δράσης (Raškonić *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, παρέχει πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, βιταμίνες και μέταλλα που είναι γνωστό ότι έχουν ιδιότητες πρόληψης ασθενειών (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). Αυτές τις φαρμακευτικές ιδιότητες το δενδρολίβανο τις οφείλει στην παρουσία πλήθους φαινολικών και флаβονοειδών ενώσεων στην σύνθεσή του (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

Από την άλλη πλευρά, έχουν χρησιμοποιηθεί στη συντήρηση τροφίμων, επειδή εμποδίζουν την οξείδωση και τη μικροβιακή μόλυνση. Ως εκ τούτου, το εκχύλισμα δεντρολίβανου θα μπορούσε να είναι χρήσιμο για την αντικατάσταση ή ακόμη και τη μείωση των συνθετικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα. Ως συντηρητικά, τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου προσφέρουν αρκετά τεχνολογικά πλεονεκτήματα και οφέλη στους καταναλωτές (Nieto *et al.*, 2010). Αυτά θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν με το δεντρολίβανο να προστίθεται απευθείας στα τρόφιμα ή να ενσωματώνεται σε συσκευασίες τροφίμων, λειτουργώντας ως αντιμικροβιακός και αντιοξειδωτικός παράγοντας (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). Σήμερα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, εκχυλίσματα δεντρολίβανου προστίθενται σε τρόφιμα και ποτά σε επίπεδα έως και 400 mg/kg (Nieto, Ros and Castillo, 2018).



Εικόνα 2.16 Rosmarinus officinalis, L.

2.5.4 *Origanum majorana*

Το *Origanum majorana* L. (ματζουράνα), που ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae (Labiatae) και έχει φαρμακευτικές αξίες, είναι συχνά γνωστό ως «γλυκιά μαντζουράνα». Είναι ένα θαμνώδες και πολυετές βότανο του γένους *Origanum*, ιθαγενές της Νότιας Ευρώπης και της Μεσογείου (Jin Jun *et al.*, 2001). Η ματζουράνα έχει αναφερθεί ότι διαθέτει πολύ καλή αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση έναντι διαφορετικών παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι έχει αντισπασμωδικές, πεπτικές, αποχρεμπτικές και διουρητικές ιδιότητες. Είναι, ακόμη, αποτελεσματικό για τη θεραπεία του άσθματος και του βήχα και χρησιμοποιείται ευρέως στη γαστρονομία και τη φυσική ιατρική. Επιπρόσθετα, τα αιθέρια έλαια της *O. majorana* έχουν μεγάλες δυνατότητες στις βιομηχανίες καλλυντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, αρωμάτων, τροφίμων και αρωμάτων. Ενώ, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για πόνο,

γαστρεντερικά προβλήματα και διαταραχές της αναπνευστικής οδού. Η αντιπαρασιτική και προνυμφοκτόνος δράση της μαντζουράνας έχουν επίσης αναφερθεί σε αρκετές μελέτες. Επιπλέον, η *majorana* αναφέρθηκε ότι παρουσιάζει αντιδιαβητική δράση, προστατευτικές επιδράσεις νεφροτοξικότητας, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιπυρετικές δραστηριότητες (Paudel *et al.*, 2022).

Για χρήσεις τροφίμων, η μαντζουράνα χρησιμοποιείται για να αρωματίσει λουκάνικα, κρέατα, σαλάτες και σούπες. Παραδοσιακά, χρησιμοποιείται ως λαϊκό φάρμακο κατά του άσθματος, της δυσπεψίας, του πονοκεφάλου και των ρευματισμών. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τις βιολογικά ενεργές ενώσεις της μαντζουράνας ως φαρμακευτικού φυτού, εκτός από το αιθέριο έλαιό της (Jin Jun *et al.*, 2001).

Ωστόσο, η μαντζουράνα έχει πολλές προοπτικές στην βιομηχανία τροφίμων να λειτπυργήσει ως συντηρητικό προϊόντων με αντιμικροβιακό παράγοντα (Busatta *et al.*, 2008). Σε μελέτες έχει επιβεβαιωθεί ο αντιμικροβιακός της χαρακτήρας απέναντι σε παθογόνα που συνδέονται πολύ συχνά με την αλλοίωση τροφίμων αλλά και με σοβαρές τροφικές δηλητηριάσεις όπως τα βακτήρια *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* καθώς και ο μύκητας *Aspergillus niger* (Deans and Svoboda, 1990; Choi and Rhim, 2008).

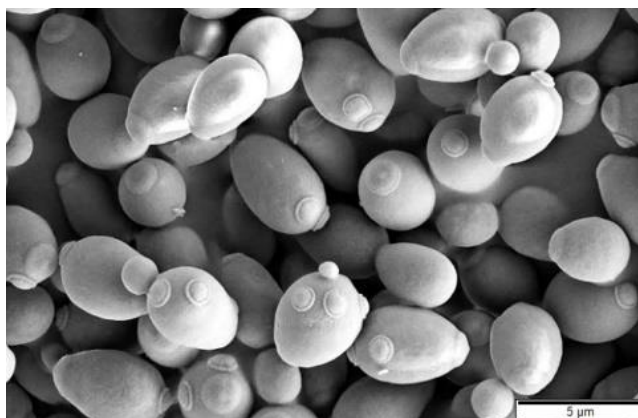


Εικόνα 2.17 *Origanum majorana*

3 Μέθοδοι & Υλικά

3.1 Επιλεγμένες ζύμες

Οι αποξηραμένες ζύμες του εμπορίου χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα με βάση τα κύτταρα για τον έλεγχο της αντιμυκητιακής δράσης διαφόρων εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη *S. cerevisiae*: (α) μια μαγιά κρασιού - ταχείας ζύμωσης κλασική μαγιά 8 Turbo (παραγωγός: Still Spirits, Νέα Ζηλανδία), η οποία είναι μαγιά αλκοόλης υψηλής περιεκτικότητας για παραγωγή κρασιού. (β) μαγιά μπύρας - M15 Empire Ale μαγιά, μαγιά μπύρας με κορυφαία ζύμωση, κατάλληλη για μια ποικιλία από μπύρες με πλήρες σώμα (παραγωγός: Mangrove Jack's, Νέα Ζηλανδία). και (γ) μια μαγιά αρτοποιίας - μια στιγμιαία αποξηραμένη μαγιά για αρτοποιεία (Alimentaria, Ελλάδα).



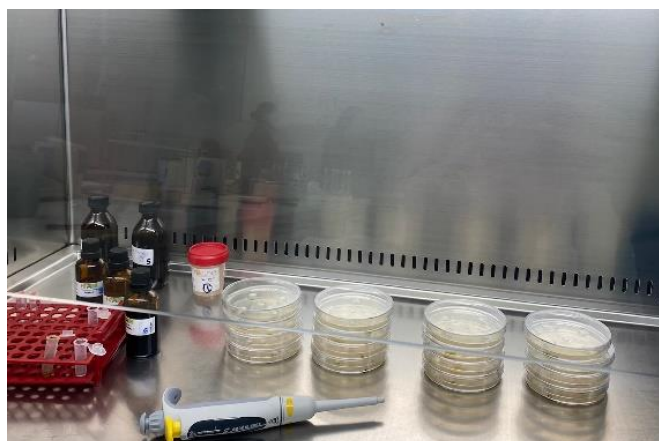
Εικόνα 3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

3.2 Φυσικά Εκχυλίσματα Ελεγχμένα ως Αντιμικροβιακά Μέσα

Όλα τα εκχυλίσματα είναι βιολογικά πιστοποιημένα από 100% ελληνικά φυτά που παράγονται από ντόπιους αγρότες. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα είναι: (α) Εκχύλισμα *H. perforatum* που περιέχει το μη πολικό κλάσμα συστατικών από οργανικά άνθη και φύλλα *H. perforatum* (10% w/w) σε φορέα καπρυλικού/καπρικού τριγλυκεριδίου 90% και 0,2% σορβικό οξύ, (β) εκχύλισμα ρητίνης μαστίχας που περιέχει το μη πολικό κλάσμα συστατικών από το *P. lentiscus var. Chia* (20% w/w) σε φορέα καπρυλικού/καπρικού τριγλυκεριδίου 80% w / w και (γ) εκχύλισμα δεντρολίβανου που περιέχει φύλλα *R. officinalis* (6% w/w) σε σπόρους ηλίανθου (*Helianthus annuus*) 94% λάδι ως φορέας, (δ) εκχύλισμα *origanum majorana*. Τα εκχυλίσματα παρήχθησαν και παρασχέθηκαν ευγενικά από την εταιρεία Natural Food Additives, Αθήνα, Ελλάδα.

3.3 Μέθοδος διάχυσης δίσκου άγαρ

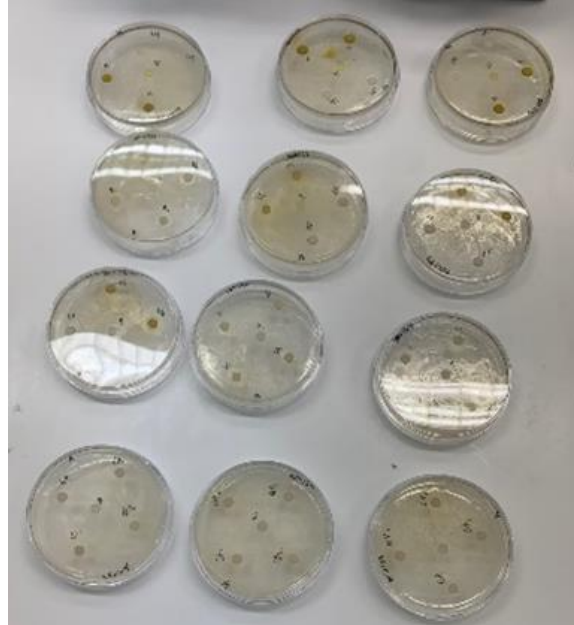
Η μέθοδος διάχυσης δίσκου χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης των φυσικών εκχυλισμάτων έναντι των ζυμομυκήτων. Ένα εναιώρημα της εξεταζόμενης ζύμης (σε αποστειρωμένο ρυθμισμένο με φωσφορικό νερό ΑΡΗΑ) που περιέχει περίπου 10^6 cfu/mL παρασκευάστηκε από μια ολονύκτια καλλιέργεια στη στατική φάση. Ένας όγκος 100 μ L από αυτό το εναιώρημα απλώθηκε στην επιφάνεια των πλακών άγαρ εκχυλίσματος μαγιάς γλυκόζης χλωραμφενικόλης (Biolife, Μιλάνο, Ιταλία). Κενοί αποστειρωμένοι χάρτινοι δίσκοι (HiMedia) διαμέτρου 6mm τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των εμβολιασμένων τρυβλίων άγαρ και εμποτίστηκαν με 50 μ L από κάθε φυσικό εκχύλισμα.



Εικόνα 3.2 Προετοιμασία τρυβλίων άγαρ για την μέθοδο διάχυσης δισκίων

Με την ίδια μέθοδο δοκιμάστηκε και η αντιμυκητιακή δράση 6 φαρμακευτικών ενώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν έτοιμοι προς χρήση δίσκοι εμποτισμένοι με τη συγκεκριμένη αντιμυκητιακή ένωση (HiMedia, Modautal, Γερμανία): κλοτριμαζόλη (10 μ g), φλουκοναζόλη (25 μ g), ιτρακοναζόλη (10 μ g), κετοκοναζόλη (10 μ g), νυστατίνη (100 μονάδες), αμφοτερικίνη Β (100 μονάδες). Οι πλάκες στη συνέχεια επώαστηκαν για 48 ώρες στους 37°C. Η θερμοκρασία επώασης στους 37 °C επιλέχθηκε ως παράγοντας που επάγει πιθανά παθογόνα χαρακτηριστικά των στελεχών *S. cerevisiae*, σύμφωνα με την ανασκόπηση των Ahoor *et al.*, (2015). Η διάμετρος των ζωνών αναστολής (συμπεριλαμβανομένης της διαμέτρου του χάρτινου δίσκου) μετρήθηκε χρησιμοποιώντας παχύμετρα και εκφράστηκε σε χιλιοστά. Η προετοιμασία των τρυβλίων Petri πραγματοποιήθηκε

εντός της Καμπίνας Βιοασφάλειας Τάξης II του εργαστηρίου για να διασφαλιστούν συνθήκες αποστείρωσης. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.



Εικόνα 3.3 Τρυβλία άγαρ προς επώαση



Εικόνα 3.4 Δίσκοι φαρμακευτικών αντιμυκητιακών ενώσεων

3.4 Μέθοδος Spot Assay

Οι προσδιορισμοί κηλίδων χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική αξιολόγηση της ανάπτυξης και της επιβίωσης των κυττάρων ζυμομύκητα. Ο προσδιορισμός κηλίδας εκτελέστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Petropavlovskiy *et al.*, (2020) με ορισμένες τροποποιήσεις. Αυτή η μέθοδος ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί την ανάπτυξη ζυμομυκήτων σε πλάκες άγαρ λαμβάνοντας εικόνες των αποικιών ζυμομυκήτων καθώς μεγαλώνουν και εφαρμόζοντας ανάλυση εικόνας για τη μέτρηση της γκρι τιμής των κηλίδων. Οι ζυμομύκητες αναπτύχθηκαν στους 37°C όλη τη νύχτα σε ζωμό Brain Heart Infusion (BHI, Condalab, Madrid, Ισπανία) που περιείχε 20g/L δεξτρόζη, και το εμβόλιο 200μL OD₆₀₀ 0,5 τοποθετήθηκε στη σειρά Α μιας πλάκας 96 φρεατίων. Πραγματοποιήθηκαν δύο σειριακές αραιώσεις 1:5 στις σειρές Β και Γ προσθέτοντας 30 μL από τη σειρά Α σε 120μL ddH₂O στη σειρά Β και στη συνέχεια προσθέτοντας 30 μL από τη σειρά Β σε 120μL ddH₂O στη σειρά Γ. Στη συνέχεια, σε όλες τις σειρές προστέθηκαν 50 μL από τα φυσικά εκχυλίσματα και τα έλαια μεταφοράς. Όλα τα δείγματα προστέθηκαν εις τριπλούν. Ίσοι όγκοι (10μL) από κάθε φρεάτιο μεταφέρθηκαν στην επιφάνεια μιας πλάκας άγαρ (άγαρ Brain Heart Infusion (BHI, Condalab) που περιείχε και 20g/L δεξτρόζης) σε ίσες αποστάσεις για να σχηματιστούν ορατές κηλίδες μετά την επώαση. Οι πλάκες επώαστηκαν για 48 ώρες στους 37°C και οι εικόνες λήφθηκαν με κινητό τηλέφωνο. Η τρίτη αραιώση (25×) μετά την επώαση στις 24 ώρες επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη για ανάλυση εικόνας.

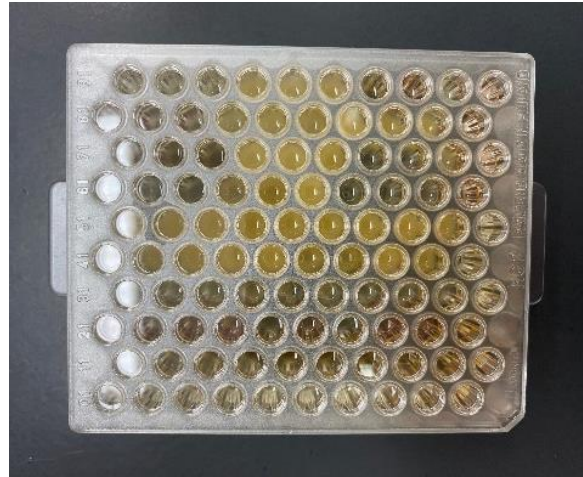


Εικόνα 3.5 Θάλαμος βιολογικής ασφαλείας

Η προεπεξεργασία των εικόνων υλοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό GIMP 2.99.16 για να αφαιρεθούν τυχόν στοιχεία που θα μπορούσαν να προκαλέσουν σύγχυση στην ανάλυση, όπως διάφορες αντανάκλασεις φωτός στο φόντο, και για να απομονωθεί κάθε σημείο ζύμης. Το λογισμικό MATLAB (Matlab R2022b) χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση εικόνας, πρώτα με διαχωρισμό των κηλίδων (περιοχές καλλιέργειας ζύμης) από το φόντο χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο κατωφλίου για εστίαση μόνο στις κηλίδες ζύμης που θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση και για επιλογή περιοχών ενδιαφέροντος ίσης διαμέτρου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση εικόνας των κηλίδων ζύμης με μέτρηση της κατανομής των τιμών του επιπέδου του γκρι (τιμές της έντασης του γκρι επιπέδου που κυμαίνονται από 0, που αντιστοιχεί στο μαύρο, έως 255, που αντιστοιχεί στο λευκό) των κηλίδων και υπολογίζοντας τις μέσες τιμές του επιπέδου του γκρι.

3.5 Ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης

Οι καμπύλες ανάπτυξης των ζυμομυκήτων δημιουργήθηκαν με αυτόματη θολερότητα χρησιμοποιώντας ένα όργανο Bioscreen C (Lab systems Helsinki, Vantaa, Finland) σε κυψελωτές πλάκες 100 φρεατίων. Τα στελέχη ζυμομύκητα επώαστηκαν στους 37°C όλη τη νύχτα σε ζωμό Brain Heart Infusion (BHI, Condalab) που περιείχε 20g/L δεξτρόζης. Μετά από στροβιλισμό, δείγματα 100 μ L εμβολίου προστέθηκαν σε 9mL αποστειρωμένο νερό APHA με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για να ληφθεί θολότητα 0,5 προτύπου McFarland. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στις πλάκες προσθέτοντας 50 μ L του μικροοργανισμού, 50 μ L ελεγμένου φυσικού εκχυλίσματος και 200 μ L ζωμού (Brain Heart Infusion, BHI + 20g/L δεξτρόζης) σε συνολικό όγκο 300 μ L. Η προετοιμασία των πλακών πραγματοποιήθηκε εντός της Καμπίνας Βιοασφάλειας Τάξης II. Η οπτική πυκνότητα (OD) των φρεατίων μετρήθηκε στα 600nm κάθε 30 λεπτά για 48 ώρες στους 37°C και στους 30°C. Πριν από κάθε μέτρηση, τα φρεάτια ανακινούνταν αυτόματα για 10 δευτερόλεπτα. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.



Εικόνα 3.6 Συμπληρωμένη πλάκα Bioscreen προς μέτρηση

Μετά την επώαση, τα δεδομένα εξήχθησαν στο Excel και κατασκευάστηκαν αντίστοιχα γραφήματα οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου για κάθε δείγμα. Αυτά τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών υπό τις καθορισμένες συνθήκες. Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το εργαλείο ComBase (<https://www.combase.cc/index.php/en/>, πρόσβαση στις 3 Δεκεμβρίου 2023) DMFit για Excel, το οποίο είναι ένα πρόσθετο του Excel που προσαρμόζει μια πρωτογενή καμπύλη σε δεδομένα log CFU ή OD μετρήσεων συναρτήσει του χρόνου και εκτιμά μικροβιακές κινητικές παραμέτρους, όπως ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) και ο χρόνος υστέρησης της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Αντιμικροβιακή δράση παρατηρείται εάν παρουσία του αντιμικροβιακού παράγοντα παρατηρείται παρατεταμένη φάση υστέρησης και χαμηλότερος ρυθμός ανάπτυξης κατά τη λογαριθμική φάση.



Εικόνα 3.7 Bioscreen C (Lab systems Helsinki, Vantaa, Finland)

Μετά την επώαση της πλάκας στους 37°C για 24 ώρες πραγματοποιήθηκαν οι εξής αραιώσεις: λαμβάνοντας 100μL από κάθε φρεάτιο που περιείχε το ίδιο δείγμα, προσθέτονταν σε 1,8 mL αραιωτικού. Στη συνέχεια, από αυτο το το διάλυμα λαμβάνοταν 1 mL και προσθέτοταν σε 9 mL αραιωτικού. Αυτη η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι να αποκτήσουμε αραιωση 10⁻⁵. Ύστερα, από κάθε αραιωση έγινε επίστρωση σε δύο τριβλία χρησιμοποιώντας 1 mL δείγματος για το καθένα. Τα τριβλία είχαν ως υπόστρωμα PCA (Plate Count Agar). Η συνολική διαδικασία πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα της πλάκας.

Στη συνέχεια, αυτά τα τριβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 48 ώρες. Αφού παρατηρήθηκαν διακριτές αποικίες ζυμών χρησιμοποιώντας το εργαλείο “Plate counter” μετρήθηκαν οι αποικίες σε κάθε τριβλίο.



Εικόνα 3.8 Plate counter

3.6 Στατιστική ανάλυση

Για όλες τις αναλύσεις, διεξήχθησαν τρία ανεξάρτητα πειράματα ακολουθούμενα από μετρήσεις εις τριπλούν για τον υπολογισμό των μέσων τιμών και της τυπικής απόκλισης (SD). Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων βασίστηκε σε μονόδρομη ANOVA (ANOVA) ακολουθούμενη από δοκιμές Duncan post hoc ($p < 0,05$). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) (Letsiou *et al.*, 2024).

4 Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η αντιμυκητιακή ικανότητα διαφόρων φυσικών εκχυλισμάτων με τρεις τρόπους: (1) μέθοδος διάχυσης δίσκου άγαρ, (2) μέθοδος spot assay και (3) ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης.

4.1 Μέθοδος διάχυσης δίσκου άγαρ

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μια κλασική μικροβιολογική μέθοδο για τον έλεγχο φαρμακευτικών αντιμικροβιακών παραγόντων όπως αντιβιοτικά και αντιμυκητιακά (Balouiri, Sadiki and Ibnsouda, 2016). . Σε αυτή τη μέθοδο, ο αντιμικροβιακός παράγοντας, ο οποίος τοποθετείται σε δίσκο στην επιφάνεια ενός εμβολιασμένου άγαρ, διαχέεται στο άγαρ και αναστέλλει την ανάπτυξη του εξεταζόμενου μικροοργανισμού. Η αναστολή δημιουργεί μια καθαρή ζώνη γύρω από τους εμποτισμένους δίσκους, η οποία αντιπροσωπεύει περιοχές «χωρίς ανάπτυξη» και η διάμετρος των ζωνών ανάπτυξης αναστολής είναι ένδειξη της ευαισθησίας του μικροοργανισμού στον συγκεκριμένο αντιμικροβιακό παράγοντα. Αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ζώνη αναστολής, τόσο μεγαλύτερη ευαισθησία του μικροοργανισμού στον παράγοντα.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι ζώνες αναστολής που δημιουργήθηκαν στις τρεις χρησιμοποιούμενες ζύμες τόσο από τα φυσικά εκχυλίσματα όσο και από τους φαρμακευτικούς αντιμυκητιακούς παράγοντες.

Πίνακας 4.1 Ζώνες αναστολής				
	Ποσότητα	Ζώνη αναστολής (mm)		
Φυσικά εκχυλίσματα		Wine Yeast	Beer Yeast	Baker's Yeast
<i>Hypericum perforatum</i>	20μL	0	0	0
Liquid mastic (<i>Pistacia lentiscus</i> var. Chia)	20μL	8	0	0
Rosemary (<i>Rosemarinus officinalis</i>)	20μL	9,5	15,5	19,2
<i>Origanum majorana</i>	20μL	0	0	0
Φαρμακευτικά αντιμυκητιακά				
Clotrimazole	10 μg	0	0	28
Fluconazole	25 μg	0	0	15
Itraconazole	10 μg	20	0	0
Ketoconazole	10 μg	0	28	0
Nystatin	100 units	29	32	35
Amphotericin B	100 units	25	22	30

Από τον πίνακα 4.1 προκύπτει ότι τα φυσικά εκχυλίσματα εμφάνισαν αμελητέες ζώνες αναστολής (<10 mm) ή καθόλου ζώνες αναστολής (6 mm), εκτός από το εκχύλισμα δεντρολίβανου, το οποίο έδειξε ζώνη αναστολής (>10 mm) υψηλότερη από αυτή της φλουκοναζόλης στην περίπτωση της μαγιάς μπύρας. Είναι γεγονός ότι μελέτες έχουν αποδείξει την αντιμικροβιακή δράση του δεντρολίβανου (Veenstra and Johnson, 2021).

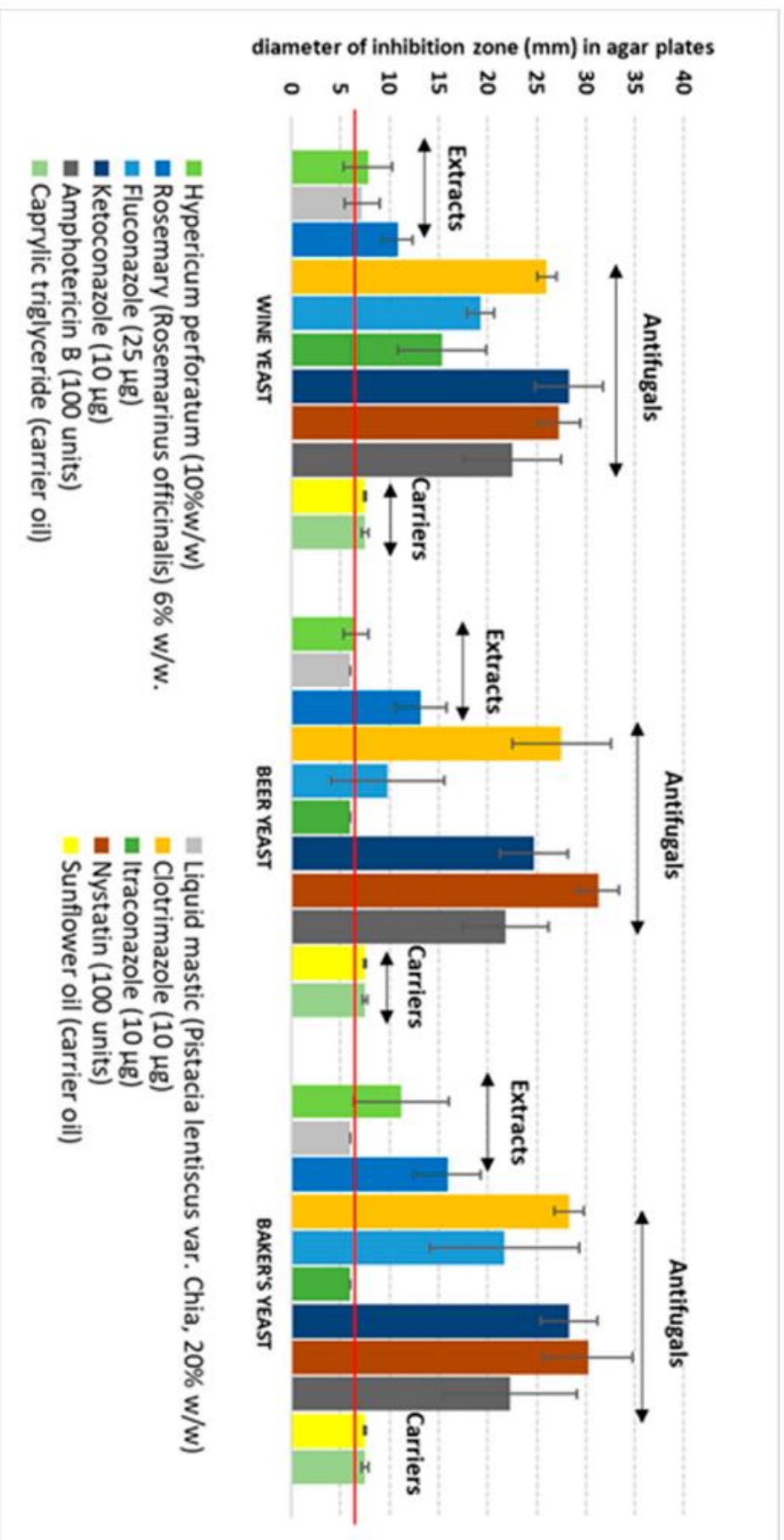
Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν το δεντρολίβανο ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως φυσικό συντηρητικό τροφίμων. Η ΕΕ ενέκρινε το εκχύλισμα δεντρολίβανου ως συντηρητικό τροφίμων μετά από εκτενείς μελέτες τοξικότητας και προσδιορίζοντας ότι το εύρος των παρατηρούμενων επιπέδων αρνητικών επιπτώσεων (NOAEL) ήταν αρκετά ευρύ ώστε να μην δημιουργηθούν ανησυχίες για την ασφάλειαν. Ωστόσο, όταν ένα εκχύλισμα ασκεί χαμηλή αναστολή ανάπτυξης μυκήτων, μπορεί να μην υπάρχουν αποτελέσματα στη μέθοδο

διάχυσης με δίσκο και θα άξιζε τον κόπο να αξιολογηθεί η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας εναλλακτικές μεθόδους (Letsiou *et al.*, 2024).

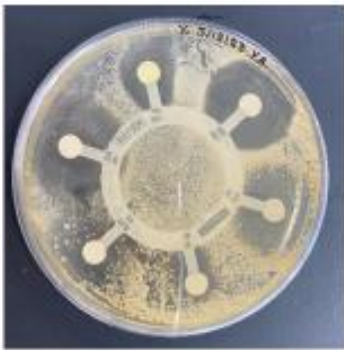
Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι τα έλαια φορείς των φυσικών εκχυλισμάτων, καπρυλικό τριγλυκερίδιο και ηλιέλαιο, δοκιμάστηκαν επίσης για αντιμυκητιακή δράση με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου άγαρ και έδειξαν αμελητέα ανασταλτική δράση (<10 mm), αν και υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν αντιμυκητιακή δράση του καπρυλικού οξέος (Letsiou *et al.*, 2024). Γεγονός που επιβεβαιώνει την ανάγκη μελέτης με διαφορετικές μεθόδους.

Σύμφωνα με τον πίνακα 4.1, όσον αφορά τα φαρμακευτικά αντιμυκητιακά παρατηρήθηκε ότι τα τρία στελέχη του ίδιου είδους *S. cerevisiae* έδειξαν διαφορετική ευαισθησία στα διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα. Και τα τρία στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία στην αμφοτερικίνη Β, τη νυστατίνη, την κετοκοναζόλη και την κλοτριμαζόλη, που άσκησαν σαφώς μυκητοκτόνο δράση (διάμετρος ζώνης αναστολής > 20 mm). Ωστόσο, τα στελέχη μύρας και αρτοποιίας *S. cerevisiae* παρουσίασαν αντοχή στην ιτρακοναζόλη (χωρίς ζώνη αναστολής) και το στέλεχος μύρας είχε χαμηλή ευαισθησία στη φλουκοναζόλη (διάμετρος ζώνης αναστολής < 14 mm), ενώσεις που αποτελούν γνωστούς φαρμακευτικούς παράγοντες, που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μυκητιακών ασθενειών.

Είναι γνωστό ότι οι βιομηχανικές ζύμες έχουν προσαρμοστεί για να ανέχονται διάφορες περιβαλλοντικές πιέσεις όπως υψηλή οσμωτική πίεση, οξειδωτικό στρες, αλλαγές θερμοκρασίας, καθώς και χημικές ενώσεις. για παράδειγμα, οι ζύμες κρασιού έχουν προσαρμοστεί σε θειώδεις ενώσεις και φυτοφάρμακα με βάση τον χαλκό που χρησιμοποιούνται στα οινοποιεία. Είναι πιθανό ότι οι καλά προσαρμοσμένες βιομηχανικές ζύμες που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την εργασία έχουν μηχανισμούς αντοχής που τους επιτρέπουν να ευδοκούν παρουσία συγκεκριμένων φαρμακευτικών αζολών. Η χαμηλή ευαισθησία του *S. cerevisiae* σε ορισμένες αζόλες έχει ήδη τεκμηριωθεί, και παρόλο που η ζύμη θεωρείται GRAS (γενικά αναγνωρίζεται ως ασφαλής), υπήρξαν περιπτώσεις στις οποίες έχει προκαλέσει διεισδυτική μόλυνση (Letsiou *et al.*, 2024).



Εικόνα 4.1 Αντιμυκητιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων (*Hypericum* (*H. perforatum*), 10% w / w, υγρό εκχύλισμα μαστίχας (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*, 20% w / w), και δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*, 6% w / w)) και διάφορες φαρμακευτικές ενώσεις που εκφράζονται σε μη ζωνών αναστολής στη μέθοδο διάχυσης με δίσκο άγαρ. Η μηδενική αναστολή θεωρείται όταν η διάμετρος είναι 6 mm (η διάμετρος του δίσκου, υποδεικνύεται με μια κόκκινη γραμμή). Οι μέσες τιμές και η SD συγκρίθηκαν με την ANOVA ακολουθούμενη από τη δοκιμή Duncan post hoc (Letisou et al., 2024).



Εικόνα 4.2 Αναστολή της ανάπτυξης με δίσκο άγαρ διάχυση της μαγιάς κρασιού, χρησιμοποιώντας φαρμακευτικά αντιμυκητιασικά φάρμακα κλοτριμαζόλη (10μg), φλουκοναζόλη (25μg), ιτρακοναζόλη (10μg), Κετοκοναζόλη (10μg), Νυστατίνη (100 μονάδες), Αμφοτερικίνη Β (100 μονάδες).



Εικόνα 4.3 Αναστολή της ανάπτυξης με δίσκο άγαρ διάχυση της μαγιάς μύρας, χρησιμοποιώντας φαρμακευτικά αντιμυκητιασικά φάρμακα κλοτριμαζόλη (10μg), φλουκοναζόλη (25μg), ιτρακοναζόλη (10μg), Κετοκοναζόλη (10μg), Νυστατίνη (100 μονάδες), Αμφοτερικίνη Β (100 μονάδες).



Εικόνα 4.4 Αναστολή της ανάπτυξης με δίσκο άγαρ διάχυση της μαγιάς αροποιίας, χρησιμοποιώντας φαρμακευτικά αντιμυκητιασικά φάρμακα κλοτριμαζόλη (10μg), φλουκοναζόλη (25μg), ιτρακοναζόλη (10μg), Κετοκοναζόλη (10μg), Νυστατίνη (100 μονάδες), Αμφοτερικίνη Β (100 μονάδες).



Εικόνα 4.5 Αναστολή της ανάπτυξης της ζύμης αρτοποιίας χρησιμοποιώντας εκχυλισμάτων δενδρολίβανου (R) (50μL) και μαστίχας (LM) (50μL) και αμφοτερικίνης B (100 μονάδες)



Εικόνα 4.6 Αναστολή της ανάπτυξης της ζύμης μπόρας χρησιμοποιώντας εκχυλισμάτων δενδρολίβανου (R) (50μL) και μαστίχας (LM) (50μL) και αμφοτερικίνης B (100 μονάδες)

4.2 Μέθοδος spot assay

Στη μέθοδο spot assay, αποικίες ζυμομύκητα αναπτύσσονται ως κηλίδες σε πλάκες άγαρ απουσία ή παρουσία της δοκιμασμένης αντιμικροβιακής ένωσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η ευαισθησία της ζύμης προς την αντιμικροβιακή ένωση αναλύεται με βάση την πυκνότητα των κυττάρων που αναπτύσσονται σε κάθε σημείο. Η σύγκριση της αναστολής ανάπτυξης σε ένα συγκεκριμένο σημείο με και χωρίς την αντιμικροβιακή ένωση επιτρέπει την αξιολόγηση της ευαισθησίας ενός στελέχους στον συγκεκριμένο παράγοντα (Sahu *et al.*, 2023).

Σε αυτή τη δοκιμή, φωτογραφήθηκαν οι αποικίες που σχηματίστηκαν στα τρυβλία (εικόνες 4.7-4.9) και μέσω του λογισμικού GIMP 2.99.16 και MATLAB πραγματοποιήθηκε ανάλυση εικόνας, και μετρήθηκαν οι μέσες τιμές γκρίζου των αποικιών ζυμομύκητα που εμφανίστηκαν ως κηλίδες (εικόνα 4.10). Οι κηλίδες με υψηλή ανάπτυξη ζυμομύκητα αποδίδουν υψηλότερη μέση τιμή επιπέδου γκρίζου από τις κηλίδες στις οποίες η μαγιά δεν έχει αναπτυχθεί λόγω της παρουσίας ενός αντιμικροβιακού παράγοντα. Επομένως, αυτή η ανάλυση μπορεί να εκτιμήσει ποσοτικά την ικανότητα ανάπτυξης και την επιβίωση των ζυμομυκήτων με βάση την πυκνότητα των κυττάρων σε κηλίδες ίδιου μεγέθους.

Από την παρακάτω εικόνα προκύπτει ότι τα δείγματα που περιέχουν μόνο την ζύμη οινοποιίας και μπύρας παρουσιάζουν μεγαλύτερη αναπτυξιακή ικανότητα σε σχέση με τα δείγματα που περιέχουν ζύμη μαζί με φυσικό εκχύλισμα. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στην ζύμη αρτοποιίας, αλλά μόνο για το *Hypericum perforatum* και τα έλαια μεταφοράς. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι τα φυσικά εκχυλίσματα επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη της μαγιάς.

Παρόλ' αυτά, λόγω της αναστολής που προκαλούν τα έλαια φορείς, καπρυλικό οξύ και ηλιέλαιο, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι τα συστατικά των φυσικών εκχυλισμάτων είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες της αντιμυκητιακής δράσης. Ο συν-ενοφθαλμισμός των ελαίων φορέων με κύτταρα ζυμομύκητα στην επιφάνεια του άγαρ είχε ως αποτέλεσμα ήπια αναστολή της ανάπτυξης ζυμομύκητα, σε αντίθεση με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου άγαρ, στην οποία το έλαιο φορέα εμφάνισε αμελητέα αντιμυκητιακή δράση. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα έλαια δεν είχαν διαχυθεί επαρκώς από το

δίσκο στο άγαρ για να αναστείλουν την ανάπτυξη της ζύμης, ενώ στη μέθοδο spot assay τα έλαια φορείς επηρέαζαν άμεσα την ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης εξαιτίας του συννεοφθαλισμού. Τα λιπαρά οξέα μπορεί να ασκούν αντιμυκητιακή δράση κυρίως παρεμβαίνοντας στις λιπιδικές διπλές στοιβάδες των μυκητιακών μεμβρανών, και έχει αποδειχθεί ότι το παράγωγο εστέρα καπρυλικού οξέος έχει ισχυρές διασπαστικές δράσεις της μεμβράνης έναντι του *C. albicans* και του *M. furfur* (Letsiou *et al.*, 2024).



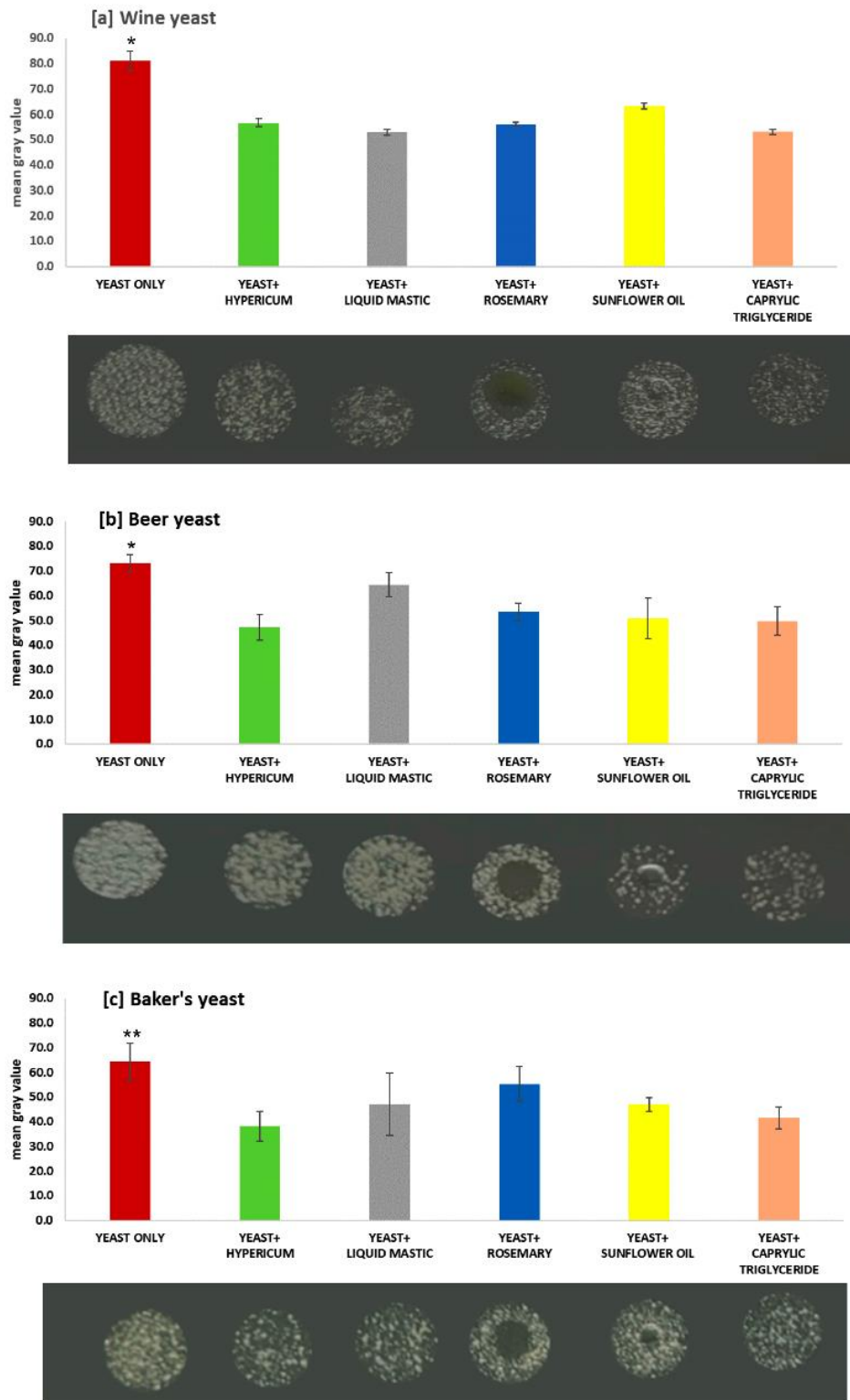
Εικόνα 4.7 Spot assay- Beer yeast



Εικόνα 4.8 Spot assay- Wine yeast



Εικόνα 4.9 Spot assay- Baker's yeast



Εικόνα 4.10 Δοκιμές spot assay για τα τρία στελέχη *S. cerevisiae* που μελετήθηκαν. Η τρίτη αραιώση (1:25) των κηλίδων σε 24 ώρες επώασης χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση εικόνας. Οι μέσες τιμές του γκρι παρουσιάζονται στα γραφήματα ράβδων. Οι μέσες τιμές και η SD συγκρίθηκαν με την ANOVA ακολουθούμενη από τη δοκιμή Duncan post hoc. * Δηλώνει σημαντικά υψηλότερη ($p < 0,05$) από όλες τις άλλες καταστάσεις σε μοντέλα κυττάρων ζύμης (ζύμες κρασιού και μπύρας). ** Δηλώνει σημαντικά υψηλότερο ($p < 0,05$) από το "μαγιά + Hypericum" (μαγιά αρτοποιίας) και τα λάδια μεταφοράς (Letsiou et al., 2024).

4.3 Ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης

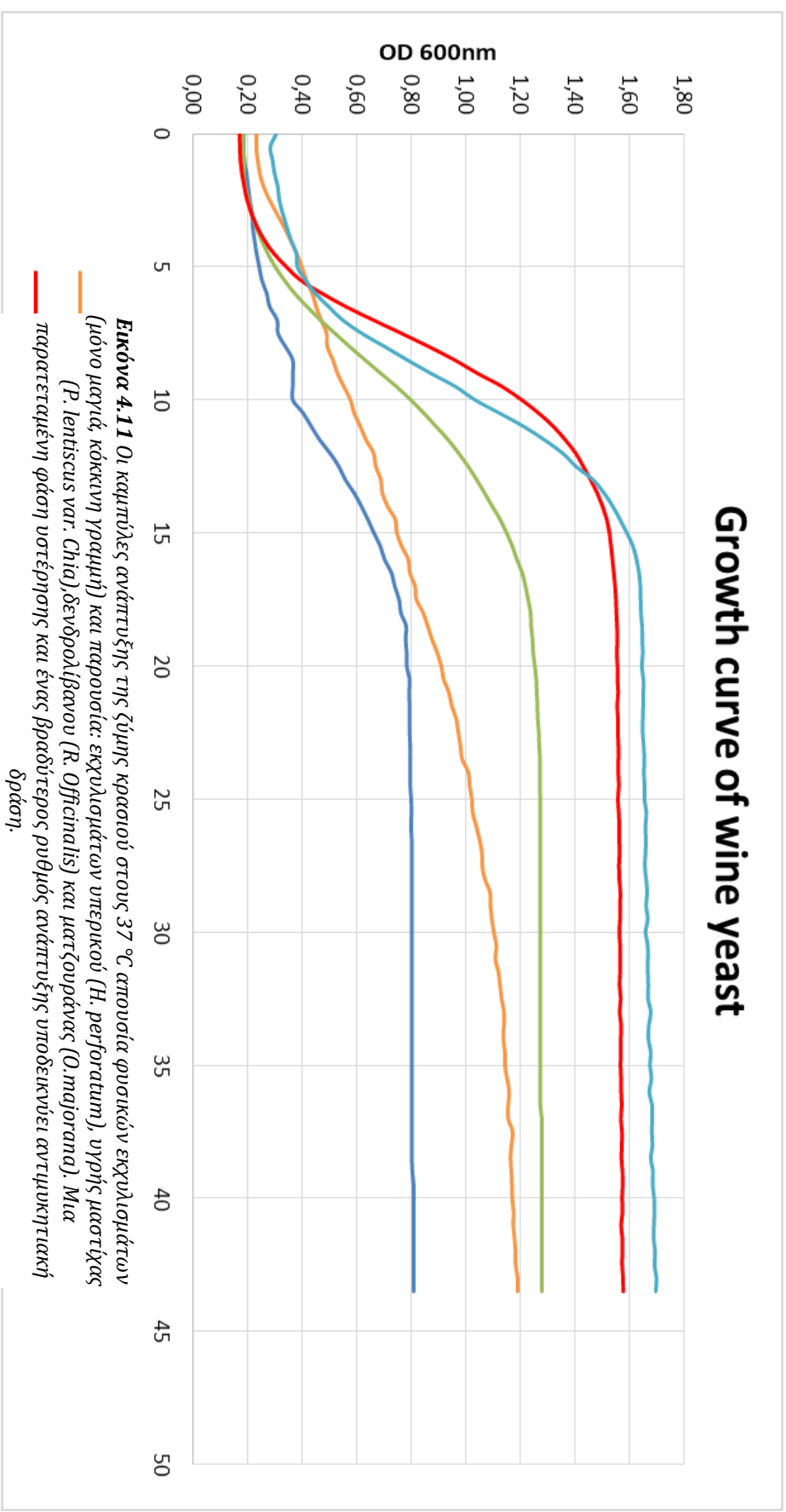
Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού συνήθως αναπαρίσταται γραφικά από μια σιγμοειδή καμπύλη ανάπτυξης που έχει τρεις χαρακτηριστικές φάσεις: τη φάση υστέρησης (λ) κατά την οποία δεν εμφανίζεται ανάπτυξη, τη λογαριθμική (\log) φάση που είναι μια φάση ταχείας ανάπτυξης στην οποία ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) του μικροοργανισμού παρατηρείται και η στατική φάση που επιτυγχάνεται όταν τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται (De Silvestri *et al.*, 2018). Κατά τη διάρκεια της βέλτιστης μικροβιακής ανάπτυξης, παρατηρείται μια σύντομη φάση καθυστέρησης και ένας υψηλός μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης. Ωστόσο, οποιοσδήποτε παράγοντας που μπορεί να στρεσάρει τον μικροοργανισμό και να θέσει σε κίνδυνο τη βιωσιμότητά του (π.χ. διακύμανση θερμοκρασίας, οσμωτική πίεση, αντιδρώντα είδη οξυγόνου (ROS), αντιμικροβιακά μέσα, κ.λπ.) δημιουργεί μια μετατόπιση από τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης (Tonner *et al.*, 2017). Αυτό συνήθως παρατηρείται από μια μεγαλύτερη φάση καθυστέρησης, έναν πιο αργό μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης και ένα χαμηλότερο επίπεδο μέγιστου πληθυσμού στη στατική φάση. Μια συνηθισμένη μέθοδος για τη λήψη της καμπύλης ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού είναι η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD στα 600 nm) σε τακτά χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε 30 λεπτά) σε έναν εμβολιασμένο μικροβιακό ζωμό σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης του μικροοργανισμού (συνήθως 24–48 h) και κατασκευάζοντας μια καμπύλη οπτικής πυκνότητας έναντι του χρόνου (Rolfe *et al.*, 2012).

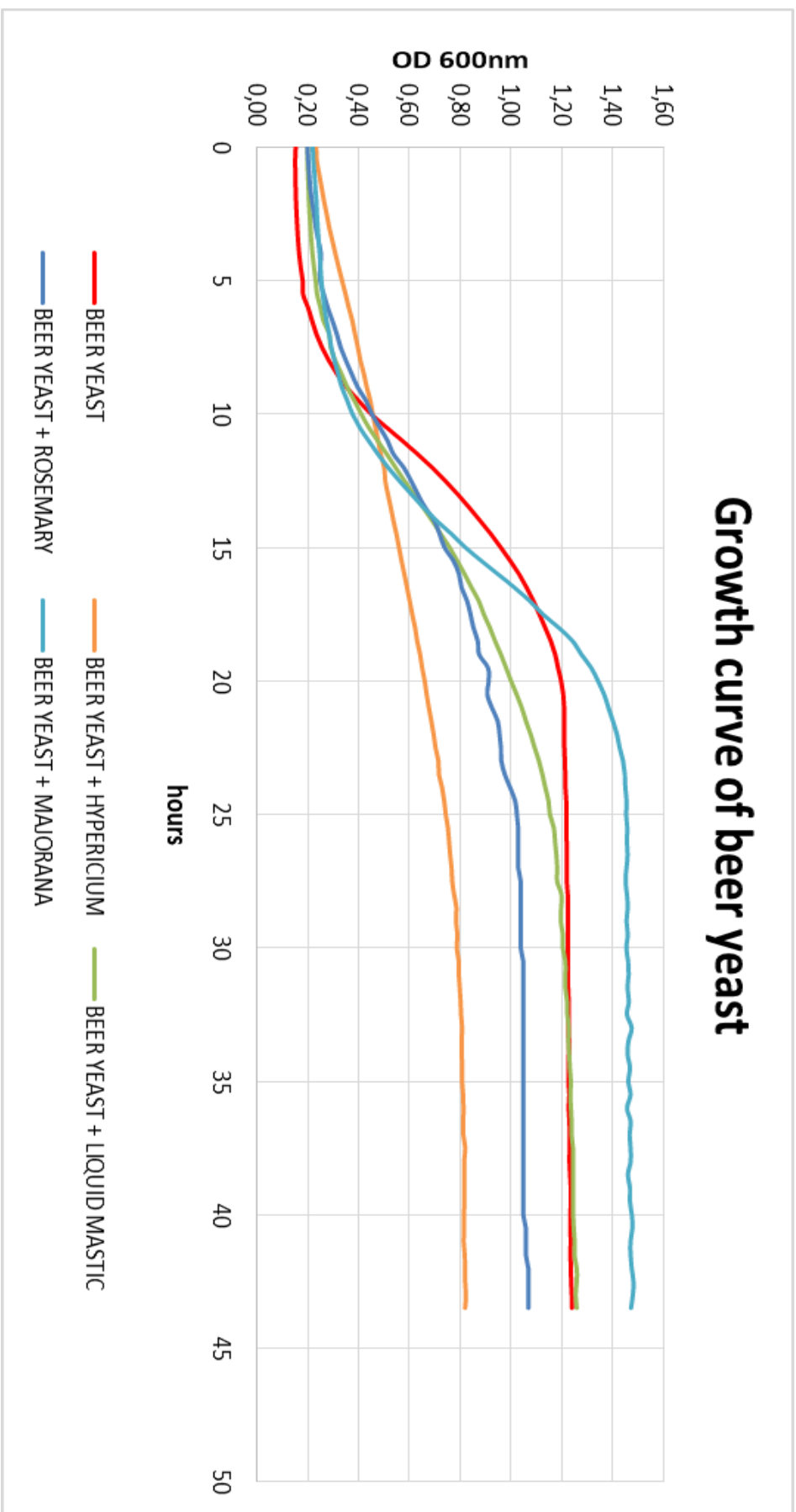
Οι καμπύλες ανάπτυξης των τριών ζυμομυκήτων μετρήθηκαν με αυτόματη θολερότητα χρησιμοποιώντας ένα όργανο Bioscreen C. Η φάση καθυστέρησης είναι ο χρόνος κατά τον οποίο τα κύτταρα ζυμομύκητα είναι βιοχημικά ενεργά αλλά εξακολουθούν να μην διαιρούνται αφού προσπαθούν να προσαρμοστούν στο νέο μέσο ανάπτυξης. Μετά τη φάση υστέρησης, τα κύτταρα αρχίζουν να διαιρούνται και εισέρχονται στη λογαριθμική φάση στην οποία παρατηρείται ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και η κλίση της καμπύλης αυξάνεται απότομα.

Στα παρακάτω σχήματα παραθέτονται τις σιγμοειδείς καμπύλες των ζυμών όταν καλλιεργούνται σε θρεπτικό ζωμό στους 37 °C απουσία φυσικού εκχυλίσματος (μόνο μαγιά) και τις καμπύλες ανάπτυξης των ζυμών παρουσία φυσικού

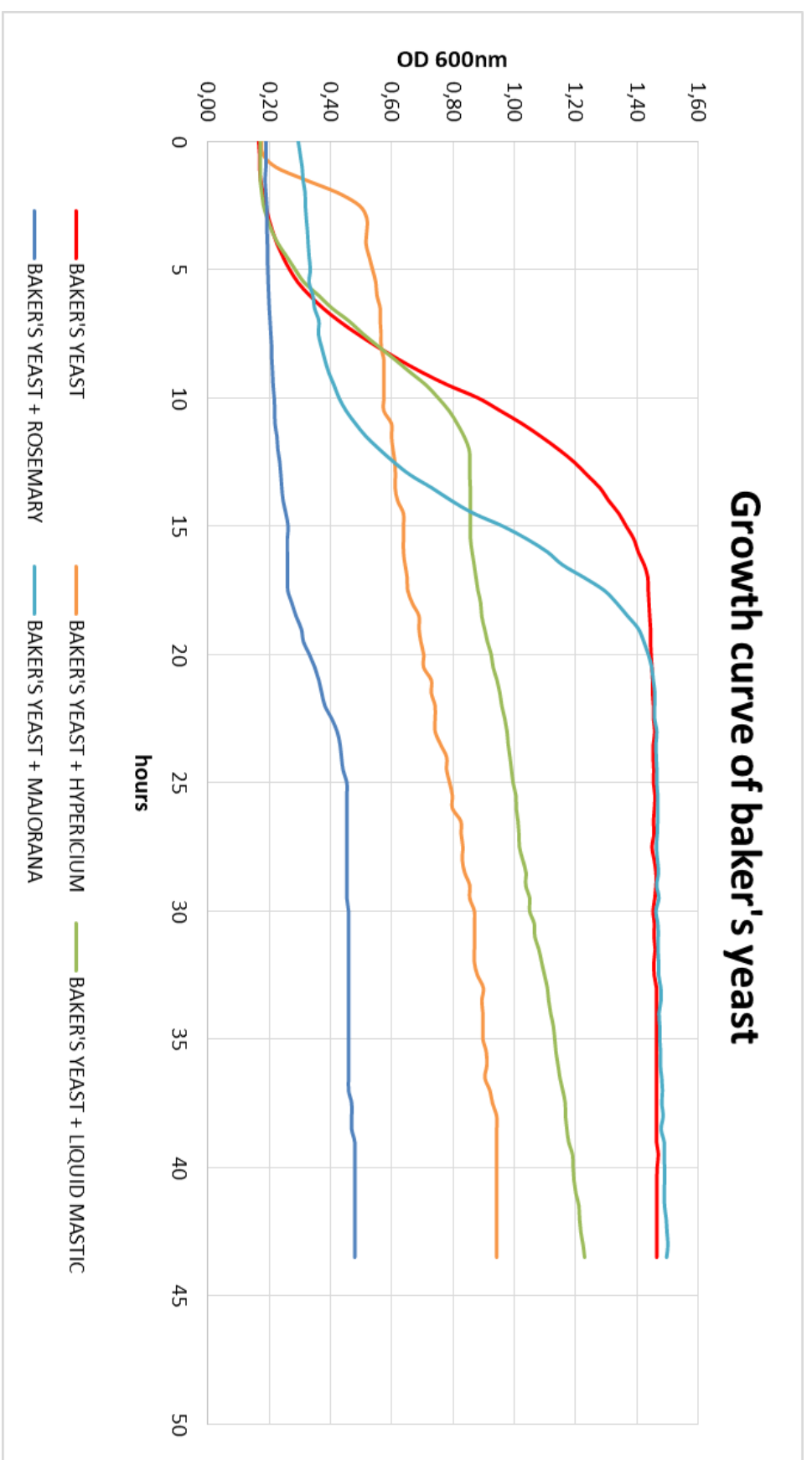
εκχυλίσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα τρία διαφορετικά μοντέλα που σχετίζονται με το στέλεχος *S. cerevisiae* είχαν διαφορετικές αποκρίσεις στον ρυθμό ανάπτυξης παρουσία των τριών εκχυλισμάτων. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός αύξησης των καμπυλών υπολογίστηκε με το εργαλείο ComBase. Στους 37 °C, οι ρυθμοί των ζυμομυκήτων που αναπτύχθηκαν παρουσία φυσικών εκχυλισμάτων βρέθηκαν να είναι σημαντικά χαμηλότεροι από εκείνους του μάρτυρα (μόνο μαγιά) ($p < 0,05$), κάτι που είναι ενδεικτικό της αντιμικροβιακής δράσης. Παράλληλα, Επιπλέον, σε αυτή τη μέθοδο, τα έλαια-φορείς των φυσικών εκχυλισμάτων, το καπρυλικό τριγλυκερίδιο και το ηλιέλαιο δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αντιμυκητιακή δράση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η αξιολόγηση της ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε σε ζυμό και όχι σε συνθήκες στατικού άγαρ (Letsiou *et al.*, 2024).

Growth curve of wine yeast



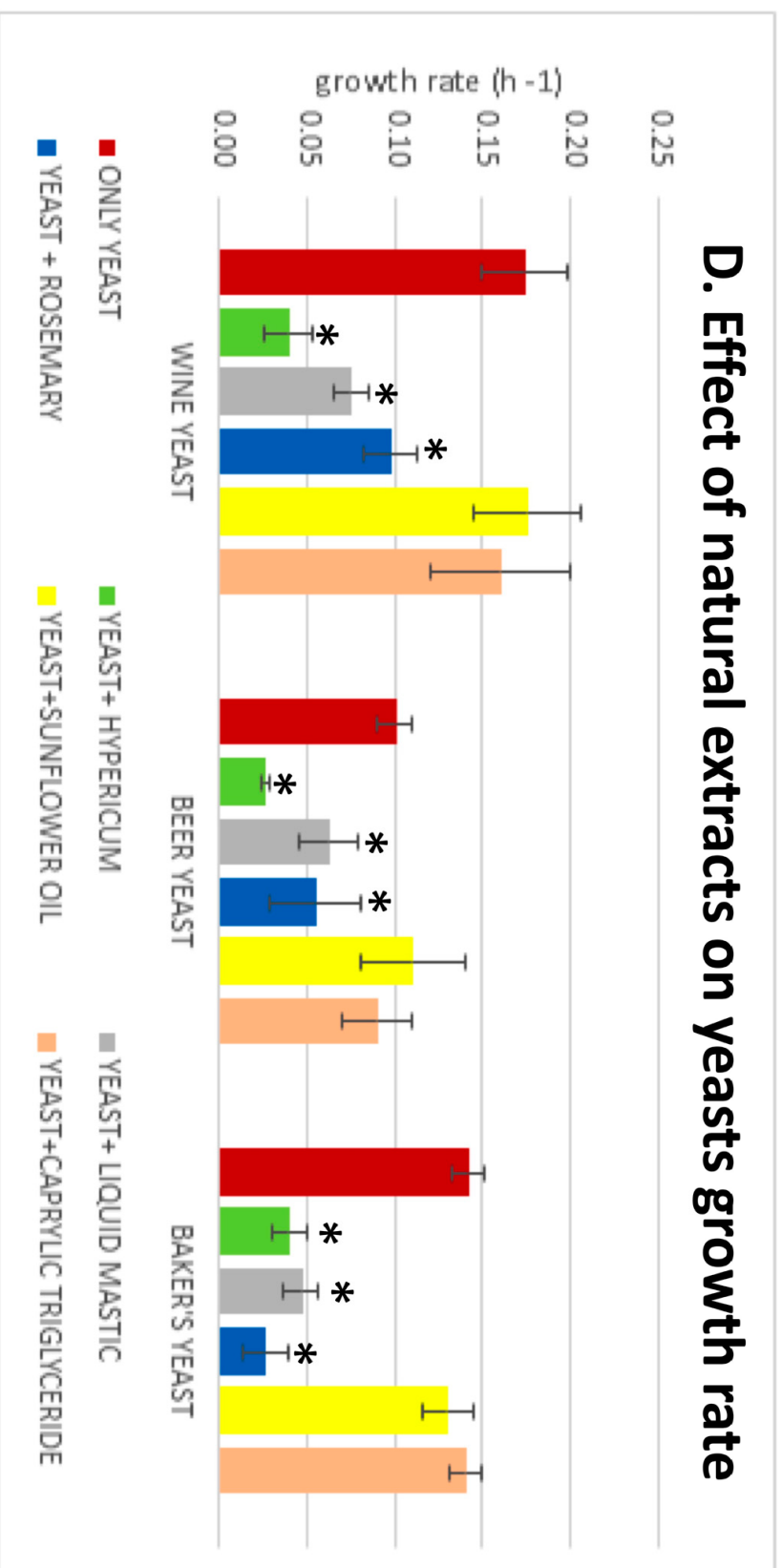


Εικόνα 4.12 Οι καμπύλες ανάπτυξης της ζύμης μπύρας στους 37 °C απουσία φυσικών εγκυλιωμάτων (μόνο μαγιά, κόκκινη γραμμή) και παρουσία: εγκυλιωμάτων υπερίκου (*H. perforatum*), γρήρης μαστίχας (*P. lentiscus* var. *Chia*), δενδρολίβανου (*R. Officinalis*) και ματζουράνας (*O. majorana*). Μια παρατεταμένη φάση υστέρησης και ένας βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης υποδεικνύει αντιμικροβιακή δράση.



Εικόνα 4.13 Οι καμπύλες ανάπτυξης των τριών στελεχών *S. cerevisiae* στους 37 °C απουσία φυσικών εκχυλισμάτων (μόνο μαγιά, κόκκινη γραμμή) και παρουσία: εκχυλισμάτων υπερικού (*H. perforatum*), υγρής μαστίχας (*P. lentiscus* var. *chia*), δενδρολίβανου (*R. Officinalis*) και ματζουράνας (*O. majorana*). Μια παρατεταμένη φάση υστέρησης και ένας βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης υποδεικνύει αντιμικροβιακή δράση.

D. Effect of natural extracts on yeasts growth rate

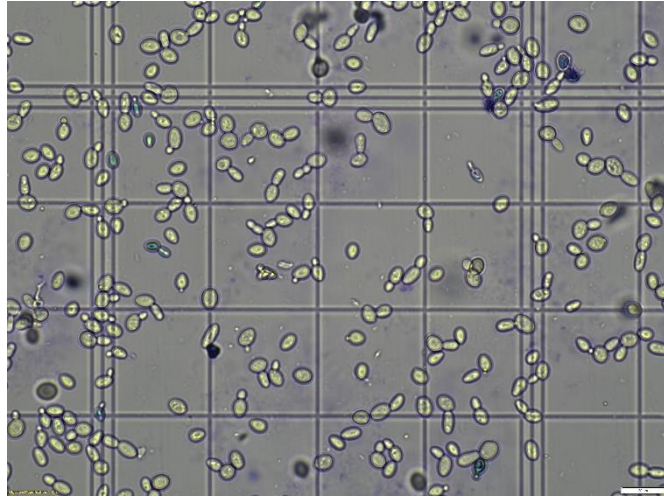


Εικόνα 4.14 Οι ρυθμοί ανάπτυξης των τριών στελεχών *S. cerevisiae* στους 37 °C. Οι μέσες τιμές και η SD συγκρίθηκαν με ANOVA ακολουθούμενη από Duncan post hoc test. * Υποδεικνύει σημαντικά χαμηλότερο ($p < 0,05$) από το «μόνο μαγιά» σε κάθε μοντέλο κυττάρων ζύμης (αρτοποιός, κρασί, μπύρα).

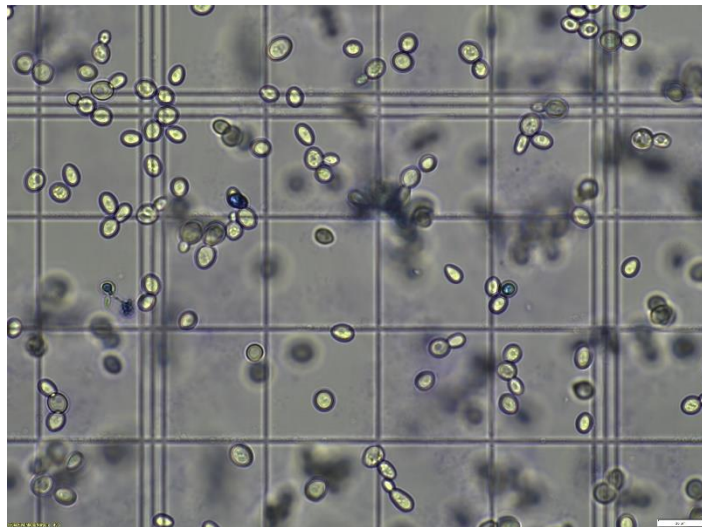
Από τις παραπάνω καμπύλες προκύπτει ότι για την ανάπτυξη της ζύμης οινοποιίας αντιμυκητιακή δράση εμφανίζουν το δενδρολίβανο, το *H. perforatum* και η μαστίχα, με πιο έντονη εκείνη της μαστίχας, ενώ η ματζουράνα φαίνεται να μην επηρεάζει καθόλου την ανάπτυξη της ζύμης. Στη συνέχεια για τη ζύμη της μπίρας αναστολή ανάπτυξης προκαλεί το δενδρολίβανο και το *H. perforatum*, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται καθόλου από τη μαστίχα και την ματζουράνα. Τέλος, η μαγιά αρτοποιίας παρατηρείται να έχει ευαισθησία στα *H. perforatum*, δενδρολίβανο και μαστίχα, με πιο έντονη αναστολή να προκαλεί το δενδρολίβανο. Ενώ, παράλληλα έχει μεγάλη αντοχή στην ματζουράνα.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο για να ποσοτικοποιηθεί το εύρος ανάπτυξης των μικροοργανισμών έγινε χρήση της μεθόδου “Yeast viable count”. Ειδικότερα, συμπληρώθηκε μια πλάκα ELISA των 96 θέσεων. Οι θέσεις εμβολιάστηκαν με 50μL του μικροοργανισμού, 50μL ελεγμένου φυσικού εκχυλίσματος και 200μL ζωμού (Brain Heart Infusion, BHI + 20g/L δεξτρόζης), εφαρμόζοντας διπλά δείγματα.

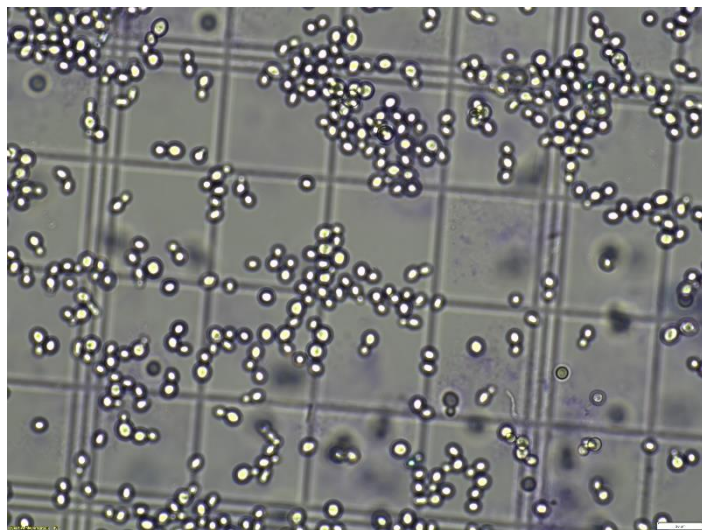
Πριν την επώαση της πλάκας στο Bioscreen στις αναφερόμενες συνθήκες, τα δείγματα ελέχθηκαν σε μεγέθυνση X40 στο μικροσκόπιο OLYMPUS PE50 και με χρώση methylene blue, η οποία βάφει μπλε μόνο τα νεκρά κύτταρα, επομένως αφήνει λευκά/διαφανή τα ζωντανά κύτταρα. Αυτό παρατίθεται στις παρακάτω φωτογραφίες.



Εικόνα 4.15 Baker's Yeast



Εικόνα 4.16 Beer Yeast



Εικόνα 4.17 Wine yeast

5 Συμπεράσματα

Αυτή η εργασία ασχολήθηκε με την μελέτη της αντιμυκητιακής δράσης τεσσάρων εμπορικών φυσικών φυτικών εκχυλισμάτων έναντι τριών βιομηχανικών στελεχών *S. cerevisiae*: ενός κρασιού, μιας μπύρας και ενός στελέχους αρτοποιίας. Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται ευρέως ως πρότυπο ευκαρυωτικού μικροοργανισμού, αλλά περιλαμβάνει πολυάριθμα στελέχη με σημαντικές γενετικές και φαινοτυπικές διαφορές που δεν έχουν διερευνηθεί καλά (Letsiou *et al.*, 2024). Σε αυτή τη μελέτη, στελέχη *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα ζυμομύκητα που είναι βιώσιμα και καλά προσαρμοσμένα στις περιβαλλοντικές πιέσεις για την αξιολόγηση της πιθανής εφαρμογής των φυσικών φυτικών εκχυλισμάτων κατά της αλλοίωσης των τροφίμων ζύμης. Η αντιμυκητιακή δράση των φυσικών φυτικών εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές μεθόδους από τις οποίες προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο βαθμός αντιμικροβιακής δράσης που ανιχνεύτηκε ποικίλλει ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο. Στη μέθοδο διάχυσης δίσκου άγαρ, μόνο το εκχύλισμα δεντρολίβανου φάνηκε να είναι μυκητοστατικό έναντι όλων των ελεγχόμενων ζυμών σε σύγκριση με τα άλλα τέσσερα εκχυλίσματα. Η μέθοδος spot assay εμφάνισε ήπια αντιμυκητιακή δράση κατά της μαγιάς του κρασιού και της μπύρας από όλα τα φυσικά εκχυλίσματα εκτός αυτού της ματζουράνας. Ενώ, τα έλαια φορείς έδειξαν παρόμοια αντιμυκητιακή δράση, επομένως η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων δεν αποδείχθηκε. Ωστόσο, μια πιο ολοκληρωμένη ανάλυση της μυκητοστατικής δραστηριότητας παρατηρήθηκε στην ανάλυση της καμπύλης ανάπτυξης, η οποία παρουσίασε στατιστικά σημαντικούς βραδύτερους ρυθμούς ανάπτυξης όλων των ζυμομυκήτων παρουσία των φυσικών φυτικών εκχυλισμάτων εκτός της ματζουράνας ξανά. Ως εκ τούτου, αποδείχθηκε ότι τα φυσικά εκχυλίσματα της μαστίχας του δενδρολίανου και του *H. perforatum* ελάττωσαν τον ρυθμό ανάπτυξης των στελεχών *S. cerevisiae* που μελετήθηκαν. Επιπλέον, τα τρία στελέχη ζύμης σε αυτή τη μελέτη εμφάνισαν διαφορές στην ευαισθησία τους σε φαρμακευτικά αντιμυκητιακά, και δύο από αυτά βρέθηκαν να έχουν αποκτήσει αντοχή στην ιτρακοναζόλη (μαγιά μπύρας και μαγιά αρτοποιίας)

Ένα επιπλέον δεδομένο που προκύπτει από τη μελέτη είναι τα έλαια-φορείς, τα οποία πιθανότατα παρεμπόδισαν την ανασταλτική δράση των φυσικών εκχυλισμάτων λόγω της χαμηλής διαχυτικότητας στη μέθοδο του δίσκου άγαρ. Ωστόσο, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι η ήπια αντιμυκητιασική δράση των ελαίων φορέων ανιχνεύθηκε μόνο στη μέθοδο spot assay. Συνεπώς, συνιστάται η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης να πραγματοποιείται με μέθοδο που να εξαρτάται από πολυάριθμους παράγοντες και σε ιδανικές περιπτώσεις να εφαρμόζονται περισσότερες από μία τεχνικές κατά τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης διαφόρων συστατικών (Tan and Lim, 2015).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με την αντιμυκητιακή δράση των φυσικών εκχυλισμάτων σε διαφορετικά είδη ζυμών. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματά της παραπάνω μελέτης υποδεικνύουν ότι θα μπορούσαμε να εξετάσουμε τη διαφορετική χρήση αυτών των εκχυλισμάτων στη βιομηχανία τροφίμων. Τέτοιες χρήσεις, για παράδειγμα, είναι ως φυσικά συντηρητικά σε συνδυασμό με χαμηλότερες από τις συνηθισμένες συγκεντρώσεις χημικών συντηρητικών για την αναστολή ή την καθυστέρηση της αλλοίωσης των τροφών μαγιάς.

Σχετικά με τις τάσεις της βιομηχανίας επεξεργασίας και παραγωγής τροφίμων, παρατηρείται ότι στρέφεται σημαντικά προς την μείωση των χημικών προσθέτων στα τρόφιμα. Επομένως, είναι χρήσιμο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες σε διαφορετικά φυσικά φυτικά εκχυλίσματα αλλά και διαφορετικά είδη μυκήτων που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anoop, V. *et al.* (2015) 'Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains towards humans', *FEMS Yeast Research*, 15(6), p. fov057. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov057>.

Bailey, E.M., Krakovsky, D.J. and Rybak, M.J. (1990) 'The Triazole Antifungal Agents: A Review of Itraconazole and Fluconazole', *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 10(2), pp. 146–153. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1990.tb02561.x>.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibensouda, S.K. (2016) 'Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review', *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp. 71–79. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

Bamforth, C. (2003) *Brewing Yeast Fermentation Performance*. 1st edn. John Wiley & Sons, Ltd. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470696040>.

Banat, I.M. and Marchant, R. (1995) 'Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11(3), pp. 304–306. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00367104>.

Barnes, J., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D. (2001) 'St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(5), pp. 583–600. Available at: <https://doi.org/10.1211/0022357011775910>.

Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (1990) *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press (CUP) Cambridge, p. 1012 pp. Available at: <https://repository.rothamsted.ac.uk/item/86719/yeasts-characteristics-and-identification> (Accessed: 22 May 2024).

Benincasa, M. *et al.* (2011) 'Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Carbon Nanotubes', *ACS Nano*, 5(1), pp. 199–208. Available at: <https://doi.org/10.1021/nn1023522>.

Brass, C. *et al.* (1982) 'Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(1), pp. 151–158. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.21.1.151>.

Busatta, C. *et al.* (2008) 'Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage', *Food Microbiology*, 25(1), pp. 207–211. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.07.003>.

Cervo, L. *et al.* (2002) 'Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts', *Psychopharmacology*, 164(4), pp. 423–428. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1229-5>.

Choi, M.-Y. and Rhim, T.-J. (2008) 'Antimicrobial Effect of Oregano (*Origanum majorana* L.) Extract on Food-borne Pathogens', *Korean Journal of Plant Resources*, 21(5), pp. 352–356.

Crowley, P.D. and Gallagher, H.C. (2014) 'Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future.', *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), pp. 611–617. Available at: <https://doi.org/10.1111/jam.12554>.

Cuvelier, M.-E., Richard, H. and Berset, C. (1996) 'Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary', *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), pp. 645–652. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02518121>.

Daneshmend, T.K. and Warnock, D.W. (1988) 'Clinical Pharmacokinetics of Ketoconazole', *Clinical Pharmacokinetics*, 14(1), pp. 13–34. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003088-198814010-00002>.

Davidson, P.M., Taylor, T.M. and Schmidt, S.E. (2012) 'Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds', in *Food Microbiology*, pp. 765–801. Available at: <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch30>.

De Beule, K. and Van Gestel, J. (2001) 'Pharmacology of Itraconazole', *Drugs*, 61(1), pp. 27–37. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003495-200161001-00003>.

De Silvestri, A. *et al.* (2018) 'Determination of Temperature Dependent Growth Parameters in Psychrotrophic Pathogen Bacteria and Tentative Use of Mean Kinetic Temperature for the Microbiological Control of Food', *Frontiers in Microbiology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03023>.

De Vuyst, L. and Neysens, P. (2005) 'The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions', *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), pp. 43–56. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>.

Deak, T. (2006) 'Environmental Factors Influencing Yeasts', in G. Péter and C. Rosa (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 155–174. Available at: https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_8.

Deak, T. (2007) *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. 2nd edn. Boca Raton: CRC Press. Available at: <https://doi.org/10.1201/9781420044942>.

Deans, S.G. and Svoboda, K.P. (1990) 'The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil', *Flavour and Fragrance Journal*, 5(3), pp. 187–190. Available at: <https://doi.org/10.1002/ffj.2730050311>.

Dias, M.C., Pinto, D.C.G.A. and Silva, A.M.S. (2021) 'Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity', *Molecules*, 26(17), p. 5377. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>.

Dombrovskaya, Y.P. *et al.* (2021) 'The use of water-honey extract of hypericum herb to prevent bakery products from "potato disease"', *IOP Conference Series*:

Earth and Environmental Science, 640(2), p. 022044. Available at: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/640/2/022044>.

Estevinho, B.N. *et al.* (2021) 'Development of Controlled Delivery Functional Systems by Microencapsulation of Different Extracts of Plants: *Hypericum perforatum* L., *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum*', *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), pp. 1503–1517. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02652-9>.

Fleet, G. (1992) 'Spoilage Yeasts', *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(1–2), pp. 1–44. Available at: <https://doi.org/10.3109/07388559209069186>.

Fleet, G.H. (2007) 'Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety', *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), pp. 170–175. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.010>.

Galgiani, J.N. (1990) 'Fluconazole, a New Antifungal Agent', *Annals of Internal Medicine*, 113(3), pp. 177–179. Available at: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-3-177>.

Gallone, B. *et al.* (2016) 'Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts', *Cell*, 166(6), pp. 1397–1410.e16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>.

Gioti, E.M. *et al.* (2009) 'Αντιοξειδωτική δράση και βιοενεργά συστατικά των εναέριων τμημάτων του *Hypericum perforatum* L. από την Ήπειρο, Ελλάδα', *Food Chemistry*, 117(3), pp. 398–404. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.016>.

Haller, I. (1985) 'Mode of action of clotrimazole: Implications for therapy', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 152(7, Part 2), pp. 939–944. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(85\)80005-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(85)80005-3).

Hamelman, J. (2004) *Bread: A Baker's Book of Techniques and Recipes*. John Wiley & Sons.

Heitmann, M. (2017) 'THE INVESTIGATION OF TECHNOLOGICAL, NUTRITIONAL AND SENSORIAL CHARACTERISTICS OF WHEAT BREAD, INFLUENCED BY DIFFERENT STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'.

Hernández, A. *et al.* (2018) 'Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages?', *International Journal of Food Microbiology*, 286, pp. 98–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031>.

Hittinger, C.T., Steele, J.L. and Ryder, D.S. (2018) 'Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods', *Current Opinion in Biotechnology*, 49, pp. 199–206. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.004>.

Hui, Y.H. *et al.* (2008) *Bakery Products: Science and Technology*. John Wiley & Sons.

Jin Jun, W. *et al.* (2001) 'Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals', *Food Chemistry*, 75(4), pp. 439–444. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00233-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00233-3).

Kalousi, F.D. *et al.* (2023) 'Regulation of Energy Metabolism and Anti-Inflammatory Activities of Mastiha Fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. chia', *Foods*, 12(7), p. 1390. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods12071390>.

Kapoor, S. *et al.* (2023) 'Το άνθος του *Hypericum perforatum* L.: Μια παραδοσιακή πηγή βιοδραστικών για νέες εφαρμογές τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων', *Biochemical Systematics and Ecology*, 110, p. 104702. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104702>.

Kim, E. *et al.* (2022) 'Physiological Effects of Green-Colored Food-Derived Bioactive Compounds on Cardiovascular and Metabolic Diseases', *Applied Sciences*, 12(4), p. 1879. Available at: <https://doi.org/10.3390/app12041879>.

Kovacic, P. and Cooksy, A. (2012) 'Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action.', *MedChemComm*, 3(3), pp. 274–280. Available at: <https://doi.org/10.1039/C2MD00267A>.

Kurtzman, C., Fell, J.W. and Boekhout, T. (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.

Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S. (2000) *Yeast and its importance to wine aroma*. Available at: <https://scholar.sun.ac.za/items/2338f879-9ea5-4d2f-8ddb-7947f22e4dd4> (Accessed: 5 June 2024).

Lemke, A., Kiderlen, A.F. and Kayser, O. (2005) 'Amphotericin B', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(2), pp. 151–162. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>.

Letsiou, S. *et al.* (2024) 'Exploring the Antifungal Activity of Various Natural Extracts in a Sustainable *Saccharomyces cerevisiae* Model Using Cell Viability, Spot Assay, and Turbidometric Microbial Assays', *Applied Sciences*, 14(5), p. 1899. Available at: <https://doi.org/10.3390/app14051899>.

Linko, Y.Y., Javanainen, P. and Linko, S. (1997) 'Biotechnology of bread baking', in *Trends in food science & technology*, pp. 339–344. Available at: <https://www.sciencedirect.com/b/s/science/article/pii/S0924224497010662?brr=88f1fc741c3938d4> (Accessed: 5 June 2024).

Lowes, K.F. *et al.* (2000) 'Prevention of Yeast Spoilage in Feed and Food by the Yeast Mycocin HMK', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), pp. 1066–1076. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1066-1076.2000>.

Melkounov, A. *et al.* (2013) 'Nystatin nanosizing enhances in vitro and in vivo antifungal activity against *Candida albicans*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(9), pp. 2099–2105. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt137>.

- Moreno-Arribas, M.V. and Polo, M.C. (2005) 'Winemaking Biochemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), pp. 265–286. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408690490478118>.
- Nazzaro, F. *et al.* (2017) 'Essential Oils and Antifungal Activity', *Pharmaceuticals*, 10(4), p. 86. Available at: <https://doi.org/10.3390/ph10040086>.
- Negi, P.S. (2012) 'Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application', *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), pp. 7–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>.
- Nieto, G. *et al.* (2010) 'Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality', *Meat Science*, 84(1), pp. 23–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.001>.
- Nieto, G., Ros, G. and Castillo, J. (2018) 'Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review', *Medicines*, 5(3), p. 98. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>.
- Pachi, V.K. *et al.* (2020) 'Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*, Anacardiaceae): A review', *Journal of Ethnopharmacology*, 254, p. 112485. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112485>.
- Parapouli, M. *et al.* (2020) 'Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications', *AIMS Microbiology*, 6(1), pp. 1–31. Available at: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>.
- Paudel, P.N. *et al.* (2022) 'Chemical Composition, Enantiomeric Distribution, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Origanum majorana L. Essential Oil from Nepal', *Molecules*, 27(18), p. 6136. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27186136>.
- Petropavlovskiy, A.A. *et al.* (2020) 'A Quantitative Imaging-Based Protocol for Yeast Growth and Survival on Agar Plates', *STAR Protocols*, 1(3), p. 100182. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100182>.
- Phale, S. (2018) 'Yeast: Characteristics and Economic Significance', *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 08(05). Available at: <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000337>.
- Piérard, G.E., Arrese, J.E. and Piérard-Franchimont, C. (2000) 'Itraconazole', *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [Preprint]. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14656566.1.2.287> (Accessed: 12 June 2024).
- Pronk, J.T., Yde Steensma, H. and Van Dijken, J.P. (1996) 'Pyruvate Metabolism in Saccharomyces cerevisiae', *Yeast*, 12(16), pp. 1607–1633. Available at:

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4).

Rašković, A. *et al.* (2014) 'Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), p. 225. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-225>.

Ribeiro-Santos, R. *et al.* (2015) 'A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)', *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), pp. 355–368. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.015>.

Rolfe, M.D. *et al.* (2012) 'Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation', *Journal of Bacteriology*, 194(3), pp. 686–701. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.06112-11>.

Sahu, S.R. *et al.* (2023) 'Spot Assay and Colony Forming Unit (CFU) Analyses-based sensitivity test for *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*', *Bio-protocol*, 13(21). Available at: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4872>.

Sawyer, P.R. *et al.* (1975) 'Clotrimazole: A Review of its Antifungal Activity and Therapeutic Efficacy', *Drugs*, 9(6), pp. 424–447. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003495-197509060-00003>.

Sharifi-Rad, J. *et al.* (2020) 'Rosmarinus plants: Key farm concepts towards food applications', *Phytotherapy Research*, 34(7), pp. 1474–1518. Available at: <https://doi.org/10.1002/ptr.6622>.

Sousa, F. *et al.* (2023) 'Reviving the interest in the versatile drug nystatin: A multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 199, p. 114969. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114969>.

Suriyarachchi, V.R. and Fleet, G.H. (1981) 'Occurrence and Growth of Yeasts in Yogurts', *Applied and Environmental Microbiology*, 42(4), pp. 574–579. Available at: <https://doi.org/10.1128/aem.42.4.574-579.1981>.

Tan, J.B.L. and Lim, Y.Y. (2015) 'Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts', *Food Chemistry*, 172, pp. 814–822. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.141>.

Terpou, A. *et al.* (2018) 'Evaluation of Chios mastic gum as antimicrobial agent and matrix forming material targeting probiotic cell encapsulation for functional fermented milk production', *LWT*, 97, pp. 109–116. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.045>.

Tiwari, B.K. *et al.* (2009) 'Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), pp. 5987–6000. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf900668n>.

Tonner, P.D. *et al.* (2017) 'Detecting differential growth of microbial populations with Gaussian process regression', *Genome Research*, 27(2), pp. 320–333. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.210286.116>.

Türker, M. (2014) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*.

Veenstra, J.P. and Johnson, J.J. (2021) 'Rosemary (*Salvia rosmarinus*): Health-promoting benefits and food preservative properties', *International journal of nutrition*, 6(4), pp. 1–10.

White, C. and Zainasheff, J. (2010) *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Publications.

Zervos, M. and Meunier, F. (1993) 'Fluconazole (Diflucan®): a review', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 3(3), pp. 147–170. Available at: [https://doi.org/10.1016/0924-8579\(93\)90009-T](https://doi.org/10.1016/0924-8579(93)90009-T).