



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
**Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες έναντι τροφιμογενών παθογόνων**

MSc Thesis  
**Natural antimicrobial agents against foodborne pathogens**

Διευθυντής  
Καθ. Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α) Ιωάννης Τσάκνης



**ΦΟΙΤΗΤΗΣ/ STUDENT**  
Φιλντίσης Γεώργιος/ FILNTISIS GEORGIOS

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ/ SUPERVISOR**  
Κοντελής Σπυρίδων/ Konteles Spyridon

AIGALEO 2022





Faculty of Food Sciences  
Department of Food Science and Technology

Master of Science  
**FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY**

MSc THESIS  
**Natural antimicrobial agents against foodborne pathogens**

FILNTISIS GEORGIOS  
20029

george.fild@gmail.com

SUPERVISOR  
KONTELES SPYRIDON

AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες έναντι τροφιμογενών παθογόνων**» που παρουσιάστηκε από τον ή την **ΦΙΛΑΝΤΙΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην **ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

**Κοντελής Σπυρίδων**  
*Επίκουρος Καθηγητής*  
*Επιβλέπων*

Ημερομηνία

**Ζουμπουλάκης Παναγιώτης**  
*Αναπληρωτής Καθηγητής*

Ημερομηνία

**Μπατρίνου Ανθιμία**  
*Επίκουρη Καθηγήτρια*

## Δήλωση περί λογοκλοπής/ Copyright

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην ολοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.



Φιλντίσης Γιώργος



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών σπουδών μου, στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, στη Σχολή Επιστημών Τροφίμων, στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και πιο συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων.

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη υποστήριξη του καθηγητή μου, Επίκουρου Καθηγητή του ΠΑ.Δ.Α., Κου Σπύρου Κοντελέ, τον οποίο ευχαριστώ βαθιά για την βοήθεια και τη γνώση που μου προσέφερε. Επίσης, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Κα Μπατρίνου Ανθιμία (Επίκουρη Καθηγήτρια) για την άριστη συνεργασία και και τον χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Κο Ζουμπουλάκη Παναγιώτη (Πρόεδρος του Τμήματος, Αναπληρωτής Καθηγητής) για τις στοχευμένες και πολύτιμες συμβουλές του, οι οποίες φάνηκαν εξαιρετικά χρήσιμες για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας μου.

Φιλντίσης Γιώργος





## **Αφιερώσεις**

Η αφιέρωση της συγκεκριμένης Διπλωματικής Εργασίας είναι στον Παππού μου Κωνσταντίνο Καραστάθη, ως το ελάχιστο ευχαριστώ για όλα όσα μου προσέφερε καθόλη την διάρκεια της ζωής του.



## Περίληψη

Εμπορικά διαθέσιμες σκόνες Μαύρου πιπεριού, Πράσινου πιπεριού καθώς και κόκκινης πιπεριάς Καγιέν προστέθηκαν σε ποσοστό 5% κ.β. σε νερό. Κατόπιν ρυθμίστηκε το pH με 1 N HCl/ 1 N NaOH σε τιμές 4.5, 5.5 και 6.5 και κατόπιν κάθε ένα από τα εναιωρήματα των μπαχαρικών εκτέθηκαν για 5, 30 και 60 min σε θερμοκρασίες 60, 80 και 100°C. Μετά την ολοκλήρωση των επεξεργασιών, τα υδατικά εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν και το pH του υπερκείμενου υγρού ρυθμίστηκε στο 7.0. Ακολούθησε αποστειρωτική διήθηση (0.22 μm) και προέκυψε το «μητρικό εκχύλισμα - ME». Από το ME σχηματίστηκαν διαλύματα 5.0, 3.1, και 1.2% ο.ο τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την επίδρασή τους επί τριών Gram θετικών βακτηρίων: *S. aureus*, *L. monocytogenes* και *B. cereus*, αρχικού πληθυσμού (εμβόλιο) 10<sup>4</sup> cfu/mL. Η αξιολόγηση των εκχυλισμάτων έγινε μέσω φωτομετρικής παρακολούθησης της καμπύλης ανάπτυξής τους στο πολυφωτόμετρο/ επωαστήρα (Bioscreen C) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και θερμοκρασία επώασης 37°C/ 48 h. Η επίδραση των εκχυλισμάτων επί των μικροοργανισμών-στόχων ποσοτικοποιούνταν χρησιμοποιώντας το χρόνο προσαρμογής (*lag phase*) της καμπύλης ανάπτυξής τους ως δείκτη όπως αυτός προέκυπτε μέσω της εξίσωσής όπως προσαρμοζόταν μέσω του μοντέλου Baranyi & Roberts. Τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα: Τα αποτελέσματα εξαρτώνταν πρωτίστως από το συνδυασμό βακτηρίου-εκχυλίσματος. Σε ότι αφορά το *S. aureus* το 9.87% του συνόλου των εκχυλισμάτων μαύρου πιπεριού προκάλεσαν αύξηση του χρόνου προσαρμογής από -20% έως -39% ενώ κανένα δεν περιόρισε πλήρως την ανάπτυξή του. Αντίθετα, το 13.6% από τα εκχυλίσματα του πράσινου πιπεριού προκάλεσαν πλήρη αναστολή του μικροοργανισμού-στόχου. Σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα πιπεριάς Καγιέν το 2.46% των δειγμάτων προκάλεσαν πλήρη αναστολή του *S. aureus* και 2.46% αναστολή από -48.01% έως -53.29%. Αναφορικά με το στέλεχος *L. monocytogenes* το 13.6% των εκχυλισμάτων μαύρου πιπεριού προκάλεσαν αύξηση του χρόνου προσαρμογής από -10% έως -39% ενώ αντίθετα το 24.7% προκάλεσε μείωση του χρόνου προσαρμογής από 10% έως και 39%, δηλαδή ευνοήθηκε η ανάπτυξη του *L. monocytogenes*. Το 11.1% των εκχυλισμάτων πράσινου πιπεριού προκάλεσαν πλήρη αναστολή του *L. monocytogenes* ενώ αντίθετα το 37.0% μείωσε τον χρόνο προσαρμογής από 10% έως 55%, δηλαδή ευνοήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου. Σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα πιπεριάς Καγιέν το 18% αυτών αύξησαν το χρόνο προσαρμογής από -10% έως -39%. Ωστόσο κανένα δείγμα δεν ανέστειλε την ανάπτυξη του βακτηρίου. Σε ότι αφορά το στέλεχος *B. cereus*, το 27.16% των δειγμάτων μαύρου πιπεριού

προκάλεσαν αύξηση του χρόνου προσαρμογής από 10% έως 39% ενώ κανένα δεν πέτυχε πλήρη αναστολή. Από το σύνολο των εκχυλισμάτων πράσινου πιπεριού το 33% αύξησε το χρόνο προσαρμογής από 20% έως 59% αν και κανένα δεν προκάλεσε πλήρη αναστολή (100%). Από τα εκχυλίσματα κόκκινης πιπεριάς Καγιέν ένα δείγμα ανέστειλε την ανάπτυξη του *B. cereus*, το 11.1% των δειγμάτων αύξησε το χρόνο προσαρμογής από 20% έως 39% και το 5% από 40% έως 59%. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι από το σύνολο των δειγμάτων που αύξησαν το χρόνο προσαρμογής των βακτηρίων-στόχων τα περισσότερα είχαν προέλθει από εκχυλίσσεις σε όξινο περιβάλλον (pH 4.5).

## Abstract

Commercially available powders of black pepper, green pepper and red Cayenne pepper added at 5% w/w in water. Then the pH adjusted with 1 N HCl/ 1 N NaOH to 4.5, 5.5 and 6.5 and then each of the spice suspensions exposed for 5, 30 and 60 min at 60, 80 and 100°C. Following heat treatment, the aqueous extracts centrifuged, the pH of the supernatant adjusted to 7.0, and sterilized by micro-filtration (0.22 µm) and the "Mother-Extract - ME" obtained. From the ME, solutions of 5.0, 3.1, and 1.2% v/v in BHI broth were prepared which, then evaluated for their effect on the growth of three Gram positive bacteria: *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *B. cereus*, with initial population (inoculum)  $10^4$  cfu /mL. The evaluation of the different extracts on the growth of the target-strains was carried-out photometrically in the multiphotometer/incubator Bioscreen C in BHI broth medium following incubation for 48 h at 37°C. The effect of the extracts on the target microorganisms quantified using the lag time of their growth curve as index as derived through the equation the Baranyi & Roberts model. The results were as follows: The results depended primarily on the bacteria-extract combination. As far as *S. aureus* is concerned, the 9.87% of the black pepper extracts evaluated, they increased the lag time from 20% to 39% while none of the samples inhibited the target strain. In contrast, the 13.6% of the green pepper extracts caused complete inhibition of the target microorganism. Regarding the cayenne pepper extracts, the 2.46% of the samples caused complete inhibition of *S. aureus* while the 2.46% increased the lag time from 48.01% to 53.29%, compared to control samples. Concerning, the *L. monocytogenes* strain, the 13.6% of the black pepper extracts samples increased the lag-time from 10% to 39% while the 24.7% of the black pepper samples decreased the lag-time from 10% to 39% means that the extracts favored the growth of *L. monocytogenes*. Regarding the green pepper extracts, the 11.1% of them completely inhibited *L. monocytogenes* while the 37.0% of the samples reduced the lag-time from 10% to 55%, means favored the growth of the bacterium. As far as cayenne pepper extracts are concerned, the 18% of them increased the lag-time from 10% to 39%. However, neither of the samples completely inhibited the growth of the bacterium. Regarding the *B. cereus*, the 27.16% of the samples increased the lag-time of the strain from 10% to 39% but none completely inhibited its growth. Of the green pepper samples, the 33% increased the lag-time from 20% to 59% compared to control samples and again none of the samples completely

inhibited *B. cereus*. Of the red cayenne pepper extracts one sample inhibited the growth of *B. cereus*, 11.1% of the samples increased the adaptation time from -20% to -39% and 5% from -40% to -59%. Of the samples that increased the lag time of the target bacteria, most of them came from extractions in an acidic environment (pH 4.5).

## Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής/ Copyright .....	3
Ευχαριστίες.....	5
Αφιερώσεις.....	7
Περίληψη.....	9
Abstract .....	11
Κατάλογος Πινάκων .....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	2
Εισαγωγή .....	2
Μπαχαρικά και Βότανα .....	2
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	2
1.2 Σημασία και εφαρμογές των μπαχαρικών και βοτάνων για την προώθηση της υγείας και της ευεξίας .....	4
1.3 Κίνητρο και Στόχοι της Διπλωματικής εργασίας .....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	8
Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....	9
2.1 Μπαχαρικά, μορφές και σύνθεση.....	9
2.1.1 Καυτερά Μπαχαρικά – Πιπέρι και Πιπεριές.....	10
2.1.1.1 Πιπέρι.....	11
2.1.1.2 Τσίλι και πιπέρι καγιέν.....	12
2.2 Κύριες βιοενεργές ενώσεις βοτάνων και μπαχαρικών.....	14
2.2.1 Φυτοχημικά συστατικά επιλεγμένων μπαχαρικών .....	19
2.3 Μέθοδοι και συνθήκες εκχύλισης βιοενεργών ενώσεων από μπαχαρικά και βότανα.....	22
2.3.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης .....	23
2.3.1.1 Βασικές αρχές συμβατικών μεθόδων εκχύλισης.....	24
2.3.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών .....	27
2.3.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης ή εκχύλιση με τεχνικές υψηλής ενέργειας.....	32
2.4 Εκχυλίσματα μπαχαρικών και βοτάνων ως βιοενεργά και αντιμικροβιακά συστατικά .....	39
2.5 Ορισμένα «ανοιχτά» ζητήματα που αφορούν την εφαρμογή εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων σε τρόφιμα. ....	42

2.6	Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων βοτάνων και μπαχαρικών.....	47
2.7	Μέθοδοι ελέγχου αντιμικροβιακής δράσης και προσδιορισμός αποτελεσματικότητας εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων .....	50
2.8	Εφαρμογές αιθέριων ελαίων μπαχαρικών .....	55
2.8.1	Εφαρμογές υδατικών και αλκοολικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών .....	59
2.9	Εφαρμογές εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων μπαχαρικών και βοτάνων έναντι τροφιμογενών παθογόνων.....	66
2.10	Συνεργιστικές και ανταγωνιστικές δράσεις εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων μπαχαρικών και βοτάνων .....	67
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....</b>	<b>72</b>
	<b>Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>72</b>
3.1	Υλικά .....	72
3.1.1	Μικροοργανισμοί.....	72
3.1.2	Υπόστρωμα και συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	72
3.1.3	Φυτικά υλικά .....	73
3.1.4	Αντιδραστήρια – Υποστρώματα.....	73
3.2	Εξοπλισμός .....	73
3.2.1	Πολυφωτόμετρο με σύστημα επώασης – Bioscreen System.....	73
3.3	Μέθοδοι.....	74
3.3.1	Παρασκευή εμβολίου.....	74
3.3.2	Εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών και προετοιμασία δειγμάτων .....	75
3.3.3	Προετοιμασία και εμβολιασμός της πλάκας μικροβοθρίων .....	75
3.3.4	Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των υδατικών εκχυλισμάτων έναντι επιλεγμένων τροφιμογενών παθογόνων .....	77
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....</b>	<b>81</b>
	<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>81</b>
4.1	Εκχυλίσματα Μαύρου Πιπεριού .....	82
4.1.1	Επίδραση έναντι στελέχους <i>S.aureus</i> .....	82
4.1.2	Επίδραση έναντι στελέχους <i>L. monocytogenes</i> .....	83
4.1.3	Επίδραση έναντι στελέχους <i>B. cereus</i> .....	86
4.2	Εκχυλίσματα Πράσινου Πιπεριού.....	88
4.2.1	Επίδραση έναντι στελέχους <i>S.aureus</i> .....	88



4.2.2	Επίδραση έναντι στελέχους <i>L. monocytogenes</i> .....	88
4.2.3	Επίδραση έναντι στελέχους <i>B. cereus</i> .....	92
4.3	Εκχυλίσματα Πιπεριάς Καγιέν.....	92
4.3.1	Επίδραση έναντι στελέχους <i>S.aureus</i> .....	92
4.3.2	Επίδραση έναντι στελέχους <i>L. monocytogenes</i> .....	94
4.3.3	Επίδραση έναντι στελέχους <i>B. cereus</i> .....	97
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....	98
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	98
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....	102
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	102
	Βιβλιογραφία .....	103

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b>	Θεραπευτικές επιδράσεις του μαύρου πιπεριού στην ανθρώπινη υγεία ΠΗΓΗ: Mian K. Sharif, 2018
<b>Εικόνα 2:</b>	Θεραπευτικές επιδράσεις του γαρυφάλλου στην ανθρώπινη υγεία ΠΗΓΗ: Mian K. Sharif, 2018
<b>Εικόνα 3:</b>	Θεραπευτικές επιδράσεις του γαρυφάλλου στην ανθρώπινη υγεία ΠΗΓΗ: Mian K. Sharif, 2018
<b>Εικόνα 4:</b>	Φυτό και καρπός πιπεριού ΠΗΓΗ: <a href="https://balconygardenweb.com/where-does-black-pepper-come-from/">https://balconygardenweb.com/where-does-black-pepper-come-from/</a>
<b>Εικόνα 5:</b>	Κόκκινο, Πράσινο, Κόκκινο και Λευκό πιπερι ΠΗΓΗ: <a href="https://www.imageprofessionals.com/en/images/11263543-Various-peppercorns-black-white-pink-green">https://www.imageprofessionals.com/en/images/11263543-Various-peppercorns-black-white-pink-green</a>
<b>Εικόνα 6:</b>	Scoville Heat Units (SHU) για είδη πιπεριών <i>Capsicum</i> ΠΗΓΗ: Ammara Waheeda, 2021
<b>Εικόνα 7:</b>	Ορισμένες μη πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν από διάφορα είδη του αφρικανικού γένους <i>Piper</i> . Πιπερίνη (1)- πιπεριδίνη (2)- χαβικίνη (3)- πιπλαρτίνη (4)- γκινεεν-σίνη (5)- πελλιτορίνη (6). ΠΗΓΗ (Oyemitan, 2017).
<b>Εικόνα 8:</b>	Ενεργά συστατικά του <i>Capsicum</i> ΠΗΓΗ (Kulkarni, Suryvanshi, Auti, & Gaikwad, 2017)
<b>Εικόνα 9:</b>	Δομές των κύριων καροτενοειδών στο <i>Capsicum</i> ΠΗΓΗ (Y.A. Kulkarni, 2017).
<b>Εικόνα 10:</b>	(α) Πολυφωτόμετρο με σύστημα επώασης – Bioscreen System, (β) πλάκες μικροβοθρίων (honeycomb) ΠΗΓΗ: <a href="http://www.bioscreen.fi/?page_id=288">http://www.bioscreen.fi/?page_id=288</a>
<b>Εικόνα 11:</b>	Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις μικροβιακών πληθυσμών ΠΗΓΗ: <a href="https://www.fao.org/3/ac802e/ac802e0q.htm">https://www.fao.org/3/ac802e/ac802e0q.htm</a>
<b>Εικόνα 12:</b>	Η πρώτη σελίδα του λογισμικού DMFit 2.0, το οποίο είναι επέκταση του λογισμικού Microsoft EXCEL στην βάση δεδομένων Combase. ΠΗΓΗ: <a href="https://browser.combase.cc/DMFit_Excel.aspx">https://browser.combase.cc/DMFit_Excel.aspx</a>
<b>Εικόνα 13:</b>	Καμπύλη ανάπτυξης <i>Bacillus cereus</i> (Control – Μπλε χρώμα), αρχικού πληθυσμού $10^4$ cfu/mL σε σύγκριση με καμπύλη ανάπτυξης <i>Bacillus cereus</i> με υδατικό εκχύλισμα πράσινου πιπεριού εκχυλισμένο σε συνθήκες 80°C, 32,5 min, 5% w/v και αρχικό pH 4,5.
<b>Εικόνα 14</b>	Καμπύλη ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> (μπλε χρώμα) αρχικού πληθυσμού $10^4$ cfu/mL, σε σύγκριση με καμπύλη ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> με υδατικό εκχύλισμα πιπεριού καγιέν εκχυλισμένο σε συνθήκες 100°C, 32,5 min, 5%w/v, αρχικό pH 4,5.
<b>Εικόνα 15</b>	Καμπύλη ανάπτυξης <i>Listeria monocytogenes</i> $10^4$ cfu/mL, σε σύγκριση με καμπύλη ανάπτυξης <i>Listeria monocytogenes</i> με υδατικό εκχύλισμα μαύρου πιπεριού εκχυλισμένο σε συνθήκες 80°C, 60 min, 5%w/v, αρχικό pH 4,5
<b>Εικόνα 16</b>	Χρωματικός κώδικας συσχέτισης του % μεταβολής της φάσης προσαρμογής (lag phase) του μικροοργανισμού-στόχου σε υγρό υπόστρωμα παρουσία και απουσία του δείγματος από την εκχύλιση.

## Κατάλογος Πινάκων

- 
- Πίνακας 1:** Μηχανισμοί δράσης βιοενεργών ενώσεων  
Πηγή: Ταμοκου, 2017
- 
- Πίνακας 2:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (*lag phase*) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *S. aureus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες ανάπτυξης στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα μαύρου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλισθεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
- 
- Πίνακας 3:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (*lag phase*) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *L. monocytogenes* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα μαύρου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
- 
- Πίνακας 4:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (*lag phase*) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *B. cereus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα μαύρου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
- 
- Πίνακας 5:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (*lag phase*) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *S. aureus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα πράσινου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
-

- 
- Πίνακας 6:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *L. monocytogenes* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα πράσινου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
- 
- Πίνακας 7:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *B. cereus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα πράσινου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
- 
- Πίνακας 8:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *S. aureus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα πιπεριάς καγιέν το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
- 
- Πίνακας 9:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *L. monocytogenes* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα πιπεριάς καγιέν το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.
- 
- Πίνακας 10:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *B. cereus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/ mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα πιπεριάς καγιέν το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## Εισαγωγή

### Μπαχαρικά και Βότανα

#### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Ήδη από το 1500 π.Χ., οι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν μπαχαρικά για να συντηρούν τα τρόφιμα. Στην Ευρώπη, στη Μέση Ανατολή και στην Ασία, τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνταν για τη συντήρηση κρεάτων, ψαριών, ψωμιού και λαχανικών. Τα μπαχαρικά χρησιμοποιήθηκαν μόνα τους ή σε συνδυασμό με το κάπνισμα ή/και το αλάτισμα για να εμποδίσουν την αλλοίωση των τροφίμων. Οι Ρωμαίοι συντηρούσαν σάλτσα ψαριού με άνηθο, δυόσμο και θρούμπι, ενώ τα κρέατα και τα λουκάνικα με κύμινο και κόλιανδρο, ενώ οι Έλληνες χρησιμοποιούσαν σκόρδο για την πρόληψη της αλλοίωσης των τροφίμων. Στην Ινδία χρησιμοποιούσαν τζίντζερ, σκόρδο και κουρκουμά για τη συντήρηση κρεάτων και ψαριών. Στην αρχαία Αίγυπτο χρησιμοποιούσαν κανέλα, κύμινο και θυμάρι ακόμα και στην διαδικασία της μουμιοποίησης. Τα μπαχαρικά όπως το γαρούφαλλο, η κανέλα, η μουστάρδα, το σκόρδο, το τζίντζερ και η μέντα εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική θεραπεία για την υγεία σε πολλές περιοχές του κόσμου (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Ενώ, τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνται ακόμα για τη συντήρηση των τροφίμων στα χωριά της Ινδίας, της Αφρικής, της Ινδονησίας και της Ταϊλάνδης (Raghavan, 2006).

Από την άλλη πλευρά όμως θα πρέπει να σημειωθεί ότι μπαχαρικά και τα βότανα ως φυτικά υλικά χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια, και ως γευστικοί παράγοντες και ως αρώματα τροφίμων καθώς και ως πηγές ουσιών για ιατρικούς σκοπούς. Στην πραγματικότητα, τα μπαχαρικά είχαν μεγάλο πολιτιστικό και οικονομικό αντίκτυπο στις παλαιότερες αυτοκρατορίες για αιώνες, λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων τους και είχαν καταλάβει σημαντικό μέρος του εμπορίου πριν τον 15<sup>ο</sup> αιώνα. Το εμπόριο μπαχαρικών μονοπωλήθηκε για αρκετά χρόνια από τους μεσάζοντες από την Μέση Ανατολή και από τη Βόρεια Αφρική, για περισσότερα από 5000 χρόνια, το οποίο ήταν μια τεράστια πηγή πλούτου, λόγω των αρωματικών/ γευστικών ιδιοτήτων τους, τη συντηρησιμότητα που προσέδιδαν στο κρέας, στην παρασκευή αρωμάτων και παραδοσιακών φαρμάκων. Για το λόγο αυτό, οι ευρωπαϊκές χώρες δοκίμασαν διάφορους τρόπους ώστε να προσεγγίσουν

αυτές τις πολύτιμες πηγές μπαχαρικών, με πρωτοπόρο την Ισπανία που έφτιαξε τις κατάλληλες διόδους εμπορίου για την εύρεση αυτών των σημαντικών πηγών. Εκείνη την περίοδο, τα μπαχαρικά ήταν πολύ ακριβά. Στην Ευρώπη, ένα κιλό μοσχοκάρυδο, πιστεύεται ότι ήταν πιο πολύτιμο και από χρυσό. Τα μπαχαρικά ήταν από τα πιο πολύτιμα προϊόντα στην αρχαιότητα καθώς και στα μεσαιωνικά χρόνια. Η αναζήτηση των μπαχαρικών στις χώρες της Ανατολής από τους Ευρωπαίους εξερευνητές όπως ο Φερδινάνδος Μαγγελάνος, ο Βάσκο ντα Γκάμα, ο Μπαθολομέου Ντίας και ο Χριστόφορος Κολόμβος οδήγησε στη μεγάλη Εποχή της Εξερεύνησης και στην ανακάλυψη του Νέου Κόσμου. Ένα από τα επιτυχημένα ταξίδια, έγινε από τον Ντα Γκάμα ο οποίος βρήκε τη διαδρομή για την Ινδία μέσω της άκρης της Αφρικής και επέστρεψε από το ταξίδι του με μοσχοκάρυδο, κανέλα, τζίντζερ και κόκκους πιπεριού για τον βασιλιά της Πορτογαλίας, Μανουέλ Α΄. Την περίοδο αυτή επήλθε η κυριαρχία των ευρωπαϊκών χωρών και τα μονοπώλια των Πορτογάλων, Ολλανδών, Γάλλων, Ισπανών και Άγγλων, οι οποίοι κατέλαβαν μια μεγάλη μερίδα του εμπορίου μπαχαρικών. Αυτό οδήγησε στον πλουτισμό των ευρωπαϊκών αυτοκρατοριών (Embuscado, 2018).

Τα μπαχαρικά έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και ως ιατρικές παρεμβάσεις. Συγκεκριμένα κατά το Μεσαίωνα, μπαχαρικά όπως η κανέλα, το σκόρδο και η ρίγανη χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία της χολέρας και άλλων μολυσματικών ασθενειών. Στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα, το γαρύφαλλο, η μουστάρδα και η κανέλα αποδείχθηκε ότι είχαν αντιμικροβιακή δράση. Η πρώτη επιστημονική μελέτη για τις συντηρητικές επιδράσεις των μπαχαρικών διεξήχθη στη δεκαετία του 1880 και έδειξε την αντιμικροβιακή επίδραση του ελαίου κανέλας κατά των σπορίων του *Bacillus anthracis* (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Στον εικοστό αιώνα, συνεχίστηκαν νέες έρευνες για μπαχαρικά, συμπεριλαμβανομένου του τζίντζερ, του σκόρδου, του κόλιανδρου, του κουρκουμά και του γαρυφαλλίου, ως πιθανά φυσικά αντιμικροβιακά. Σήμερα αυτές οι έρευνες συνεχίζονται (Raghavan, 2006).

Σήμερα τα βότανα και τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων σε όλο τον κόσμο. Δεν βελτιώνουν μόνο τις οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων, αλλά μπορούν επίσης, να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων μειώνοντας ή θανατώνοντας τον πληθυσμό των τροφιμογενών παθογόνων. Τα μπαχαρικά και τα φυτικά εκχυλίσματα, φαίνεται να επιδεικνύουν έντονες αντιμικροβιακές επιδράσεις κατά Gram-θετικών παθογόνων μικροοργανισμών όπως τη *Listeria monocytogenes*. Αυτές οι αντιμικροβιακές

ιδιότητες μπορεί να αυξήσουν το χρόνο αποθήκευσης και τη σταθερότητα του τροφίμου, με ενεργά συστατικά όπως φαινόλες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, αιθέρες και υδρογονάνθρακες, όπως στην περίπτωση της κανέλας, σκόρδου, μουστάρδας και κρεμμυδιού. (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Αλδεΐδες, θείο, τερπένια και τα παράγωγά τους, φαινόλες και αλκοόλες, παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Τα μπαχαρικά έχουν ισχυρή, μέτρια ή ελαφρά ανασταλτική δράση δραστηριότητα έναντι συγκεκριμένων βακτηρίων. Μελέτες του Πανεπιστημίου Cornell αναφέρουν ότι το σκόρδο, η ρίγανη, το κρεμμύδι και το μπαχάρι σκοτώνουν όλα τα βακτήρια. Το θυμάρι, κανέλα, εστραγκόν και το κύμινο σκοτώνουν έως και το 80% των βακτηρίων, το τσίλι έως και 75% των βακτηρίων. Μαύρο και λευκό πιπέρι, τζίντζερ, γλυκάνισο και σπόροι σέλινου έως 25%. Μελέτες, επίσης, στο Πανεπιστήμιο του Κάνσας αναφέρουν ότι το γαρύφαλλο, η κανέλα, η ρίγανη και το φασκόμηλο καταστέλλουν την ανάπτυξη του *Escherichia coli O157:H7* σε άψητα κρέατα, που προκαλεί γαστρεντερικές παθήσεις. Άλλες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το δωδεκαδάκτυλο σε φύλλα και σπόρους κόλιανδρου σκοτώνει τα βακτηριακά στελέχη *Salmonella spp* στα κρέατα (Raghavan, 2006).

## **1.2 Σημασία και εφαρμογές των μπαχαρικών και βοτάνων για την προώθηση της υγείας και της ευεξίας**

Τα μπαχαρικά και τα βότανα θεωρείται ότι έχουν μεγάλες δυνατότητες να προάγουν την υγεία και να δρουν ως θεραπευτικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση πολλών φυσιολογικών διαταραχών, κυρίως διότι ορισμένα συστατικά τους δρουν ως αναστολείς στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, ενώ άλλα μειώνουν την παραγωγή μυκοτοξινών (Sharif, Esaj, & Pasha, 2018).

Η αυξανόμενη έμφαση στην υγιεινή διατροφή έχει ενισχύσει την ανάγκη να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στα σημαντικά βιοενεργά συστατικά των μπαχαρικών και βοτάνων όχι μόνο για τη δημιουργία εύγεστων τροφίμων με χαμηλά λιπαρά ή αλάτι, αλλά και την προώθηση της υγείας και της ευεξίας. Γενικά οι καταναλωτές προτιμούν να τρώνε ένα «φυσικό» προϊόν που περιέχει κατά το δυνατόν λιγότερα ή καθόλου συνθετικά συντηρητικά. Με διευρυμένη την έρευνα πάνω στις φαρμακευτικές ιδιότητες των μπαχαρικών, τα τελευταία ολοένα αποκτούν και μεγαλύτερη προσοχή από τους καταναλωτές. Είναι γεγονός, πλέον, ότι τα μπαχαρικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προϊόντα που προάγουν την



υγεία και την ευεξία και αυτό δεν είναι ασφαλώς τυχαίο δεδομένης της μεγάλης ποικιλίας βιοενεργών συστατικών όπως: πολυακετυλένια, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, καψακινοειδή, τριτερπενοειδή, στερόλες και μονοτερπένια, τα οποία είναι ισχυρά βιοδραστικά εργαλεία. Μπαχαρικά και βότανα όπως, το σέλινο, ο μαϊντανός, το τζίντζερ, ο κουρκουμάς, η μέντα, ο δυόσμος, η γλυκόριζα, το σκόρδο, το κρεμμύδι, η μουστάρδα, το χρένο και το τσίλι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση της παραγωγής ενζύμων που δραματίζουν σημαντικό ρόλο, στην αντιμετώπιση των καρκινογόνων κυττάρων, αναστέλλουν την σύνθεση χοληστερόλης, μπλοκάρουν τα οιστρογόνα και αυξάνουν την ανοσοποιητική δραστηριότητα (Raghavan, 2006). Μπαχαρικά, όπως το μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum*), το γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*), η κανέλλα (*C. zeylanicum*, *C. cassia*), το τζίντζερ (*Zingiber officinale*), οι πιπεριές τσίλι και το πιπέρι καγιέν (*Capsicum annum*), έχουν επιδείξει εξαιρετικές θεραπευτικές και φαρμακευτικές ιδιότητες.

- **Μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum*):** Διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται σε αυτό μπαχαρικό περιλαμβάνουν σαπωνίνες, φλαβονοειδή, τανίνες, αλκαλοειδή καθώς και φαινόλες οι οποίες όπως είναι γνωστό ότι διαθέτουν ποικίλου βαθμού αντιοξειδωτική δράση. Αυτές οι ενώσεις μεμονωμένα ή συνεργιστικά εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Sharif, Esaj, & Pasha, 2018).



**Εικόνα 1:** | Θεραπευτικές επιδράσεις του μαύρου πιπεριού στην ανθρώπινη υγεία (Sharif, Esaj, & Pasha, 2018)

Το γένος *Piper* αποτελεί μια σημαντική κατηγορία φαρμακευτικών φυτών που

χρησιμοποιούνται, μεταξύ άλλων, για την αντιμετώπιση του πόνου και των φλεγμονωδών διαταραχών στη λαϊκή πρακτική (Oyemitan, 2017). Στην **Εικόνα 1**, ενδεικτικά, παρουσιάζονται οι θεραπευτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων μαύρου πιπεριού στην ανθρώπινη υγεία, όπως αντιμετώπιση δυσπεψίας, καρδιακών ασθενειών, ηπατικές δυσλειτουργίες, πνευμονικές ασθένειες κ.λπ.

▪ **Γαρούφαλλο (*Syzygium aromaticum*):** Το αιθέριο έλαιο γαρούφαλλου εμφανίζει κυτταροτοξικές δράσεις έναντι καρκινικών κυττάρων, καθώς και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Επιπλέον, τα υδατικά εκχυλίσματα, αιθανόλης και ελαίου του γαρούφαλλου έχουν δείξει κυτταροτοξικές επιδράσεις έναντι των κυττάρων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του μαστού, του καρκίνου του προστάτη και των κυττάρων του καρκίνου του οισοφάγου με περιορισμένες επιδράσεις στα φυσιολογικά ανθρώπινα λεμφοκύτταρα του αίματος. Αρκετές αναφορές έχουν τεκμηριώσει, ακόμα, τον πιθανό ρόλο του γαρούφαλλου ως αντιδιαβητικού παράγοντα. Επίσης, αλκοολικά εκχυλίσματα γαρούφαλλου έχουν επιδείξει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έχουν αναφερθεί και άλλες θεραπευτικές ιδιότητες, όπως οργανοπροστατευτικές επιδράσεις και αντιθρομβωτική δράση (Mbaveng & Kuete, *Syzygium aromaticum*, 2017). Στην **Εικόνα 2** συνοψίζονται ορισμένες θεραπευτικές ιδιότητες του γαρούφαλλου στην ανθρώπινη υγεία.



**Εικόνα 2:** Θεραπευτικές επιδράσεις του γαρούφαλλου στην ανθρώπινη υγεία (Sharif, Esaj, & Pasha, 2018)

▪ **Κανέλα (*Cinnamom species*):** Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε διάφορες φαρμακολογικές δραστηριότητες του *C. zeylanicum* και του *C. cassia*. Οι βιολογικές επιδράσεις

των φυτών του είδους, μεταξύ άλλων, φαίνεται να συνοψίζονται, σε αντικαρκινικές, αντι-διαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και ηπατοπροστατευτικές (Mbaveng & Kuete, 2017). Ενδεικτικά οι θεραπευτικές ιδιότητες των ειδών κανέλλας, παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.



**Εικόνα 3:** | Θεραπευτικές επιδράσεις του γαρυφάλλου στην ανθρώπινη υγεία (Sharif, Esaj, & Pasha, 2018)

- **Τζίντζερ (*Zingiber officinale*):** Πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν τεκμηριώσει το βιολογικό και φαρμακολογικό δυναμικό του τζίντζερ, συμπεριλαμβανομένων των αντιβακτηριακών, αναλγητικών, αντιφλεγμονωδών, αντιδιαβητικών και αντικαρκινικών επιδράσεων. Επίσης, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και πρόληψη της αρθρίτιδας. Εκτός των άλλων, από μελέτες, φαίνεται να επιδεικνύει νεφροπροστατευτική και ηπατοπροστατευτική δράση (Mbaveng & Kuete, *Zingiber officinale*, 2017).
- **Τσίλι και πιπέρι καγιέν (*Capsicum annum*, *C. frutescens*):** Το πιπέρι καγιέν ασκεί μια σειρά από ευεργετικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης αρτηριοσκλήρυνσης μειώνοντας τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα. Το πιπέρι καγιέν μειώνει επίσης την συσσώρευση αιμοπεταλίων και αυξάνει την ινωδολυτική δραστηριότητα. Η κατανάλωση πιπεριού καγιέν οδηγεί σε μειωμένα περιστατικά καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον, θεωρούνταν, εδώ και αιώνες, χρήσιμο για διάφορες παθήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως στομαχόπονοι. Εξακολουθεί να χρησιμοποιείται στη παραδοσιακή ιατρική ως τονωτικό του κυκλοφορικού συστήματος (ουσία που πιστεύεται ότι βελτιώνει την κυκλοφορία). Τρίβοντας το στο δέρμα, το καγιέν είναι ένα παραδοσιακό, καθώς και σύγχρονο, φάρμακο για τους ρευματικούς πόνους και

την αρθρίτιδα λόγω αυτού της αντιφλεγμονώδους δράση. Θεωρείται θερμογόνο, που σημαίνει ότι μπορεί να "ανεβάσει" το μεταβολισμό και να βοηθήσει στην απώλεια βάρους. Επίσης, πολλοί άνθρωποι καταναλώνουν πολλές καυτερές πιπεριές σε τροπικά κλίματα καθώς το χαρακτηριστικό «κάψιμο» προκαλεί εφίδρωση, η οποία στην πραγματικότητα βοηθά το άτομο να δροσιστεί. Τα κύρια χημικά συστατικά του καγιέν περιλαμβάνουν καψαϊκίνη, καψανθίνη, β-καροτένιο, φλαβονοειδή και βιταμίνη C. Το καγιέν θεωρείται προκαλεί στον εγκέφαλο την έκκριση περισσότερων ενδορφινών. Επίσης, βοηθά στην ανακούφιση από τον πόνο, όχι μόνο λόγω των ιδιοτήτων του που ενισχύουν τις ενδορφίνες, αλλά διότι όταν αραιώνεται και χρησιμοποιείται τοπικά βοηθά στο να εμποδίσει τη μετάδοση της ουσίας P, η οποία μεταφέρει μηνύματα πόνου στον εγκέφαλο (Kulkarni, Suryvanshi, Auti, & Gaikwad, 2017).

### **1.3 Κίνητρο και Στόχοι της Διπλωματικής εργασίας**

Είναι κοινός τόπος ότι τα μπαχαρικά έχουν καθημερινή παρουσία στην διατροφή μας. Πραγματικά είναι πολύ λίγα τα τρόφιμα στα οποία δεν προσθέτονται μπαχαρικά, συνήθως λίγο πριν την ολοκλήρωσή τους. Όλα τα τρόφιμα, περισσότερο ή λιγότερο, περιέχουν νερό. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι τα μπαχαρικά που έχουν προστεθεί σε ένα τρόφιμο και έχουν διαλυθεί στην υδατική φάση τους εκχυλίζονται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, π.χ. θερμοκρασία, pH, αλάτι. Το ερώτημα που ανακύπτει είναι: τα μπαχαρικά που περισσότερο η λιγότερο εκχυλίζονται έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων;

**Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας** είναι η μελέτη της επίδρασης υδατικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών τα οποία έχουν εκχυλισθεί υπό διαφορετικές συνθήκες (α) θερμοκρασίας (60, 80, 100°C), (β) χρόνου εκχύλισης (5, 30, 60 min), (γ) pH υδατικού εκχυλίσματος (4.5, 5.5, 6.5) σε (δ) τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ( 5.0, 3.1 και 1.2 v/v) επί τριών διαφορετικών παθογόνων βακτηρίων *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

## Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

### 2.1 Μπαχαρικά, μορφές και σύνθεση

Τα μπαχαρικά και τα βότανα συλλέγονται από διαφορετικά μέρη του φυτού. Τα βότανα είναι τα φυλλώδη υλικά του φυτού ενώ τα μπαχαρικά είναι οι σπόροι, ο φλοιός, τα φρούτα/μούρα, οι λοβοί και τα άνθη του φυτού (Embuscado, 2018). Τα μπαχαρικά είναι διαθέσιμα σε πολλές μορφές: φρέσκα, αποξηραμένα ή κατεψυγμένα, ολόκληρα, αλεσμένα, θρυμματισμένα, πουρές, ως πάστες, εκχυλίσματα ή αφεψήματα. Κάθε μορφή έχει τις αντίστοιχες ιδιότητές και μειονεκτήματα. Η μορφή που θα επιλέξει ο ειδικός ανάπτυξης προϊόντων διατροφής θα εξαρτηθεί από τη συγκεκριμένη εφαρμογή, τις παραμέτρους επεξεργασίας και την προσδοκώμενη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Raghavan, 2006)

- **Φρέσκα ολόκληρα μπαχαρικά:** Οι καταναλωτές ή/και οι μάγειρες/σες χρησιμοποιούν συχνά φρέσκα μπαχαρικά για να δώσουν μια «φρέσκια» ή «πικάντικη» γεύση, πολύχρωμη εμφάνιση, και γενικά ένα ικανοποιητικό οπτικό αποτέλεσμα στα τρόφιμα. Η φρέσκια γεύση του τζίντζερ ή της πιπεριάς τσίλι οφείλεται στο συνολικό «flavor», άρωμα και υφή. Σε ένα ολόκληρο μπαχαρικό, τα χημικά συστατικά που παρέχουν τις γεύσεις ποικίλλουν στις συγκεντρώσεις σε διαφορετικές περιοχές του ολόκληρου μπαχαρικό, π.χ. στις πιπεριές τσίλι, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των πικάντικων ενώσεων βρίσκονται στα εσωτερικά τμήματα, όπως στις φλέβες και στους σπόρους (Raghavan, 2006).

- **Αποξηραμένα μπαχαρικά:** Τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνται συχνά στις αποξηραμένες μορφές τους επειδή δεν υπόκεινται σε εποχιακή διαθεσιμότητα, και μετά την ξήρασή τους έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και χαμηλότερο κόστος. Αυτές οι αποξηραμένες μορφές χρησιμοποιούνται συχνότερα σε μεταποιημένα προϊόντα ή για χονδρική χρήση. Τα αποξηραμένα μπαχαρικά μπορεί να είναι ολόκληρα, λεπτά ή χοντροαλεσμένα, σπασμένα ή σε σωματίδια διαφόρων μεγεθών. Τα μπαχαρικά κονιοποιούνται με την άλεση σε σωματίδια διαφόρων μεγεθών. Επίσης, η κονιοποίηση τους δημιουργεί γρήγορη κίνηση του αέρα και θερμότητα που με τη σειρά τους δημιουργούν διάχυση μέρος των πτητικών ελαίων και ακόμη, αλλάζουν κάποιες φυσικές γευστικές νότες μέσω της επαφής με το περιβάλλον και της επερχόμενης οξείδωσης (Raghavan, 2006).

- **Εκχυλίσματα μπαχαρικών:** Τα εκχυλίσματα μπαχαρικών είναι μορφές μπαχαρικών με υψηλή συγκέντρωση συγκεκριμένων ενώσεων, όπως πτητικά και μη πτητικά συστατικά, που δίνουν σε κάθε μπαχαρικό τη χαρακτηριστική του γεύση. Τα πτητικά συστατικά

των εκχυλισμάτων μπαχαρικών, που αναφέρονται επίσης ως αιθέρια έλαια, χαρακτηρίζουν το συγκεκριμένο άρωμα του μπαχαρικού. Τα περισσότερα μπαχαρικά οφείλουν τον ιδιαίτερο «φρέσκο» χαρακτήρα τους στη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο που γενικά κυμαίνεται από 1% έως 5% αλλά ακόμη και μέχρι 15% σε ορισμένα μπαχαρικά. Τα μη πτητικά περιλαμβάνουν σταθερά έλαια, κόμμεα, ρητίνες, αντιοξειδωτικά και υδρόφιλες ενώσεις και συμβάλλουν στη γεύση του μπαχαρικού. Ορισμένα μπαχαρικά εκτιμώνται για τη μασητικότητα και το χρώμα τους, όπως το μαύρο πιπέρι (Raghavan, 2006). Τα εκχυλίσματα μπαχαρικών έρχονται ως υγρά τα οποία συνήθως περιλαμβάνουν αιθέρια έλαια, ελαιόρητίνες ή ως ξηρά ενθυλακωμένα έλαια (αποξηραμένες με ψεκασμό σκόνες και ξηρά διαλυτά) (Raghavan, 2006). Η γεύση ενός μπαχαρικού όπως γλυκό, πικάντικο, ξινό ή αλμυρό, οφείλεται σε πολλά διαφορετικά χημικά συστατικά όπως εστέρες, φαινόλες, οξέα, αλκοόλες, χλωρίδια, αλκαλοειδή, ή σάκχαρα. Η γλυκύτητα οφείλεται σε εστέρες και σάκχαρα, η όξινη αίσθηση σε οργανικά οξέα (κιτρικό, μηλικό, οξικό ή γαλακτικό), η αλμυρή γεύση σε κατιόντα χλωριδίων και κιτρικών, η στυπτικότητα σε φαινόλες και τανίνες και η πικρή γεύση στα αλκαλοειδή (καφεΐνη και γλυκοσίδες), και τέλος, το πικάντικο στα οξέο-αμίδια, καρβονύλια, θειοαιθέρες και ισοθειοκυανικά (Raghavan, 2006).

Η αναλογία πτητικών προς μη πτητικά ποικίλλει μεταξύ των μπαχαρικών που προκαλούν διαφοροποιήσεις στο άρωμα και διαφορές μέσα σε ένα γένος, ακόμη και σε μια ποικιλία. Μέσα στο γένος *Allium*, για παράδειγμα, υπάρχουν διαφορές στη γεύση μεταξύ σκόρδου, κρεμμυδιού, σχοινόπρασου και πράσο, που διαφέρουν σε αυτή την αναλογία. Διαφέρουν ανάλογα με το είδος μπαχαρικών, την πηγή τους, τις περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας και συγκομιδής, αποθήκευσης και μεθόδους προετοιμασίας. Ακόμη και οι τεχνικές εκχύλισης μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά συστατικά, όπως απώλεια πτητικών υψηλού βρασμού και εκχύλιση μη πτητικών συστατικών (Raghavan, 2006).

Τα μη πτητικά σε ένα μπαχαρικό ποικίλλουν επίσης ανάλογα με την ποικιλία, την προέλευση, τις συνθήκες περιβαλλοντικής ανάπτυξης, το στάδιο ωριμότητας και τις συνθήκες μετά τη συγκομιδή. Για παράδειγμα, οι διαφορετικές πιπεριές τσίλι που ανήκουν στην ομάδα *Capsicum*, όπως habaneros, cayennes, jalapenos, ή roblanos, όλα δίνουν ξεχωριστές γευστικές αντιλήψεις, ανάλογα με την αναλογία από τα διάφορα μη πτητικά, τα καψαϊκιοειδή (Raghavan, 2006).

### **2.1.1 Καυτερά Μπαχαρικά – Πιπέρι και Πιπεριές**

Τα κυριότερα ίσως μπαχαρικά – τουλάχιστον από πλευράς όγκου παραγωγής και διακίνησης – που έχουν «καυτερή» γεύση είναι το πιπέρι και το πιπέρι καγιέν, τα οποία συχνά από τον μέσο καταναλωτή πιστεύεται ότι ανήκουν στην ίδια Οικογένεια φυτών, ενώ δεν ισχύει κάτι τέτοιο.

#### 2.1.1.1 Πιπέρι

Το πιπέρι (*Piper nigrum*) είναι γνωστό ως ο βασιλιάς των μπαχαρικών. Απαιτεί μια συγκεκριμένη θερμοκρασία και βροχοπτώσεις για την ανάπτυξή του. Το μέρος που χρησιμοποιείται είναι τα μικρά σταφυλόμορφα μούρα και τα αποξηραμένα μέρη και καρποί του πολυετούς φυτού πιπεριού. Υπάρχουν ανάλογα με την επεξεργασία και το στάδιο της συγκομιδής μαύρο, πράσινο, κόκκινο, και λευκό πιπέρι (Εικόνα 2) (Oyemitan, 2017). Το μαύρο πιπέρι ανήκει στην Οικογένεια Piperaceae και αποτελείται από περίπου 8 γένη και 3000 είδη. Είναι ευρέως διαδεδομένο στα θερμά τροπικά και υποτροπικά κλίματα και είναι ιδιαίτερα στη Νότια και Κεντρική Αμερική και στην Κεντρική Ασία και ιδιαίτερα στην Ινδία. Η επιστημονική ονομασία *Piper* και η κοινή ονομασία "πιπέρι" προήλθαν από τον σανσκριτικό όρο "pippali", που αναφέρεται στο «μαύρο πιπέρι», *Piper nigrum*. Το *Piper* είναι το ονομαστικό γένος της οικογένειας Piperaceae (Oyemitan, 2017)



**Εικόνα 4:**

Φυτό και καρπός πιπεριού

(Πηγή: <https://balconygardenweb.com/where-does-black-pepper-come-from/>)

Το μαύρο, το λευκό και το πράσινο πιπέρι, προέρχονται από τους καρπούς του *Piper nigrum* L. Το μαύρο πιπέρι συγκομίζεται πριν φτάσει σε πλήρη ωριμότητα, ενώ το πράσινο πιπέρι παράγεται από άγουρους πράσινους καρπούς. Επειδή προέρχεται από άγουρα φρούτα, το πράσινο πιπέρι έχει μια φρέσκια, βοτανική γεύση. Σε αντίθεση, το λευκό πιπέρι παράγεται από πλήρως ώριμους καρπούς πιπεριού, ακολουθώντας την αφαίρεση της

εξωτερικής φλούδας τους. Το λευκό πιπέρι συνήθως περιγράφεται ότι έχει πιο ήπια γεύση από το μαύρο πιπέρι. Χαρακτηριστικά όπως η γεύση και οξύτητα ποικίλλουν μεταξύ των ποικιλιών. Ωστόσο, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη χαρακτηριστική πικάντικη γεύση και το άρωμα του πιπεριού (Liu, Zeng, Wang, Ou, Tan, & Gu, 2013).

### 2.1.1.2 Τσίλι και πιπέρι καγιέν

Το «πιπέρι» καγιέν και το τσίλι ανήκουν στο είδος *Capsicum annuum*. Το *Capsicum* ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae*, η οποία περιλαμβάνει επίσης την ντομάτα, τη μελιτζάνα και την πατάτα (Pickersgill, 2003).



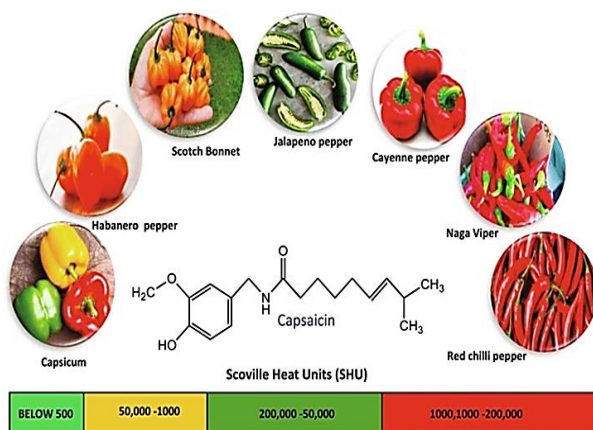
**Εικόνα 5:** Κόκκινο, Πράσινο, Κόκκινο και Λευκό πιπερι  
ΠΗΓΗ: <https://www.imageprofessionals.com/en/images/11263543-Variou-peppercorns-black-white-pink-green>

Το *Capsicum* είναι ένας ετήσιος, πολυετής ανθοφόρος θάμνος ευρέως γνωστός για τους καρπούς του, που χρησιμοποιούνται συνήθως φρέσκοι ή ως ξηρή σκόνη (πιπεριές τσίλι ή πιπέρι καγιέν). Επί του παρόντος, το γένος αυτό πιστεύεται ότι αποτελείται από 27 είδη, 5 από τα οποία είναι «εξημερωμένα» και χρησιμοποιούνται ως φρέσκα λαχανικά και μπαχαρικά: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum*



*frutescens* και *Capsicum pubescens*, μαζί με περίπου 3000 ποικιλίες. Το *Capsicum* παρουσιάζει εκτεταμένες μορφολογικές παραλλαγές, ιδίως όσον αφορά το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα των καρπών (Y.A. Kulkarni, 2017). Γενικά, οι πιπεριές καταναλώνονται ωμές (πιπεριές καμπάνας) ή σε σκόνη ως μπαχαρικό (πιπεριά τσίλι) ή ως χρωστική ουσία (πάπρικα). Οι καρποί πιπεριάς κυμαίνονται από γλυκούς, μεγάλους και χοντρούς, όπως οι πράσινες πιπεριές, έως λεπτές και καυτερές ποικιλίες, όπως οι πιπεριές καγιέν. Οι καρποί μπορεί να έχουν διαφορετικά χρώματα, από πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί που αντιστοιχούν σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. και ικανότητες σύνθεσης καροτενοειδών ή χλωροφυλλών. Όσον αφορά τη γεύση, αυτό το λαχανικό κυμαίνεται από γλυκές (μη καυστικές) ποικιλίες, όπως η πάπρικα, έως τα καυτερά είδη, όπως το τσίλι ή το καγιέν (Baenas, Belovic, Moreno, & Garcia-Viguera, 2018).

Το πιπέρι καγιέν είναι ένα είδος *Capsicum annuum* και συγγενεύει στενά με τις πιπεριές «καμπάνα» και τις «jalapenos». Η παραλαβή τους γίνεται από ένα υποτροπικό έως τροπικό φυτό που βρίσκεται συνήθως στη Νότια Αμερική, οι πιπεριές αυτές έχουν μήκος 10 έως 25 εκατοστά και έχουν κόκκινο χρώμα. Η ονομασία «Cayenne» προέρχεται από την πόλη Cayenne στη Γαλλική Γουινέα, από όπου προέρχεται η πιπεριά (δηλαδή οι πρώτες καταγεγραμμένες χρήσεις) (Baenas, Belovic, Moreno, & Garcia-Viguera, 2018).



**Εικόνα: 6** | Scoville Heat Units (SHU) για είδη πιπεριών *Capsicum* (Ammara Waheeda, 2021)

Οι καρποί *Cayenne* (πιπεριές) γενικά αποξηραίνονται και αλέθονται για να παρασκευαστεί η σκόνη *Cayenne*. Στην πραγματικότητα το πιπέρι καγιέν διατίθεται στην αγορά κυρίως ως ψιλοαλεσμένη σκόνη. Η πικάντικη γεύση προέρχεται από το ενεργό συστατικό τους, την καψαϊκίνη. Θεωρούνται ως μέτρια «πικάντικες» πιπεριές και έχουν τιμή που κυμαίνεται μεταξύ 30.000 – 50.000 μονάδες καυστικότητας Scoville (SHU). Η σκόνη τσίλι είναι ένα μίγμα μπαχαρικών με καυτερή γεύση και κόκκινο χρώμα. Όπως υποδηλώνει το

όνομα του, το κύριο μπαχαρικό στο μίγμα σκόνης τσίλι, είναι οι πιπεριές τσίλι. Στο μίγμα σκόνης τσίλι, μπορεί να περιέχεται μία ή περισσότερες πιπεριές τσίλι, και μερικές φορές προσθήκη και άλλων μπαχαρικών όπως ρίγανη, κύμινο και σκόνη σκόρδου. Ορισμένες σκόνες τσίλι μπορεί να περιλαμβάνουν και πιπεριές καγιέν. Επιπλέον, η καυστικότητα της σκόνης τσίλι εξαρτάται από το μίγμα μπαχαρικών και πιπεριών που χρησιμοποιούνται. Γενικά, οι διαφορές τους συνοψίζονται στις εξής: Η σκόνη πιπεριού καγιέν είναι μια καυτερή σκόνη τσίλι που παρασκευάζεται ειδικά από πιπέρι καγιέν, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Capsicum*, ενώ η σκόνη τσίλι είναι ένα πικάντικο μπαχαρικό το οποίο παρασκευάζεται από αλεσμένες αποξηραμένες κόκκινες πιπεριές τσίλι, στην οποία μπορούν να προστεθούν και άλλα φυτικά υλικά. Επιπλέον, το πιπέρι καγιέν είναι περίπου οκτώ φορές πιο καυτερό από τη σκόνη τσίλι (Pickersgill, 2003).

Μια ευρέως διαδεδομένη χρησιμοποιούμενη μέτρηση της θερμότητας για τις πιπεριές τσίλι είναι η SHU (Scoville Heat Units). Αυτή η μέτρηση είναι η υψηλότερη αραιώση ενός εκχυλίσματος πιπεριάς τσίλι στην οποία η θερμότητα μπορεί να ανιχνευθεί από την ανθρώπινη γευστική δοκιμή. Βέβαια, έχουν αναπτυχθεί και πιο ακριβείς μέθοδοι οργάνων μετά τη δοκιμή Scoville (1912), όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Bosland, Coon, & Reeves, 2012).

## **2.2 Κύριες βιοενεργές ενώσεις βοτάνων και μπαχαρικών**

Οι βιοενεργές ενώσεις των μπαχαρικών και βοτάνων, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που εκτελούν σημαντικές λειτουργίες στα φυτά. Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται στα φυτά, για να λειτουργήσουν ως προστατευτικά (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

Τα φλαβονοειδή π.χ. είναι βιοδραστικές ουσίες που προστατεύουν το φυτό από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται κατά τη φωτοσύνθεση (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

Τα αλκαλοειδή από την άλλη πλευρά, αποκρούουν τις επιθέσεις εντόμων ενώ τα τερπενοειδή προσελκύουν επικονιαστές. Τα φυτά παράγουν αυτές τις ουσίες για να αμυνθούν έναντι διαφόρων παραγόντων του περιβάλλοντος για την επιβίωσή τους και την προσαρμογή τους (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Τα φυτά έχουν μια σχεδόν ατελείωτη δυνατότητα να συνθέτουν κυρίως φαινολικές αρωματικές ενώσεις ή τις

υποκατεστημένες με οξυγόνο μορφές τους. Η πλειοψηφία αυτών των ενώσεων είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και περίπου 12.000 έχουν ήδη απομονωθεί. Ωστόσο, αυτός ο αριθμός αντιστοιχεί στο 10% του συνολικού αριθμού μεταβολιτών. Αυτές οι ουσίες, όπως για παράδειγμα τα τερπενοειδή, δίνουν στα φυτά τη χαρακτηριστική τους μυρωδιά, ενώ οι κινόνες και οι τανίνες σχετίζονται με τις φυτικές χρωστικές ουσίες. Οι περισσότεροι από αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες δίνουν στα φυτά τη γεύση τους, όπως τα τερπενοειδή στο τσίλι (Tariq Bor, 2016). Οι κύριες ομάδες βιοδραστικών ενώσεων φυτών ταξινομούνται με βάση τις λειτουργίες, τις μοριακές δομές ή τις πηγές τους.

Οι φαινολικές ενώσεις και τα флаβονοειδή περιλαμβάνουν δομικές λειτουργίες σε διαφορετικούς υποστηρικτικούς ή προστατευτικούς ιστούς, συμμετοχή στον αμυντικό μηχανισμό των φυτών και τους επιτρέπουν να αντιμετωπίζουν δραστικά μικροοργανισμούς, έντομα και φυτοφάγα ζώα, ελκύουν τους επικονιαστές και τα ζώα διασποράς σπόρων, προστατεύουν από το υπεριώδες (UV) φως και γενικά από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτών και του περιβάλλοντος τους. Υπάρχουν και άλλες λειτουργίες των βιοδραστικών ουσιών στα φυτά, οι οποίες δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί ή εξηγηθεί πλήρως (Embuscado, 2018). Οι κυριότερες βιοδραστικές ουσίες είναι:

▪ **Φαινόλες και φαινολικά οξέα:** Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από έναν μόνο υποκατεστημένο φαινολικό δακτύλιο (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Οι φαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα αρωματικών ενώσεων που αποτελείται από:

- флаβόνες, флаβονοειδή και флаβονόλες που περιέχουν μια καρβονυλική ομάδα,
- κινόνες με καρβονυλικές ομάδες,
- τανίνες,
- πολυμερείς φαινολικές ουσίες,
- κουμαρίνες,
- φαινολικές ενώσεις με συντηγμένες ομάδες βενζολίου και πυρόνης.

Η τελευταία έχει καλές αντιμικροβιακές δράσεις και χρησιμεύει ως αμυντικός μηχανισμός των φυτών κατά των παθογόνων μικροοργανισμών. Η αναστολή των μικροοργανισμών από φαινολικές ενώσεις μπορεί να οφείλεται σε στέρηση σιδήρου ή σε δεσμούς υδρογόνου με ζωτικές πρωτεΐνες, όπως τα μικροβιακά ένζυμα. Οι φαινόλες είναι ευάλωτες στον πολυμερισμό μέσω αντιδράσεων οξειδωσης. Ως εκ τούτου, ένας σημαντικός παράγοντας που διέπει την τοξικότητα τους είναι το μέγεθος του πολυμερισμού τους. Η

οξείδωση και η συμπύκνωση μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την μικροβιακή ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017). Το κινναμικό και το καφεϊκό οξύ είναι κοινά υποκατάστατα μίας μεγάλης ομάδας ενώσεων που προέρχονται από φαινυλοπροπάνιο. Το εστραγκόν και το θυμάρι, αποτελούνται από καφεϊκό οξύ και είναι αποτελεσματικά κατά των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων. Η κατεχόλη και η πυρογαλλόλη είναι υδροξυλιωμένες φαινόλες που αποδείχθηκε ότι είναι τοξικές σε μικροοργανισμούς (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

▪ **Κινόνες:** Οι κινόνες είναι έγχρωμες ενώσεις με δύο υποκαταστάσεις κετονών στον αρωματικό δακτύλιο. Πρόκειται για μια άλλη σημαντική ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με πιθανές αντιμικροβιακές ιδιότητες. Παρέχουν μια πηγή σταθερών ελεύθερων ριζών και συμπλέκονται μη αναστρέψιμα με πυρηνόφιλα αμινοξέα σε μικροβιακές πρωτεΐνες οδηγώντας σε απώλεια των λειτουργιών τους. Οι ανθρακινόνες ειδικότερα, που χαρακτηρίζονται από φάσμα αντιβακτηριακών δράσεων, βασίζουν τη δράση τους στην αδρανοποίηση και την απώλεια λειτουργίας βακτηριακών πρωτεϊνών, όπως οι συγκολλητίνες, τα πολυπεπτίδια του κυτταρικού τοιχώματος, και τα ένζυμα που συνδέονται με τη μεμβράνη, οδηγώντας κατά συνέπεια στο θάνατο των μικροοργανισμών (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017). Οι κινόνες είναι υπεύθυνες για το μαύρισμα σε αποφλοιωμένα φρούτα και λαχανικά. Το συνένζυμο Q (ουβικινόνη) έχει σημαντικό ρόλο στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα θηλαστικά. Επομένως, οι κινόνες έχουν δυνητικά μεγάλες αντιμικροβιακές δυνατότητες. Επιπλέον, οι κινόνες μπορούν επίσης να κάνουν μη διαθέσιμο το υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς. Οι ανθρακινόνες έχουν αντιβακτηριακή δράση (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

▪ **Φλαβόνες, φλαβονοειδή και φλαβονόλες:** Οι φλαβόνες έχουν φαινολική δομή που περιέχει μια ομάδα καρβονυλίου. Οι φλαβονόλες έχουν επιπλέον 3-υδροξυλομάδες. Τα φλαβονοειδή είναι επίσης υδροξυλιωμένες φαινολικές ενώσεις, αλλά υπάρχει μια μονάδα C6-C3 συνδεδεμένη στον αρωματικό δακτύλιο (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Συνολικά, υπάρχουν 14 κατηγορίες φλαβονοειδών, οι οποίες διαφοροποιούνται με βάση τη χημική φύση και την θέση των υποκαταστών στους διαφόρους δακτυλίους. Συντίθεται από τα φυτά ως απάντηση σε μικροβιακές λοιμώξεις και συχνά κρίνονται αποτελεσματικά *in vitro* ως αντιμικροβιακή ουσία έναντι ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017). Τα φλαβονοειδή έχουν αντιμικροβιακή δράση μέσω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και τα κυτταρικά τοιχώματα,

όπως εξηγείται παραπάνω για τις κινόνες. Οι κατεχίνες, έχει αποδειχθεί αναστέλλουν, μεταξύ άλλων, τα βακτήρια *Vibrio cholerae* και *Shigella* spp. Επίσης, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι ορισμένων ιών όπως π.χ. HIV, συγκυτιακός ιός του αναπνευστικού (RSV), ιός απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1), ιός πολιομυελίτιδας τύπου 1, και του ιού της γρίπης τύπου 3. Ως παράδειγμα αξίζει να αναφερθεί η εσπερετίνη η οποία μειώνει την ενδοκυτταρική αντιγραφή των ιών καθώς και η γκαλανγκίνη έχει ευρύτατη αντιμικροβιακή δράση κατά Gram θετικών βακτηρίων, μυκήτων και ιών (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

▪ **Τανίνες:** Είναι μια ομάδα πολυμερών υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων που έχουν την ικανότητα «μαυρίσματος του δέρματος», δηλαδή, σε χημικές αντιδράσεις με ενώσεις σιδήρου, σχηματίζεται ένα μωβ, ιώδες ή μαύρο ίζημα και όταν συνδυάζονται με νερό, παράγονται κολλοειδή διαλύματα και υπό την επίδραση οξυγόνου, οξειδώνονται και αποκτούν σκούρο χρώμα (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Οι τανίνες είναι είτε υδρολύσιμες είτε συμπυκνωμένες. Οι υδρολυόμενες τανίνες βασίζονται στο γαλλικό οξύ και οι συμπυκνωμένες ταννίνες, που συχνά ονομάζονται προανθοκυανιδίνες, βασίζονται σε μονομερή φλαβονοειδή, παράγωγα φλαβονών ή μονάδες κινίνης. Υδρολυόμενες και συμπυκνωμένες τανίνες, που προέρχονται από φλαβονόλες, ασκούν αντιμικροβιακή δράση μέσω ιδιοτήτων αντιπεροξειδωσης, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του ουρουπαθόγνου *E. coli* (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017). Τανίνες υπάρχουν στο φλοιό, το ξύλο, τα φύλλα, τους καρπούς και τις ρίζες των φυτών. Οι τανίνες μπορούν επίσης να συνδεθούν με πολυσακχαρίτες και μπορούν να συνδεθούν τοξικά με νηματώδεις μύκητες, ζυμομύκητες και βακτήρια (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

▪ **Κουμαρίνες:** Οι κουμαρίνες είναι φαινολικές ουσίες που αποτελούνται από τηγμένο βενζόλιο και δακτυλίους α-πυρόνης. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον 1300 διαφορετικές κουμαρίνες. Οι κουμαρίνες έχουν αντιθρομβωτική, αντιφλεγμονώδη και αγγειοδιασταλτική δράση (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Έχουν χαρακτηριστική οσμή και αρκετές από αυτές έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τα υδροξυκινναμωνικά οξέα που σχετίζονται με τις κουμαρίνες, φαίνεται να είναι ανασταλτικά για τα Gram θετικά βακτήρια (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017). Οι κουμαρίνες μπορεί επίσης να έχουν αντικαταστάσιμα αποτελέσματα και είναι εξαιρετικά τοξικά στα τρωκτικά. Ορισμένες από τις ενώσεις κουμαρίνης έχουν αντιμικροβιακή δράση επιδράσεις όπως ανασταλτική δράση κατά του μύκητα *C. albicans* και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της κολπικής καντιντίασης.

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα μπορούν να αναστείλουν τα θετικά κατά Gram βακτήρια και τις φυτοαλεξίνες και θεωρείται ότι έχουν αποτελέσματα κατά των μυκήτων (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

▪ **Τερπένια και αιθέρια έλαια:** Τα αιθέρια έλαια είναι υπεύθυνα για τη μυρωδιά των φυτών και είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι εξαιρετικά εμπλουτισμένοι σε ουσίες που ονομάζονται τερπένια (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Τα τερπένια, που αναφέρονται επίσης ως ισοπρενοειδή και τα παράγωγα τους που περιέχουν πρόσθετα στοιχεία, συνήθως οξυγόνο, ονομάζονται τερπενοειδή (Ταμοκου, Mbaveng, & Kuete, 2017). Αυτά τα τερπένια είναι βασισμένοι σε δακτυλίου ισοπροπενίου. Η γενική χημική τους διαμόρφωση είναι  $C_{10}H_{16}$  και οι υποκατηγορίες τους είναι διτερπένια, τριτερπένια, τετρατερπένια, ημιτερπένια και σεσκιτερπένια. Όταν αυτές οι ενώσεις αποτελούνται, κυρίως από οξυγόνο, ονομάζονται τερπενοειδή και αυτά συντίθενται από οξικές μονάδες και μοιράζονται την προέλευσή τους με λιπαρά οξέα. Τα τερπενοειδή είναι χημικά σε κυκλική μορφή και εκτεταμένα διακλαδισμένα. Πολύ γνωστό τερπενοειδές είναι η μεθανόλη και η καμφορά (μονοτερπένια) και η φαρνεσόλη και αρτεμισίνη (σεσκιτερπένια). Τα τερπενοειδή είναι αποτελεσματικά ενάντια στα βακτήρια, τους μύκητες, τους ιούς και τα πρωτόζωα. Το βετουλινικό οξύ μπορεί να αναστείλει τον HIV. Ο τρόπος δράσης των τερπενίων δεν είναι ακριβώς κατανοητός, αλλά θεωρείται ότι διαταράσσουν τη μεμβράνη από τη δράση των λιπόφιλων ενώσεων. Τα τερπενοειδή των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο *L. monocytogenes* (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Ενδιαφέρουσα δράση έχει η καψαϊκίνη είναι ένα αναλγητικό τερπενοειδές που υπάρχει στις τσίλι πιπεριές και εμπλέκεται σε μια σειρά βιολογικών δραστηριοτήτων που σχετίζονται με το νευρικό, καρδιαγγειακό και πεπτικό συστήματα των ανθρώπων. Η καψαϊκίνη μπορεί να αναστείλει πολλά διαφορετικά βακτήρια και έχει βακτηριοκτόνα αποτελέσματα κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

▪ **Αλκαλοειδή:** Τα αλκαλοειδή είναι ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου και εμφανίζουν συνήθως αντιμικροβιακή δράση. Τα διτερπενοειδή αλκαλοειδή έχουν αντιμικροβιακή δράση. Η σολαμαργίνη είναι ένα γλυκοαλκαλοειδές και μπορεί να είναι χρήσιμο κατά του HIV μαζί με άλλα αλκαλοειδή. Η βερβερίνη είναι μία από μια σημαντική ομάδα αλκαλοειδών που είναι δραστική ενάντια στα τρυπανοσώματα (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016). Είναι δραστικά σε διάφορους μικροοργανισμούς στοχεύοντας την πολυμεράση

RNA, τη γυράση και την τοποϊσομεράση IV, καθώς και τα νουκλεϊκά οξέα (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017).

- **Λεκτίνες και πολυπεπτίδια:** Πεπτίδια με ανασταλτική δράση έναντι μικροοργανισμών ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1942. Τα πεπτίδια αυτά έχουν γενικά θετικά φορτία και αποτελούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο τρόπος δράσης τους μπορεί να εξηγηθεί από το σχηματισμό καναλιών ιόντων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη.

**Πίνακας 1** | Μηχανισμοί δράσης βιοενεργών ενώσεων (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017)

Class	Mechanism of action
Alkaloids	Intercalate into cell wall and DNA
Terpenes	Membrane disruption
Phenols polyphenols	Substrate deprivation, metal ion complexation, membrane disruption, bind to adhesins, complex with cell wall, enzymes inhibition
Flavonoids	Inactivate enzymes, complex with cell wall, bind to adhesins
Quinones	Bind to adhesins, complex with cell wall, enzymes inhibition
Tannins	Bind to proteins, enzyme inhibition, substrate deprivation, complex with cell wall, metal ion complexation
Coumarins	Interaction with eucaryotic DNA

Οι θειονίνες είναι συνήθως παρούσες στο κριθάρι και το σιτάρι και είναι τοξικά κατά των ζυμών, των Gram-αρνητικών και των θετικά κατά Gram βακτηρίων, ενώ οι θειονίνες AX1 και AX2 είναι μόνο αποτελεσματικές κατά των μυκήτων. Η φαβατίνη είναι ένα πεπτίδιο που απομονώνεται από τη φάβα και αναστέλλει τους *E. coli*, *Ps. aeruginosa* και *Ent. hirae* (Bor, Aljaloud, Gyawali, & Ibrahim, 2016).

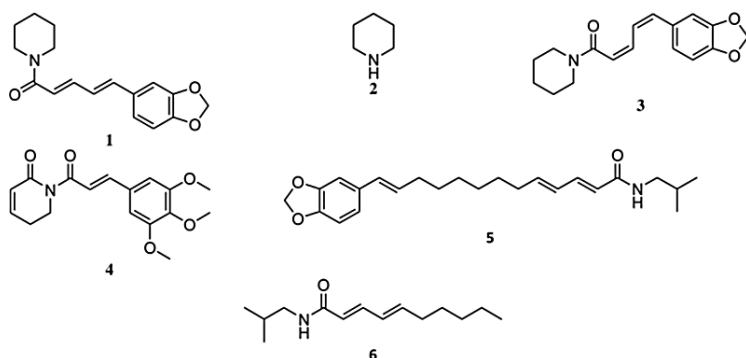
### 2.2.1 Φυτοχημικά συστατικά επιλεγμένων μπαχαρικών

Στην ενότητα αυτή δίνεται μια συνοπτική παρουσίαση των βιοενεργών επιλεγμένων μπαχαρικών και ειδικότερα των «καυτερών» - πιπέρια και πιπεριές.

- **Μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum*):** Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό των χημικών συνθέσεων του γένους *piper*. Οι μελέτες έχουν καλύψει την εκχύλιση, την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό πολυάριθμων ενώσεων από τα πτητικά και μη συστατικά. Διάφορα μέρη των ειδών *Piper*, ιδίως οι καρποί του μαύρου πιπεριού, αναφέρεται ότι περιέχουν έως και 2,5% αιθέρια έλαια και 9% αλκαλοειδή μεταξύ πολλών άλλων συστατικών. Η πρώτη ένωση που απομονώθηκε από το *P. nigrum* είναι η πιπερίνη, η οποία είναι και υπεύθυνη για την καυστικότητα των πολυάριθμων ειδών *piper*. Από το γένος

pipeer απομονώθηκαν 145 αλκαλοειδή ή αμίδια, 47 από αυτά ήταν λιγνάνες, 70 νεολιγνάνες και 89 ήταν τερπένια (Oyemitan, 2017).

Όσο αφορά τα μη πτητικά συστατικά του γένους pipeer, εκχύλιση με διαφόρους διαλύτες οδήγησε στην απομόνωση αρκετών μη πτητικών δευτερογών μεταβολιτών, όπως αλκαλοειδή, τανίνες, σαπωνίνες, υδατάνθρακες, σαπωνίνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, στερόλες, φλαβονοειδή, φαινόλες, ανθρακινόνες κ.λπ. Αυτές οι ενώσεις έχουν αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνες για όλες τις δραστηριότητες που σχετίζονται με το γένος pipeer. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί αφορούν τα είδη που απαντώνται στην Ανατολική, Κεντρική και Δυτική Αφρική και περιλαμβάνουν τα *P. guineese*, *P. nigrum*, *P. betle* και *P. cabense*. Οι συνυθέστερες ενώσεις που απομονώνονται από τα διάφορα είδη pipeer είναι η πιπερίνη (1) και τα ισομερή της (πιπεριδίνη (2), χαβικίνη (3), πιπλαρτίνη (4) γκινεσενσιμίδιο, γκινεσενσίνη (5), πελλιτορίνη (6) κ.λπ. Η πιπερίνη είναι ένα αλκαλοειδές που απομονώθηκε από τους καρπούς του *P. nigrum* το 1819, και βρίσκεται σε όλα τα είδη του γένους pipeer σε διαφορετική συγκέντρωση (Oyemitan, 2017).

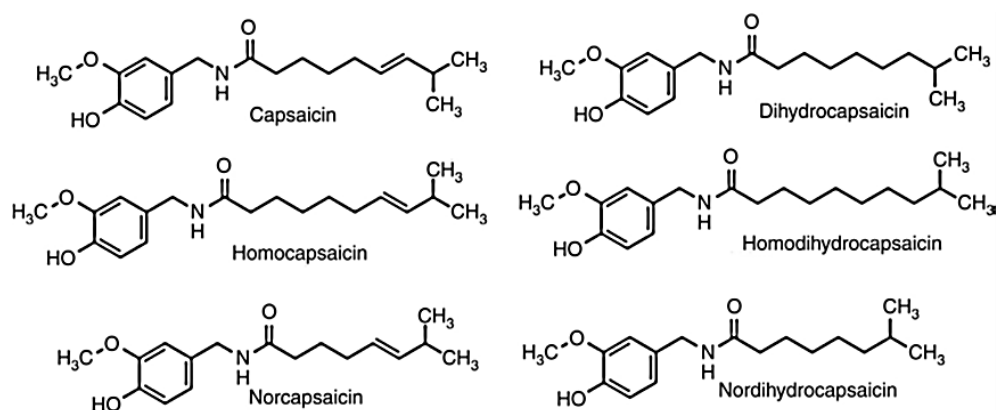


**Εικόνα 7:** Ορισμένες μη πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν από διάφορα είδη του αφρικανικού γένους Pipeer. Πιπερίνη (1)- πιπεριδίνη (2)- χαβικίνη (3)- πιπλαρτίνη (4)- γκινεσενσίνη (5)- πελλιτορίνη (6). ΠΗΓΗ (Oyemitan, 2017).

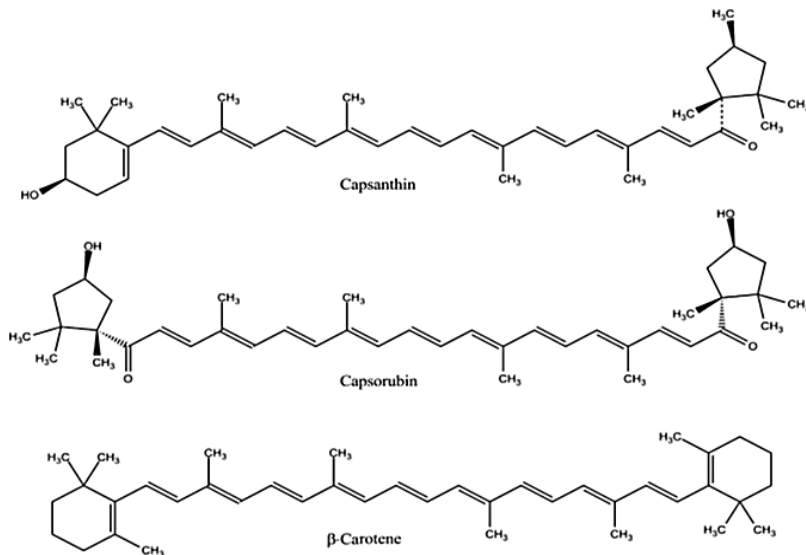
Γενικά, οι συνηθέστερες ενώσεις που απαντώνται ως πτητικές ενώσεις στα είδη *Piper* περιλαμβάνουν: τα γερμακρένιο D, λιμονένιο, β-πινένιο, α-φελλανδρένιο, β-καρυοφυλλένιο, α-πινένιο, cis-β-οκιμένιο, β-ελμένιο, (Z)-β-διζαβολένιο, (Z,Z)-α-φαρνεσένιο, α-ζιγκιβερένιο, β-πισαβολένιο, δ-καδίνιο, κ.λπ. Η χημική σύνθεση των αιθέριων ελαίων του ίδιου είδους ποικίλλει από μία γεωγραφική τοποθεσία σε άλλη εκτός από την εποχιακή διακύμανση, τη μορφολογία και τη φύση (νωπά/αποξηραμένα) των χρησιμοποιούμενων μερών, τον τύπο εδάφους, τον τύπο καλλιέργειας (άγρια/ποικιλία), επεξεργασία και μεθόδους ανάλυσης (Oyemitan, 2017).



▪ **Τσίλλι και πιπέρι καγιέν (*Capsicum annuum*):** Το γένος *Capsicum* περιέχει κυρίως δραστικές – «πικάντικες» – χημικές ομάδες μη πτητικών αλκαλοειδών ενώσεων που ονομάζονται καψαϊκινοειδή. Όλα τα καψαϊκινοειδή είναι όξινα αμίδια με βανιλυλαμίδιο και διακλαδισμένα C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub> αλυσίδα λιπαρών οξέων. Η καψαϊκίνη, (C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>) είναι μια άχρωμη, κρυσταλλική ένωση, η οποία και βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία (46%) μεταξύ των άλλων καψαϊκινοειδών στο *Capsicum*. Άλλα καψαϊκινοειδή περιλαμβάνουν τη διυδροκαψαϊκίνη (41%), τη νορδιυδροκαψαϊκίνη (7%), νορκαψαϊκίνη (7%), ομοκαψαϊκίνη (3%), ομοδιυδροκαψαϊκίνη (2%) και άλλα. Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των καψαϊκινοειδών είναι: η σχετική οξύτητά τους, το μήκος της διακλαδισμένης αλυσίδας, το σημείο διακλάδωσης και ο αριθμός των ακόρεστων στην πλευρική αλυσίδα. Γενικά, η καψαϊκίνη και η διυδροκαψαϊκίνη είναι σχεδόν 10 φορές πιο πικάντικες από τα άλλα καψαϊκινοειδή. Μαζί με τα καψαϊκινοειδή, το *Capsicum* περιέχει επίσης ασκορβικό οξύ, θειαμίνη και καροτενοειδείς χρωστικές ουσίες. Τα καροτενοειδή στο *Capsicum* είναι υπεύθυνα για το κόκκινο χρώμα των ώριμων καρπών, συμπεριλαμβανομένης της καψανθίνης, της καψορουβίνης και του β-καροτένιου. Από αυτά τα καροτενοειδή η καψανθίνη και η καψορουβίνη είναι εστέρες λιπαρών οξέων και δεν απαντώνται σε άλλα φυτικά ή ζωικά είδη. Οι κύριες χρωστικές ουσίες στο *Capsicum* περιλαμβάνουν την καψανθίνη (31,7% του συνόλου των καροτενοειδών), β-καροτένιο (12,3%), και η καψορουβίνη (7,5% των συνολικών καροτενοειδών) (Kulkarni, Suryvanshi, Auti, & Gaikwad, 2017).



**Εικόνα 8:** | Ενεργά συστατικά του *Capsicum*  
ΠΗΓΗ (Kulkarni, Suryvanshi, Auti, & Gaikwad, 2017)



**Εικόνα 9:** Δομές των κύριων καροτενοειδών στο *Capsicum*  
 ΠΗΓΗ (Y.A. Kulkarni, 2017).

## 2.3 Μέθοδοι και συνθήκες εκχύλισης βιοενεργών ενώσεων από μπαχαρικά και βότανα

Γενικά, τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των φυτικών εκχυλισμάτων και επομένως η αποτελεσματικότητά τους ως βιοενεργοί και συγκεκριμένα αντιμικροβιακοί παράγοντες, εξαρτώνται από τη μέθοδο εκχύλισης και τις συνθήκες εκχύλισης (θερμοκρασία, μέγεθος σωματιδίων, πίεση, διαλύτης, αναλογία δείγματος προς διαλύτη κ.λπ.). Αν και προσφάτως εισήχθησαν νέες τεχνικές εκχύλισης όπως: εκχύλιση με μικροκύματα, εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, υποβοηθούμενη εκχύλιση με ένζυμα, εκχύλιση παλμικού ηλεκτρικού πεδίου, εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού και επιταχυνόμενη εκχύλιση, η εκχύλιση με διαλύτη εξακολουθεί να είναι η πιο διαδεδομένη διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη λήψη εκχυλισμάτων από φυτικά υλικά. Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με διαλύτη συνοψίζονται ως εξής: Ευκολία χρήσης και ευρεία δυνατότητα εφαρμογής χωρίς να χρειάζεται χρήση προηγμένου εξοπλισμού. Ωστόσο, από περιβαλλοντική άποψη, η εκχύλιση με διαλύτη δεν ανήκει στις μεθόδους της «πράσινης» χημείας, δεδομένου ότι μεγάλο ποσό απορριμμάτων παράγεται με δυνητικά επικίνδυνα υπολείμματα, ανάλογα με τον τύπο του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. Κρίσιμο βήμα της διαδικασίας εκχύλισης είναι η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη που καθορίζει το προφίλ των βιοδραστικών ενώσεων που εκχυλίζονται (Muzolf-Panek & Stuper-Szablewska, 2021).

Υπάρχει μια τεράστια ποικιλία ενώσεων, μόνο εντός της ομάδας των φαινολικών που είναι αποτέλεσμα των διαφόρων χημικών δομών από ένα μόνο υδροξυλιωμένο αρωματικό δακτύλιο (φαινολικά οξέα) σε πολύπλοκες πολυμερείς ουσίες (τανίνες και λιγνάνες). Η υψηλή ποικιλομορφία των φαινολικών δημιουργείται, επίσης, από την επίδραση των πολλαπλών λειτουργικών ομάδων που ποικίλλουν ως προς τον τύπο, τον αριθμό και τη θέση στην δομή της ένωσης. Φαινόμενα όπως υδροξυλίωση, μεθυλίωση, γλυκοσυλίωση και ακυλίωση θα μπορούσαν να εμφανιστούν στη φαινολική δομή. Έτσι, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φαινολικών, συμπεριλαμβανομένης της διαλυτότητάς τους, μπορεί να ποικίλλουν μεταξύ τους σε μεγάλο βαθμό. Μπορεί, επίσης, να αναφερθεί ότι το προφίλ των φαινολικών ενώσεων που εκχυλίζονται από το φυτό εξαρτώνται από την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση. Η μεθανόλη και η αιθανόλη ήταν οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες με σχετική πολικότητα 0,762 και 0,654, αντίστοιχα, και συχνά, υπήρχε η προσθήκη νερού σε διάφορες αναλογίες για να αυξηθεί η πολικότητα. Επίσης διαλύτες όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο, εξάνιο, διαιθυλαιθέρας και βουτανόλη έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλους διαλύτες. Αν και από την άποψη της ασφάλειας, οι διαλύτες αιθανόλης και αιθανόλης- νερού, θα μπορούσαν να εισαχθούν στα τρόφιμα χωρίς τον κίνδυνο μόλυνσης του προϊόντος με υπολείμματα τοξικών διαλυτών (Muzolf-Panek & Stuper-Szablewska, 2021). Επιπλέον, η παρατεταμένη έκθεση και εισπνοή αυτών των διαλυτών μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό, ιδιαίτερα στο ήπαρ και στα νεφρά (Daud, και συν., 2021). Οι βιοενεργές ενώσεις, μπορούν να εκχυλιστούν από μπαχαρικά και βότανα με διάφορους τρόπους. Οι μέθοδοι εκχύλισης μπορούν να ταξινομηθούν γενικότερα σε δύο: τις συμβατικές και τις μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Embuscado, 2018).

### **2.3.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης**

Από τις πρώτες καταγραφές της χρήσης βοτάνων στην ιατρική, βρέθηκαν σε πήλινες ταμπλέτες των Σουμερίων πριν 4000 χρόνια πριν, οι οποίες περιλαμβάνουν περιγραφές της χρήσης του θυμαριού (*Thymus spp.*) και της γλυκόριζας (*Glycyrrhiza glabra*) για ιατρικές εφαρμογές. Αυτή η πρακτική στη συνέχεια εξελίχθηκε προς χρήση συμπυκνωμάτων που προέρχονται από φαρμακευτικά βότανα και μερικές από τις παλαιότερες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η έγχυση (Infusion) και η αφέψηση (Decoction). Στη συνέχεια, εξελίχθηκαν και άλλες τεχνικές, διότι αναγνωρίστηκε ότι οι τεχνικές εκχύλισης θα

μπορούσαν να έχουν σχεδιαστεί, ώστε να στοχεύουν συγκεκριμένες ομάδες βιοδραστικών ενώσεων. Όπως περιγράφεται σε πολλές βιβλιογραφικές πηγές, οι τεχνικές εκχύλισης έχουν πλέον εξελιχθεί στο σημείο που η ανάκτηση του εκχυλίσματος δεν στοχεύει μόνο σε μια συγκεκριμένη ομάδα ενώσεων, αλλά να είναι και σχεδιασμένη για να είναι όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματική μέσω της ανάκτησης της υψηλότερης απόδοσης και ελαχιστοποιώντας την ενέργεια και τη χρήση τοξικών διαλυτών (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

Παρά ταύτα, οι βασικές αρχές μιας στοχευμένης εκχύλισης παραμένουν οι ίδιες. Πρώτα απ' όλα, το αρχικό υλικό συνήθως προκατεργάζεται για να διευκολύνει φυσικά την απελευθέρωση της ένωσης στόχου από το ενδοκυτταρική της τοποθεσία. Αυτό το βήμα μπορεί να κυμαίνεται από απλή διαβροχή έως τη χρήση υψηλής τάσης ηλεκτρικών πεδίων για να τρυπήσουν τα τοιχώματα των κυττάρων. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την επιλογή ενός κατάλληλου διαλύτη στην οποία μπορεί να διαχωριστεί η ένωση ή/και ενώσεις στόχοι. Αυτό είναι ένα κρίσιμο βήμα και η επιλογή θα γίνει όχι μόνο από την πολικότητα της ένωσης στόχου αλλά και από την προοριζόμενη εφαρμογή της. Για παράδειγμα, η ευρεία χρήση της φιλικής προς τα τρόφιμα αιθανόλης για εφαρμογές σε λειτουργικά τρόφιμα. Μόλις επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την μεγιστοποίηση των ευκαιριών για την ένωση στόχο να χωριστεί στον διαλύτη. Αυτό μπορεί να μεγιστοποιηθεί διασφαλίζοντας ότι ο διαλύτης διεισδύει στο στερεό και διαλύει τον στόχο - ένωση αποτελεσματικά και μεταφέρεται στον διαλύτη. Οι αρχές πίσω από αυτή τη διαδικασία, στην ουσία είναι η επιλογή του σωστού διαλύτη, ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης και οι παράμετροι που αποδίδουν τα περισσότερα αποτελέσματα σε αυτό το σημείο. Το τελικό βήμα περιλαμβάνει την περαιτέρω συμπύκνωση του εκχυλίσματος με, για παράδειγμα, διαμερισμό του σε άλλο διαλύτη (εκχύλιση υγρού-υγρού, LLE) ή απορρόφηση της ένωσης στόχου σε στερεά μήτρα και στη συνέχεια απελευθερώνοντάς το χρησιμοποιώντας μικρότερο όγκο κατάλληλου διαλύτη (εκχύλιση στερεάς φάσης) (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

### **2.3.1.1 Βασικές αρχές συμβατικών μεθόδων εκχύλισης**

Η εκχύλιση από βότανα και μπαχαρικά για τη βιοδραστική ή/και για τη γευστική τους αξία έχει μελετηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπου στόχος είναι ο επιλεκτικός διαχωρισμός των βιοδραστικών ενώσεων, καθώς και η διατήρηση της βέλτιστης ποιότητας και

ποσότητας. Η επιλογή της διαδικασίας εκχύλισης θα πρέπει να πραγματοποιείται με τρόπο που να επιτρέπει την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων με μέγιστη αποτελεσματικότητα και επιλεκτικότητα για την απλοποίηση των μετέπειτα βήματα επεξεργασίας (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020). Υπάρχουν αρκετές μεθοδολογίες εκχύλισης ενώ αναπτύσσονται συνεχώς και νεότερες. Κατά ένα άτυπο τρόπο διαχωρίζονται σε «συμβατικές» και «καινοτόμες», με τις δεύτερες να στοχεύουν στην «θεραπεία» ορισμένων μειονεκτημάτων των «συμβατικών» (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

Οι συμβατικές μέθοδοι, εφαρμόστηκαν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους κατά τη διάρκεια των προηγούμενων δεκαετιών και μερικές από αυτές είναι η εκχύλιση Soxhlet, η διαβροχή, η έγχυση ή αφέψηση, διήθηση και απόσταξη με ατμό ή υδροαπόσταξη. Οι παρακάτω ενότητες περιγράφουν μερικές από αυτές τις τεχνικές, καθώς και τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους, όσον αφορά την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από βότανα και μπαχαρικά. Η επιλογή συγκεκριμένης τεχνικής εξαρτάται συνήθως από τον τύπο των υλικών, την επιθυμητή ποιότητα των βιοενεργών ενώσεων, τον αναμενόμενο χρόνο της ολοκλήρωσης της εκχύλισης και μερικές φορές από τη βιωσιμότητα των διαλυτών (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

- **Μέθοδος Soxhlet:** Η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε αρχικά για την εκχύλιση λιπιδίων αλλά χρησιμοποιείται και για ποικιλία προϊόντων, συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης βιοενεργών ενώσεων (Embuscado, 2018). Η Soxhlet γενικά έχει αρκετά μειονεκτήματα όπως: μακρύς ο χρόνος εκχύλισης που είναι από 1 έως 72 ώρες, μειωμένη εκλεκτικότητα στην εκχύλιση, ακριβοί, τοξικοί και υψηλής καθαρότητας διαλύτες, κ.α. (Yousefi, και συν., 2019).
- **Διαβροχή (Maceration):** Η διαβροχή είναι μια πολύ παλιά διαδικασία όπου το ολόκληρο ή αλεσμένα φυτικά υλικά διατηρούνται σε επαφή με έναν κατάλληλο διαλύτη, για καθορισμένο χρονικό διάστημα, από αρκετές ώρες έως ημέρες προς εξισορρόπηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αυτό το μίγμα αναδεύεται συχνά μέχρι να διαλυτοποιηθεί το φυτικό υλικό, στη συνέχεια πιέζεται το μείγμα και τέλος, τα συνδυασμένα υγρά διαυγάζονται με διήθηση ή απόχυση μετά την παραμονή. Γενικά, ο σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι να μαλακώσει και να σπάσει τα φυτικά υλικά και ως εκ τούτου να ενισχυθεί η διαλυτότητα των φυτοχημικών-στόχων στο στερεό υλικό. Αν και αυτή η διαδικασία θεωρείται συχνά ως αναποτελεσματική διαδικασία λόγω της μεγαλύτερης απαίτησης χρόνου, η διαβροχή έχει βρει εφαρμογή για εκχύλιση φαινολικών ενώσεων και αντιοξειδωτικών

από φυτικά υλικά, χρησιμοποιώντας διαλύτες όπως διχλωρομεθάνιο, αιθανόλη, μεθανόλη και μίγμα νερού/μεθανόλης. (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

- **Έγχυση ή Αφέψηση (Infusion or Decoction):** Η έγχυση και η αφέψηση ανήκουν πρακτικά στην ίδια αρχή εκχύλισης με τη διαβροχή, και στις δύο τεχνικές το φυτικό υλικό εμποτίζεται σε κρύο ή βρασμένο νερό. Σε σύγκριση με την έγχυση και τη διαβροχή, οι εφαρμογές της αφέψησης έγκειται στην εκχύλιση σταθερών ενώσεων στη θέρμανση από σκληρά φυτικά υλικά όπως ρίζες και φλοιοί, και συνήθως καταλήγει σε λιποδιαλυτές ενώσεις. Μια καθορισμένη ποσότητα κρύου ή βραστού νερού προστίθεται στο αλεσμένο φυτικό υλικό για σύντομο χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια της έγχυσης, ενώ στην αφέψηση, το δείγμα βράζεται σε νερό για 15-30 λεπτά. Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται για διάφορες διαδικασίες εκχύλισης, όπως η εκχύλιση φαρμακευτικών ενώσεων από βότανα ή τσάι. Επίσης, η παραδοσιακή διαδικασία της αφέψησης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών από φυτικές μήτρες (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

- **Διήθηση (Percolation):** Η διήθηση είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιεί ένα διηθητή όπου ο διαλύτης προστίθεται αργά στις κονιοποιημένες στερεές μήτρες. Ο διαλύτης απορροφά τις διαλυτές ενώσεις και στάζει έξω από τον φιλτραρισμένο πυθμένα του δοχείου. Η διαδικασία της διήθησης συνήθως συνεχίζεται με μέτριο ρυθμό (π.χ. έξι σταγόνες ανά λεπτό) έως ότου η εκχύλιση ολοκληρώνεται και αργότερα χρησιμοποιείται εξάτμιση για τη συμπύκνωση των εκχυλισμάτων. Το κύριο πλεονέκτημα της διήθησης είναι ο μικρός χρόνος επεξεργασίας, μεγαλύτερη ευελιξία και σε ορισμένες περιπτώσεις εξαντλητική εκχύλιση των ενώσεων. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία δεν θεωρείται εφικτή για ορισμένα βότανα (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

- **Υδροαπόσταξη και απόσταξη με ατμό (Hydro-distillation and Steam Distillation):** Στην διαδικασία της υδροαπόσταξης χρησιμοποιείται νερό ως διαλύτης. Η μέθοδος υδροαπόσταξης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εάν οι βιοενεργές ενώσεις είναι θερμικά ασταθής. Για αυτές τις μεθόδους εκχύλισης, η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας θα εξαρτηθεί από την επιλογή του διαλύτη. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης επηρεάζεται από την πολικότητα του διαλύτη, την συγγένεια των βιοδραστικών ενώσεων με τον διαλύτη, τη μεταφορά μάζας και τη θερμοκρασία εκχύλισης. Μερικά πλεονεκτήματα είναι, το χαμηλό κόστος, η ταυτόχρονη παραλαβή αρωματικών και υδατικών διαλυμάτων, ενώ στα μειονεκτήματα, είναι ο κίνδυνος πολυμερισμού και υδρολύσεως, η

απώλεια συστατικών με ψηλό σημείο ζέσεως, και η αλλοίωση χρώματος και οσμής του ελαίου (Embuscado, 2018).

### 2.3.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών

Πολλοί παράγοντες, όπως ο τύπος του φυτικού υλικού, ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία, η αναλογία στερεού υλικού προς διαλύτη, ο τύπος του διαλύτη, το pH και το μέγεθος των σωματιδίων των υλικών βοτάνων και μπαχαρικών μπορούν να επηρεάσουν τις αποδόσεις εκχύλισης καθώς και τη βιοδραστηριότητά τους (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

▪ **Τύπος βοτάνων και μπαχαρικών:** Ο τύπος του βοτάνου ή του μπαχαρικού που προορίζεται για εκχύλιση είναι ένα σημαντικός παράγοντας για την απόδοση των ενώσεων-στόχων. Για παράδειγμα, οι Hinneburg κ.ά. (2006) προσδιόρισαν τις συνολικές φαινολικές και αντιοξειδωτικές δράσεις των υδροαποσταγμένων εκχυλισμάτων από βασιλικό, δάφνη, μαϊντανό, άρκευθο, γλυκάνισο, κύμινο, κάρδαμο και τζίντζερ. Βρέθηκε, ότι η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ήταν από το εκχύλισμα βασιλικού και δάφνης, ενώ βρέθηκαν οι συνολικές φαινόλες που εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος με τη σειρά: βασιλικός > δάφνη > κύμινο > μάραθος. Οι Wojdylo κ.ά. (2007) πραγματοποίησαν παρόμοια μελέτη σε 32 κονιοποιημένα αποξηραμένα φυτικά υλικά από 32 βότανα που αναπτύχθηκαν στην Πολωνία και έδειξαν ότι βρέθηκε το υψηλότερο επίπεδο φαινολικών στην *Echinacea purpurea*, ενώ η χαμηλότερη ήταν στην *Carum carvi*. Επίσης, ανέφεραν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά των έξι μπαχαρικών, βρέθηκε με την ακόλουθη σειρά: βάλσαμο > φασκόμηλο > λαχανίδα > δεντρολίβανο > θυμάρι > ρίγανη. Έχει αναφερθεί ότι οι διαφορές στις ποσότητες φαινολικών ενώσεων πιθανότατα οφείλονταν σε γονοτυπικές και περιβαλλοντικές διαφορές (δηλαδή, κλίμα, τοποθεσία, θερμοκρασία, γονιμότητα, ασθένειες και έκθεση σε παράσιτα) εντός των ειδών, επιλογή των φυτικών μερών που δοκιμάστηκαν, ο χρόνος λήψης δειγμάτων και οι μέθοδοι προσδιορισμού (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

Επιπλέον, οι φαινολικές και αντιοξειδωτικές δράσεις ενός υδατικού εκχυλίσματος από αποξηραμένη σκόνη σκόρδου, τζίντζερ και πιπεριού καγιέν αξιολογήθηκαν από τους Otunola και Afolayan (2013). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα από τα μπαχαρικά διέθεταν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά, φλαβονοειδή, φλαβονόλες και προανθοκυανιδίνες, με το εκχύλισμα πιπεριού να έχει τις υψηλότερες ποσότητες

πολυφαινολών. Σε μια άλλη μελέτη, οι Howard κ.ά. (2000) ανέφερε ότι το μεθανολικό εκχυλίσμα (50%) καρπού πιπεριάς περιείχε υψηλό επίπεδο L-ασκορβικού οξέος και καροτενοειδών συμπεριλαμβανομένων όπως β-κρυπτοξανθίνη, α-καροτίνη, β-καροτίνη, καψανθίνη και ζεαξανθίνη (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020). Από την άλλη πλευρά, εκχυλίσματα από ζεστό νερό 13 διαφορετικών μπαχαρικών που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία κρέατος έδειξαν ότι το γαρούφαλλο είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά (108,28 μg ισοδύναμο κατεχίνης/g), ενώ τα συνολικά φλαβονοειδή κυμαίνονταν από 324,08 μg ισοδύναμο κερκετίνης/g για το θυμάρι και 3,38 μg ισοδύναμο κερσετίνης/g για τον κόλιανδρο (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

Επίσης, όσον αφορά την αντιμικροβιακή του δράση, αιθανολικά (80–96%, v/v) εκχυλίσματα μιας σειράς λεπτοαλεσμένων μπαχαρικών που εκχυλίστηκαν για 1 έως 4 ημέρες στους 10 °C σε θερμοκρασία δωματίου, δοκιμάστηκαν για τις αντιμικροβιακές τους δράσεις κατά των *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhi* και στελέχη μυκήτων *Candida albicans* και *Rhizopus zygosporae*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από κανέλα, σκόρδο και γαρούφαλλο εμφάνισαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση (80–94%). Ωστόσο, επίδραση έναντι των βακτηρίων ποικίλλει ανάλογα με τους τύπους εκχυλίσματος που χρησιμοποιούνται. Η επίδραση των εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων στη μικροβιακή δραστηριότητα δεν εξαρτώνται μόνο από τους τύπους των εκχυλισμάτων αλλά και από τους τύπους των μικροβίων που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Στο πλαίσιο αυτό, ενώ η ερευνητική εργασία που έγινε από τους Chan κ.ά. (2018) περιέγραψε την υψηλότερη ευαισθησία των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*Bacillus cereus* και *S. aureus*) σε εφαρμοζόμενα εκχυλίσματα από αυτά των αρνητικών κατά gram βακτηρίων (*E. coli* και *Salmonella Typhimurium*), αντιφατικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ήταν πιο ευαίσθητα από τα gram θετικά που αναφέρθηκαν από Baljeet κ.ά. (2015) (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

▪ **Επιλογή και επίδραση των διαλυτών:** Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης στερεού-υγρού, περιλαμβάνουν διάφορους παράγοντες, όπως το μέγεθος των σωματιδίων του φυτικού υλικού, τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του διαλύτη, τη διαλυτότητα του φυτικού υλικού και την εξάρτηση από την θερμοκρασία, καθώς και η ανάδευση του διαλύτη. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύτη όπως: (α) σημείο βρασμού, (β) διηλεκτρική σταθερά και (γ) η πολικότητα του, διότι διαφορετικοί τύποι



διαλυτών δίνουν διαφορετικούς τύπους εκχυλισμάτων με διαφορετικές βιοδραστικές ενώσεις και ποσότητες αυτών (Daud, και συν., 2021)

Η επιλογή πολικών ή μη πολικών διαλυτών διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα των εκχυλισμάτων, ενώ το εύρος στο σημείο ζέσεως των διαλυτών, βοηθάει ώστε να κατανοηθεί η απόδοση των εκχυλισμάτων. Παράδειγμα, είναι η χρήση διαλύτη με υψηλό σημείο βρασμού, όπως το τολουόλιο, που μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερο ποσοστό απόδοσης του εκχυλίσματος λόγω της μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας επαφής του φυτικού υλικού με τον διαλύτη (Nurizzati Mohd Daud, 2021).

Άλλος παράγοντας, είναι η διηλεκτρική σταθερά. Διαλύτες με διηλεκτρική σταθερά μικρότερη από 15, θεωρούνται μη πολικοί διαλύτες. Το εξάνιο είναι ένας μη πολικός διαλύτης, με υψηλή πτητικότητα, με χαμηλό σημείο βρασμού και είναι σχετικά εύκολος ο διαχωρισμός των στερεών από το εκχύλισμα με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. Παράδειγμα, η εκχύλιση της ένωσης της τοκοφερόλης από «φρούτα του πάθους», είναι υψηλότερη με χρήση εξανίου, το οποίο οφείλεται στον μη πολικό χαρακτήρα του, και έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το μη πολική, λιπόφιλη τοκοφερόλη, το οποίο και συνήθως βρίσκεται στα φυτικά έλαια (Daud, και συν., 2021).

Ο συνδυασμός χλωροφορμίου και μεθανόλης ως διαλύτες προς εκχύλιση φυτικών εκχυλισμάτων, όπως κόλιανδρο και μοσχοκάρυδο, συμβάλλουν στην υψηλότερη απόδοση αιθέριου ελαίου με αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Η μεθανόλη ως πολικός διαλύτης μπορεί να εκχυλίσει πολικά υλικά, όπως φωσφολιπίδια και φαινολικές ενώσεις. Η παρουσία φαινολικών και πολικών λιπιδίων στα εκχυλίσματα ως βιοενεργά συστατικά και την πιθανή αλληλεπίδραση τους με άλλα συστατικά του εκχυλίσματος μπορούν να δημιουργήσουν έναν έντονο αντιοξειδωτικό χαρακτήρα στα εκχυλίσματα. Το νερό και η αιθανόλη περιέχουν υδροξυλομάδες που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τη διαλυμένη ουσία (Daud, και συν., 2021).

Οι Akkol κ.ά. (2008) αναφέρθηκαν ότι οι τιμές της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά στο φασκόμηλο κυμαίνονταν από 2.830 έως 21.230 mg ανά 100 g εκχυλισμάτων, ανάλογα με τους τύπους του διαλύτη που χρησιμοποιείται, όπου η υψηλότερη ποσότητα των φαινολικών ενώσεων παρατηρήθηκε σε εκχυλίσματα μεθανόλης 50%, ακολουθούμενα από καθαρά εκχυλίσματα μεθανόλης, οξικού αιθυλεστέρα και ν-εξανίου, αντίστοιχα. Επίσης, αναφέρθηκε ότι η απόδοση εκχύλισης της καθαρής μεθανόλης είναι υψηλότερη από εκείνη της καθαρής αιθανόλης (και καθαρής ακετόνης, που δείχνει την αύξηση της

απόδοσης εκχύλισης του *Limnophila aromatica* με αυξανόμενη πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση). Ομοίως, οι Dent κ.ά. (2013) ανέφεραν ότι τα δυαδικά συστήματα διαλυτών είναι πιο αποτελεσματικά στην εκχύλιση πολυφαινολών από φασκόμηλο παρά από έναν διαλύτη. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στην ίδια μελέτη αναφέρθηκε ότι η απόδοση της εκχύλισης ήταν συγκρίσιμη με 30% αιθανόλη ή ακετόνη με αυτή του απεσταγμένου νερού σε υψηλότερη θερμοκρασία και σε μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες όπως, ακετόνη (80%), αιθανόλη (80%), μεθανόλη (80%), και απεσταγμένο νερό για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από αλεσμένες σκόνες κουρκουμά, τζίντζερ, φύλλα λεμονόχορτου και φύλλα κάρυ. Ο διαλύτης 80% ακετόνη αποδείχθηκε ότι είναι ο περισσότερο αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση ολικών φαινολικών ενώσεων από κουρκουμά, τζίντζερ και λεμονόχορτο (221.68, 98.10 και 28.19 mg GA/g dw, αντίστοιχα), ενώ για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από φύλλο κάρυ (92,23 mg GA/g dw), ο διαλύτης 80% αιθανόλης ήταν ο καταλληλότερος διαλύτης (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

▪ **Αναλογία στερεού υλικού προς διαλύτη και μέγεθος σωματιδίων:** Ένας ακόμα παράγοντας της απόδοσης εκχύλισης είναι η αναλογία του φυτικού υλικού και του διαλύτη. Η διατήρηση της κατάλληλης αναλογίας υγρού προς στερεό είναι σημαντική, καθώς μια χαμηλότερη αναλογία μπορεί να παράγει εκχυλίσματα με μειωμένες βιοδραστικές ενώσεις, ενώ η υψηλότερη αναλογία μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια πολύτιμων διαλυτών (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020). Οι Mohamad κ.ά. (2010) παρατήρησαν, ότι η αύξηση της αναλογίας διαλύτη προς φυτικό υλικό πέραν του 5 : 1 δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην απόδοση του *Eurycoma longifolia*. Παρομοίως, οι Fan κ.ά. (2015) ανέφεραν ότι η εκχύλιση ολικών φλαβονοειδών και ολικών φαινολικών περιεχομένων από σπαράγγι (*Asparagus officinalis* L.) αρχικά αυξήθηκαν με την αύξηση της αναλογίας υγρού προς στερεό και στη συνέχεια μειώθηκαν. Δεδομένου ότι η μάζα των ενώσεων ήταν πρωτίστως μέσα στο εσωτερικό του φυτικού υλικού, μεγαλύτεροι όγκοι διαλύτη δύσκολα θα μπορούσαν να αυξήσουν την ποσότητα της εκχύλισης, όμως, η αυξημένη απόδοση των ενώσεων στην αρχή θα οφείλεται στην ενισχυμένη μεταφορά μάζας των διαλυμένων ουσιών στον διαλύτη (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

Το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί επίσης να επηρεάσει την ποσότητα της βιοδραστικής εκχύλισης από βότανα και μπαχαρικά. Σε αυτό το πλαίσιο, οι Borhan κ.ά. (2013)

ανέφεραν εκχύλιση με υδατικό διαλύτη από την αποξηραμένη και αλεσμένη σκόνη σε νανοσωματίδια του *Centella asiatica* L. είχε σχεδόν 50% υψηλότερη απόδοση εκχύλισης με 7,09 mg/g σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια. Ομοίως, οι Durling κ.ά. (2007) ανέφεραν ότι η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από το φασκόμηλο μειώθηκε με αυξανόμενο μέγεθος σωματιδίων από 1 σε 3 mm λόγω της ανεπαρκούς διάχυσης υδροαλκοολικού διαλύτη στο στερεό σωματίδιο και τον περιορισμό της διάχυσης διαλύτη-διαλυμένης ουσίας έξω από τα σωματίδια (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

▪ **Θερμοκρασία και χρόνος εκχύλισης:** Αν και η υψηλή θερμοκρασία θεωρείται ότι αυξάνει την ολική απόδοση εκχύλισης στα βότανα και μπαχαρικά, συνήθως αποφεύγονται οι ακραίες συνθήκες για την παράκαμψη κάθε επιβλαβούς επίδρασης στη βιολογική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020). Για παράδειγμα, οι Chen κ.ά. (1985) παρατήρησαν ότι η υψηλή θερμοκρασία (100 °C σε 20 λεπτά) αφαίρεσαν πλήρως τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από τον πυρήνα και τα εξωτερικά στρώματα του κρεμμυδιού, τα λευκά και τα πράσινα μέρη του πράσινου κρεμμυδιού, του σκόρδου, της ρίζας τζίντζερ, του γλυκού πιπεριού, του τσίλι, της καστανής πιπεριάς και της μουστάρδας. Ενδείξεις, επίσης, για την μείωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των βολβών σκόρδου από 60 έως 100 °C έχει αναφερθεί από τους Yin και Cheng (1998). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες από εκχύλισμα άγριου φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.) που λαμβάνεται στους 60°C και 90°C με 30% και 50% αιθανόλη, μειώθηκε κατά τη διάρκεια μεγαλύτερης χρονικής περιόδου εκχύλισης (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

Επίσης, σύμφωνα με τον δεύτερο νόμο του Fick, μετά από μια ορισμένη περίοδο εκχύλισης επιτυγχάνεται μια τελική ισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης διαλυμένης ουσίας στο στερεό υλικό και στο διάλυμα, και μετά από αυτό το σημείο η μεγαλύτερη χρονική διάρκεια εκχύλισης δεν θεωρείται χρήσιμη παράμετρος για την αύξηση της απόδοσης παραγωγής. Παράδειγμα, οι Ziaedini κ.ά. (2010) διερεύνησαν τις επιπτώσεις της θερμοκρασίας (50, 60, 70, 80, 90 °C), ως προς τον χρόνο (5, 10, 20, 40, 80 λεπτά), στις κατεχίνες και τη διαλυτότητα της καφεΐνης στο νερό, από Ιρανικό πράσινο τσάι. Οι καλύτεροι συνδυασμοί θερμοκρασίας και χρόνου εκχύλισης με νερό ήταν 20–40 λεπτά και 80°C για την επιγαλλοκατεχίνη, την επικατεχίνη και την καφεΐνη, ενώ οι 90 °C για 80 min για την κατεχίνη, γαλλική επικατεχίνη και γαλλική επιγαλλοκατεχίνη. Οι Ereifej κ.ά. (2016) προσδιόρισαν το εκχύλισμα από 10 διαφορετικά μπαχαρικά από την τοπική αγορά της Ιορδανίας

(*Syzygium aromaticum* L., *Coriandrum sativum* L., *Cuminum cyminum* L., *Zingiber officinale* Rosc., *Elettaria cardamomum*, *Curcuma longa*, *Rhus coriaria* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Foeniculum vulgare* Mill και *Laurus nobilis* L.) χρησιμοποιώντας αιθανόλη, μεθανόλη και ακετόνη σε διάφορες θερμοκρασίες όπως 20, 40 και 60°C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους 60°C ελήφθη η υψηλότερη ποσότητα ολικών φαινολικών από γαρύφαλλο χρησιμοποιώντας και τους τρεις διαλύτες (Siddique, Tzima, Rai, & Brunton, 2020).

### **2.3.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης ή εκχύλιση με τεχνικές υψηλής ενέργειας**

Οι ανεπτυγμένες κοινωνίες ανησυχούν όλο και περισσότερο για το περιβάλλον. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, το κίνημα της «Πράσινης Χημείας» το οποίο ηγήθηκε της αλλαγής προς μια πιο βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική βιομηχανία χημείας και προσπάθησε να εξερευνήσει νέους τρόπους μείωσης ή εξάλειψης της χρήσης ή της δημιουργίας επικίνδυνων ουσιών από χημικά προϊόντα και διεργασίες και για τη βελτίωση όλων των τύπων χημικών προϊόντων και διαδικασιών μειώνοντας τις επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Όπως ορίστηκε από τους Anastas and Warner (1998) «Η πράσινη χημεία είναι η χρήση των χημικών τεχνικών και μεθόδων που μειώνουν ή εξαλείφουν τη χρήση ή τη δημιουργία πρώτων υλών, προϊόντων, υποπροϊόντων, διαλυτών, αντιδραστηρίων κ.λπ. που είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον». Οι τεχνολογίες «Πράσινης Χημείας» περιλαμβάνουν όλους τους τύπους χημικών διαδικασιών και επικεντρώνονται σε τρεις κύριες πτυχές που κυριαρχούν στις αρχές της «Πράσινης Χημείας»: τα απόβλητα, τους κινδύνους (υγεία, περιβάλλον και ασφάλεια) και την ενέργεια (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020). Σε αυτό το πλαίσιο, είναι εύκολο να κατανοηθεί η ανάγκη για ανάπτυξη νέων και προηγμένων τεχνικών εκχύλισης, ικανές να επιλύσουν σημαντικά μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση συμβατικών τεχνικών. Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται μια σύντομη επισκόπηση των αρχών και των εφαρμογών των προηγμένων τεχνικών εκχύλισης, όπως:

- εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (SFE),
- υπό πίεση υγρή εκχύλιση (PLE),
- εκχύλιση με υπερήχους (HAE),
- υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση (MAE),
- υποβοηθούμενη από ένζυμο εκχύλιση (EAE) και

οι συνδυασμοί αυτών (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020).

Στις μη συμβατικές μεθόδους ανήκουν οι παρακάτω:

▪ **Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (Ultrasound – assisted extraction, UAE):**

Η μέθοδος της UAE, ως αρχή της λειτουργίας της, χρησιμοποιεί ακουστική σπηλαιώση (*cavitation*) για να προκαλέσει διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και την ενίσχυση της επαφής μεταξύ του διαλύτη και της ένωσης στόχου. Είναι μια πολύ ευέλικτη μέθοδος, λόγω της δυνατότητας χρήσης πολλών διαλυτών διαφορετικής πολικότητας. Επιπλέον, επιτρέπει τη γρήγορη εκχύλιση, η οποία αποτρέπει καθοριστικά την υποβάθμιση των ασταθών ενώσεων. Χρησιμοποιεί επίσης μικρές ποσότητες διαλυτών και είναι οικονομικό. Επομένως, η ανάπτυξη των μεθόδων UAE θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα βασικό άλμα στη βιώσιμη ανάπτυξη των μεθόδων εκχύλισης (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020).

Έρευνα πραγματοποιήθηκε από τους Jana Sic Zlabur κ.ά. (2021), με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δραστηριότητας τριών φυτικών εκχυλισμάτων σκόρδου (*Allium sativum* L.), τζίντζερ (*Zingiber officinale* L.) και κουρκουμά (*Curcuma longa* L.) καθώς και των περιεχόμενων εξειδικευμένων μεταβολιτών, με εκχύλιση υπερήχων, καθώς και τη σύγκριση της μεθόδου με συμβατική εκχύλιση. Η επεξεργασία με υπερήχους αύξησε την τιμή της παραμέτρου χρωματικότητας β των εκχυλισμάτων κουρκουμά και τζίντζερ, υποδεικνύοντας έτσι, ένα υψηλότερο κίτρινο χρώμα κυρίως λόγω των κουρκουμινοειδών, το οποίο είναι χαρακτηριστικό αυτών των ειδών. Επίσης, αύξησε σημαντικά το περιεχόμενο ολικών διαλυτών στερεών, φαινολικών ενώσεων, ολικών καρροτενοειδών και βιταμίνης C. Η θερμοκρασία του συστήματος υπερήχων ήταν επίσης ένας σημαντικός παράγοντας, με τις υψηλότερες (70°C) συνθήκες στην υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση έχοντας θετική επίδραση στις θερμοευαίσθητες ενώσεις (βιταμίνη C, φαινόλες, ολικά καρροτενοειδή). Για παράδειγμα, το εκχύλισμα κουρκουμά που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με υπερήχους στους 70°C είχε έως και 67% υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και 69,4% υψηλότερη περιεκτικότητα σε καρροτενοειδή σε σύγκριση με δείγματα που υποβλήθηκαν σε συμβατική επεξεργασία στην ίδια θερμοκρασία, ενώ τα εκχυλίσματα τζίντζερ είχαν έως και 40% υψηλότερες συνολικές φαινόλες. Όλες οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων μπαχαρικών δεν ήταν επαρκή για την πλήρη αναστολή των παθογόνων βακτηριακών στελεχών της *Salmonella*, *L. monocytogenes* και *S. aureus*. Ωστόσο, μόνο τα εκχυλίσματα σκόρδου είχαν επίδραση στην επιβράδυνση της ανάπτυξης και των αριθμό αποικιών *L. monocytogenes*. Εκχυλίσματα μπαχαρικών που

λαμβάνονται με επεξεργασία με υπερήχους περιείχε σημαντικά υψηλότερο επίπεδο βιοδραστικών ενώσεων και αντιοξειδωτική ικανότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται έχουν σημαντική θρεπτική δυνατότητα και επομένως σημαντική πιθανότητα για φυτοθεραπευτικές χρήσεις (Zlabur, Brajer, Voca, Galic, Sanja, & Rimac - Brncic, 2021).

▪ **Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave – assisted extraction, MAE):** Η αρχή της εκχύλισης βασίζεται στην παραγωγή θερμότητας μέσω της μετατροπής της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας λόγω της ιοντικής αγωγιμότητας και της διπολικής περιστροφής. Από την αλλαγή στις κατευθύνσεις των μορίων, συμβαίνει σύγκρουση μεταξύ των μορίων και αυτές οι συγκρούσεις δημιουργούν θερμότητα. Η θερμότητα που δημιουργείται διευκολύνει τη διάχυση του διαλύτη στη μήτρα του φυτού, και επίσης αυξάνει την απόδοση του διαλύτη για να διαλυθούν τα βιοδραστικά. Το MAE προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στην εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης της γρήγορης θέρμανσης (με αποτέλεσμα γρήγορη εκχύλιση) και καλύτερη απόδοση σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης. Επιπλέον, η χρήση MAE μειώνει την ποσότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διαδικασία εκχύλισης (Embuscado, 2018).

Σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης αλκαλοειδών (εκχύλιση με παλινδρόμηση θερμότητας [HRE], εκχύλιση με έγχυση [IE], ή HAE), η τεχνική MAE έχει δείξει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την απόδοση και τον χρόνο εκχύλισης. Οι Liang κ.ά. (2014) αξιολόγησαν όλες τις παραμέτρους που επηρεάζουν την εκχύλιση αλκαλοειδών από την *Portulata oleracea* (γλυστρίδα) με την μέθοδο MAE, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η θερμοκρασία ήταν ο κύριος παράγοντας που επηρέασε την διαδικασία. Γενικά, η ανάκτηση των αλκαλοειδών βελτιώνεται με την αύξηση θερμοκρασία (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020).

Έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες για την εκχύλιση σαπωνινών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MAE. Παραδείγματα είναι η εκχύλιση MAE στεροειδών σαπωνινών από το ιατρικό βότανο *Paris polyphylla*, για το οποίο οι βέλτιστες συνθήκες ήταν: ισχύς 300W, αναλογία υγρού προς στερεό 20ml/g με χρήση μείγματος αιθανόλης/νερού, 70 : 30 (v/v), 50 °C και 15 λεπτά. Συνθήκες της μεθόδου MAE για την εκχύλιση των τριτερπενικών σαπωνινών από την *Pulsatilla turczaninonii* είχαν ισχύ μικροκυμάτων 500 W στους 80°C για 3 λεπτά, χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη εκχύλισης και το ίδιο αναλογία στερεού - υγρού. Όπως φαίνεται, οι κύριες διαφορές σχετίζονται με τη θερμοκρασία εκχύλισης και του χρόνου. Αν και

η εκχύλιση σαπωνινών ενισχύεται σε υψηλές θερμοκρασίες, το ποσοστό των σαπωνινών που εκχυλίζονται αρχίζει να μειώνεται όταν υπάρχει υψηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω της θερμικής αποικοδόμησης των ενώσεων. Στις προαναφερθείσες εφαρμογές, οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται είναι διαφορετικές αλλά συμβατές με τη θερμική σταθερότητα των σαπωνινών αφού μία από αυτές χρησιμοποιεί μέτρια θερμοκρασία (50°C) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (15 λεπτά) ενώ στην άλλη πραγματοποιείται εκχύλιση σε υψηλή θερμοκρασία (80°C) αλλά σε σύντομο χρονικό διάστημα (3 λεπτά). Και οι δύο στρατηγικές προστατεύουν τις βιοδραστικές ενώσεις επιτρέποντας την αποτελεσματική εκχύλιση τους (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020).

- **Εκχύλιση με χρήση παλμικού ηλεκτρικού πεδίου ( Pulsed electric field, PEF):** Η τεχνική PEF χρησιμοποιεί μέτρια έως υψηλή ένταση ηλεκτρικού πεδίου (EFS) που κυμαίνεται από 100–300 V/cm και 20–80 kV/cm σε συνεχή λειτουργία εκχύλισης. Οι επικρατέστερες δύο προσεγγίσεις για τον πιθανό μηχανισμό της μεθόδου PEF στη βιολογική κυτταρική μεμβράνη είναι: (α) η επιτάχυνση των χημικών αντιδράσεων από διάφορες ενώσεις για την ενίσχυση της διαλυτότητας του διαλύτη και (β) ηλεκτροδιάτρηση ή ηλεκτροδιαπερατότητα όπου εικάζεται ότι η εξωτερική ηλεκτρική δύναμη ενισχύει τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Πρακτικά, οποιοδήποτε υλικό τοποθετείται μεταξύ ηλεκτροδίων και ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης και δημιουργούνται υδρόφιλοι πόροι στην κυτταρική τους μεμβράνη. Η μεμβράνη χάνει τη δομική της λειτουργικότητα, παύει να αποτελεί εμπόδιο και συνεπώς εκχυλίζεται το φυτικό υλικό (Muhammad Modassar A. N. Ranjha, 2021). Λόγω της ικανότητάς του να διαταράσσει την κυτταρική μεμβράνη, η μέθοδος PEF χρησιμοποιείται ως προεπεξεργασία για την διευκόλυνση της ανάκτησης του βιοδραστικού υλικού που ακολουθείται από μία μεταγενέστερη συμβατική ή μη εκχύλιση. Η μέθοδος PEF, όταν εφαρμόστηκε σε νερό, έδειξε μειωμένη χρήση θερμότητας, ενώ καταναλώνει λιγότερο διαλύτη και ενισχύει τον ρυθμό με τον οποίο τα συστατικά εκχυλίζονται. Η μέθοδος PEF έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανακύκλωση υπολειμμάτων τροφίμων και υποπροϊόντων μέσω εκχύλισης πολύτιμων συστατικών. Μείωσε το ενεργειακό κόστος, βελτίωσε την απόδοση της εκχύλισης, μείωσε την αποικοδόμηση των ευαίσθητων στη θερμότητα ουσιών, με ελάχιστη ή καμία περιβαλλοντική επίπτωση (Ranjha, και συν., 2021).

Το *Phyllanthus emblica* L. (Συν. *Emblica officinalis*) είναι ένα αρχαίο βότανο, πολύ γνωστό για τις λειτουργικές ιδιότητες του. Ο χυμός *Emblica* που είχε υποστεί επεξεργασία με PEF (18 έως 24 kV/cm, 300 έως 1000 s) έδειξε βελτιωμένη (9 φορές) εκχύλιση κερκετίνης και ελλαγικού οξέος σε σχέση με τη θερμική επεξεργασία του χυμού. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα 22 kV/cm ήταν η βέλτιστη ισχύς ηλεκτρικού πεδίου με 0,79 δείκτη αποσύνθεσης μέσα σε 500 s. Ομοίως, εκχύλισης PEF στα 20 kV/cm χρησιμοποιώντας διαλύτη, 70% αιθανόλη και νερό αύξησαν την απόδοση (12,69 mg/g) τζινσενονοσιδών σε σύγκριση με εκχύλιση υπερήχων, εκχύλιση με μικροκύματα και εκχύλιση υγρού υπό πίεση. Οι ερευνητές δήλωσαν ότι χρειάστηκε λιγότερο από 1 δευτερόλεπτο για να ολοκληρωθεί η εκχύλιση με τη μέθοδο PEF, που είναι πολύ λιγότερος χρόνος από τις άλλες μεθόδους που δοκιμάστηκαν (Ranjha, και συν., 2021).

▪ **Εκχύλιση με υποβοήθηση ενζύμων (Extraction – enzyme assisted):** Δεδομένης της συνεχώς αυξανόμενης ζήτησης για νέα και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο εκχύλισης, και λόγω της ιδιαίτερης φύσης των φυτικών υλικών, η χρήση ενζύμων για εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών κερδίζει την προσοχή. Τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα που συνήθως είναι δομημένο σε μια τρισδιάστατη μήτρα που σχηματίζεται από πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες. Μεταξύ της ποικιλίας των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η πηκτίνη και η λιγνίνη είναι οι πιο κοινές ομάδες. Αυτές οι δομές παρέχουν ένα φυσικό εμπόδιο ή καθιστούν δύσκολη την εκχύλιση συνδεδεμένων συστατικών. Για το λόγο αυτό, η χρήση ενζύμων για την αποτελεσματική αποδυνάμωση των δομών του κυτταρικού τοιχώματος είναι χρήσιμη, σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές εκχύλισης. Τα ένζυμα καταλύουν τις αντιδράσεις υδρόλυσης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος με τεράστια εξειδίκευση, τοποεπιλεκτικότητα και συνήθως υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης, ευνοεί περαιτέρω την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων. Έτσι, ανάλογα με το υλικό προς εκχύλιση, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες ή μείγματα αυτών, χρησιμοποιούνται. Ως αποτέλεσμα, τα κυτταρικά τοιχώματα αποδυναμώνονται αποτελεσματικά και το πορώδες τους αυξάνεται, διευκολύνοντας έτσι την εκχύλιση των ενώσεων-στόχων. Η ΕΑΕ έχει εφαρμοστεί κυρίως σε βότανα και μπαχαρικά για τη λήψη ελαιορητινών, αιθέριων ελαίων, γαλάκτωμα μπαχαρικών, ουσία μπαχαρικών, ενθυλακωμένα μπαχαρικά, σκόνες κ.λπ., λόγω της υψηλής απόδοσης και την ποιότητα των προϊόντων που λαμβάνονται (Akthar, Birnahu, & Demisse, 2014).



Όπως αναφέρθηκε, τα ένζυμα πρέπει να επιλέγονται με βάση τη δράση τους στα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και τη χημική σύσταση του φυτικού υλικού. Λαμβάνοντας υπόψη τη σύνθεση του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος φυτών, συνήθως χρησιμοποιούνται κυτταρινάσες, ημικελλάσες και πηκτινάσες. Εκτός από τον τύπο του επιλεγμένου ενζύμου, άλλοι παράγοντες όπως το pH, ο χρόνος αντίδρασης, η αναλογία μπαχαρικών/ενζύμου και η θερμοκρασία θα πρέπει να προσαρμοστούν για να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Οι Chandran κ.ά. (2012) ανέφεραν τη χρήση ενός μείγματος κυτταράσης, β-γλυκανάση, πηκτινάση και ξυλαμάση για την αύξηση της απόδοσης αιθέριου ελαίου από 0,9% έως 1,8% στο μαύρο πιπέρι και 1,9% έως 2,5% στο κάρδαμο. Επίσης, έχει αναφερθεί η εφαρμογή ενζύμων κατά την εκχύλιση τζίντζερ αυξάνουν την απόδοση του αιθέριου ελαίου και της ανάκτησης τζίντζερόλης σε 5% και 90%, αντίστοιχα. Ομοίως, οι Naidu κ.ά. (2012) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση της μεθόδου EAE είναι πολύ χρήσιμη για τη λήψη υψηλότερης απόδοσης εκχυλίσματος βανίλιας και ανώτερης ποιότητας γεύσης βανίλιας, αποφεύγοντας την παραδοσιακή επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Μείγματα ενζύμων έχουν επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της απόδοσης εκχύλισης και των βιολογικών δραστηριοτήτων των αιθέριων ελαίων. για παράδειγμα, τα φύλλα *Thymus capitatus* και *Rosmarinus officinalis* υποβλήθηκαν σε ενζυμική προεργασία για την απομόνωση των αιθέριων ελαίων με υδροαπόσταξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός κυτταράσης και ημικυτταράσης προώθησε μια αύξηση 109% και 20% στην αποδόσεις αιθέριων ελαίων για *T. capitatus* και *R. officinalis*, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός των δύο ένζυμα προκάλεσε αύξηση 38% στην ποσότητα της καρβακρόλης, του κυρίου συστατικού του *T. capitatus*. Όσον αφορά τη σχετική βιοδραστικότητα, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα είχαν τα αιθέρια έλαια επεξεργασμένα με ημικυτταράση που ήταν τα πιο αποτελεσματικά (Akthar, Birnahu, & Demisse, 2014).

▪ **Εκχύλιση υπό πίεση (Pressurized liquid extraction):** Η εκχύλιση υπό πίεση (PLE) είναι μια άλλη νέα τεχνική για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών σε φυτικά υλικά. Η αρχή της εφαρμογής υψηλής πίεσης, είναι ο διαλύτης να παραμείνει υγρός πάνω από το σημείο βρασμού του κατά τη διαδικασία εκχύλισης (Embuscado, 2018). Αυτό η τεχνική είναι επίσης ευρέως γνωστή ως εκχύλιση υπό πίεση (PFE), εκχύλιση υπό πίεση με θερμό διαλύτη (PHSE), ή επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (ASE). Μεγάλη ποικιλία διαλυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση, αν και, σήμερα, αναζητείται η χρήση του πιο

οικολογικού δυνατού διαλύτη. Μεταξύ αυτών, είναι το νερό, το οποίο προσελκύει ιδιαίτερη προσοχή λόγω της τροποποίησης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του, όταν υποβληθεί σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Σε αυτή την περίπτωση, η τεχνική μετονομάστηκε σε εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (SWE), και σε άλλη περίπτωση εκχύλιση με υπέρθερμο νερό (SHWE), ή εκχύλιση ζεστού νερού υπό πίεση (PHWE). Σε κάθε περίπτωση, οι βασικές αρχές και οι απαιτήσεις για τα όργανα είναι οι ίδιες ανεξάρτητα από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Στην PLE, ο διαλύτης είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας αφού θα επηρεάσει άμεσα τον τύπο των ενώσεων που εκχυλίστηκαν. Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από τον στόχο της διαδικασίας εκχύλισης. Ο πιο επαρκής διαλύτης επιλέγεται λαμβάνοντας υπόψη, τη φύση και τα χαρακτηριστικά των αναλυόμενων ουσιών-στόχων και ειδικά την διαλυτότητα τους. Επιπλέον, οι περιβαλλοντικές εκτιμήσεις έχουν μεγάλη επιρροή σε αυτήν την επιλογή, καθώς θα πρέπει να χρησιμοποιείται πάντα ο πιο πράσινος δυνατός διαλύτης (Zlabur, Brajer, Voca, Galic, Sanja, & Rimac - Brncic, 2021).

Η μέθοδος PLE έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση ενός ευρέος φάσματος διαφορετικών ενώσεων από βότανα και μπαχαρικά, όπως φαινολικές ενώσεις, αιθέρια έλαια, ανθρακινόνες, αλκαλοειδή ή ακόμα και φυτοφάρμακα. Όπως αναφέρθηκε, για να επιτευχθεί η καλύτερη απόδοση εκχύλισης, πολλές από τις εφαρμογές, πραγματοποίησαν μια βελτιστοποίηση των κύριων παραμέτρων της PLE που επηρεάζουν την διαδικασία της εκχύλισης. Εκτός από τις παραμέτρους εκχύλισης της διαδικασίας PLE, ο τύπος, η χημική δομή και η σταθερότητα των ενώσεων-στόχων θα πρέπει να μελετηθούν προσεκτικά. Οι κύριες ενώσεις που είναι υπεύθυνες όχι μόνο για τη χαρακτηριστική πικάντικη γεύση της πιπεριάς αλλά και για τις βιοδραστικές της επιδράσεις είναι τα αλκαλοειδή όπως η πιπερίνη, χαβικίνη, πιπεριδίνη και πιπερετίνη. Η μέθοδος PLE έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πιπερίνης και πιπεριδίνης από εμπορικές πιπεριές ως τρόπος αξιολόγησης της ποιότητάς τους. Θεωρώντας ότι η πιπερίνη και η πιπεριδίνη έχουν τελείως διαφορετική διαλυτότητα στο νερό, η εκλεκτική εκχύλιση κάθε ένωσης είναι δυνατή με χρήση διχλωρομεθανίου στους 70°C για την εκχύλιση πιπερίνης και χρήση νερού στους 50°C για την πλήρη ανάκτηση της πιπεριδίνης. Επίσης, μελετήθηκε, η επίδραση της φυσικής κατάστασης του δείγματος (σκόνη, σπασμένοι κόκκοι πιπεριού, ή πιπέρι). Η ανάκτηση πιπερίνης από ολόκληρους κόκκους πιπεριού ήταν πολύ χαμηλότερη από ό,τι με το αλεσμένο δείγμα, διότι οι ολόκληροι κόκκοι δεν επέτρεψαν αρκετή επαφή με τον διαλύτη και,

επομένως, επιτεύχθηκαν χαμηλότερες αποδόσεις (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020).

▪ **Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (Supercritical fluid extraction):** Το SFE βασίζεται στη χρήση διαλυτών σε θερμοκρασίες και πιέσεις πάνω από αυτές των «κρίσιμων σημείων». Οι φυσικές ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών είναι μεταξύ ενός αερίου και ενός υγρού. Για παράδειγμα, η πυκνότητα ενός υπερκρίσιμου ρευστού είναι παρόμοια με ένα υγρό ενώ το ιξώδες του είναι παρόμοιο με ένα αέριο και η διάχυσή του είναι μεταξύ αερίου και υγρού. Οι θερμικές αγωγιμότητες είναι σχετικά υψηλές σε υπερκρίσιμα ρευστά και έχουν μεγάλες τιμές κοντά στο κρίσιμο σημείο. Η επιφανειακή τάση είναι κοντά στο μηδέν στο κρίσιμο σημείο, όντας παρόμοια με τα αέρια και πολύ μικρότερες από ότι στα υγρά. Πολλές άλλες φυσικές ιδιότητες, όπως η σχετική διαπερατότητα και η ισχύς του διαλύτη, συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την πυκνότητα και με την πίεση πάνω από το κρίσιμο σημείο. Οι αλλαγές σε αυτές τις ιδιότητες είναι κρίσιμες κατά την αντιμετώπιση των δεδομένων της εκχύλισης, καθώς σχετίζονται με αλλαγές στη διαλυτότητα και στην μεταφορά μάζας (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020).

Ένα από τα πιο πολύτιμα χαρακτηριστικά της SFE είναι η πολύ μειωμένη χρήση ή η απουσία τοξικών οργανικών διαλυτών. Υπό αυτή την έννοια, η SFE χρησιμοποιώντας πράσινους διαλύτες έχει προταθεί ως καθαρή εναλλακτική λύση σε επιβλαβείς διαδικασίες. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την εκχύλιση βιοενεργών από φυσικές πηγές. Στην πραγματικότητα, το CO<sub>2</sub> έχει μια σειρά από ενδιαφέρουσες ιδιότητες: (α) είναι φθηνό, (β) οι κρίσιμες συνθήκες του είναι εύκολα προσεγγίσιμες (30,9 °C και 7,38 MPa), (γ) είναι φιλικός προς το περιβάλλον διαλύτης που θεωρείται και GRAS για τη χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων (Sanchez - Carmago , Montero, Mendiola , & Herrero, 2020).

## **2.4 Εκχυλίσματα μπαχαρικών και βοτάνων ως βιοενεργά και αντιμικροβιακά συστατικά**

Φρέσκα τρόφιμα όπως θαλασσινά, κρέας και γεωργικά προϊόντα έχουν περιορισμένη διάρκεια αποθήκευσης και συνδέονται με τροφιμογενείς ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς (Maria - Garcia, Gonzalez-Bermudez, Caballero - Valcarcel, Santaella-Pascual, & Frontela - Saseta, 2015). Παγκόσμια, η αλλοίωση που

προκαλείται από μικροοργανισμούς έχει μεγάλο αντίκτυπο σε όλα τα είδη τροφίμων και οδηγούν σε απώλεια μεγάλων ποσοτήτων προϊόντων, ακόμα και στις ανεπτυγμένες χώρες. Εκτιμάται ότι οι ετήσιες απώλειες τροφίμων φτάνει το 40%, λόγω πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένη την αλλοίωση των τροφίμων. Τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ζύμες είναι οι πιο κοινοί παράγοντες για την αλλοίωση σημαντικού αριθμού τροφίμων. Όταν οι μικροοργανισμοί έλθουν σε επαφή με τα τρόφιμα, μεταβολίζουν τα θρεπτικά συστατικά και παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι προκαλούν την αλλοίωση. Οι τροφιμογενείς ασθένειες είναι επίσης ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα για την ασφάλεια των τροφίμων που προκαλούνται από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, και καθίσταται ανησυχητικό για την δημόσια υγεία. Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται φυσικά στο περιβάλλον, έτσι μπορούν εύκολα να μολύνουν τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, σφαγής, επεξεργασίας και συσκευασίας. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν κάτω από διάφορες συνθήκες συντήρησης, όπως χαμηλή θερμοκρασία, συσκευασίες MAP και υπό κενό, καθώς και στην συμβατική παστερίωση (Gonelimali, και συν., 2018).

Διάφορες τεχνικές συντήρησης τροφίμων χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τον έλεγχο των μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Αυτές οι τεχνικές συντήρησης περιλαμβάνουν ψύξη, κατάψυξη, μείωση της υδατικής δραστηριότητας, περιορισμό των θρεπτικών συστατικών, οξίνιση, συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP), ζύμωση και μη θερμικές φυσικές επεξεργασίες ή προσθήκη συνθετικών αντιμικροβιακών ουσιών. Οι μέθοδοι συντήρησης που χρησιμοποιούν συνθετικά συντηρητικά είχαν ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκαν αυξανόμενες ανησυχίες για ζητήματα υγείας που σχετίζονται με τη χρήση συνθετικών συντηρητικών. Αυτές οι αυξημένες ανησυχίες παρακίνησαν την επιστημονική κοινότητα να διερευνήσει τα φυσικά αντιμικροβιακά προϊόντα ως εναλλακτική λύση. Τα φυτά είναι πλούσια σε φυσικές ουσίες με αντιμικροβιακές ιδιότητες και δρουν ως αντιοξειδωτικά και παράγοντες ενίσχυσης της γεύσης και του χρώματος που μπορούν να αυξήσουν την οργανοληπτική αποδοχή, να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων και να αποτρέψουν την ανάπτυξη τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

Έτσι, τα αντιμικροβιακά εκχυλίσματα που λαμβάνονται από φυτικά προϊόντα έχουν αναγνωριστεί ως πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις στα υπάρχοντα συνθετικά συντηρητικά. Τα φυτά είναι πλούσια σε μια ποικιλία αντιμικροβιακών ενώσεων, όπως σαπωνίνες, τανίνες, αλκαλοειδή, αλκενυλοφαινόλες, γλυκοαλκαλοειδή, φλαβονοειδή,

σεσκιτερπένια, λακτόνες, τερπενοειδή και εστέρες φορβόλης. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτικών προϊόντων. Οι πολυφαινόλες, οι οποίες είναι ιδιαίτερα πλούσια σε φλαβονοειδή φυτικά εκχυλίσματα, έχουν αντιβακτηριακή δράση έναντι μιας σειράς παθογόνων μικροοργανισμών. Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι παρούσες με ποικίλη δομική σύνθεση και αυτές οι διαφορές στις χημικές δομές των πολυφαινολών συμβάλλουν επίσης στην αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για την ανακάλυψη της ακριβούς αντιμικροβιακής δράσης αυτών των αιθέριων ελαίων. Αρκετές πρόσφατες ανασκοπήσεις έχουν επικεντρωθεί σε πρόσφατες αναφορές σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση μπαχαρικών και βοτάνων ή των αιθέριων ελαίων τους κατά των παθογόνων βακτηρίων που μεταδίδονται με τρόφιμα (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για την εύρεση φυσικών αντιμικροβιακών που μπορούν να αναστείλουν βακτήρια, μύκητες, καθώς και ιούς. Παράλληλα, η βιομηχανία των τροφίμων εξετάζει την αντικατάσταση ή/και συμπλήρωση ήδη υπάρχοντων τεχνικών συντήρησης, όπως θερμικές επεξεργασίες, αλάτισμα, οξίνιση, ξήρανση και συντήρηση με χημικά, με λιγότερο επεμβατικές μεθόδους (υψηλές πιέσεις, παλμικά ηλεκτρικά πεδία, παλμικό φως, ταλαντούμενο μαγνητικό πεδίο, επεξεργασίες με UV ακτινοβολίες, κλπ.). Ένας από τους λόγους είναι ότι ορισμένοι καταναλωτές, επιλέγουν σκόπιμα ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, με χρήση λιγότερων προσθέτων, ή τρόφιμα με φυσικά πρόσθετα (Maria - Garcia, Gonzalez-Bermudez, Caballero - Valcarcel, Santaella-Pascual, & Frontela - Saseta, 2015). Υπάρχουν σημαντικές ανησυχίες μεταξύ των καταναλωτών για το ρίσκο της χρήσης συνθετικών συντηρητικών όσον αφορά την υγεία, που οδηγεί σταδιακή μείωση της χρήσης τους ως συντηρητικά τροφίμων. Έτσι, χρειάζονται «πράσινες» μέθοδοι για την συντήρηση των τροφίμων, ώστε να μειώσουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών και να αυξήσουν το «shelf - life» των προϊόντων τροφίμων, χωρίς τη χρήση χημικών συντηρητικών (Faraja D. Gonelimali, 2018).

Ουσίες που απαντώνται στη φύση και προέρχονται άμεσα από βιολογικά συστήματα χωρίς αλλοίωση ή τροποποίηση σε εργαστηριακό περιβάλλον, αναγνωρίζονται ως φυσικά αντιμικροβιακά. Αυτά μπορούν να ληφθούν από διαφορετικές πηγές, συμπεριλαμβανόμενων φυτών, ζώων, βακτηρίων και μυκήτων. Από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα των φυσικών εκχυλισμάτων, είναι ότι καταναλώνονται από τους ανθρώπους για χιλιάδες χρόνια, καθώς και μέσα σε αυτά τα χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορους

τομείς της ανθρώπινης υγείας, όπως η παραδοσιακή ιατρική, στην διατροφή του ανθρώπου, ως λειτουργικά τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής και την παραγωγή ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών. Ο ρόλος τους ως αντιμικροβιακά προέρχεται από την ικανότητα τους να ελέγχουν την φυσική αλλοίωση (συντήρηση τροφίμων) και για την πρόληψη/έλεγχο της ανάπτυξης μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων (ασφάλεια τροφίμων). Οι πιθανές αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτών έχουν συσχετιστεί με την ικανότητα τους να συνθέτουν δευτερογενής μεταβολίτες, χημικές ενώσεις με σύνθετες δομές. Αυτές οι χημικές ενώσεις στα φυτά λειτουργούν για την ενίσχυση του αμυντικού συστήματός τους, και τα προστατεύουν από την έκθεση τους σε δυσμενείς για αυτά συνθήκες (Maria - Garcia, Gonzalez-Bermudez, Caballero - Valcarcel, Santaella-Pascual, & Frontela - Saseta, 2015).

## **2.5 Ορισμένα «ανοιχτά» ζητήματα που αφορούν την εφαρμογή εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων σε τρόφιμα.**

Για να γίνει εφικτή η εφαρμογή φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε ένα εμπορικό τρόφιμο, πρέπει να συμπεριληφθεί ένας αριθμός πιθανών ζητημάτων που πρέπει να εξεταστούν, συμπεριλαμβανομένου του Νομοθετικού καθεστώτος, των τοξικολογικών και αλλεργιογόνων επιδράσεων, το κόστος, η πιθανή μορφή, οι αισθητηριακές επιδράσεις, η επίδραση των συστατικών τροφίμων στη δραστηριότητα, την απόδειξη της αποτελεσματικότητας και την απουσία αρνητικών αλληλεπιδράσεων με την φυσική μικροχλωρίδα. Οι προκλήσεις αυτές εξετάζονται κατωτέρω (Davidson, Cekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

- **Νομικό καθεστώς:** Η εμπορία τροφίμων με φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες απαιτεί έγκριση από τις ρυθμιστικές αρχές και οργανισμούς στις περισσότερες χώρες. Η Γενική νομοθεσία για την ασφάλεια των τροφίμων ή/και ανώτατα όρια και άλλοι περιορισμοί (π.χ. αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη και το μη παρατηρούμενο ανεπιθύμητο ενεργειακό επίπεδο) χρήσης για συγκεκριμένα πρόσθετα καθορίζονται με βάση τις τοξικολογικές τους πληροφορίες. Ωστόσο, είναι δύσκολο να καθοριστεί μια συγκεκριμένη αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη ή μια μη παρατηρούμενη για τις φυσικές ενώσεις, λόγω της ποικιλίας των συστατικών τους. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, εάν μια ουσία άμεσου πρόσθετου τροφίμων δεν έχει καθεστώς GRAS σύμφωνα με τον ομοσπονδιακό νόμο για τα τρόφιμα, τα

φάρμακα και τα καλλυντικά, δεν αναφέρονται ως ασφαλείς με βάση το ιστορικό χρήσης από ανθρώπους (που κυκλοφόρησαν στην αγορά πριν από τις 15 Οκτωβρίου 1994) σύμφωνα με Dietary Supplement Health and Education Act. Η ασφάλεια του εν λόγω συστατικού/σύνθεσης πρέπει να τεκμηριώνεται για έγκριση πριν από την κυκλοφορία μέσω της διαδικασίας υποβολής αιτήσεων. Έτσι, όχι μόνο οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες, για παράδειγμα, το εκχύλισμα γαρούφαλλου ή το έλαιο κανέλας προϊόντα που καταναλώνονται συνήθως, δημιουργούν ελκυστικές ετικέτες τροφίμων για τους καταναλωτές, αλλά είναι επίσης λιγότερο πιθανό να υπόκεινται στις πολύπλοκες κανονιστικές απαιτήσεις και διαδικασίες έγκρισης για χρήση στα τρόφιμα σε σύγκριση με τα συνθετικά συντηρητικά (Davidson, Cekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

- **Τοξικολογικές και αλλεργιογόνες επιδράσεις:** Η τοξικολογική και αλλεργιογόνος ασφάλεια των προσθέτων τροφίμων αποτελεί προτεραιότητα και ένα μία από τις πιο σημαντικές πτυχές για να προσδιοριστεί κατά πόσον κάθε ένωση είναι κατάλληλη για κατανάλωση. Οι ενώσεις που απαντώνται και προέρχονται από τη φύση δεν αποτελούν εξαίρεση, διότι "φυσικές" δεν σημαίνει απαραίτητα "ασφαλείς". Είναι απαραίτητο να μελετηθούν τα τοξικολογικά χαρακτηριστικά των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών και των βιολογικών μεταβολιτών τους, της πιθανής τοξικότητας που προκαλείται από την αλληλεπίδραση με τα συστατικά των τροφίμων και την αλλεργιογένεια σε ευαίσθητα άτομα. Κατανάλωση συγκεκριμένων ενώσεων, όπως αυτές που περιέχονται στα μπαχαρικά, μπορεί να μην προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στα επίπεδα που υπάρχουν στη φύση, αλλά μπορεί να είναι τοξικές όταν μια υψηλή συγκέντρωση χρησιμοποιείται για την επίτευξη αντιμικροβιακής δράσης ή όταν καταναλώνεται συνεχώς για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για παράδειγμα, η κατανάλωση φυτικών εκχυλισμάτων με υψηλό επίπεδο τανίνης μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της απορρόφησης ιχνοστοιχείων και βιταμινών Β, ή η συνεχή κατανάλωση πιπεριάς (*Capsicum*) και τζίντζερ (*Zingiber officinale*) μπορεί να οδηγήσει σε γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση. Δυστυχώς, η διαδικασία συλλογής δεδομένων σχετικά με νέες αντιμικροβιακές ενώσεις και συστήματα για την τοξικότητά τους και τα αποδεκτά όρια για την ανθρώπινη κατανάλωση είναι εξαιρετικά δαπανηρή και χρονοβόρα, περιορίζοντας έτσι τη χρήση των περισσότερων νέων ενώσεων και συστημάτων (Davidson, Cekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

- **Κόστος:** Εκτός από την αποτελεσματική αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης και τη δραστηριότητα αδρανοποίησης, ένα «επιτυχημένο» αντιμικροβιακό πρέπει να έχει ένα

λογικό "κόστος χρήσης". Επειδή η προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών αυξάνει το κόστος ανά μονάδα ενός τελικού προϊόντος, οι δαπάνες για ένα αντιμικροβιακό σε απαιτούμενο επίπεδο, ανενεργούς φορείς (αδρανή συστατικά όπως η γλυκερόλη και μαλτοδεξτρίνη), και ενισχυτές (όπως επιφανειοδραστικές ουσίες και γαλακτωματοποιητές) πρέπει να δικαιολογούν την βελτιωμένη μικροβιολογική σταθερότητα και ποιότητα των προϊόντων. Λαμβάνοντας υπόψη το συνολικό κόστος σε πολλές περιπτώσεις, μια παρατεταμένη διάρκεια ζωής τουλάχιστον 2 - 3 ημερών θα μπορούσε να αντισταθμίσει το κόστος ενός αντιμικροβιακού, ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου. Παρόλο που τα φυσικά αντιμικροβιακά είναι συχνά πιο ακριβά από τις συνθετικές χημικές ουσίες λόγω των διαδικασιών παραγωγής και εξευγενισμού και της χαμηλότερης σταθερότητάς τους, η φιλική προς τον καταναλωτή επισήμανση των φυσικών ενώσεων είναι ιδιαίτερα επιθυμητή (Davidson, Sekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

- **Μορφή του αντιμικροβιακού:** Προσδιορισμός του(των) ενεργού(-ών) συστατικού(-ών) των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών και των ιδιοτήτων τους είναι ένα απαραίτητο βήμα για την καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο κάθε αντιμικροβιακό δρα. Φυσικοχημικές ιδιότητες όπως η πολικότητα, η πτητικότητα, το καθαρό φορτίο, η pKa και οι μοριακή διαμόρφωση σχετίζονται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις αυτών των ενώσεων με τους μικροοργανισμούς καθώς και με τα συστατικά των τροφίμων. Επιπλέον, μια συνεπής αντιμικροβιακή δράση μπορεί να επιτευχθεί με την τυποποίηση του επιπέδου των δραστικών συστατικών. Παρόλο που η χρήση «καθαρών» αντιμικροβιακών ουσιών μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε μεγαλύτερη δραστικότητα, δεν είναι απαραίτητα επιθυμητό να καθαρίζονται σε μεγάλο βαθμό τα φυσικά αντιμικροβιακά. Η εφαρμογή απομονωμένων συστατικών αναιρεί τον στόχο της διατήρησης της ετικέτας τροφίμων καθαρή από την ονοματολογία των χημικών συστατικών. Είναι επίσης πιο πιθανό ότι μια καθαρισμένη ένωση πρέπει να εγκριθεί από τους ρυθμιστικούς φορείς πριν από τη χρήση στα τρόφιμα. Επιπλέον, η απομόνωση του/των ενεργού(-ών) αντιμικροβιακού(-ών) συστατικού(-ών) θα απαιτούσε περισσότερα στάδια επεξεργασίας, αυξάνοντας έτσι το κόστος του αντιμικροβιακού και του τελικού προϊόντος. Επομένως, η χρήση αποτελεσματικών φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε μορφή όσο το δυνατόν πιο κοντά στις πηγές τους είναι τελικά επιθυμητή για μια "καθαρή" αντιμικροβιακή εφαρμογή στα τρόφιμα (Davidson, Sekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).



▪ **Αισθητηριακές/ Οργανοληπτικές επιδράσεις:** Η επίδραση των αντιμικροβιακών ουσιών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (π.χ. γεύση, οσμή, υφή και χρώμα) και την γευστικότητα ενός τροφίμου είναι ένας βασικός παράγοντας για την εφαρμογή των φυσικών αντιμικροβιακών. Οι γεύσεις ή οι οσμές των φυσικών ενώσεων θα μπορούσαν να συμβάλουν στη συνολική γεύση και οσμή των τροφίμων, οι οποίες μπορεί να είναι επιθυμητές ή ανεπιθύμητες. Μια αισθητηριακή συμβατότητα των επιλεγμένων αντιμικροβιακών ουσιών, ιδίως εκείνων με έντονο άρωμα, και του τύπου του τροφίμου θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά (π.χ. ένα εκχύλισμα σκόρδου είναι πιθανό να μην είναι συμβατό αντιμικροβιακό για το γάλα, ενώ μπορεί να είναι καλό για τα προϊόντα κρέατος). Η υψηλή συγκέντρωση πολλών φυσικών ενώσεων, όπως τα φυτικά αιθέρια έλαια, απαιτούνται συνήθως για να επιτευχθεί σημαντική αντιμικροβιακή δράση στα τρόφιμα, συνεπώς προκαλώντας δυνητικά απaráδεκτες παραμορφωτικές οσμές ή αρώματα. Η χρήση πολλαπλών αντιμικροβιακών ουσιών δεν θα μπορούσε να επηρεάσει θετικά μόνο την αντιμικροβιακή δράση, θα μπορούσε επίσης να είναι επωφελής για τη μείωση των αισθητηριακών επιπτώσεων με τη μείωση των επιπέδων χρήσης κάτω από τα μη αποδεκτά αισθητηριακά όρια. Για παράδειγμα, μια υψηλή συγκέντρωση αιθέριου ελαίου μουστάρδας θα μπορούσε να προκαλέσει αίσθηση θερμότητας στη γλώσσα. Συνδυασμοί αιθέριου ελαίου μουστάρδας με άλλα αντιμικροβιακά, συμπεριλαμβανομένου του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών, του εκχυλίσματος ελιάς, του αργινικού λαουρικού οξέος ή της νισίνης, βρέθηκε ότι μειώνουν την απαιτούμενη ποσότητα του ελαίου μουστάρδας, διατηρώντας παράλληλα τον έλεγχο των τροφιμογενών βακτηρίων και, συνεπώς, ελαχιστοποιώντας ενδεχομένως τον αισθητηριακό αντίκτυπο (Davidson, Cekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

▪ **Αλληλεπιδράσεις με συστατικά των τροφίμων:** Οι φυσικές ουσίες που έχουν αποδειχθεί ότι έχουν υψηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα *in vitro* συχνά έχουν μικρή έως καθόλου επίδραση έναντι μικροβιακών στόχων σε παρόμοιες συγκεντρώσεις όταν ενσωματώνονται σε ένα σύστημα τροφίμων. Αυτό οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με συστατικά των τροφίμων. Αρκετές φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες, όπως τα φυτικά αιθέρια έλαια, είναι γνωστό ότι είναι εν μέρει υδρόφοβα και εν μέρει υδρόφιλα. Τα υδρόφιλα μέρη των αντιμικροβιακών ουσιών είναι απαραίτητες για τη διαλυτοποίηση μιας ένωσης στην υδατική φάση όπου υπάρχουν μικροοργανισμοί, ενώ τα λιπόφιλα τμήματα απαιτούνται για την αλληλεπίδραση μιας ένωσης με μια μικροβιακή κυτταρική μεμβράνη που αποτελείται από φωσφολιπίδια. Ωστόσο, ο ίδιος αμφίφιλος χαρακτήρας μπορεί να έχει ως

αποτέλεσμα οι αντιμικροβιακές ουσίες να αλληλοεπιδρούν ή να διαλύονται από υδρόφοβα συστατικά των τροφίμων, όπως τα λιπίδια ή τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών. Αυτό, τα καθιστά μη διαθέσιμα για να αντιδράσουν με τους μικροοργανισμούς. Συστατικά των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών υδατανθράκων, ανιόντα και κατιόντα έχουν αποδειχθεί ότι αλληλοεπιδρούν με τα αντιμικροβιακά, με αποτέλεσμα την μειωμένη βιολογική τους δραστηριότητα. Ως εκ τούτου, είναι πολύ κρίσιμη η διεξαγωγή μιας δοκιμής αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας με αντιπροσωπευτικές παραμέτρους ενός συγκεκριμένου συστήματος τροφίμων πριν από την εφαρμογή (Davidson, Cekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

▪ **Μέθοδοι επικύρωσης της δραστηριότητας:** Μία από τις κύριες ανάγκες στον τομέα των αντιμικροβιακών ουσιών τροφίμων είναι η καθιέρωση μεθόδων για την επικύρωση της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας. Εκτός από τη νισίνη και τη λυσοζύμη, δεν υπάρχουν εγκεκριμένες από τις ρυθμιστικές αρχές μέθοδοι επικύρωσης της αντιμικροβιακής δραστηριότητας για άλλα αντιμικροβιακά τροφίμων στις Ηνωμένες Πολιτείες ή διεθνώς. Εάν μία εταιρεία επιθυμεί να αποδείξει ότι μια ένωση έχει την ισχυριζόμενη δραστηριότητα και/ή εξακολουθεί να είναι αποτελεσματική κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, πρέπει να αναπτυχθεί μια μέθοδος επικύρωσης της αντιμικροβιακής δράσης της. Λόγω των διαφόρων διαθέσιμων προσεγγίσεων (αραίωση σε ζωμό/αγάρ, διάχυση σε άγαρ, χρωματομετρική ανάλυση/δοκιμή μείωσης χρωστικής και πλάκες διαβάθμισης για την ανίχνευση ενός ανασταλτικού τελικού σημείου και μια μέθοδος με βάση τη θολερότητα και καμπύλες time - kill για ανίχνευση της δυναμικής κινητικής της μικροβιακής ανάπτυξης/θανάτωσης) χωρίς να υπάρχουν τυποποιημένες δοκιμασίες για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης, οι μέθοδοι και τα κριτήρια αξιολόγησης μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των μελετών. Παρόλο που υπάρχουν διαθέσιμα μοντέλα για την πρόβλεψη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας ενώσεων, η επικύρωση για αντιμικροβιακή χρήση σε συγκεκριμένα τρόφιμα είναι ζωτικής σημασίας. Η ισχυρή in vitro (σε μικροβιολογικό μέσο) δραστηριότητα μιας ένωσης δεν συνεπάγεται απαραίτητα υψηλή αποτελεσματικότητα in situ (σε ένα σύστημα τροφίμων). Για παράδειγμα, μια εννεαπλάσια αύξηση της συγκέντρωσης της θυμόλης χρειάστηκε για να ανασταλούν παρόμοια επίπεδα *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes* σε γάλα 2% σε σύγκριση με μηλίτη μήλου. Για την ορθή αξιολόγηση της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας, έχουν καθιερωθεί πρωτόκολλα δοκιμών που

είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά των πραγματικών προϊόντων τροφίμων ή της επεξεργασίας τροφίμων συνθήκες (Davidson, Cekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

▪ **Επίδραση στη φυσική μικροχλωρίδα:** Η εφαρμογή αντιμικροβιακών ουσιών με ειδική δραστηριότητα έναντι συγκεκριμένων μικροβιακών τύπων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση άλλων μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τις πηγές και τους τύπους της φυσιολογικής χλωρίδας και των αρχικών επιπέδων τους σε ένα τρόφιμο, έτσι ώστε η επιλογή του αντιμικροβιακού τύπου και της δοσολογίας να είναι κατάλληλη. Ένα ιδανικό φυσικό αντιμικροβιακό δεν θα πρέπει να συμβάλλει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους μικροοργανισμούς-στόχους ή στη μικροχλωρίδα. Όταν εκτίθεται σε δυσμενείς περιβαλλοντικές παράγοντες, όπως ακραίες θερμοκρασίες, χαμηλό pH, παρουσία αλατιού και οσμωτικών πιέσεων, ή/και διαλείπουσες ή συνεχείς υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις ενός συγκεκριμένου αντιμικροβιακού/ απολυμαντικού, οι μικροοργανισμοί μπορεί να αναπτύξουν είτε μειωμένη ευαισθησία είτε ακόμη και αντίσταση σε ένα αντιμικροβιακό. Η προσαρμογή των μικροοργανισμών περιλαμβάνει την απόκριση στο στρες/ κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας, όπως η μεταβολή της ανθεκτικότητας σε πολλαπλά αντιβιοτικά έκφρασης οπερονίου, αύξηση μιας αντλίας εκροής αντιμικροβιακών ουσιών, σύνθεση οξέος σοκ. πρωτεϊνών, ή μεταβολή της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης. Αυτές οι αντιδράσεις μπορεί επίσης να έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανοχής των μικροοργανισμών σε επακόλουθες καταπονήσεις, παραγωγή τοξινών και/ή αλλαγή της μικροβιακής μολυσματικότητας. Οι μικροοργανισμοί ως μέρος βιοϋμενίων είναι συνήθως πιο ανθεκτικοί σε αντιμικροβιακές σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Τα βιοϋμένια όχι μόνο περιορίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ αντιμικροβιακών και βακτηριακών κυττάρων, αυξάνουν επίσης τις πιθανότητες για μικροβιακή προσαρμογή επιτρέποντας την επικοινωνία από κύτταρο σε κύτταρο, γνωστή και ως "quorum sensing" και διευκολύνουν την ανίχνευση του στρες και την αντίδραση στο εξωτερικό περιβάλλον. Παρόλο που δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η σωστή χρήση των αντιμικροβιακών/απολυμαντικών στην παρασκευή τροφίμων θα οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών μικροοργανισμών, είναι πιθανό να εμφανιστούν στελέχη ανθεκτικά στα μικρόβια (Davidson, Cekmer, Monu, & Techathuvanan, 2015).

## **2.6 Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων βοτάνων και μπαχαρικών**

Αν και το αποτέλεσμα της αντιμικροβιακής δράσης συχνά είναι σχεδόν προφανές, ο μηχανισμός δράσης είναι ένα σχετικά ανεξερεύνητο πεδίο. Λαμβάνοντας υπόψη τον μεγάλο αριθμό διαφορετικών χημικών ενώσεων που υπάρχουν στα βότανα και στα μπαχαρικά, είναι πιθανό η αντιβακτηριακή δράση να οφείλεται σε περισσότερους του ενός μηχανισμού αλλά και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τον μικροοργανισμό στόχο που καλείται να αντιμετωπίσει. Οι Gyawali και Ibrahim (2015), σε μια πρόσφατη μελέτη, σχετικά με τα φυσικά προϊόντα ως αντιμικροβιακούς παράγοντες, εξήγησαν την σημασία των υδροξυλίων (-OH), στις φαινολικές ομάδες, οι οποίες προκαλούν ανασταλτική δράση στους μικροοργανισμούς. Τα υδροξύλια, πιθανόν ασκούν τοξικές επιδράσεις στη κυτταρική μεμβράνη. Η ενεργή, αυτή ομάδα, διαταράσσει τα ηλεκτρόνια και προωθεί την μεταγκατάσταση τους. Η ροή του  $K^+$  είναι συνήθως ένα πρώιμο σημάδι βλάβης και συχνά ακολουθείται με εκροή κυτταρικών συστατικών. Ενώσεις, όπως θυμόλη, καρβακρόλη, ευγενόλη και άλλες, έχουν αναφερθεί ότι αλληλοεπιδρούν με τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, διασκορπίζονται ιόντα  $H^+$  και  $K^+$ , επιτρέποντας έτσι τη διαρροή ζωτικών συστατικών για τα μικροβιακά συστήματα, όπως νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα και ATP, που επιφέρουν το θάνατο του κυττάρου. Με αυτόν τον τρόπο, η συνολική δραστηριότητα του κυττάρου διακόπτεται σε μεγάλο βαθμό, όπως η ωσμωτική πίεση, η μεταφορά διαλυμένων ουσιών και η ρύθμιση του μεταβολισμού του. Υπάρχει μεγάλη αύξηση της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, το οποίο είναι συνέπεια της ραγδαίας μείωσης τους ενδοκυτταρικού pH, τα μειωμένα επίπεδα ATP, η απώλεια πρωτονίων το οποίο ακολουθείται από κυτταρικό θάνατο (Maria - Garcia, Gonzalez-Bermudez, Caballero - Valcarcel, Santaella-Pascual, & Frontela - Saseta, 2015).

Περαιτέρω κυτταρική βλάβη μπορεί επίσης να σχετίζεται με τη διαταραχή των ενζυμικών δραστηριοτήτων, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο γενετικό υλικό των βακτηρίων, σχηματίζοντας υδροϋπεροξειδάση λιπαρών οξέων, μείωση στη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και αύξηση της δραστηριότητας της ATPάσης. Το ενδοκυτταρικό ATP μειώνεται με την εφαρμογή εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων στα βακτηριακά κύτταρα (λόγω μείωσης του ρυθμού σύνθεσης ATP ή της αυξημένης υδρόλυσης ATP), ενώ το εξωκυτταρικό ATP αυξάνεται εν μέρει λόγω της ενδοκυτταρικής διαρροής ATP έξω από το κύτταρο. Η πήξη του κυτταροπλασματικού υλικού, η απελευθέρωση των κυστιδίων της μεμβράνης και ο σχηματισμός δομής που μοιάζει με μεσοσωμάτιο, έχουν επίσης περιγραφεί ως αιτίες επιβράδυνσης της ανάπτυξης των

βακτηρίων (Maria - Garcia, Gonzalez-Bermudez, Caballero - Valcarcel, Santaella-Pascual, & Frontela - Saseta, 2015).

Γενικά, Gram αρνητικά βακτήρια όπως το *Escherichia coli* ή *Salmonella enteritidis* είναι λιγότερο ευαίσθητα σε αυτά τα φυσικά αντιμικροβιακά λόγω του λιποπολυσακχαρίτη που βρίσκεται στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία περιορίζει τη διάχυση των φαινολικών ενώσεων. Από την άλλη τα Gram θετικά βακτήρια (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ή *Bacillus cereus*) είναι συνήθως πιο ευαίσθητα στις βιοδραστικές ενώσεις βοτάνων και μπαχαρικών λόγω της άμεσης αλληλεπίδρασης της κυτταρικής μεμβράνης με αυτές τις λιπόφιλες ενώσεις (Maria - Garcia, Gonzalez-Bermudez, Caballero - Valcarcel, Santaella-Pascual, & Frontela - Saseta, 2015). Συνοπτικά οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης περιλαμβάνουν τα εξής:

- Ενώσεις που διαταράσσουν τις μεμβράνες και προκαλούν διαρροή κυτταρικού περιεχομένου, παρεμβολή της ενεργούς μεταφοράς ή των μεταβολικών ενζύμων, ή διάχυση της κυτταρικής ενέργειας με τη μορφή ATP (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).
- Άμεση μείωση του pH του υποστρώματος ή του μέσου ανάπτυξης λόγω αύξησης της συγκέντρωσης πρωτονίων, μείωση του εσωτερικού κυτταρικού pH με ιονισμό του μη διαχωρισμένου μορίου οξέος, ή διαταραχή της μεταφοράς του υποστρώματος με μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).
- Τα οργανικά οξέα που υπάρχουν στα φυτικά είδη μπορούν επίσης να αναστείλουν την οξείδωση της NADH, εξαλείφοντας έτσι αναγωγικούς παράγοντες στα συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το μη διαχωρισμένο τμήμα ενός μορίου οξέος είναι κυρίως υπεύθυνο για την αντιμικροβιακή δράση, η αποτελεσματικότητα σε ένα δεδομένο pH εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σταθερά διάστασης ( $pK_a$ ) του οξέος (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015)
- Τα οργανικά οξέα παρεμβαίνουν στη διαπερατότητα των μεμβρανών. Τα οργανικά οξέα βραχείας αλυσίδας παρεμβαίνουν στον ενεργειακό μεταβολισμό μεταβάλλοντας τη δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω αλληλεπίδρασης με μεμβρανικές πρωτεΐνες (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).
- Τα αιθέρια έλαια προκαλούν δομικές και λειτουργικές βλάβες στη βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη, όπου το βέλτιστο εύρος της υδροφοβικότητας εμπλέκεται επίσης στην τοξικότητα των αιθέριων ελαίων (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

- Οι αντιμικροβιακές ενώσεις των φυτών μπορούν να προσβάλουν τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, διαταράσσουν τα κυτταρικά ενζυμικά συστήματα, θέτουν σε κίνδυνο το γενετικό υλικό ενός βακτηριακού κυττάρου ή σχηματίζουν υδροϋπεροξειδάση λιπαρών οξέων με οξυγόνωση ακόρεστων λιπαρών οξέων (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).
- Η αντιμικροβιακή δράση των φλαβονοειδών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα αυτών των ενώσεων να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων. Η βλάβη της μεμβράνης και αλλαγές στο διακυτταρικό pH, στο δυναμικό της μεμβράνης και στη σύνθεση τριφωσφορικής αδενοσίνης (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

Οι προαναφερθέντες πιθανοί τρόποι δράσης είναι οι πιο γνωστοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται για να εξηγηθεί η αντιμικροβιακή δράση των φυσικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών εκχυλισμάτων. Ωστόσο, οι ακριβείς αντιμικροβιακοί μηχανισμοί δράσης συγκεκριμένων φυσικών ενώσεων έναντι των μικροοργανισμών-στόχων είναι ακόμη άγνωστοι. Συνοπτικά, ο θάνατος του βακτηρίου μπορεί να συμβεί κυρίως με: (α) Φυσική διάσπαση της μεμβράνης, (β) Διάσπαση της κινητήριας δύναμης πρωτονίων ή/ και (γ) Αναστολή της δραστηριότητας ενζύμων που συνδέονται με τη μεμβράνη (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

## **2.7 Μέθοδοι ελέγχου αντιμικροβιακής δράσης και προσδιορισμός αποτελεσματικότητας εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων**

Φυτά και άλλες φυσικές πηγές, παρέχουν μια μεγάλη ποικιλία σύνθετων ενώσεων, με πολύπλοκες δομές. Πρόσφατα, πολλοί ερευνητές επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών, τα οποία φαίνεται να είναι δυνητικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες. Ωστόσο, ύστερα από τη δημοσίευση των σχετικών ερευνών για την αντιμικροβιακή επίδραση των φυσικών αυτών προϊόντων, η σύγκριση των αποτελεσμάτων ήταν δύσκολη, λόγω της χρήσης διαφορετικών, μη τυποποιημένων προσεγγίσεων, τεχνικών προετοιμασίας εμβολίου, μεγέθους εμβολίου, το μέσο ανάπτυξης, της συνθήκης επώασης και τον προσδιορισμό των τελικών σημείων. Το γεγονός ότι ένα φυτικό εκχύλισμα παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση κεντρίζει το ενδιαφέρον, αλλά παράλληλα πρέπει να παρουσιάζονται αξιόπιστα δεδομένα, που να επιτρέπουν στους ερευνητές να συγκρίνουν αποτελέσματα. Μια ποικιλία εργαστηριακών μεθόδων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

αξιολόγηση της *in vitro* αντιμικροβιακής δραστηριότητας μια εκχυλισμένης βιοενεργής ουσίας (Balouiri, Sadiki, & Koraichi Ibnsouda, 2016).

Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά συστήματα δοκιμών και οργανισμοί για τον έλεγχο φυτικών εκχυλισμάτων και των συστατικών τους για αντιμικροβιακές δραστηριότητες. Τα συστήματα δοκιμής θα πρέπει ιδανικά να είναι απλά, γρήγορα, αναπαραγωγίμα, φθηνά και να μεγιστοποιούν την απόδοση των δειγμάτων. Η μέθοδος αραιώσης σε άγαρ έχει τυποποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιβιοτικών. Οι μέθοδοι αραιώσης για τον ανασταλτικό προσδιορισμό, επίσης συνιστώνται από το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI), χρησιμοποιώντας διαφορετικές αρχές για την αξιολόγηση της μικροβιακής ανάπτυξης ή της αναστολής της. Οι χρωματομετρικές μέθοδοι θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική προσέγγιση, χρησιμοποιώντας άλατα τετραζολίου ως δείκτες, δεδομένου ότι τα βακτήρια τα μετατρέπουν σε έγχρωμα παράγωγα φορμαζάνης που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν. Οι χρωματομετρικές μέθοδοι είναι καλοί δείκτες βακτηριακής ανάπτυξης- μερικές από αυτές περιλαμβάνουν το ΧΤΤ( 3'-{1-[(φαινυλαμινο)-καρβονύλιο]-3,4-τετραζολίου}-δισ (4-μεθοξυ-6-νιτροβενζολοσουλφονικό οξύ ένυδρο), TTC (2,3,5-τριφαινυλο-τετραζολίου χλωριούχο) και ρεσαζουρίνη. Ωστόσο, οι δυσκολίες που προκύπτουν λόγω του αυτοφθορισμού, αλάτων και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φυτικών προϊόντων, θα μπορούσαν να καταστήσουν λιγότερο κατάλληλους δείκτες για τη δοκιμασία MIC σε ορισμένες περιπτώσεις. Η μικροβιακή ανάπτυξη ή η αναστολή της μπορεί επίσης να μετρηθεί με διάφορους τρόπους, όπως η καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων, η άμεση μικροσκοπική μέτρηση, μέτρηση θολερότητας (οπτικής πυκνότητας), βιοφωταύγεια και φθορισμομετρία (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017).

▪ **Η μέθοδος μικροαραιώσεων:** Φαίνεται να είναι πιο κατάλληλη κατά τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των φυτοχημικών ουσιών. Στην πραγματικότητα, η μέθοδος αυτή έχει αρκετές πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ. Η μέθοδος της μικροαραιώσης σε ζωμό είναι ποσοτική, επιτρέπει τη χρήση μικρών ποσοτήτων ενώσεων ή φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και καλλιεργητικών μέσων και είναι καλά προσαρμοσμένη για φάρμακα που προορίζονται για συστηματική χρήση. Επιπλέον, η χρήση μικροπλακών επιτρέπει γρήγορη και μεγάλη παραγωγή ποσότητας δεδομένων. Η βακτηριακή ανάπτυξη θα μπορούσε να αξιολογηθεί είτε οπτικά είτε φασματοφωτομετρικά με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD, optical density). (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017). Η μικροβιολογία απαιτεί μεγάλη ποσότητα δεδομένων όταν μελετάται η

ανάπτυξη ενός ή περισσότερων στελεχών ως συνάρτηση διαφορετικών συνθηκών, όπως η θερμοκρασία, το pH ή η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ), καθώς και συγκέντρωση. Από μια στατιστική άποψη, παράμετροι ανάπτυξης (φάση καθυστέρησης, ποσοστό ανάπτυξης, μέγιστος πληθυσμός) λαμβάνονται με ακρίβεια, όταν υπάρχει επαρκής αριθμός καμπυλών ανάπτυξης (Begot , Densier, Daudin, Labadie, & Lebert, 1996)

Οι μέθοδοι των τρυβλίων έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως από την πρώιμες μέρες της μικροβιολογίας, αλλά δεν δίνουν άμεσα αποτελέσματα και είναι χρονοβόρα, ιδιαίτερα όταν απαιτείται μεγάλη ποσότητα δεδομένων. Η θολερότητα είναι μια καθιερωμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης βακτηρίων από μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (O.D.) που καθιστούν δυνατή την παρακολούθηση της ανάπτυξη του πληθυσμού των βακτηρίων σε πραγματικό χρόνο (Begot , Densier, Daudin, Labadie, & Lebert, 1996)

- **Χρωματομετρικές τεχνικές:** Οι χρωματομετρικές τεχνικές μικροαραιώσεων σε ζυμό με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων, όπως άλατα τετραζολίου, ή έγχρωμου δείκτη, επιτρέπουν την εύκολη εφαρμογή της MIC και αυξάνουν την αξιοπιστία αυτής της μεθόδου. Το κύριο μειονέκτημά της προέρχεται από το γεγονός ότι δεν είναι κατάλληλη για υδρόφοβα δείγματα, όπως τα τερπενοειδή (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017).
- **Βιοφωταύγεια ή φθοριομετρία:** Οι μετρήσεις είναι ευαίσθητες, αλλά απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και μπορεί να απαιτούν εκτεταμένη εργαστηριακή εργασία πριν από κάθε δοκιμή. Κατά συνέπεια, λίγες συμβατικές μέθοδοι του ελέγχου της αντιμικροβιακής ευαισθησίας είναι τόσο ακριβείς όσο και αναπαραγώγιμες όταν εφαρμόζονται σε βακτήρια που έχουν ειδικές απαιτήσεις ανάπτυξης ή αργό ρυθμό ανάπτυξης. Στο πλαίσιο αυτό, οι χρωματομετρικές μέθοδοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική προσέγγιση (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017).
- **Μέθοδοι διάχυσης:** Οι μέθοδοι διάχυσης είναι ελκυστικές λόγω της απλότητας και της χαμηλής τους κόστους, αλλά είναι, όπως όλες οι μέθοδοι που βασίζονται σε άγαρ, ενεργοβόρες και χρονοβόρες. Μπορούν επίσης να προσαρμοστούν για τον προσδιορισμό MIC, χρησιμοποιώντας αραιώσεις του δείγματος. Ωστόσο, οι υψηλότερες τιμές MIC λαμβάνονται όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος διάχυσης δίσκου, γεγονός που την καθιστά μη αξιόπιστη για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων. Στη μέθοδο διάχυσης δίσκου άγαρ ή διάχυσης με πηγαδάκια, η απουσία ζώνης αναστολής δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η ένωση είναι ανενεργή, ιδίως για τις λιγότερο πολικές ενώσεις,



οι οποίες διαχέονται περισσότερο αργά στο μέσο καλλιέργειας. Ως εκ τούτου, η δοκιμασία διάχυσης δεν είναι κατάλληλη για φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις που είναι ελάχιστα διαλυτές ή αδιάλυτες στο νερό και συνεπώς η υδρόφοβη φύση τους εμποδίζει την ομοιόμορφη διάχυση μέσω των μέσων άγαρ. Η διάχυση σε άγαρ είναι πιο κατάλληλη για δείγματα που προορίζονται για εξωτερική χρήση, όπως η θεραπεία των δερματοφύτων, αλλά θα πρέπει να αποφεύγεται για εκείνα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν συστηματικά (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017).

- **Βιοαυτογραφικές μέθοδοι:** Πρόκειται για μια παραλλαγή της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ, όπου ο αναλύτης είναι προσροφάται σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Η βιοαυτογραφία χρησιμοποιείται επίσης ως προκαταρκτική τεχνική φυτοχημικού ελέγχου, με την καθοδηγούμενη από τη βιοαυτοψία κλασματοποίηση, για την ανίχνευση δραστικών συστατικών. Η δοκιμασία βιοαυτογραφίας μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον καθαρισμό των αντιμικροβιακών ουσιών εάν οι δοκιμές πραγματοποιούνται με χρήση χρωματογραφημάτων. Βιοαυτογραφία επιτρέπει τον εύκολο εντοπισμό της δραστικότητας ακόμη και σε πολύπλοκες μήτρες, όπως αυτές που προέρχονται από φυσικές προϊόντα. Σύγκριση χρωματογραφημάτων που αναπτύσσονται υπό πανομοιότυπες συνθήκες και οπτικοποιούνται με τη χρήση κατάλληλου χρωμογόνου αντιδραστηρίου μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη φύση των δραστικών ενώσεων. Ένα πλεονέκτημα της βιοαυτογραφικής μεθόδου είναι η δυνατότητα χρήσης κινητών φάσεων που περιέχουν διαλύτες χαμηλής πτητικότητας, όπως η n-βουτανόλη, σε περίπτωση πλήρους απομάκρυνσής της πριν από τη διεξαγωγή των δοκιμών. Ωστόσο, πολύ όξινοι ή πολύ αλκαλικοί διαλύτες παραμένουν στην πλάκα TLC μετά από μεγάλο χρόνο ξήρανσης, αναστέλλοντας την πιθανή ανάπτυξη βακτηρίων (Tamokou, Mbaveng, & Kuete, 2017).

### **2.7.1 Ποσοτικοποίηση της αντιμικροβιακής δράσης και προσδιορισμός της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων**

Η αντιμικροβιακή δράση στα περισσότερα πειράματα έχει ποσοτικοποιηθεί σε δύο βάσεις, MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) και MBC (ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση), το οποίο λογικά είναι πάντα μεγαλύτερο από το MIC. Το MIC ορίζεται με διαφορετικούς όρους, μερικοί από αυτούς είναι: «χαμηλότερη συγκέντρωση με αποτέλεσμα τη

συντήρηση ή μείωση της βιωσιμότητας του μικροβιακού εμβολίου», «χαμηλότερη συγκέντρωση που απαιτείται για πλήρη αναστολή του μικροοργανισμού δοκιμής», «χαμηλότερη συγκέντρωση αναστολής που απαιτείται για πλήρη αναστολή του δοκιμαστικού οργανισμού μετά από 48 ώρες επώασης», ή « Η χαμηλότερη συγκέντρωση με αποτέλεσμα την σημαντική μείωση στη βιωσιμότητα του αρχικού μικροβιακού εμβολίου (>90%)». Από την άλλη, το MBC ορίζεται ως «η συγκέντρωση που το 99,9% ή περισσότερο του αρχικού πληθυσμού των μικροοργανισμών που εμβολιάστηκε θανατώνεται», ή «η χαμηλότερη συγκέντρωση κατά την ανακαλλιέργεια σε φρέσκο ζυμό που δεν παρατηρείται ανάπτυξη». Η ποσοτικοποίηση με τον όρο MIC αναφέρεται από τους περισσότερους ερευνητές, αλλά μερικοί αναφέρουν ότι το MBC είναι το μέτρο της αντιβακτηριακής απόδοσης. Η ελάχιστη ανασταλτική δράση (MIC) για τα περισσότερα κύρια γνωστά αντιμικροβιακά, όπως η καρβακρόλη, θυμόλη, κινναμαλδεΐδη και το κανναμικό οξύ είναι στην περιοχή 0,05 – 5 μl/m σε πειράματα in vitro (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010)

▪ **Ερμηνεία της αντιμικροβιακής δράσης των φυτοχημικών ουσιών:** Στις δοκιμές μικροβιακής ευαισθησίας, οι στατιστικές αναλύσεις δεν είναι απαραίτητες για να δείξουν τη σημασία των καταγεγραμμένων τιμών MIC. Αυτό οφείλεται συνήθως στο γεγονός ότι οι τιμές MIC προσδιορίζονται μετά από διπλές αραιώσεις, με διαφορές μεταξύ διαδοχικών συγκεντρώσεων είναι πολύ υψηλές ώστε να καθιστούν αξιόπιστη την απόκτηση διαφορετικών αποτελεσμάτων. Σε ένα τριπλό πείραμα, MIC θα πρέπει να λαμβάνεται ως η ίδια τιμή που λαμβάνεται τρεις φορές, ή μια τιμή που λαμβάνεται σε δύο από των τριών δοκιμών και όχι ο μέσος όρος των τριών δοκιμών. Ωστόσο, όταν οι μέθοδοι διάχυσης αφορούν, η σημασία των διαμέτρων της ζώνης αναστολής των δειγμάτων θα μπορούσε να επιβάλει στατιστικές αναλύσεις. Ωστόσο, οι στατιστικές αναλύσεις δεν είναι απαραίτητες όσον αφορά τις MIC, έχουν οριστεί από διάφορους συγγραφείς σημεία αντιμικροβιακής αποκοπής για να καταστεί δυνατή η καλύτερη κατανόηση του δυναμικού των φυτοχημικών ουσιών. Οι Fabry κ.ά. (1998) θεώρησαν ότι τα εκχυλίσματα που έχουν τιμές MIC κάτω από 8 mg/mL να έχουν αξιόλογες αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σύμφωνα με τους Simões κ.ά. (2009), τα φυτοχημικά ταξινομούνται συνήθως ως αντιμικροβιακά με βάση την ευαισθησία δοκιμών ευαισθησίας που παράγουν MIC στην περιοχή 100-1000 μg/mL. Τιμή MIC 100 μg/mL χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο για την ταξινόμηση της αντιμικροβιακής δράσης σύμφωνα με ορισμένες συγγραφείς που θεωρούν μια τιμή MIC μεταξύ 100 και 200 μg/mL

ως θετική για τα φυτικά εκχυλίσματα. Πιο επεξεργασμένα σημεία ελάχιστης αντιμικροβιακής δραστηριότητες ορίστηκαν πρόσφατα ως εξής:

(1) για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα:

- σημαντική δραστικότητα (MIC < 100 µg/mL),
- μέτρια δραστικότητα (100 < CMI ≤ 625 µg/mL),
- ασθενής δραστικότητα (CMI > 625 µg/mL),

(2) για καθαρές ενώσεις:

- σημαντική δραστικότητα (MIC < 10 µg/mL),
- μέτρια δραστικότητα (10 < MIC ≤ 100 µg/mL)
- χαμηλή δραστικότητα (MIC > 100 µg/mL) (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010).

## 2.8 Εφαρμογές αιθέριων ελαίων μπαχαρικών

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά ελαιώδη υγρά που λαμβάνονται από φυτικά υλικά, κυρίως βότανα και μπαχαρικά. Τα αιθέρια έλαια έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος παθογόνων και μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση. Οι περισσότερες αντιμικροβιακές εργασίες των αιθέριων ελαίων έχουν διεξαχθεί *in vitro*, με τη χρήση εργαστηριακών καλλιεργητικών μέσων (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015). Η μόλυνση των τροφίμων από αλλοιογόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Salmonella spp*, *Staphylococcus spp*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* και *L. monocytogenes*, επηρεάζουν την ποιότητα των τροφίμων και προκαλούν σοβαρή βλάβη στο ανθρώπινο εντερικό σύστημα, το ουροποιητικό σύστημα, το εντερικό σύστημα, με αποτέλεσμα εντερικές λοιμώξεις ακόμη και τροφικές δηλητηριάσεις. Η επίδραση των αιθέριων ελαίων κατά της αλλοίωσης των τροφίμων και των παθογόνων βακτηριών (αρνητικά κατά gram και θετικά κατά gram βακτήρια) έχει διερευνηθεί ευρέως (Li, Erhummwunsee, Liu, Yang, Zheng, & Tian, 2022). Τα αιθέρια έλαια από βότανα και μπαχαρικά έχουν υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli O157:H7*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus* σε επίπεδα μεταξύ 0,2 και 10 µl/ml (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010). Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά εξαιτίας των διαφόρων δομών των αντίστοιχων κυτταρικών τους τοιχωμάτων. Περίπου το 90 – 95% του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων

αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες, ενώ τα κυτταρικά τοιχώματα των κατά gram θετικών βακτηρίων είναι πιο πολύπλοκα, με ένα λεπτότερο στρώμα πεπτιδογλυκάνης και μια εξωτερική μεμβράνη που αποτελείται από ένα διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων. Τα μόρια των φυτικών αιθέριων ελαίων δύσκολα μπορούν να διαπεράσουν την πολύπλοκη μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, αλλά μπορούν να εισέλθουν ελεύθερα στα θετικά κατά Gram βακτήρια (Li, Erhummwunsee, Liu, Yang, Zheng , & Tian, 2022).

Τα αιθέρια από θυμάρι, γαρύφαλλο και πικροδάφνη μπορούν να μειώσουν τον πληθυσμό του *L. monocytogenes* σε διάλυμα πεπτόνης (1 g/l) σε χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης, 0,5 ml/l. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αιθέρια έλαια του θυμαριού και του γαρύφαλλου μείωσαν τον πληθυσμό του *L. monocytogenes* από 7,17 log σε 1,48 log CFU/g εντός 5 λεπτών από χρόνο επεξεργασίας. Τα αιθέρια έλαια πιμέντου προκάλεσαν μόνο μικρή μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes*, από 7,05 σε 6,75 log CFU/g, στις ίδιες συνθήκες. Ομοίως, ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης μέσα σε 4 ώρες έκθεσης σε μέσο καλλιέργειας στους 30 °C παρουσία αιθέριων ελαίων από ρίγανη, δεντρολίβανο και δάφνη. Οι συνδυασμοί αιθέριων ελαίων από ρίγανη με μαντζουράνα και θυμάρι με φασκόμηλο, είχαν υποσχόμενη αποτελεσματικότητα κατά του *E. coli* και του *L. monocytogenes*, αντίστοιχα. Ωστόσο, τα αιθέρια έλαια από ρίγανη και το θυμάρι είναι πιο αποτελεσματικά όταν εφαρμόζονται μεμονωμένα σε σύγκριση με το συνδυασμό. Η προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού (0,1%) σε τροποποιημένο ατμοσφαιρικό συσκευασμένο ψιλοκομμένο αρνίσιο κρέας είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της διατηρησιμότητας (Li, Erhummwunsee, Liu, Yang, Zheng , & Tian, 2022).

- **Μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum*):** Μελέτες των Dorman και Dean (2000) εξέτασαν την αντιμικροβιακή δράση ορισμένων αιθέριων ελαίων έναντι 25 διαφορετικών γενών βακτηρίων και έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο του μαύρου πιπεριού ήταν αποτελεσματικό τόσο κατά των θετικών κατά Gram όσο και κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. Το απέδωσαν αυτό στην ικανότητά του να αναστέλλει τη μεταφορά ηλεκτρονίων, τη μετατόπιση πρωτεϊνών, τη φωσφορυλίωση και τα ένζυμα εντός της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης. Η τερπινένιο-4-όλη βρέθηκε να αναστέλλει όλα τα βακτήρια εκτός από το *Leuconostoc cremoris*, επειδή μπορεί να δρα είτε ως παράγοντας μετουσίωσης πρωτεϊνών, είτε ως διαλύτης, είτε ως αφυδατωτικός παράγοντας. Τα τερπενοειδή β-πινένιο και α-πινένιο ασκούν την ανασταλτική τους δράση λόγω των λιπόφιλων ιδιοτήτων τους, της ισχύος των λειτουργικών τους ομάδων και της σταθερότητάς τους σε υδατικό περιβάλλον. Οι Karsha και

Lakshmi (2010) απέδωσαν τη βακτηριοκτόνο δράση του ελαίου του μαύρου πιπεριού στη ικανότητα να μεταβάλλει τη διαπερατότητα των μεμβρανών με αποτέλεσμα τη διαρροή ενδοκυτταρικών υλικών και την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Οι Zarringhalam κ.ά. (2013) απέδωσαν την αντιβακτηριακή δράση του αιθέριου ελαίου στα συστατικά πιπερίνη και ελαϊκό οξύ. Αν και έχει αναφερθεί η αντιβακτηριακή δράση της πιπερίνης, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τις ανασταλτικές επιδράσεις των λιπαρών οξέων σε ορισμένα βακτήρια. Σε μια άλλη μελέτη, το αιθέριο έλαιο του μαύρου πιπεριού αναφέρθηκε ότι αναστέλλει έξι οργανισμούς αλλοίωσης του κρέατος μόνο όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι Sahadeo και Vilas (2011) απέδειξαν επίσης ότι το αιθέριο έλαιο είχε ποσοστό αναστολής 43-64% όταν δοκιμάστηκε κατά των θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram οργανισμών, αλλά δεν ανέστειλε την *Escherichia coli* και τη *Salmonella typhi*. Αυτό δεν συνάδει με τις αναφορές των Dorman και Dean (2000), οι οποίοι απέδειξαν ότι το αιθέριο του μαύρου πιπεριού ανέστειλε και τους δύο οργανισμούς (Abdulazzez, Sani, James, & Abdullahi, 2016).

- **Γαρύφαλλο (*S. aromaticum*):** Οι ανασταλτικές παράμετροι (MIC, MBC και βέλτιστος χρόνος επαφής) του αιθέριου ελαίου γαρυφαλλού για τη μείωση ενός τροφιμογενούς παθογόνου (*Escherichia coli* O157:H7) αξιολογήθηκε από τους Moreira κ.ά. (2005). Οι τιμές MIC και MBC για το γαρυφαλλό ήταν 0,25 και 0,3 ml/100 ml, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Hammer κ.ά. (1999), αναφέρθηκαν παρόμοιες τιμές MIC (0,25 mL/100 mL) για το αιθέριο έλαιο γαρυφαλλού κατά του *E. coli*. Από την άλλη πλευρά, για να επιτευχθεί επαρκής διάρκεια ζωής, τα τρόφιμα απαιτούν μειωμένο αρχικό μικροβιακό φορτίο, καθώς και τον έλεγχο του ή την αναστολή του κατά τα στάδια παραγωγής. Για να επιτευχθεί η υψηλότερη απόδοση του αντιμικροβιακού παράγοντα είναι πολύ σημαντικό να βελτιστοποιηθεί ο χρόνος επαφής μεταξύ παθογόνου και αιθέριων ελαίων. Οι Moreira κ.ά. (2005) μελέτησα την ανασταλτική επίδραση του αιθέριου ελαίου γαρυφαλλού στην επιβίωση του *E. coli* κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 20 ωρών στους 20 °C. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ανέφεραν ότι κατά τη χρονική στιγμή μηδέν, η εφαρμογή γαρυφαλλού παρήγαγε μείωση κατά μία λογαριθμική φάση σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Μετά από 15 λεπτά εφαρμογής γαρυφαλλού οι μετρήσεις μειώθηκαν κατά 3,5 log σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, συμπεραίνοντας ότι ο βέλτιστος χρόνος επαφής μεταξύ του αιθέριου ελαίου και παθογόνου ήταν κοντά στα 15 λεπτά και αποδεικνύοντας ότι το γαρυφαλλό ασκεί σημαντική βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση στην ανάπτυξη του παθογόνου. Επίσης, οι

Elgaygar κ.ά. (2001) έδειξαν αντιμικροβιακή δράση του γαρύφαλλου έναντι επιλεγμένων παθογόνων και σαπροφυτικούς μικροοργανισμούς (Goni, Roura, Ponce, & Moreira, 2016).

▪ **Κανέλλα (*Cinnamom species*):** Η παρουσία της κινναμαλδεΐδης ως η πιο άφθονη ένωση στο αιθέριο έλαιο κανέλας και ως η κύρια βακτηριοκτόνος ένωση αναφέρθηκε επίσης από τους Bouhdid κ.ά. (2010), οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μηχανισμοί δράσης του αιθέριου ελαίου κανέλας κατά του *Staphylococcus aureus* ήταν η διαρροή του ενδοκυτταρικού ιόντος καλίου από τα κύτταρα των βακτηρίων και μια σημαντική μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας και της ικανότητας αναπαραγωγής του. Οι Mello κ.ά. (2012) εξέτασαν τη MIC και MBC του αιθέριου ελαίου κανέλας έναντι έξι επιλεγμένων παθογόνων τροφικών βακτήρια. Η *Yersinia enterocolitica* προέκυψε να είναι το πιο ευαίσθητο βακτήριο παρουσία αιθέριου ελαίου κανέλας με τιμές MIC και MBC 0,075 και 1,25 mg/ml, αντίστοιχα, ακολουθούμενες από τις *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus* που παρουσίασαν τις ίδιες τιμές MIC και MBC (2,5 και 5,0 mg/ml, αντίστοιχα). Τέλος, οι υψηλότερες τιμές MIC και MBC ελήφθησαν για τον *St. aureus*, το *E. coli* και τη *Salmonella typhimurium*: 5,0 και 10,0 mg/ml, αντίστοιχα. Ωστόσο, σε αυτή το μελέτη, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η αντιβακτηριακή δράση του αιθέριου ελαίου κανέλας οφειλόταν στην παρουσία οξυγονωμένων ενώσεων, όπως η λιναλοόλη, η 1,8-σινεόλη, η νεράλη και η γερανιάλη (Cardoso-Ugarte, Lopez-Malo, & Sosa-Morales, 2016).

▪ **Τζίντζερ (*Z. officinale*):** Το έλαιο τζίντζερ έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντιμικροβιακές επιδράσεις και μελέτες των Natta κ.ά. (2008) έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο του τζίντζερ που εξάγεται με υδροαπόσταξη διαθέτει υψηλές αντιβακτηριακές επιδράσεις σε παθογόνα των τροφίμων (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Listeria monocytogenes*), με ελάχιστη συγκέντρωση 6,25 μg/ml για την αναστολή των *B. cereus* και *L. monocytogenes*. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το έλαιο που εξάγεται από το ρίζωμα ήταν μέτρια δραστικό έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων *Bacillus licheniformis*, *Bacillus spizizenii* και *S. aureus*, και σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas stutzeri*. Μελέτες για τα θετικά κατά Gram βακτήρια, *Bacillus subtilis* (NCIM 2162), *S. aureus* (NCIM 2602), *Micrococcus luteus* (NCIM 2704), και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, *E. coli* (NCIM 2576), *Pseudomonas aeruginosa* (NCIM 2200), *Proteus vulgaris* (NCIM 2813), *K. pneumoniae* (NCIM 2957) έχουν επίσης δείξει ότι το έλαιο τζίντζερ είναι αποτελεσματικό. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αντιβακτηριακές επιδράσεις ήταν οι εξής: *B. subtilis* > *S. aureus* > *E. coli* = *P. vulgaris* > *P. aeruginosa* > *M.*

*luteus* > *K. pneumonia*. Το έλαιο τζίντζερ έχει επίσης αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιβακτηριακές επιδράσεις στην ανάπτυξη ψυχοτρόπων βακτηρίων που μεταδίδονται με τρόφιμα (Jakribettu, και συν., 2016).

### **2.8.1 Εφαρμογές υδατικών και αλκοολικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών**

Οι προτεινόμενες μέθοδοι, άμεση και υδατική, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του υδατικού εκχυλίσματος από σκόρδο έδειξε αναστολή της *E. coli* και της *Salmonella Typhi*. Οι Sakagami κ.ά. (2000) διερεύνησαν την επίδραση του εκχυλίσματος γαρύφαλλου στην παραγωγή βεροτοξινών από εντεροαιμορραγικό (EHEC) *E. coli* O157:H7. Το εκχύλισμα σε αποσταγμένου νερού γαρύφαλλου σε συγκέντρωση 0,5% (w/v) αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την παραγωγή της βεροτοξίνης EHEC. Οι Belguith κ.ά. (2009) ανέφεραν τη χρήση υδατικών εκχυλισμάτων σκόρδου που λαμβάνονται με απλά βήματα (ανάμειξη, φυγοκέντρηση, και αποστείρωση με φίλτρο). Αναφέρθηκε ότι το εκχύλισμα στα 11 - 13 mg/ml είχε βακτηριοστατική επίδραση στη *Salmonella Hadar*. Θερμική επεξεργασία του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος μοσχοκάρυδου εκχυλίσματα σπόρων μπορεί να ενισχύσει την αντιμικροβιακή δράση με την αύξηση της οξύτητας, των ολικών φαινολικών, και των μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων. Έτσι, το άμεσο εκχύλισμα φαίνεται να είναι υποσχόμενη μέθοδος για την αποφυγή πιθανής αλλοίωσης ή τροποποίηση της φύσης των φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων. Η άμεση/υδατική εκχύλιση χρησιμοποιείται στα εργαστήριό εδώ και πολλά χρόνια, δείχνοντας συνεπή αποτελέσματα. Επίσης, έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις εκχυλισμάτων διαφόρων φυτικών ειδών κατά διαφόρων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015). Αρκετές επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει αντιμικροβιακή δράση του *Capsicum annum* έναντι θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που προκαλούν τροφιμογενείς ασθένειες, ωστόσο, οι πληροφορίες σχετικά με τις υπεύθυνες ενώσεις για αυτές τις επιδράσεις είναι σχετικά λίγες. Οι Dorantes κ.ά. (2000) ανέφεραν υψηλή ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων του *C. annum* (habanero, serrano και morrón) κατά της *Listeria monocytogenes*, ακολουθούμενη από *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Salmonella enterica* sub. *Typhimurium*, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα φαινολικά οξέα m-κουμαρικό και κινναμικό οξύ ήταν υπεύθυνα για αυτές τις ανασταλτικές δραστηριότητες, σε

αντίθεση με την καψαϊκίνη και τη διυδροκαψαϊκίνη, που δεν παρουσίασαν αυτές τις επιδράσεις. Σχετικά πρόσφατα, οι Bacon κ.ά. (2017) ανέφεραν την ισχυρή αντιμικροβιακή δραστηριότητα, ιδίως έναντι της *L. monocytogenes*, από ένα είδος *Capsicum annuum* ("Jalapeño") κλάσμα εκχυλίσματος πλούσιο σε κινναμωμικά οξέα (~5 ppm). Οι συγγραφείς ανέφεραν επίσης μια ειδική αντιμικροβιακή δράση των καψινουσών, τα ανάλογα των καψαϊκινουοειδών, κατά των θετικών κατά Gram βακτηρίων, τα οποία έδειξαν διαταραχή του σχηματισμού βιοφίλμ που μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά του ασβεστίου που επηρεάζει την ανάπτυξη της αρχιτεκτονικής του βιοφίλμ. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, οι Careaga κ.ά. (2003) ανέφεραν μια ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση μιας «καμπάνας» *Capsicum annuum* εκχυλίσματος πιπεριάς 1,5 ml 100 g<sup>-1</sup> σε κιμά βοδινού κρέατος που εμποδίζει την ανάπτυξη του *S. Typhimurium*. Τα εκχυλίσματα *C. annuum* παρουσίασαν επίσης ανασταλτική δράση έναντι διαφορετικών μυκητών, συμπεριλαμβανομένου του *Penicillium expansum* (παραγωγός της μυκοτοξίνης πατουλίνης) και *Debaryomyces hansenii* (ευκαιριακό παθογόνο) (Baenas, Belovic, Moreno, & Garcia-Viguera, 2018). Επιπλέον, σε μελέτη διερευνήθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων γαρυφάλλου και σκόρδου ενάντια των μικροοργανισμών, *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus spp.* (θετικά κατά gram) και σε τρία αρνητικά κατά gram βακτήρια, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumoniae*. Η προετοιμασία των εκχυλισμάτων έγινε με διαφορετικό τρόπο από την παραπάνω έρευνα, δηλαδή, συνολικά 5 g σκόνης μπαχαρικών προστέθηκαν σε 20 ml διαλύτη που βρισκόταν σε κωνική φιάλη. Οι φιάλες σφραγίστηκαν με ξύλινο φελλό και τα περιεχόμενα των φιαλών αναμίχθηκαν επιμελώς. Οι σφραγισμένες φιάλες, στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα ρυθμισμένο στα 100 rpm κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ύστερα τα μείγματα διηθήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν σε 2000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε στείρο σωληνάριο Falcon και φυλάχθηκε σε ψυγείου στους 4°C για την μετέπειτα χρήση τους. Για την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα χρησιμοποιήθηκε δοκιμή διάχυσης σε άγαρ. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα γαρυφάλλου είχε μεγαλύτερο αντιμικροβιακό δυναμικό, ακολουθούμενο από το υδατικό εκχύλισμα γαρυφάλλου. Το αιθανολικό εκχύλισμα σκόρδου έδειξε μέτρια αντιμικροβιακή δράση, ενώ το υδατικό εκχύλισμα σκόρδου ήταν το λιγότερο αποτελεσματικό. Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής παρήχθη από το αιθανολικό εκχύλισμα γαρυφάλλου (25 ± 0,5 mm) κατά του *K. pneumoniae* ακολουθούμενο από τις ζώνες αναστολής από το



αιθανολικό εκχύλισμα του γαρυφάλλου έναντι του *S. aureus* ( $20 \pm 1$ mm), σε συγκεντρώσεις 1,0 mg/ml. Τα αιθανολικά και υδατικά διαλύματα είχαν ελάχιστες ανασταλτικές δράσεις 64 – 128mg/mL, έναντι όλων των υπό δοκιμή παθογόνων. Αυτό δείχνει την προοπτική χρήσης αυτών των εκχυλισμάτων φυτικών υλικών στην εφαρμογή τους σε παραγωγή φαρμάκων ή σε συστήματα τροφίμων (Liu, και συν., 2021).

Μία ακόμα πρόσφατη έρευνα από τους Barera Rani κ.ά. (2021), σχεδιάστηκε έτσι ώστε να αξιολογηθούν υδατικά εκχυλίσματα διαφορετικών κοινών μπαχαρικών, του μαύρου πιπεριού (*Piper nigrum*), μάραθου (*Foeniculum vulgare*), Ατζοβάν (*Trachyspermum ammi*) κανέλλας (*Cinnamomum Verum*), και κουρκουμά (*Curcuma Longa*). Η αποτελεσματικότητα των διαφορετικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών αξιολογήθηκε με την μέθοδο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), έναντι του *Staphylococcus aureus*. Η μέθοδος προετοιμασίας των εκχυλισμάτων διαφέρει και σε αυτή την περίπτωση, με 20 g αποξηραμένης σκόνης από κάθε προαναφερθέν μπαχαρικό να βυθίζεται σε 100 ml εξυγιασμένου νερού 25°C για 72 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, τα εκχυλίσματα φιλτραρίστηκαν με φίλτρα Whatman #41. Ύστερα τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο στους 4 °C για την μετέπειτα χρήση τους. Η αντιμικροβιακή δοκιμή έγινε μετά από 24 h. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα μπαχαρικών χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (5%, 10%, 15%) έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών (Rani, Naz, Saeed, & Clatha, 2021).

Μεταξύ πέντε ειδών μπαχαρικών, το πιο αποτελεσματικό μπαχαρικό για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης ήταν η κανέλλα, έναντι του *S. aureus* αναστέλλοντας πλήρως την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους σε συγκέντρωση 15%, ενώ το μαύρο πιπέρι απέτυχε να αναστείλει την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους ακόμη και στη μέγιστη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (15%). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συγκέντρωση 5% η ανασταλτική δράση όλων των μπαχαρικών ήταν κατά σειρά *T. ammi* > *C. verum* > *F. vulgare* > *C. longa*, > *P. nigrum*, σε συγκέντρωση 10% η ανασταλτική δράση κατά φθίνουσα σειρά ήταν *T. ammi* > *C. longa* > *C. verum* > *P. nigrum*, > *F. vulgare*, ενώ, σε συγκέντρωση 15% τα μπαχαρικά ανέστειλαν την ανάπτυξη βακτηρίων με σειρά *C. verum* > *T. ammi* > *C. longa* > *F. vulgare* > *P. nigrum* (Rani, Naz, Saeed, & Clatha, 2021).

Σε άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα από τον Abdulwahab (2021), ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση κανέλλας (*Cinnamomum cassia*), έναντι των παθογόνων βακτηρίων *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus spp*, *Proteus sp* και *Staphylococcus aureus*.

Επίσης, διεξήχθη ανάλυση (FTIR) του υδατικού εκχυλίσματος, ή οποία έδειξε ότι περιέχει πολλές ομάδες και δραστικές ενώσεις, ενώ τα αποτελέσματα των βακτηριακών δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν υψηλή ανασταλτική δράση του θερμού υδατικού εκχυλίσματος κανέλας κατά όλων των παθογόνων βακτηριακών στελεχών και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η προετοιμασία του ακατέργαστου εκχυλίσματος έγινε με τον εξής τρόπο: ζυγίστηκε 50 mg σκόνης και τοποθετήθηκε σε 300 ml νερού σε χαμηλή φωτιά και αφού έβρασε για 15 min, αφαιρέθηκε από τη φωτιά και ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα, διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί 0,4 μικρών υπό αποστειρωμένες συνθήκες και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία 39°C. Παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος ήταν ενάντια σε βακτήρια και διάμετρος αναστολής ήταν 35 mm σε συγκέντρωση 800 mg/mL σε *Bacillus* sp. ενώ τα βακτηριακά στελέχη ήταν ανθεκτικά στα περισσότερα από τα αντιβιοτικά, στη μελέτη (Αμοξικιλίνη, Γενταμυκίνη, Αμπικιλίνη, Ερυθρομυκίνη, Τετρακυκλίνη) εκτός από την γενταμυκίνη, η οποία έδειξε αναστολή των βακτηρίων *Staphylococcus aureus* με διάμετρο 19mm και *Serratia* sp. σε διάμετρο 17mm. Συμπεραίνουμε από τη μελέτη ότι η το εκχύλισμα κανέλας περιέχει πολλές δραστικές ενώσεις και αυτό το ζεστό υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό της κανέλας (*Cinnamomum cassia*) δείχνει να έχει υψηλή ανασταλτική ικανότητα για διάφορα βακτηριακά στελέχη, τα οποία υπερέβαιναν την ανασταλτική ικανότητα των αντιβιοτικών. Με βάση αυτά τα συσσωματώματα που βρέθηκαν σε συγκεκριμένες περιοχές στο φάσμα FTIR των φυτών που μελετήθηκαν, έχει επιβεβαιωθεί ότι αυτές οι δραστικές ομάδες οφείλονται στην ένωση κινναμαλδεΐδη, η οποία αποδεδειγμένα είναι από τις πιο δραστικές ουσίες, και δίνει την χαρακτηριστική γεύση και οσμή της κανέλλας. Επίσης, χρησιμοποιώντας HPLC, παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης ότι το εκχύλισμα περιείχε αλκαλοειδή και σαπωνινές, που είναι αντιμυκητιασικοί και αντιβακτηριακοί παράγοντες. Σημαντική, επιπλέον, είναι και η πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή του εκχυλίσματος που παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης του εκχυλίσματος, που αναφέρεται στην διαλυτότητα ορισμένων δραστικών ενώσεων. Ο διαλύτης, όπως έχει προαναφερθεί, είναι σημαντικός παράγοντας στην αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος. Σε άλλη έρευνα, όπως αναφέρει Afnan I. Abdulwahab (2021), αποδείχθηκε ότι τα υδατικά εκχυλίσματα είχαν δραστικές ουσίες, όπως υδατάνθρακες, σαπωνίνες, ρητίνες τανίνες και αλκαλοειδή (Abdulwahab, 2021).

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Sellami κ.ά. (2013) για την αντιβακτηριακή δράση εκχυλισμάτων διαλύτη έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων που σχετίζονται με τροφιογενείς ασθένειες. Η δραστηριότητα εκτιμήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου ζώνης αναστολής και με τον προσδιορισμό των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC). Τα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση έναντι των περισσότερων βακτηρίων που δοκιμάστηκαν. Τα υδατικά εκχυλίσματα έδειξαν ασθενή ανασταλτική δράση έναντι όλων των στελεχών που δοκιμάστηκαν εκτός από το εκχύλισμα ρίζας τζίντζερ που εμφάνισε υψηλή δραστηριότητα κατά του *K. pneumoniae*. Ομοίως, τα αλκοολούχα εκχυλίσματα έδειξαν χαμηλή ανασταλτική δράση ενάντια όλων των βακτηριακών στελεχών που δοκιμάστηκαν, εκτός από τα εκχυλίσματα ρίζας τζίντζερ και φλοιού πορτοκαλιού κατά του *K. pneumoniae*, και του εκχυλίσματος κουρκουμά έναντι του βακτηρίου *S. xylosum*. Το εξανικό εκχύλισμα εμφάνισε ένα ευρύ αντιβακτηριακό φάσμα και άσκησε σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι τόσο ενάντι τόσο των Gram θετικών, όσο και των Gram αρνητικών βακτηρίων. Το *S. xylosum* βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στα περισσότερα εξανικά εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν, ιδιαίτερα σε εκείνα της τσίλι και κόκκινης πιπεριάς, γαρυφάλλου, ρίζας τζίντζερ και μέντας (Sellami, Ghariani, Louati, Miled, & Gargouri, 2013).

Σε έρευνα του Maha (2012), 17 εκχυλίσματα μπαχαρικών που χρησιμοποιούνται συνήθως στην Αίγυπτο ως καρυκεύματα τροφίμων ελέγχθηκαν για τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες έναντι 7 τυποποιημένων μικροβιακών στελεχών (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *C. albicans* και *A. niger*). Μεταξύ των εξεταζόμενων αλκοολικών εκχυλισμάτων μόνο 3 (γαρύφαλλο, θυμάρι και κανέλα) παρουσίασαν αντιμικροβιακές δραστηριότητες ευρέος φάσματος. Μόνο 4 αλκοολούχα εκχυλίσματα (μαύρο πιπέρι, κρόκος, κόλιανδρος και μύρο) δεν είχαν αντιμικροβιακή δράση. Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα (53%) παρουσίασαν μόνο δράση κατά των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Κανένα από όλα τα εξεταζόμενα υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση με χαμηλότερες αντιβακτηριακές δράσεις σε σύγκριση με τα αλκοολικά τους. Οι αντιβακτηριακές δράση των αλκοολικών εκχυλισμάτων δεν εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση, ωστόσο η αντιμικροβιακή τους δράση ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση (Ismail, Essam, Mohamed, & Mourad, 2012).

Άλλη πρόσφατη έρευνα από τους Sana Mukhtar κ.ά. (2012) για την δράση υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων σκόρδου, κανέλλας και κουρκουμά ενάντια των *E. coli*

(ATCC 25922) και *Bacillus subtilis* (DSM 3256). Μεταξύ όλων των μπαχαρικών που εξετάστηκαν το σκόρδο έδειξε την καλύτερη δραστικότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις τόσο σε υδατικό όσο και σε αιθανολικό διαλύτη. Το σκόρδο παρουσίασε καλύτερη δραστικότητα έναντι του *B. subtilis* σε σύγκριση με το *E.coli*. Το υδατικό εκχύλισμα σκόρδου ήταν αποτελεσματικότερο σε σύγκριση με το αιθανολικό εκχύλισμα. Η δραστικότητα του 100% εκχυλίσματος σκόρδου ήταν συγκριτικά μεγαλύτερη, από το ναλιδιξικό οξύ, αλλά λιγότερο από την ιμιπενέμη. Το εκχύλισμα κανέλας ήταν επίσης αποτελεσματικό κατά του *B. subtilis*. Το αιθανολικό εκχύλισμα κανέλας ήταν πιο αποτελεσματικό στην αντιβακτηριακή του δράση σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμα. Ο λόγος είναι ότι το αντιμικροβιακό συστατικό του φλοιού της κανέλας είναι περισσότερο διαλυτό στην αιθανόλη σε σύγκριση με το νερό, αλλά η δραστηριότητά του αναφέρθηκε μικρότερη σε σύγκριση με το σκόρδο. Ο κουρκουμάς ήταν λιγότερο αποτελεσματικός κατά του *B. subtilis* μεταξύ των τριών μπαχαρικών της δοκιμής. Το αιθανολικό εκχύλισμα κουρκουμά έδειξε καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμα. με τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Οι ζώνες αναστολής που σχηματίστηκαν από το σκόρδο είχαν μικρότερη διάμετρο έναντι του *E.coli* σε σύγκριση με το *B.subtilis*. Το ναλιδιξικό οξύ ήταν αναποτελεσματικό έναντι του *E.coli*, ενώ το σκόρδο εμφάνισε ζώνη αναστολής περίπου ίση με το αιθανολικό εκχύλισμα κανέλας παρουσίασε καλύτερες ζώνες σε όλες τις συγκεντρώσεις κατά του *E.coli*, όπως και το εκχύλισμα κανέλας σε σύγκριση με τα υδατικά εκχυλίσματα τα οποία ήταν αποτελεσματικά μόνο σε υψηλότερη συγκέντρωση και σε σύγκριση με το ιμιπενέμη παρήγαγε μικρότερη ζώνη. Τόσο το υδατικό όσο και το αιθανολικό εκχύλισμα ήταν αποτελεσματικά κατά του *E.coli* αλλά το αιθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε συγκριτικά καλύτερα αποτελέσματα. Η ζώνη που σχηματίστηκε από τον κουρκουμά ήταν μικρότερη σε σύγκριση με το ιμιπενέμη. Τα ευρήματα συμφωνούν με την εργασία των Srinivasan et al., (2009). Στην εν λόγω μελέτη η αντιβακτηριακή δράση του σκόρδου ελέγχθηκε έναντι θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Μεταξύ των δύο βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν η μέγιστη δραστικότητα παρουσιάστηκε έναντι του *B. subtilis*. Το αρνητικό κατά Gram *E.coli* ήταν συγκριτικά ανθεκτικό σε σχέση με το θετικό κατά Gram *Bacillus subtilis*, αυτό μπορεί πιθανόν να οφείλεται στις δομικές διαφορές της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος (Mukhtar & Ghori, 2012).

Η αντιμικροβιακή δράση των υδατικών εκχυλισμάτων θα μπορούσε να οφείλεται σε ανιονικά συστατικά όπως θειοκυανικά, νιτρικά, χλωριούχα και θειικά άλατα, εκτός από

πολλές άλλες ενώσεις που υπάρχουν φυσικά στα φυτά. Τα αλκοολικά εκχυλίσματα έδειξαν καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τα υδατικά καθώς όντας οργανικά διαλύουν περισσότερες οργανικές ενώσεις με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεγαλύτερης ποσότητας ενεργών αντιμικροβιακών συστατικών (Mukhtar & Ghori, 2012)

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Rajashri Banerji κ.ά. (2022), εξετάστηκαν οι επιδράσεις των υδατικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών γαρυφάλλου και κανέλλας στη δραστηριότητα κατά του βιοφίλμ της *L. monocytogenes*. Τα εκχυλίσματα μπαχαρικών φάνηκαν να ήταν σε θέση να αναστείλουν τη βιωσιμότητα και το σχηματισμό βιοφίλμ της *L. monocytogenes*. Τα εκχυλίσματα διασκορπίζουν το βιοφίλμ που σχηματίζουν τα βακτήρια και μειώνουν την σύνθεση eDNA. Τα δεδομένα αποκάλυψαν ότι τα εκχυλίσματα μείωσαν τους παράγοντες που σχετίζονται με τη γονιμότητα του παθογόνου. Δεδομένου ότι το *L. monocytogenes* μπορεί να διατηρηθεί σε ποικίλο εύρος θερμοκρασιών, η προσθήκη εκχυλισμάτων νερού μπαχαρικών ως συντηρητικά μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη αυτού του παθογόνου. Επιπλέον, τα μπαχαρικά έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και είναι ευεργετικά για την υγεία. Σε αυτή τη μελέτη, καθώς τα υδατικά εκχυλίσματα κανέλας και γαρυφάλλου άσκησαν αντιμικροβιακή δράση κατά του *L. monocytogenes*, τα εκχυλίσματα μπορούν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά. Τα προϊόντα που περιλαμβάνουν ωμό κρέας κοτόπουλου, λουκάνικα, αρωματισμένα τυριά, συμπεριλαμβανομένων των έτοιμων προς κατανάλωση λαχανικών, μπορούν να προ-επεξεργαστούν με τα εκχυλίσματα μπαχαρικών για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης (Banerji, Mahamune, & Saroj, 2022).

Επίσης, έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Daigham et al. (2020), για την αντιμικροβιακή αξιολόγηση υδατικού εκχυλίσματος μαύρου πιπεριού (*Piper nigrum*). Η αντιβακτηριακή δράση του υδατικού εκχυλίσματος σπόρων μαύρου πιπεριού αξιολογήθηκε έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* και *Staphylococcus aureus*) και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* και *Proteus vulgaris* και *Pseudomonas aeruginosa*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υδατικό εκχύλισμα σπόρων μαύρου πιπεριού παρουσίασε ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *Klebsiella oxytoca* με ζώνη αναστολής ( $21 \pm 0,02$  mm) σε σύγκριση με τη θετική ουσία ελέγχου σιπροφλοξασίνη ( $34 \pm 0,11$ ) mm. Επιπλέον, η μικρότερη ζώνη αναστολής καταγράφηκε κατά των θετικών κατά Gram βακτηρίων *Enterococcus faecalis* ( $7 \pm 0,05$  mm), ενώ δεν έχει καμία δραστηριότητα κατά της

*Pseudomonas aeruginosa*. Η αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων εξαρτάται από το σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Μελέτες που διεξήχθησαν δήλωσαν την δράση του μαύρου πιπεριού για τον περιορισμό της ανάπτυξης ορισμένων παθογόνων βακτηρίων. Αναφέρθηκε ότι η πιπερίνη του μαύρου πιπεριού έχει αντιμικροβιακή δράση. Λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματα άλλων ερευνητών, τα εν λόγω αποτελέσματα συμφωνούν μεταξύ τους που ανέφεραν ότι το υδατικό εκχύλισμα του μαύρου πιπεριού ασκεί ισχυρή αντιβακτηριακή δραστηριότητα κατά των διαφόρων βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από το στόμα κοιλότητα διακοσίων εθελοντών ατόμων (Mahfouz & Daigham, 2020).

## **2.9 Εφαρμογές εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων μπαχαρικών και βοτάνων έναντι τροφιμογενών παθογόνων**

Η αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο από την επεξεργασία των τροφίμων έως τη διανομή. Οι πηγές αλλοίωσης μπορεί να είναι μικροβιολογικές, φυσικές και χημικές. Οι μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων και για τον έλεγχο της μικροβιολογικής αλλοίωσης έχουν βελτιωθεί αξιοσημείωτα για την εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών. Υπήρξε μια παράλληλη αύξηση στην έρευνα που σχετίζεται με τη χρήση των αιθέριων ελαίων και εκχυλισμάτων μπαχαρικών ως φυσικά συντηρητικά τροφίμων για βελτίωση της ποιότητας και επέκταση διάρκεια ζωής των προϊόντων διατροφής και μείωση ή θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών (Sellami, Ghariani, Louati, Miled, & Gargouri, 2013). Μπαχαρικά όπως το γαρύφαλλο, η κανέλα, η ρίγανη και το δεντρολίβανο είναι μερικά από τα πιο κοινά μπαχαρικά και βότανα με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Τα αιθέρια έλαια που λαμβάνονται από αυτά τα μπαχαρικά περιέχουν αρκετές δραστικές ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση, όπως η καρβακρόλη (5-ισοπροπυλο-2-μεθυλοφαινόλη), η κανναμαλδεΐδη (3-φαινυλοπροπ-2-ενάλ), η ευγενόλη (4-αλλυλ-2-μεθοξυφαινόλη) και η καμφορά. Τα μπαχαρικά είναι πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, τερπενοειδή και άλλες πτητικές ενώσεις ως αντιμικροβιακά συστατικά (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

Ο Zaika (1988) ομαδοποίησε τα διάφορα μπαχαρικά με βάση την αντιμικροβιακή τους δράση ως:

- ισχυρά (κανέλα, γαρύφαλλο, μουστάρδα),
- μέτρια (μπαχάρι, δάφνη, κύμινο, κόλιανδρο, κύμινο, ρίγανη, δεντρολίβανο, φασκόμηλο, θυμάρι) και
- αδύναμα (μαύρο πιπέρι, κόκκινο πιπέρι, τζίντζερ) (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

Κανέλα, γαρύφαλλο και μουστάρδα έχουν αντιμικροβιακή δράση κατά των μυκοτοξινογόνων *Aspergillus spp.*, *Aspergillus parasiticus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, μυκοτοξινογόνο *Aspergillus*, *Shigella sonnei* και *Shigella flexneri*. Το κύμινο, η ρίγανη, το δεντρολίβανο, το φασκόμηλο και το θυμάρι έχουν ανασταλτικές ιδιότητες έναντι του *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus cereus*. Τα εκχύλισμα σκόρδου έχουν αντιβακτηριακή δράση έναντι όλων των ορότυπων του *E. coli*, ενώ το εντεροαιμορραγικό *E. coli* (ορότυπος O157) και το εντεροτοξινογόνο *E. coli* (οροομάδα O8) είναι πιο ευαίσθητα στο εκχύλισμα σκόρδου. Το σκόρδο επίσης έδειξε ανασταλτικές επιδράσεις έναντι ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένης της *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, μυκοτοξινογόνο *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumonia* (Gyawali, Hayek, & Ibrahim, 2015).

## **2.10 Συνεργιστικές και ανταγωνιστικές δράσεις εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων μπαχαρικών και βοτάνων**

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών των εκχυλισμάτων μπαχαρικών και βοτάνων μπορεί να παράγει τέσσερις πιθανούς τύπους αποτελεσμάτων:

**(α)** ουδέτερο, όταν υπάρχει απουσία αλληλεπίδρασης

**(β)** προσθετική όταν η συνδυασμένη επίδραση είναι ίση με το άθροισμα των επιμέρους επιδράσεων.

**(γ)** ανταγωνιστική όταν η επίδραση μιας ή και των δύο ενώσεων είναι μικρότερη όταν εφαρμόζονται μαζί από ότι όταν εφαρμόζονται μεμονωμένα

**(δ)** συνεργιστική όταν η επίδραση των συνδυασμένων ουσιών είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των επιμέρους επιδράσεων (Macwan, Dabhi, Aparnathi, & Prajapati, 2016).

Συχνά διαπιστώνεται ότι τα δευτερεύοντα στοιχεία αιθέριων ελαίων διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αύξηση της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητάς τους, δηλαδή συνεργεία (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010).

Υπάρχουν ορισμένοι γενικά αποδεκτοί μηχανισμοί αντιμικροβιακής αλληλεπίδρασης που παράγουν συνεργισμό: διαδοχική αναστολή μιας κοινής βιοχημικής οδού, αναστολή προστατευτικών ενζύμων, συνδυασμοί δραστικών παραγόντων του κυτταρικού τοιχώματος και χρήση δραστικών παραγόντων του κυτταρικού τοιχώματος για την ενίσχυση της πρόσληψης άλλων αντιμικροβιακών ουσιών. Ο συνεργισμός μεταξύ της καρβακρόλης και του π-κυμένιου, ενός πολύ ασθενούς αντιμικροβιακού παράγοντα, θα μπορούσε να διευκολύνει τη μεταφορά της καρβακρόλης στο κύτταρο με την καλύτερη διόγκωση του κυτταρικού τοιχώματος του *B. cereus*. Η θυμόλη και η καρβακρόλη έδειξαν συνεργιστικές και ανταγωνιστικές επιδράσεις, σε διάφορους συνδυασμούς αιθέριου ελαίου από κόλιανδρο, άνηθο και ευκάλυπτο και μείγματα κυνναμαλδεΰδης και ευγενόλης, έναντι *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.* και *Enterobacter sp* (Macwan, Dabhi, Arpanathi, & Prajapati, 2016).

Η εφαρμογή της νισίνης με καρβακρόλη ή θυμόλη ήταν θετικά αποτελεσματική κατά του *Bacillus cereus* με αύξηση των θερμοκρασιών από 8 έως 30°C. Η εφαρμογή νισίνης με εκχύλισμα δενδρολίβανου ενίσχυσε τη βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση της νισίνης. Τα αιθέρια έλαια ρίγανης, σε συνδυασμό με συσκευασία MAP, αύξησαν αποτελεσματικά τη διάρκεια ζωής του φρέσκου κοτόπουλου. Συνδυασμοί αιθέριων ελαίων ρίγανης και θυμαριού, ρίγανης με μαντζουράνα και θυμαριού με φασκόμηλο είχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά των *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli O157:H7* και *L. monocytogenes* (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010).

Οι συνεργιστικές επιδράσεις της ευγενόλης/καρβακρόλης και της ευγενόλης/θυμόλης μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη αποσυνθέτουν την εξωτερική μεμβράνη του *E. coli*, καθιστώντας ευκολότερη την είσοδο της ευγενόλης στο κυτταρόπλασμα και την ένωση με τις πρωτεΐνες. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η συνεργιστική δράση της ευγενόλης/κινναμαλδεΰδης πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδραση αυτών των συστατικών με διαφορετικές πρωτεΐνες ή ένζυμα. Η θυμόλη ή η καρβακρόλη θα μπορούσαν να αυξήσουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και πιθανώς να επιτρέψουν την ευκολότερη μεταφορά της κινναμαλδεΰδης στο κύτταρο. Η θυμόλη ή



η καρβακρόλη θα μπορούσαν να αυξήσουν τον αριθμό, το μέγεθος ή τη διάρκεια ύπαρξης των πόρων που δημιουργούνται από τη σύνδεση της κινναμαλδεΐδης με πρωτεΐνες στην κυτταρική μεμβράνη, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται συνεργιστικό αποτέλεσμα όταν τα δύο αυτά συστατικά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό. Οι συνεργιστικοί συνδυασμοί των ΕΟ ρίγανης/βασιλικού κατά του *E. coli*, βασιλικού/περίλλης κατά του *S. aureus*, ρίγανης/περίλλης κατά του *B. subtilis* και ρίγανης/περίλλης κατά του *S. cerevisiae* διατάραξαν σημαντικά την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών σε σύγκριση με τις μη επεξεργασμένες μεμβράνες ελέγχου (Bassolé and Juliani, 2012). Ο συνδυασμός αιθέριων ελαίων γαρύφαλλου και δεντρολίβανου παρήγαγε προσθετική δράση κατά των θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, δηλαδή των *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* και *P. aeruginosa* (Macwan, Dabhi, Aparnathi, & Prajapati, 2016).

Ένας συνδυασμός μπαχαρικών μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικός ως συντηρητικό από ένα μπαχαρικό. Οι μικροοργανισμοί διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους σε συγκεκριμένα μπαχαρικά. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στα μπαχαρικά από τα Gram-αρνητικά βακτήρια. Οι *Bacillus subtilis* και *Staphylococcus aureus* είναι πιο ευαίσθητη από το *Escherichia (E) coli*. Ορισμένα μπαχαρικά μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιμικροβιακά ευρέως φάσματος, όπως το δεντρολίβανο και το φασκόμηλο, ενώ άλλα είναι πολύ συγκεκριμένα στις λειτουργίες τους, όπως το μπαχάρι και ο κόλιανδρος (Raghavan, 2006).

Ανταγωνιστικό αποτέλεσμα μπορεί να δημιουργηθεί μεταξύ καρβακρόλης και π – κυμενίου, δημιουργώντας ένα ασθενές αντιμικροβιακό και διογκώνοντας το κύτταρικό τοίχωμα του *Bacillus Cereus*. Αντιμικροβιακή δραστηριότητα, με συνδυασμό αιθέριου ελαίου κανέλας και γαρυφάλλου σε φάση ατμού, έδειξε καλύτερες αντιμικροβιακές ιδιότητες, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στον ατμό από την υγρή φάση. Θυμόλη και καρβακρόλη έδειξαν συνεργιστικές ανταγωνιστικές επιδράσεις σε διαφορετικούς συνδυασμούς σε κόλιανδρο, άνηθο και ευκάλυπτο και μείγματα κινναμαλδεΐδης και ευγενόλης ενάντια του *Staphylococcus Sp*, *Micrococcus sp*, *Bacillus sp* και *enterobacter sp*. Ανταγωνιστική επίδραση έδειξαν, ενάντια του *B. Cereus* στο ρύζι, όταν χρησιμοποιήθηκε καρβακρόλη και π – κυμένιο με αλάτι (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010).

Έχει διερευνηθεί η εκμετάλλευση της συνεργιστικής δράσης που προκύπτει από το συνδυασμό των αιθέριων ελαίων με άλλες βιολογικές αντιμικροβιακές ουσίες, όπως οι

βακτηριοσίνες. Η χρήση αιθέριου ελαίου ρίγανης ή θρουμπιού έδειξε συνεργιστική δράση με συνδυασμό προσροφημένης από κύτταρα βακτηριοσίνης ενός στελέχους *Lactobacillus curvatus* όταν εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της *Listeria monocytogenes* σε χοιρινό κρέας που αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Ο συνδυασμός των συστατικών αιθέριου ελαίου, θυμόλης ή κανναμαλδεΰδης με χαμηλές θερμοκρασίες ( $\geq 8^{\circ}\text{C}$ ) παράγει επίσης συνεργιστική δράση στον έλεγχο του τροφιμογενούς βακτηρίου *B. cereus*. Έχει παρατηρηθεί συνεργισμός μεταξύ της καρβακρόλης και της βιολογικής πρόδρομης ουσίας του π-κυμένιου όταν επιδρά στα βλαστικά κύτταρα του *B. cereus*. Φαίνεται ότι το π-κυμένιο, ένα πολύ ασθενές αντιβακτηριακό, διογκώνει τις βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι η καρβακρόλη. Με αυτόν τον μηχανισμό το π-κυμένιο πιθανώς επιτρέπει στην καρβακρόλη να μεταφέρεται ευκολότερα στο κύτταρο, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται συνεργική δράση όταν τα δύο χρησιμοποιούνται μαζί. Σε ταραμοσαλάτα έχει καταγραφεί συνεργία μεταξύ NaCl και ελαίου μέντας κατά των *S. enteritidis* και *L. monocytogenes*. Η συνδυασμένη χρήση 2-3% NaCl και 0,5% σκόνης γαρύφαλλου (που περιέχει ευγενόλη και οξικό ευγενύλιο) σε εκχύλισμα μυών σκουμπριού έχει βρεθεί ότι εμποδίζει πλήρως την ανάπτυξη και την παραγωγή ισταμίνης από το *E. aerogenes*. Το εκχύλισμα τριών φυτών *cornifrutus*, κανέλας και κινέζικου σχίνου έδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση στα βακτήρια, στις ζύμες και στις μούχλες, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, τα εκχυλίσματα του *cornifrutus*, της κανέλας και του κινεζικού σχίνου αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1:1 (v/v/v) και αποδείχθηκε ότι διαθέτουν την ευδιάκριτη αντιμικροβιακή δράση σε 15 μικροοργανισμούς της δοκιμής (Macwan, Dabhi, Aparnathi, & Prajapati, 2016).

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Witkowska κ.ά. (2013) για την αντιμικροβιακή συνεργιστική δράση εκχυλισμάτων γλυκάνισου (*Pimpinell anisum*) L.), βασιλικού (*Ocimum basilicum* L.), δάφνης (*Laurus nobilis* L.), μαύρου πιπέριού (*Piper nigrum* L.), πιπέριου καγιέν (*Capsicum annuum* L.), σέλινου (*Apium graveolens* L.), τσίλι (*Capsicum annuum* L.), κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum* L.), γαρύφαλλου (*Syzygium aromaticum* L.), κορίανδρου (*Coriandrum sativum* L.), κύμινου (*Cuminum cyminum* L.), άνηθου (*Anethum graveolens* L.), μάραθου (*Foeniculum vulgare* Mill.), κρεμμυδιού (*Allium cepa* L.), σκόρδου (*Allium sativum* L.), τζίντζερ (*Zingiber officinale* Rosc.), μοσχοκάρυδου (*Myristica fragrans* Houtt.), μαντζουράνας (*Origanum majorana* L.), μουστάρδας (*Sinapis alba* L.), μοσχοκάρυδου (*Myristica fragrans* Houtt.), ρίγανης (*Origanum vulgare* L.), πάπρικας (*Capsicum annuum* L.), μαϊντανού (*Petroselinum crispum* L.), πιμέντο (*Pimentadioica* L.),

δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* L.), φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.), θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.), κουρκουμά (*Curcuma longa* L.) και λευκού πιπεριού (*Piper nigrum* L.), έναντι των *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Escherichia coli* (ATCC 11303), *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas fluorescens*. Για το καθένα φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί διαλύτες, νερό, αιθανόλη και εξάνιο. Τα αποτελέσματα για την συνεργιστική δράση έδειξαν ότι οι συνδυασμοί εκχυλισμάτων αιθανόλης εμφανίζουν ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες και αξιολογήθηκαν για συνεργιστικές/ανταγωνιστικές δραστηριότητες. Όσον αφορά την κλίμακα FIC, κανένας από τους συνδυασμούς δεν εμφάνισε συνεργιστική δράση (δείκτης FIC < 0,5) έναντι οποιουδήποτε από τα βακτήρια που εξετάστηκαν, ωστόσο, παρατηρήθηκαν ορισμένες προσθετικές επιδράσεις ( $0,5 \leq \text{FICindex} \leq 1$ ) σε συνδυασμούς που περιείχαν ρίγανη. Η ρίγανη σε συνδυασμό με δεντρολίβανο ή φασκόμηλο είχε προσθετική επίδραση κατά του *L. innocua* και *S. aureus*. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν προσθετικές επιδράσεις κατά του *E. coli* ή του *P. fluorescens*. Δεν παρατηρήθηκαν ανταγωνιστικές επιδράσεις για κανέναν από τους συνδυασμούς (Withowska , Hichey , Alonso - Gomez, & Wilkinson, 2013).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Υλικά και Μέθοδοι

Στις παραγράφους που ακολουθούν αναφέρονται τα φυτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, ο εξοπλισμός, τα αντιδραστήρια, η μέθοδος εκχύλισης καθώς και η μέθοδος προσδιορισμού της αντιμικροβιακής δράσης των επιλεγμένων μπαχαρικών.

#### 3.1 Υλικά

Τα υλικά, περιλαμβανομένων των μικροοργανισμών, που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή ήταν τα ακόλουθα.

##### 3.1.1 Μικροοργανισμοί

Τα είδη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- *Staphylococcus aureus* NCTC 12981
- *Listeria monocytogenes* NCTC 7973
- *Bacillus cereus* NCTC 10320

##### 3.1.2 Υπόστρωμα και συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Όλοι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονταν στο υγρό υπόστρωμα BHI (Merck, .....) στους 37°C. Όλες οι καλλιέργειες ήταν 12 ώρης επώασης ώστε τα βακτήρια του εμβολίου να

είναι στην αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξής τους.

### 3.1.3 Φυτικά υλικά

Το δείγμα που μελετήθηκαν ήταν: μαύρο πιπέρι, πράσινο πιπέρι καθώς και πιπέρι καγιέν. Όλα ήταν σε μορφή σκόνης και αγοράστηκαν από κατάστημα στην περιοχή του κέντρου των Αθηνών το οποίο ειδικεύεται στην πώληση μπαχαρικών και βοτάνων.

### 3.1.4 Αντιδραστήρια – Υποστρώματα

Για την ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκαν HCl 1M και NaOH 1M.

## 3.2 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε:

- Κωνικές εσμυρτισμένες φιάλες όγκου 100 mL
- Υάλινα ποτήρια ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτα (100  $\mu$ l – 1000 $\mu$ l)
- Θερμαντική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα (FALC INSTRUMENTS S.r.l LURANO, ITALY, 2000)
- Ψυγείο ( με κατάψυξη στους – 40 °C )
- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Chyo Balance Corp, Japan)
- Συσκευή φυγοκέντρωσης (Biofuge.pico, Kendro laboratory products, Germany 1999)
- Σωληνάκια τύπου eppendorf (1.5 + 2 mL)
- Φίλτρο μεμβρανών σε σύριγγα για μικροδιήθηση 0.45  $\mu$ m (Whatman)
- ρΗμετρική συσκευή (Hanna Inst. HI2002 – edge)
- Θερμόμετρο αλκοόλης
- Θάλαμος Νηματικής Ροής (MODEL:BSC-13000IIA2-X, JINAN BIOBASE BIOTECH BIOTECH CO.,LTD, Zhangqiu, Jinan City, 2022.01)

### 3.2.1 Πολυφωτόμετρο με σύστημα επώασης – Bioscreen System

Η παρακολούθηση της εξέλιξης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών-στόχων (*target strains*) σε γινόταν μέσω φωτόμετρου/ θολερόμετρου (*microplate reader*) σε ειδικές αποστειρωμένες πλάκες μικροβοθρίων οι οποίες περιείχαν υγρό υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

(α)



(β)



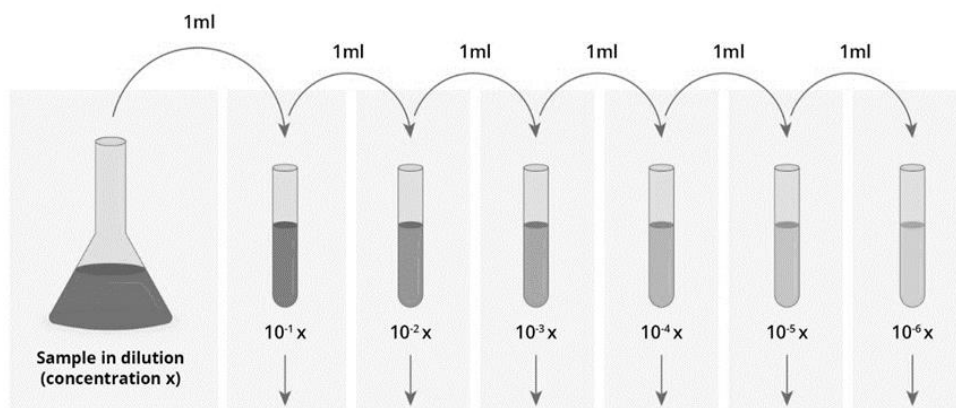
**Εικόνα 10:** (α) Πολυφωτόμετρο με σύστημα επώασης – Bioscreen System, (β) πλάκες μικροβοθρίων (*honeycomb*) ΠΗΓΗ: [http://www.bioscreen.fi/?page\\_id=288](http://www.bioscreen.fi/?page_id=288)

Οι πλάκες μικροβοθρίων (*honeycomb*) επωάζονται συνεχώς υπό κατάλληλες συνθήκες και πριν από κάθε μέτρηση ανακινούνται κατάλληλα. Οι θολερομετρικές μετρήσεις εξάγονται σε υπολογιστή και στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία για τη δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης, οπτικής πυκνότητας (OD 600 nm) έναντι του χρόνου.

### 3.3 Μέθοδοι

#### 3.3.1 Παρασκευή εμβολίου

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων δοκιμάστηκαν κατά θετικών Gram βακτηρίων, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus*. Από την 12 ωρη καλλιέργεια του βακτηρίου πραγματοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και με βάση προκαταρκτικές δοκιμές λαμβάνονται **18** μL από την κατάλληλη αραιώση όπου ο πληθυσμός ήταν  $10^4$  cfu/mL για *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes*, ενώ για *Bacillus cereus* ο πληθυσμός ήταν  $10^5$  cfu/mL.



**Εικόνα 11:** Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις μικροβιακών πληθυσμών  
Πηγή: <https://www.fao.org/3/ac802e/ac802e0q.htm>

### 3.3.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών και προετοιμασία δειγμάτων

Η εκχύλιση των δειγμάτων μπαχαρικών πραγματοποιούνταν κατά τον ακόλουθο τρόπο-βήματα:

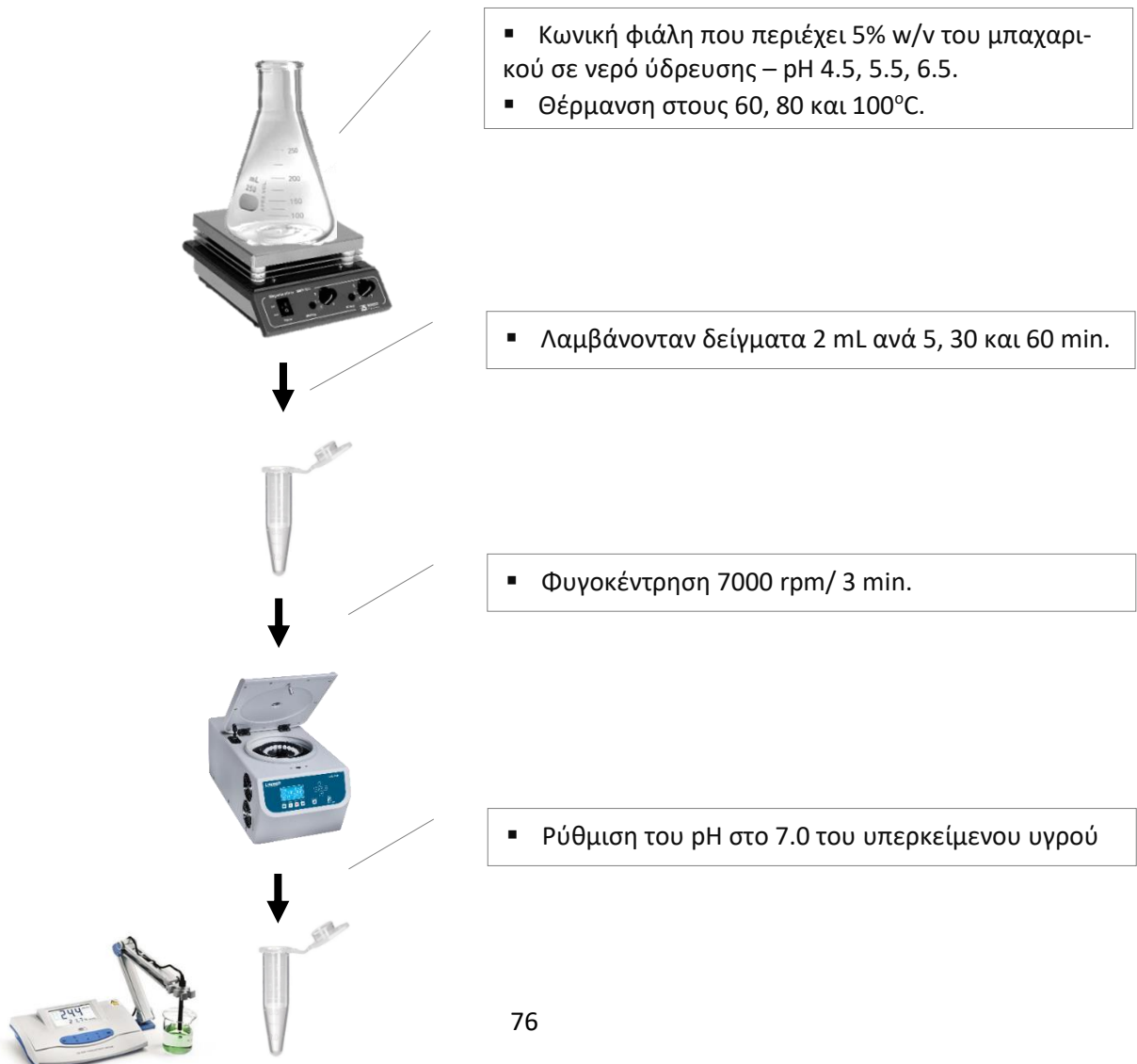
1. Σε κωνική φιάλη που περιείχε νερό ύδρευσης προσθέτονταν το υπό μελέτη μπαχαρικό σε ποσοστό 5% κ.β. Ακολουθούσε ρύθμιση του pH στις προεπιλεγμένες τιμές (4.5, 5.5, 6.5) με χρήση 1 M HCl ή 1 M NaOH.
2. Αρχικά λαμβάνονταν δείγμα 2 mL το οποίο μεταφέρονταν σε Eppendorf cup.
3. Υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση το διάλυμα τίθονταν υπό θέρμανση στους 60, 80 και 100°C.
4. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (5, 30 και 60 min) εξάγονταν δείγματα 2 mL και μεταφέρονταν σε Eppendorf cup.
5. Τα δείγματα τοποθετούταν ισοβαρώς σε μικροφυγόκεντρο και ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 3 min στα 7000 rpm.
6. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγονταν και ρυθμιζονταν σε τιμή pH 7.0
7. Τα υδατικά εκχυλίσματα που έχουν επεξεργαστεί σε διαφορετικούς συνδυασμούς αρχικού pH, θερμοκρασίας και χρόνου ρυθμίζονται σε τιμή pH 7.
8. Ακολουθούσε μικροδιήθηση με χρήση φίλτρων-δίσκου (Whatman 0,45μm) σε αποστειρωμένα Eppendorf.
9. Το διάλυμα που προέκυπτε ήταν το «Μητρικό Διάλυμα» από το οποίο λαμβάνονταν κατάλληλες ποσότητες και γίνονταν οι αραιώσεις
10. Τα δείγματα που συλλέγονται, τοποθετούνται στο ψυγείο και αποθηκεύονται για τη μετέπειτα χρήση τους.

### 3.3.3 Προετοιμασία και εμβολιασμός της πλάκας μικροβοθρίων

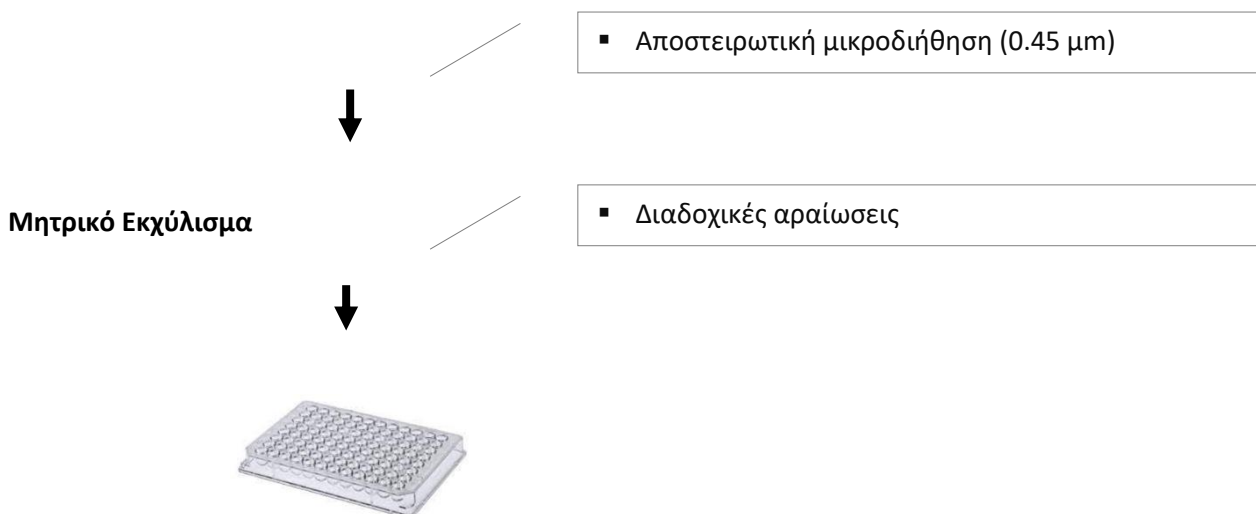
Για την προετοιμασία της πλάκας μικροτιτλοδότησης 100 φρεατίων, πριν την εισαγωγή της στη συσκευή Bioscreen C, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Κάθε ένα από τα μικροβοθρία έχει όγκο 400 μL.
2. Αρχικά προσθέτονταν 300 μL υγρού θρεπτικού υποστρώματος (BHI, Brain Heart Infusion)

3. Ακολουθούσε η προσθήκη 35μL δείγματος κατάλληλης αρχικής αραιώσης ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι: 5%, 3.1% και 2.1% κ.ο. (τελικές συγκεντρώσεις του Μητρικού Διαλύματος).
  4. Τέλος προστίθονταν 15 mL εμβολίου του μικροοργανισμού-στόχου.
  5. Συνεπώς στο τέλος της διαδικασίας σε κάθε ένα βοθρίο (microwell) περιέχονταν 350 μL, δηλαδή ίσχυε: % δείγματος =  $(35/350) \times 100 = 10\%$ .
- **Θετικοί μάρτυρες (positive controls):** Ως θετικοί μάρτυρες ήταν *S. aureus*, *L. monocytogenes* και *Bacillus cereus* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI, χωρίς όμως το εκχύλισμα. Η καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού στόχου χρησιμοποιούνταν ως καμπύλη-αναφοράς.
  - **Αρνητικοί μάρτυρες (negative controls):** Πρόκειται για μικροβοθρία που δεν περιείχαν εμβόλιο αλλά μόνο το δείγμα. Ο σκοπός αυτών των μαρτύρων ήταν να αφαιρεθεί το χρώμα του εκχυλίσματος το οποίο λειτουργεί ως «θόρυβος» κατά την φωτομετρική μέτρηση της θολερότητας.







**Διάγραμμα 1** | Διάγραμμα ροής της διαδικασίας παρασκευής του «Μητρικού Εκχυλίσματος»

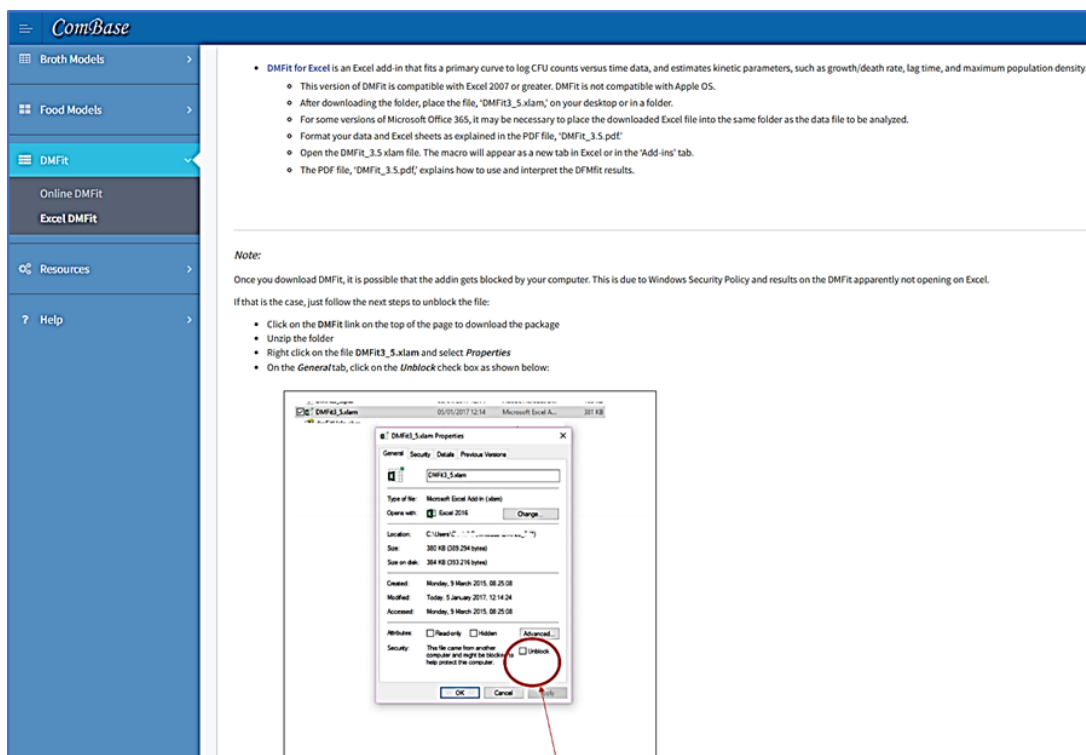
- **Συνθήκες επώασης:** Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης επωάζονταν στους 37°C για 48 h, στο αυτόματο θολερόμετρο (Bioscreen C). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD, Optical Density), έγινε σε μήκος κύματος 600 nm, και εκτελούνταν κάθε 30 λεπτά μετά από ανακίνηση 10 δευτερολέπτων.

### 3.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των υδατικών εκχυλισμάτων έναντι επιλεγμένων τροφιμογενών παθογόνων

Τα βήματα αξιοποίησης των δεδομένων που παράγονταν μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων ήταν τα ακόλουθα:

1. Εξάγονται όλες οι μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας, των θετικών μαρτύρων, των αρνητικών μαρτύρων και των δειγμάτων ως προς τον χρόνο μέτρησης (κάθε 30 min για 48h, με την πρώτη μέτρηση σε χρόνο 0 h) σε φύλλο αρχείου Microsoft EXCEL.
2. Ύστερα, υπολογίζεται ο μέσος όρος ( $n=2$ ) των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας (OD) των θετικών μαρτύρων και των δειγμάτων.
3. Για κάθε μέσο όρο των δειγμάτων αφαιρείται ο αντίστοιχος αρνητικός μάρτυρας με το ίδιο υδατικό εκχύλισμα, ώστε στις μετρήσεις να φαίνεται καθαρά η μικροβιακή πυκνότητα του κάθε δείγματος.

4. Στη συνέχεια, με τη χρήση των εργαλείων του Microsoft EXCEL δημιουργούνται οι καμπύλες ανάπτυξης των θετικών μαρτύρων των μικροοργανισμών και των δειγμάτων με τον πιθανό αντιμικροβιακό παράγοντα ώστε να παρατηρηθεί η ύπαρξη ή μη ύπαρξη ανασταλτικής δράσης.
5. Για την περαιτέρω ανάλυση και σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης και την παρατήρηση της ανασταλτικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό DMFit 2.0, το οποίο είναι επέκταση του λογισμικού Microsoft EXCEL. Το συγκεκριμένο λογισμικό προσφέρεται δωρεάν από την ιστοσελίδα «COMBASE» (<https://www.combase.cc/index.php/en/>) η οποία υποστηρίζεται από το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA, U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE). Το συγκεκριμένο λογισμικό επιτρέπει τον υπολογισμό σημαντικών παραμέτρων των καμπυλών ανάπτυξης, όπως τον ρυθμό ανάπτυξης ( $\mu$ , growth rate σε μονάδες  $h^{-1}$ ) και χρόνο υστέρησης ( $\lambda$ , lag time σε μονάδες h), από τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (OD) για κάθε καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού ως προς το χρόνο (h). Στην συγκεκριμένη εργασία για την μαθηματοποίηση των καμπυλών ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Baranyi & Roberts με  $R^2 > 95\%$ .



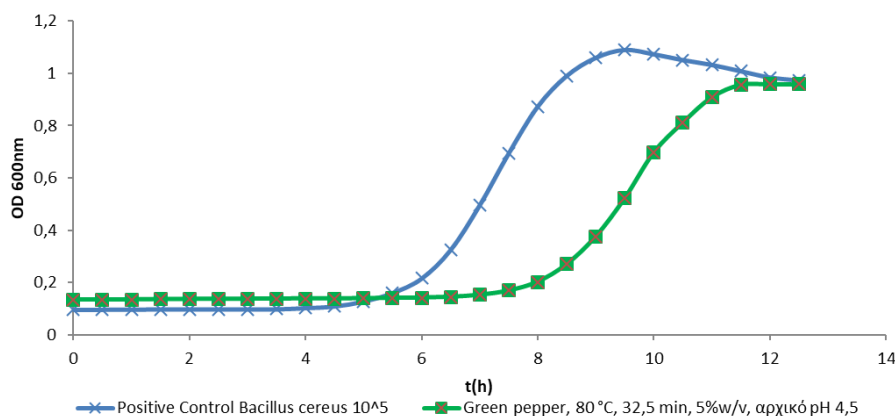
**Εικόνα 12** | Η πρώτη σελίδα του λογισμικού DMFit 2.0, το οποίο είναι επέκταση του λογισμικού Microsoft EXCEL στην βάση δεδομένων Combase.

- **Υπολογισμός βαθμού αναστολής:** Από την εξαγωγή των παραπάνω παραμέτρων ( $\mu$  και  $\lambda$ ) για κάθε καμπύλη ανάπτυξης των τριών μικροοργανισμών με υδατικά εκχυλίσματα μπαχαρικών σε διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης (θερμοκρασία °C, χρόνο εκχύλισης min, συγκέντρωση %w/v και αρχική τιμή pH εκχύλισης), καθώς και για τους θετικούς μάρτυρες του κάθε μικροοργανισμού, υπολογίστηκε ο «βαθμός αναστολής» (%) με σημείο αναφοράς τις αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα αναφοράς που πρακτικά είναι η ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού υπό ιδανικές συνθήκες.

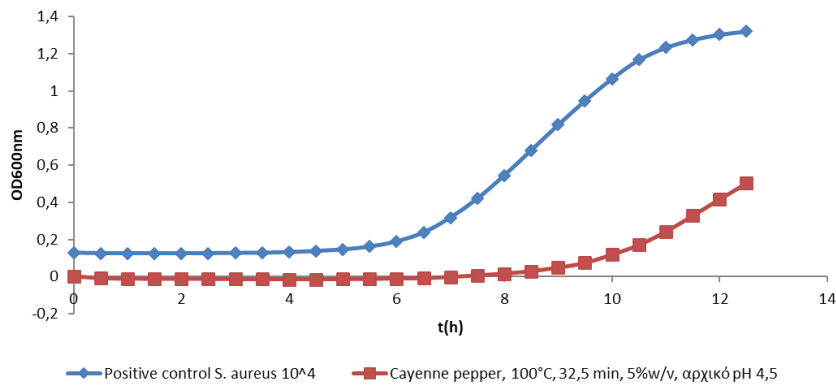
Στην συγκεκριμένη μελέτη ως «βαθμός αναστολής» (%) ορίστηκε η μεταβολή του χρόνου προσαρμογής ( $\lambda$ , lag time) του μικροοργανισμού υπό την επίδραση του εκχυλίσματος και του ίδιου μικροοργανισμού χωρίς την επίδραση του δείγματος την ίδια ημέρα υπό τις ίδιες συνθήκες.

$$(1) \text{Inhibition\%}(\text{lag time}, \lambda) = \frac{\lambda_{\text{positive control}} - \lambda_{\text{sample}}}{\lambda_{\text{positive control}}} \times 100$$

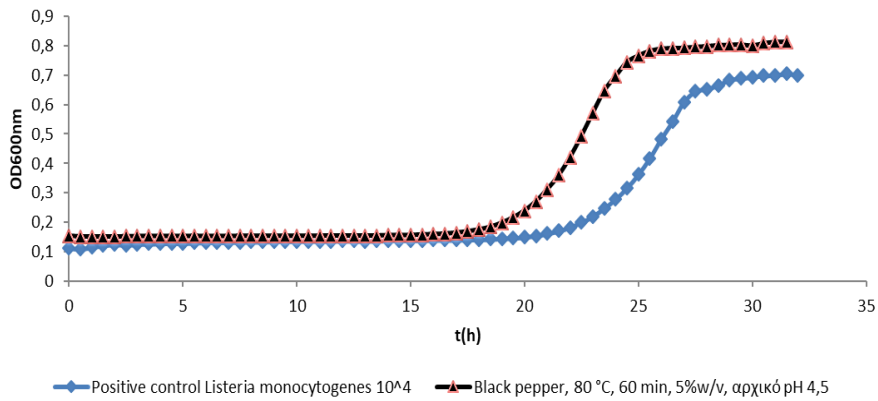
Παραδείγματα των συγκρίσεων των καμπυλών ανάπτυξης των θετικών μαρτύρων των μικροοργανισμών με τα δείγματα υδατικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών με τους αντίστοιχους μικροοργανισμούς, φαίνονται στις Εικόνες που ακολουθούν.



**Εικόνα 13:** Καμπύλη ανάπτυξης *Bacillus cereus* (Control – Μπλέ χρώμα), αρχικού πληθυσμού  $10^4$  cfu/mL σε σύγκριση με καμπύλη ανάπτυξης *Bacillus cereus* με υδατικό εκχύλισμα πράσινου πιπεριού εκχυλισμένο σε συνθήκες 80°C, 32,5 min, 5% w/v και αρχικό pH 4,5.



**Εικόνα 14:** Καμπύλη ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* (μπλε χρώμα) αρχικού πληθυσμού 10<sup>4</sup> cfu/mL, σε σύγκριση με καμπύλη ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* με υδατικό εκχύλισμα πιπεριού καγιέν εκχυλισμένο σε συνθήκες 100°C, 32,5 min, 5%w/v, αρχικό pH 4,5

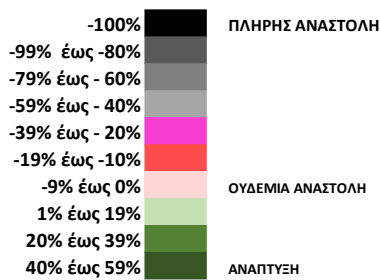


**Εικόνα 15:** Καμπύλη ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* (μπλε χρώμα) αρχικού πληθυσμού 10<sup>4</sup> cfu/mL, σε σύγκριση με καμπύλη ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* με υδατικό εκχύλισμα πιπεριού καγιέν εκχυλισμένο σε συνθήκες 100°C, 32,5 min, 5%w/v, αρχικό pH 4,5

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Αποτελέσματα

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης υδατικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών (πράσινο πιπέρι, μαύρο πιπέρι και πιπέρι καγιέν), που προήλθαν από διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης (θερμοκρασία εκχύλισης, °C, χρόνου εκχύλισης, min, συγκέντρωση μπαχαρικού, %w/v, και pH εκχύλισης), έναντι των τριών Gram θετικών βακτηρίων (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*). Η επίδραση των εκχυλισμάτων αξιολογούνταν με βάση την σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης των μικροοργανισμών-στόχων με και χωρίς την παρουσία των εκχυλισμάτων και ειδικότερα με βάση τον χρόνο προσαρμογής (*lag phase*). Τα αποτελέσματα προέρχονται από τον μέσο όρο δύο επαναλήψεων (n=2) και παρουσιάζονται υπό την μορφή Πινάκων. Προκειμένου να διευκολύνεται η εκτίμηση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε χρωματικός κώδικας ο οποίος εκφράζει το % απόκλισης της φάσης προσαρμογής (*lag phase*) του μικροοργανισμού όταν αναπτύσσεται με την παρουσία του εκχυλίσματος και απουσία αυτού (Εικόνα 16).



**Εικόνα 16:** Χρωματικός κώδικας συσχέτισης του % μεταβολής της φάσης προσαρμογής (*lag phase*) του μικροοργανισμού-στόχου σε υγρό υπόστρωμα παρουσία και απουσία του δείγματος από την εκχύλιση.

Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει αύξηση του χρόνου προσαρμογής, δηλαδή καθυστερεί να εκκινήσει η φάση λογαριθμικής ανάπτυξης, συνεπώς υπάρχει αναχαίτιση / αναστολή ενώ το θετικό πρόσημο σημαίνει συντομότερη έναρξη της λογαριθμικής φαινόμενο το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ενίσχυση της ανάπτυξης. Τα (%) μεταβολής της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ο χαρακτηρισμός τους ως αναστολή/ ανάπτυξη έγιναν αποκλειστικά για τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης μελέτης.

#### 4.1 Εκχυλίσματα Μαύρου Πιπεριού

##### 4.1.1 Επίδραση έναντι στελέχους *S.aureus*

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων Μαύρου πιπεριού έναντι του στελέχους *S. aureus* ΧΧΧΧ αρχικού πληθυσμού  $10^4$  cfu/mL. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν: **(α)** η θερμοκρασία εκχύλισης (60, 80 100°C), **(β)** ο χρόνος εκχύλισης (5, 30 60 min), **(γ)** η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων (5, 3.1, 1.2% v/v) και **(δ)** η τιμή pH στην οποία έγινε η εκχύλιση (4.5, 5.5, 6.5). Στην περίπτωση του μαύρου πιπεριού, από το σύνολο των 81 συνδυασμών που εξετάστηκαν στους 59 από αυτούς δεν παρατηρήθηκε αναστολή, δηλαδή στο 72.83%. Στο υπόλοιπο 27.16% ( 22 συνδυασμοί) των δειγμάτων παρατηρήθηκε αναστολή από -10 έως -39% εκ των οποίων σε 8 από αυτούς η αναστολή ήταν από -20 έως -39%, δηλαδή 9.87% επί του συνόλου των δειγμάτων. Κανένας από τους συνδυασμούς εκχύλισης που εξετάστηκαν δεν κατάφερε να αναστείλει πλήρως την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Σε ό,τι αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας κανένα δείγμα που είχε προέλθει από θερμοκρασία 60°C δεν έδωσε αναστολή, 5 παρουσιάστηκαν σε εκχύλιση στους 80°C και οι 3 σε θερμοκρασία βρασμού (100°C). Επίσης, αναφορικά με τις τιμές pH υπό τις οποίες γίνεται η εκχύλιση, διαπιστώθηκε ότι από τους 22 συνδυασμούς στις οποίες διαπιστώθηκε βαθμός αναστολής από 10 έως 39% οι 17 προήλθαν από εκχυλίσσεις

που έγιναν σε τιμές pH 4.5, δηλαδή στο 77.2% επί του δειγμάτων στα οποία παρατηρήθηκε αναστολή. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε καμία από τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν δεν παρουσιάστηκε πλήρης αναστολή του μικροοργανισμού-στόχου.

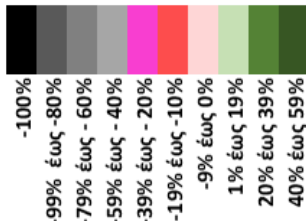
#### **4.1.2 Επίδραση έναντι στελέχους *L. monocytogenes***

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων Μαύρου πιπεριού έναντι στελέχους *L. monocytogenes*. Από το σύνολο των 81 συνδυασμών εκχύλισης στους 9 από αυτούς (11.1%) δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του χρόνου προσαρμογής. Αντίθετα, επιμήκυνση του χρόνου προσαρμογής από -10 έως -39% σε σύγκριση με το χρόνο προσαρμογής του μάρτυρα, παρατηρήθηκε 11 περιπτώσεις από τις 81 (13.6%). Από την άλλη πλευρά είναι αξιοσημείωτο ότι σε 61 περιπτώσεις από τις 81, δηλαδή στο 75% των περιπτώσεων παρουσιάστηκε μείωση του χρόνου προσαρμογής του βακτηρίου-στόχου ήταν μικρότερος απ' ότι στις συνθήκες αναφοράς (μάρτυρας). Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι τα εκχυλίσματα σε αυτές τις περιπτώσεις σαφώς ενίσχυσαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού-στόχου.

**Πίνακας 2:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των καμπυλών ανάπτυξης στελέχους *S. aureus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες ανάπτυξης στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα μαύρου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξή του.

Θερμοκρασία Εκχύλισης Χρόνος Εκχύλισης Συγκέντρωση μαπαριικού (v/v) pH Εκχύλισης lag time	5 min			3.1			1.2		
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-10.49	-4.19	-3.26	-7.40	-4.34	-2.67	-2.38	-1.30	-2.38
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
	-18.29	-7.29	-8.16	-18.29	-7.29	-8.16	-18.29	-7.29	-8.16
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-18.59	-11.58	-7.93	-18.59	-11.58	-7.93	-18.59	-11.58	-7.93
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-11.5	-1.49	-0.02	-22.7	-5.3	-1.56	-11.5	-1.49	-0.02
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-20.88	-6.54	-20.5	-20.88	-6.54	-20.5	-20.88	-6.54	-20.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-18.59	-11.39	-8.95	-17.47	-7.48	-2.56	-11.59	-2.95	-1.89
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-22.89	-11.39	-8.95	-17.47	-7.48	-2.56	-11.59	-2.95	-1.89
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-18.29	-7.29	-8.16	-18.29	-7.29	-8.16	-18.29	-7.29	-8.16
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-18.59	-11.58	-7.93	-18.59	-11.58	-7.93	-18.59	-11.58	-7.93
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-22.93	-2.893	-6.38	-22.93	-2.893	-6.38	-22.93	-2.893	-6.38
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-11.45	-0.05	-4.52	-11.45	-0.05	-4.52	-11.45	-0.05	-4.52
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-22.19	-3.67	-3.89	-22.19	-3.67	-3.89	-22.19	-3.67	-3.89
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-18.48	-8.94	0.00	-18.48	-8.94	0.00	-18.48	-8.94	0.00
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-18.59	-11.58	-7.93	-18.59	-11.58	-7.93	-18.59	-11.58	-7.93
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-22.75	-2.98	-2.30	-22.75	-2.98	-2.30	-22.75	-2.98	-2.30

ΠΛΗΡΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗ



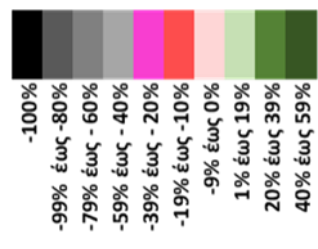
ΟΥΔΕΜΙΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ



**Πίνακας 3:** Πο 10<sup>4</sup> cfu/ mL σε εκχύλιμα με χρόνος προσα ότι ο χρόνος π

Θερμοκρασία Εκχύλισης Χρόνος Εκχύλισης Συγκέντρωση μεταβατικού pH Εκχύλισης lag time	5 min			30 min			60 min		
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	12.94	8.99	6.89	-11.48	18.48	3.27	-10.84	18.94	2.59
	3.1	3.1	1.2	3.1	3.1	1.2	3.1	3.1	1.2
	0.00	9.95	2.83	1.93	2.58	1.20	0.00	3.78	1.90
	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	-14.93	5.94	1.78	-23.38	10.38	7.38	-11.58	23.59	9.48
	2.78	3.57	0.00	0.00	6.58	1.94	-7.45	16.39	4.87
	5	5	1.2	5	5	1.2	5	5	1.2
	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	13.68	13.11	5.89	7.93	17.57	23.45	-29.59	38.96	18.42
	3.1	3.1	1.2	3.1	3.1	1.2	3.1	3.1	1.2
	12.49	26.88	8.94	-35.94	31.89	22.69	-18.97	22.59	19.69
	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	7.93	17.57	23.45	4.67	9.93	11.49	-11.60	28.94	6.63
	5	5	1.2	5	5	1.2	5	5	1.2
	13.68	13.11	5.89	12.49	26.88	8.94	0.00	19.98	8.78



Σχετικά με την θερμοκρασία στην οποία έγινε η εκχύλιση διαπιστώθηκε ότι σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν προέκυψαν εκχυλίσματα που ευνόησαν την ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Σε ό,τι αφορά τις τιμές pH υπό τις οποίες γίνεται η εκχύλιση, διαπιστώθηκε ότι από τους 11 συνδυασμούς στους οποίους διαπιστώθηκε βαθμός αναστολής από -10% έως -39% και οι 11, δηλαδή ποσοστό 100%, προήλθαν από εκχυλίσματα που έγιναν σε τιμές pH 4.5, δηλαδή υπό όξινες συνθήκες. Αναφορικά με τα 61 εκχυλίσματα που ευνόησαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού-στόχου, τα 8 (13.11%) έδωσαν συντομότερο lag phase από 20% έως 39% σε σύγκριση με το δείγμα-μάρτυρα, εκ των οποίων τα 7 (87.5%) προέρχονταν από τα δείγματα που είχαν εκχυλιστεί στους 100°C και τα 6 (75%) είχαν προέλθει από εκχυλίσματα σε pH 6.5.

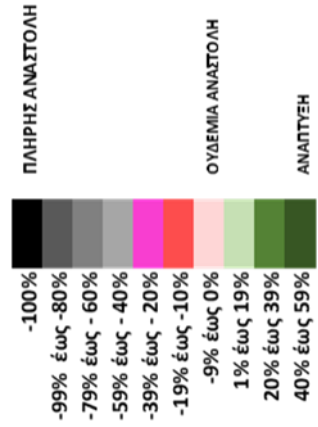
#### **4.1.3 Επίδραση έναντι στελέχους *B. cereus***

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων Μαύρου πιπεριού έναντι στελέχους *B. cereus*. Από το σύνολο των 81 εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν στα 51 δεν παρατηρήθηκε επηρεασμός της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού-στόχου. Αντίθετα, σε 22 εκχυλίσματα, δηλαδή στο 27.16% των δειγμάτων που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε επιμήκυνση του χρόνου προσαρμογής σε ποσοστά από -10% έως -39%, δηλαδή επιμηκύνθηκε ο χρόνος προσαρμογής του *B. cereus*. Τα δείγματα που προκάλεσαν επιβράδυνση της φάσης προσαρμογής του *B. cereus* προήλθαν και από τις τρεις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν (60, 80, 100°C) ενώ 14 από αυτά, δηλαδή το 63.6% επί του δειγμάτων που προκάλεσαν καθυστέρηση του χρόνου προσαρμογής προήλθαν από εκχυλίσματα υπό όξινες συνθήκες (pH 4.5) ενώ κανένα δεν προήλθε από τιμές pH 6.5.

Σε ό,τι αφορά την επίδραση του χρόνου της θερμικής επεξεργασίας διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: μετά από 5 min στους 60, 80 και 100°C ο αριθμός των δειγμάτων που επηρέασαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού-στόχου ήταν: 0, 2 και 3 αντίστοιχα. Κατά όμοιο τρόπο μετά από 30 min στους 60, 80 και 100°C ο αριθμός των δειγμάτων που επηρέασαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού-στόχου ήταν: 3, 4 και 4 ενώ μετά από 60 min στους 60, 80, 100°C, ο αριθμός των δειγμάτων που επηρέασαν την ανάπτυξη του *B. cereus* ήταν 2, 2 και 2. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κανένα δείγμα δεν προκάλεσε 100% αναστολή του μικροοργανισμού-στόχου.

**Πίνακας 4:** Πο σε υγρά υπόστ πιπεριού το σ μεγαλύτερος σ μικρότερος απ

60															
Θερμοκρασία Εκχύλισης				5 min				30 min				60 min			
Χρόνος Εκχύλισης				3.1				1.2				3.1			
Συγκέντρωση μαχαρικού				4.5 5.5 6.5				4.50 5.50 6.50				4.5 5.5 6.5			
pH Εκχύλισης				-3.45 -1.56 0.00				-22.68 -12.29 -3.56				-10.00 -10.67 -2.99			
lag time				-7.89 -3.56 0.00				-11.89 -6.38 0.00				0.00 -2.59 0.00			
Θερμοκρασία Εκχύλισης				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5			
Χρόνος Εκχύλισης				3.1				1.2				3.1			
Συγκέντρωση μαχαρικού				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5			
pH Εκχύλισης				-11.93 -1.86 0.00				-28.30 -27.11 -4.84				-18.83 -9.00 -2.48			
lag time				-10.1 -4.89 0.00				-16.74 -13.95 0.00				-11.49 -2.59 0.00			
80															
Θερμοκρασία Εκχύλισης				5 min				30 min				60 min			
Χρόνος Εκχύλισης				3.1				1.2				3.1			
Συγκέντρωση μαχαρικού				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5			
pH Εκχύλισης				-11.93 -1.86 0.00				-28.30 -27.11 -4.84				-18.83 -9.00 -2.48			
lag time				-10.1 -4.89 0.00				-16.74 -13.95 0.00				-11.49 -2.59 0.00			
100															
Θερμοκρασία Εκχύλισης				5 min				30 min				60 min			
Χρόνος Εκχύλισης				3.1				1.2				3.1			
Συγκέντρωση μαχαρικού				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5				4.5 5.5 6.5			
pH Εκχύλισης				-11.5 -10.1 -8.39				-27.3 -18.6 -11.6				-21.2 -11.7 -8.48			
lag time				-10.1 0.00 0.00				-12.8 -8.99 0.00				-8.40 -6.24 0.00			



## 4.2 Εκχυλίσματα Πράσινου Πιπεριού

### 4.2.1 Επίδραση έναντι στελέχους *S. aureus*

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων Πράσινου πιπεριού έναντι στελέχους *S. aureus* NCTC 12981 αρχικού πληθυσμού  $10^4$  cfu/mL. Από το σύνολο των 81 συνδυασμών στους 38 (46.9%) από παρατηρήθηκε επιμήκυνση του χρόνου προσαρμογής - δηλαδή παρεμπόδιση της ανάπτυξής του - σε ποσοστό από 100% έως -10%. Ειδικότερα, σε 11 από τις 38 περιπτώσεις (28.9%) δεν εμφανίστηκε ανάπτυξη δηλαδή επιτεύχθηκε πλήρης (100%) αναστολή του μικροοργανισμού-στόχου. Θα πρέπει δε να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα που προκάλεσαν την πλήρη αναστολή όλα προέρχονταν από θερμοκρασίες 80 και 100°C. Σε ό,τι αφορά το pH υπό το οποίο έγινε η εκχύλιση, είναι χαρακτηριστικό ότι όλα τα δείγματα που έδωσαν 100% αναστολή προέρχονταν από εκχυλίσματα που είχαν πραγματοποιηθεί σε pH 4.5. Αντίθετα μόνο 6 δείγματα από τα 38 όπου διαπιστώθηκε επιβράδυνση της ανάπτυξης προέρχονταν από pH 6.5.

Σε ό,τι αφορά το χρόνο εκχύλισης διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: μετά από 5 min στους 60, 80 και 100°C ο αριθμός των δειγμάτων που αύξανε το χρόνο προσαρμογής του μικροοργανισμού-στόχου ήταν: 2, 4 και 6 αντίστοιχα. Κατά όμοιο τρόπο μετά από 30 min στους 60, 80 και 100°C ο αριθμός των δειγμάτων που επηρέασαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού-στόχου ήταν: 3, 6 και 5 ενώ μετά από 60 min στους 60, 80, 100°C, ο αριθμός των δειγμάτων που επηρέασαν την ανάπτυξη του *S. aureus* ήταν 4, 5 και 4. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρηθεί το ακόλουθο: στην εκχύλιση των 5 min όσο χαμηλότερη ήταν η θερμοκρασία τόσο μικρότερος ο αριθμός των δειγμάτων που προκαλούσε αύξηση του lag phase (2, 4, 6). Αντίθετα στους 100°C όσο μικρότερος ήταν ο χρόνος εκχύλισης (5 min) τόσο μεγαλύτερος ήταν ο αριθμός των δειγμάτων που αύξανε την lag phase (6/ 5 min, 5/ 30min, 4/ 60 min).

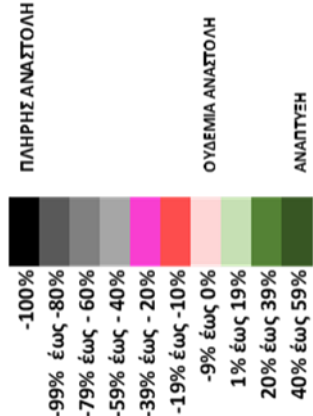
### 4.2.2 Επίδραση έναντι στελέχους *L. monocytogenes*

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων πράσινου πιπεριού έναντι στελέχους *L. monocytogenes* NCTC 7973 αρχικού πληθυσμού  $10^4$  cfu/mL.

Από το σύνολο των 81 εκχυλισμάτων, 9 από αυτά αναχαίτισαν πλήρως την ανάπτυξη του μικροοργανισμού-στόχου *L. monocytogenes*.

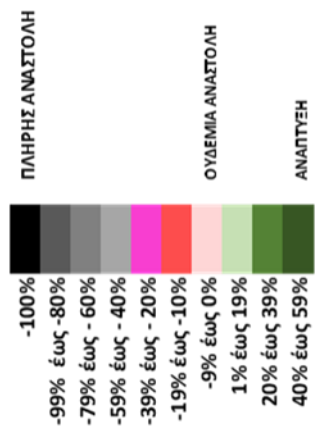
**Πίνακας 5:** Ποσοστό μεταβολής (%) του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των καμπυλών ανάπτυξης στελεχούς *S. aureus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/mL σε υγρό υπόστρωμα BHI (μάρτυρας) σε σύγκριση με τις καμπύλες στο ίδιο υπόστρωμα το οποίο περιείχε 5, 3.1 και 1.2% v/v υδατικό εκχύλισμα πράσινου πιπεριού το οποίο είχε εκχυλιστεί για 5, 30, και 60 min σε θερμοκρασία 60, 80 και 100°C. Το αρνητικό πρόσημο σημαίνει ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα (περιορισμός/ αναστολή της ανάπτυξης) και το θετικό πρόσημο ότι ο χρόνος προσαρμογής είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή ευνοείται η ανάπτυξη του.

Θερμοκρασία Εκχύλισης		60 min				60 min																																					
Χρόνος Εκχύλισης		5 min		30 min		30 min		60 min																																			
Συγκέντρωση μετακαρκαίου pH Εκχύλισης		5	3.1	5	3.1	5	3.1	5	3.1																																		
lag time		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5																																		
60	60 min	-20.49	-8.99	-7.34	-11.4	-4.66	-4.38	-5.38	-3.49	-3.25	-22.74	-12.83	-13.71	-8.39	-6.99	-4.63	-3.30	-2.27	-1.99	-24.00	-13.83	-10.39	-10.38	-6.24	-2.98	-4.30	-2.93	-0.22	1.2	4.5	5.5	6.5	1.2	4.5	5.5	6.5							
80	80 min	-11.60	-8.80		-7.45	-4.10		-22.44	-5.69	-2.89		-14.46	-20.36		-22.25	-7.10	-10.35		-12.20	-4.18	-6.45		-8.40	-11.57		-21.24	-3.78	-10.19		-29.16	-3.14	-4.53		-8.40	-11.57		-21.24	-3.78	-10.19		-29.16	-3.14	-4.53
100	100 min	-14.54	-11.53		-8.68	-6.48		-24.5	-7.02	-3.46		-20.06	-8.26		-11.20	-4.01		-2.24	-1.57				-10.60	-7.69		100	-3.75	-2.60		-22.8	-2.98	-2.30		-10.60	-7.69		100	-3.75	-2.60		-22.8	-2.98	-2.30



**Πίνακας 6:** Ποσοστό cfu/ mL σε υγρά υγρά προϊόντα πτεριομογής είναι μεγαλύτερη είναι μ

Θερμοκρασία Εκχύλισης Χρόνος Εκχύλισης Συγκέντρωση μπαχαρικού pH Εκχύλισης <i>lag time</i>	5 min			30 min			60 min										
	5	4.5	100	5	4.5	100	5	4.5	100								
	25.97	9.57	-1.49	12.21	4.57	2.39	3.02	1.90	26.41	9.67	-3.79	11.78	6.98	1.89	8.56	2.87	
	3.1	1.2	3.1	1.2	3.1	1.2	3.1	1.2	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
	100	22.84	12.74	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5



Πίνακας 7: Ποσοστά μεταβολής σε υγρά υπόστρωμα με μεγαλύτερες σε μικρότερες από

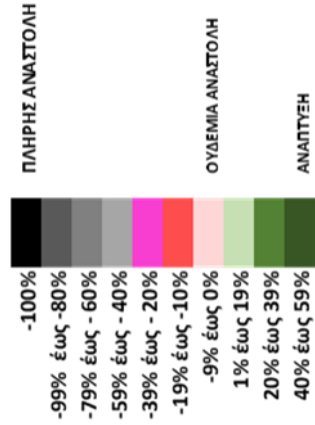
Θερμοκρασία Εκχύλισης Χρόνος Εκχύλισης Συγκέντρωση μεταβατικού pH Εκχύλισης lag time	60 min																					
	5 min				30 min				60 min													
	5	4.5	5.5	6.5	3.1	4.5	5.5	6.5	3.1	4.5	5.5	6.5										
	-14.5	-8.9	-1.25	-6.26	-6.29	0.00	-2.56	-0.78	0.00	1.2	4.5	5.5	6.5	-29.64	-12.51	-6.90	-11.57	-7.51	-1.22	-5.67	-1.98	-2.89
	-29.87	-18.18	-4.25	-20.93	-8.23	-2.35	-10.03	-2.56	-1.35	1.2	4.5	5.5	6.5	-57.69	-31.48	-25.22	-21.86	-22.41	-10.50	-16.66	-16.31	-7.59
	-28.34	-24.39	-11.59	-10.43	-8.86	-0.36	-5.72	-3.29	-1.60	1.2	4.5	5.5	6.5	-41.40	-38.49	-20.59	-28.41	-17.51	-8.93	-12.38	-8.24	-3.17

Θερμοκρασία Εκχύλισης Χρόνος Εκχύλισης Συγκέντρωση μεταβατικού pH Εκχύλισης lag time	80 min																					
	5 min				30 min				60 min													
	5	4.5	5.5	6.5	3.1	4.5	5.5	6.5	3.1	4.5	5.5	6.5										
	-29.87	-18.18	-4.25	-20.93	-8.23	-2.35	-10.03	-2.56	-1.35	1.2	4.5	5.5	6.5	-55.89	-42.29	-23.19	-35.68	-25.93	-17.89	-18.37	-18.38	-11.85
	-28.34	-24.39	-11.59	-10.43	-8.86	-0.36	-5.72	-3.29	-1.60	1.2	4.5	5.5	6.5	-44.73	-33.59	-15.45	-23.53	-23.34	-8.94	-20.71	-6.39	-2.34

Θερμοκρασία Εκχύλισης Χρόνος Εκχύλισης Συγκέντρωση μεταβατικού pH Εκχύλισης lag time	100 min																					
	5 min				30 min				60 min													
	5	4.5	5.5	6.5	3.1	4.5	5.5	6.5	3.1	4.5	5.5	6.5										
	-28.34	-24.39	-11.59	-10.43	-8.86	-0.36	-5.72	-3.29	-1.60	1.2	4.5	5.5	6.5	-44.73	-33.59	-15.45	-23.53	-23.34	-8.94	-20.71	-6.39	-2.34
	-28.34	-24.39	-11.59	-10.43	-8.86	-0.36	-5.72	-3.29	-1.60	1.2	4.5	5.5	6.5	-41.40	-38.49	-20.59	-28.41	-17.51	-8.93	-12.38	-8.24	-3.17



Κοινό σημείο και των 9 δειγμάτων ήταν η συγκέντρωσή τους (5% v/v) και pH 4.5.

Από την άλλη πλευρά σε 59 από τα 81 δείγματα (72.8%) διαπιστώθηκε μείωση του χρόνου προσαρμογής από 1 έως 59%, δηλαδή τα συστατικά του εκχυλίσματος επιτάχυναν την είσοδο του βακτηρίου στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Από τα παραπάνω 59 δείγματα 11 δείγματα μείωσαν σημαντικά το χρόνο προσαρμογής από 20 έως 39% (18.6%) ενώ 3 δείγματα μείωσαν το χρόνο προσαρμογής του *L. monocytogenes* από 40 έως 59%. Κοινά χαρακτηριστικό των 3 εκχυλισμάτων ήταν τα ακόλουθα: συγκέντρωση 5%, pH 5.5 και χρόνος εκχύλισης 60 min.

#### **4.2.3 Επίδραση έναντι στελέχους *B. cereus***

Στον **Πίνακα 7** παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων πράσινου πιπεριού έναντι στελέχους *B. cereus* NCTC 10320 αρχικού πληθυσμού  $10^4$  cfu/mL. Από το σύνολο των 81 εκχυλισμάτων, τα 36 (44.4%) δεν επηρέασαν το χρόνο προσαρμογής (lag phase) του *B. cereus*. Αντίθετα τα υπόλοιπα 45 δείγματα επηρέασαν το χρόνο προσαρμογής και συγκεκριμένα τον επιμήκυναν εκ των οποίων τα 29 (64.4%) προήλθαν μετά από θέρμανση στους 80 και 100°C είτε για 30 είτε για 60 min. Επίσης από τα 45 δείγματα, 4 προκάλεσαν σημαντική επιμήκυνση του χρόνου προσαρμογής σε ποσοστό από -40 έως -57.69% με κοινό χαρακτηριστικό ότι στα 3 από τα 4 το pH στο οποίο έγινε η εκχύλιση ήταν 4.5 σε θερμοκρασίες 80 και 100°C. Σε ό,τι αφορά την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, από το σύνολο των 81 δειγμάτων 9 δείγματα προήλθαν από θερμική επεξεργασία 5 min, δηλαδή 11.11%. Αντίθετα τα υπόλοιπα 88.88% των δειγμάτων που αύξησαν το χρόνο προσαρμογής του *B. cereus* από εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν σε 30 min και σε 60 min.

### **4.3 Εκχυλίσματα Πιπεριάς Καγιέν**

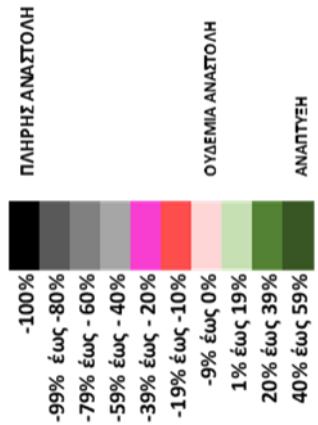
#### **4.3.1 Επίδραση έναντι στελέχους *S. aureus***

Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων κόκκινης πιπεριάς Καγιέν έναντι του στελέχους *S. aureus*. Από το σύνολο των 81 εκχυλισμάτων, τα 60 (74 %) δεν επηρέασαν το χρόνο προσαρμογής του *S. aureus* αρχικού εμβολίου  $10^4$  cfu/mL. Από την άλλη πλευρά τα υπόλοιπα 21 δείγματα προκάλεσαν - περισσότερο ή λιγότερο - αύξηση του χρόνου προσαρμογής του *S. aureus*.



**Πίνακας 8:** Ποσότητες σε υγρά υστερήματα (lag) σε υπερθερμότητα και επηρεασμένη από την προσαρμογή

Θερμοκρασία Εκχύλισης Χρόνος Εκχύλισης Συγκέντρωση μαχαρικού pH Εκχύλισης <i>lag time</i>	60																						
	5 min		30 min		60 min																		
	5	3.1	5	3.1	5	3.1																	
4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5															
-5.99	-3.19	-5.94	-2.89	-1.00	-2.89	-18.99	-12.59	-17.63	-4.97	-2.47	-6.09	0.00	0.00	0.00	-22.79	-10.59	-17.48	-11.04	-4.89	-8.78	-0.03	-0.23	-1.24
100	-12.78	-16.95	-12.15	-3.97	-8.45	100	-8.53	-18.73	-21.95	-2.99	-7.10	-8.29	-1.15	-2.65	-8.77	-1.08	-2.28	-1.74	-1.11	-0.72	-0.86	-1.41	0.00
4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
-53.29	-4.42	-1.39	-12.88	-1.46	-0.02	-48.01	-2.21	-12.78	0.00	-1.99	-3.98	0.00	0.00	0.00	-33.76	0.00	-10.58	-15.44	-1.54	-2.49	0.00	-1.77	0.00



Από τα 21 δείγματα, τα 2 προκάλεσαν πλήρη αναστολή του μικροοργανισμού-στόχου. Επίσης σε ακόμα 2 δείγματα προκλήθηκε αύξηση του χρόνου προσαρμογής κατά 48.01% και 53.29%. Κοινό χαρακτηριστικό των 4 δειγμάτων ήταν ότι η εκχύλιση έγινε σε τιμή 4.5.

Σε ό,τι αφορά την επίδραση του χρόνου εκχύλισης διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: Ο αριθμός των δειγμάτων που προκάλεσαν αύξηση του lag phase μετά από θέρμανση για 5 min ήταν 6, ενώ στα 30 min και 60 min ήταν 7 και 7, αντίστοιχα.

Τέλος σε ό,τι αφορά την επίδραση της επίδρασης της θερμικής επεξεργασίας διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: 60°C, 7 δείγματα, 80°C 7 δείγματα, και 100°C 7 δείγματα.

#### **4.3.2 Επίδραση έναντι στελέχους *L. monocytogenes***

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων κόκκινης πιπεριάς Καγιέν έναντι του στελέχους *L. monocytogenes*.

Από το σύνολο των 81 εκχυλισμάτων, τα 63 ( 77.7%) δεν επηρέασαν το χρόνο προσαρμογής του *L. monocytogenes* αρχικού εμβολίου 10<sup>4</sup> cfu/mL ενώ τα υπόλοιπα 18 δείγματα (22.2%) προκάλεσαν - περισσότερο ή λιγότερο - αύξηση του χρόνου προσαρμογής του *L. monocytogenes*. Από τα 18 δείγματα τα 4 (22.2%) προκάλεσαν αύξηση του χρόνου προσαρμογής από -20% έως -39%.

Σχετικά με την επίδραση του pH διαπιστώθηκε ότι από τα 9 δείγματα τα οποία εκχυλίστηκαν σε pH 4.5 τα 8 προκάλεσαν αύξηση του χρόνου προσαρμογής.

Αναφορικά με το χρόνο εκχύλισης διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: μετά από 5 min εκχύλισης προέκυψαν 7 δείγματα που προκάλεσαν αύξηση του χρόνου προσαρμογής, μετά από 60 min 9 δείγματα, και μετά από 60 min 2 δείγματα.

Σε ό,τι αφορά την θερμοκρασία εκχύλισης στους 60°C ο αριθμός των δειγμάτων που αύξησαν το χρόνο lag phase ήταν 2, από τους 80°C προέκυψαν 10 ενώ από τους 100°C 6 δείγματα.

Κανένα δείγμα δεν αναχαίτισε πλήρως την ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes*.

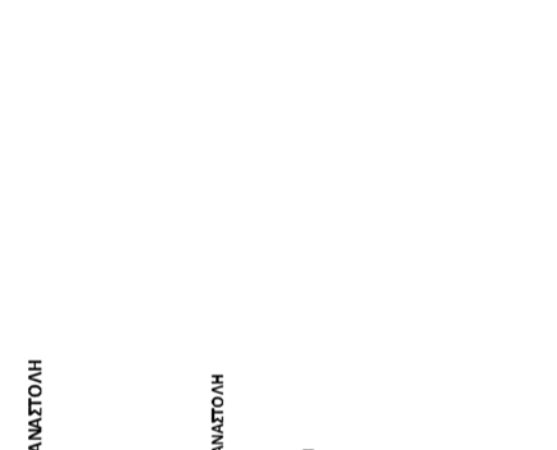
Θερμοκρασία Εγκύλισης Χρόνος Εγκύλισης Συγκέντρωση μιχαριακού pH Εγκύλισης lag time	5 min			30 min			60 min																		
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5																
	-12.47	-5.39	-7.30	-6.55	-2.53	-0.32	-11.56	-2.55	-7.30	-4.32	-0.09	-0.02	-1.01	0.00	0.00	-4.77	-0.02	-0.04	-2.46	-0.05	-0.42	0.00	0.00	0.00	
	<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>1.2</b>			<b>5</b>			<b>3.1</b>			<b>5</b>			<b>1.2</b>

Θερμοκρασία Εγκύλισης Χρόνος Εγκύλισης Συγκέντρωση μιχαριακού pH Εγκύλισης lag time	5 min			30 min			60 min																		
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5																
	-33.56	-12.59	-27.69	-14.62	-7.30	-11.48	-28.34	-10.39	-12.95	-12.49	-6.00	-8.45	-0.09	-0.90	-0.87	-10.38	-5.66	-8.35	-5.43	-0.42	-0.29	-2.00	-0.15	-0.33	
	<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>1.2</b>			<b>5</b>			<b>3.1</b>			<b>5</b>			<b>1.2</b>

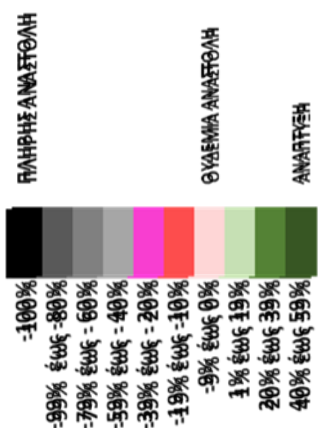
  

Θερμοκρασία Εγκύλισης Χρόνος Εγκύλισης Συγκέντρωση μιχαριακού pH Εγκύλισης lag time	5 min			30 min			60 min																		
	5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5																
	-14.68	-2.59	-6.55	-6.3	-0.010	-2.56	-34.29	-14.89	-18.95	-14.43	-6.10	-7.34	-0.01	0.00	0.00	-10.49	-2.39	-6.29	-4.21	0.00	-1.49	-0.02	0.00	0.00	
	<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>3.1</b>			<b>1.2</b>			<b>5</b>			<b>3.1</b>			<b>5</b>			<b>1.2</b>



Πίνακας 10: Π...  
 mL σε υγρό...  
 πιπεριάς και...  
 μογής είναι μ...  
 προσαρμογής

		60					
		5 min		30 min		60 min	
Θερμοκρασία Εκχύλισης		3.1		3.1		3.1	
Χρόνος Εκχύλισης		1.2		1.2		1.2	
Συγκέντρωση μαχαρακού		4.5	5.5	6.5	6.5	4.5	5.5
pH Εκχύλισης		-1.94	0.00	0.00	-0.01	-0.03	-0.04
lag time		-8.39	-3.49	-7.89	-18.44	-10.25	-15.93
		5	5	5	5	5	5
		25.78	-10.7	-11.6	-27.33	-7.32	-11.83
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-14.40	-3.95	-5.88	-14.40	-3.95	-5.88
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		100.0	13.83	-22.7	-45.90	-11.69	-22.94
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-44.4	-10.3	-18.88	-17.33	-0.01	0.00
		5	5	5	5	5	5
		72.59	-11.9	-20.77	-32.56	-5.94	-8.88
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-17.3	-2.00	-4.35	-17.33	-0.01	0.00
		100.0	13.83	-22.7	-45.90	-11.69	-22.94
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-71.86	-0.10	-0.65	-18.18	-7.67	-12.37
		5	5	5	5	5	5
		72.59	-11.9	-20.77	-45.90	-11.69	-22.94
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-22.09	-0.07	-0.99	-18.18	-7.67	-12.37
		5	5	5	5	5	5
		33.67	-0.15	-11.45	-45.90	-11.69	-22.94
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-33.67	-0.15	-11.45	-45.90	-11.69	-22.94
		5	5	5	5	5	5
		11.94	-2.59	-5.55	-24.04	-1.00	-1.03
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-11.94	-2.59	-5.55	-24.04	-1.00	-1.03
		5	5	5	5	5	5
		10.55	-0.07	0.00	-10.55	-0.07	0.00
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-10.55	-0.07	0.00	-10.55	-0.07	0.00
		5	5	5	5	5	5
		3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-3.45	-2.98	0.00	-3.45	-2.98	0.00
		5	5	5	5	5	5
		1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		0.00	0.00	-0.10	0.00	0.00	-0.10
		5	5	5	5	5	5
		71.86	-0.10	-0.65	0.00	0.00	-0.10
		4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
		-71.86	-0.10	-0.65	0.00	0.00	-0.10



### 4.3.3 Επίδραση έναντι στελέχους *B. cereus*

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων κόκκινης πιπεριάς Καγιέν έναντι του στελέχους *B. cereus*.

Από το σύνολο των 81 εκχυλισμάτων, τα 48 (59.2%) δεν επηρέασαν σημαντικά το χρόνο προσαρμογής του *B. cereus*. Για τα υπόλοιπα 33 διαπιστώθηκαν τα εξής: ένα δείγμα επέτυχε την πλήρη αναστολή του βακτηρίου-στόχου (80°C/ 5 min/ pH 4.5/ 5 v/v). Όπως παρατηρήθηκε και σε προηγούμενες δοκιμές σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις όπου η εκχύλιση έγινε σε όξινο περιβάλλον (pH 4.5) προέκυψαν δείγματα που καθυστέρησαν την ανάπτυξη του *B. cereus*. Συγκεκριμένα από τα 33 δείγματα τα 18 προέρχονταν από εκχυλίσεις σε pH 4.5, δηλαδή το 54.54%.

Αναφορικά με την θερμοκρασία εκχύλισης διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: στους 60°C 9 δείγματα καθυστέρησαν στην ανάπτυξη *B. cereus*, ενώ στους 80°C και 100°C τα αντίστοιχα δείγματα ήταν, 17 και 7.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### Συζήτηση

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων της εργασίας αυτής δεν διαπιστώθηκε μια σαφής τάση στην επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων μπαχαρικών επί των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν. Ωστόσο σε γενικές γραμμές διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα.

Η επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων πιπεριών εξαρτιόταν τόσο από το είδος του πιπεριού όσο και από το είδος του βακτηρίου. Το πράσινο πιπέρι έδωσε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων που αύξησαν τον χρόνο προσαρμογής των τριών βακτηρίων. Μάλιστα ορισμένα εκχυλίσματα του πράσινου πιπεριού πέτυχαν την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του *S. aureus* και *L. monocytogenes* ενώ δεν πέτυχαν το ίδιο έναντι του *B. cereus*. Από την άλλη πλευρά κανένα από τα εκχυλίσματα μαύρου πιπεριού δεν μπόρεσαν να αναστείλουν πλήρως την ανάπτυξη κανενός από τα στελέχη που εξετάστηκαν. Το αντίθετο ειδική αναφορά θα πρέπει να γίνει στα εκχυλίσματα του μαύρου πιπεριού τα οποία όχι μόνο δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes* αλλά αντίθετα ευνόησαν την ανάπτυξή του, δεδομένου ότι μείωσαν σημαντικά το χρόνο προσαρμογής του. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε από τους Narendra Babu κ.ά. (2018). Τα εκχυλίσματα πιπεριού καγιέν είχαν σε γενικές γραμμές παρουσίασαν μέτρια ανασταλτική δράση. Σε ό,τι αφορά το στέλεχος *S. aureus* μόνο σε δύο περιπτώσεις προέκυψαν δείγματα που αναχαίτισαν πλήρως την ανάπτυξή του ενώ κανένα δεν εκχύλισμα δεν πέτυχε την πλήρη αναστολή του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Σε ό,τι αφορά δε το βακτήριο *B. cereus* μόνο ένα πέτυχε την πλήρη αναστολή του βακτηρίου-στόχου. Στις περισσότερες των περιπτώσεων όπου παρατηρήθηκε επαύξηση του χρόνου προσαρμογής τα εκχυλίσματα ήταν στην μέγιστη συγκέντρωσή τους (5 % v/v) και κυρίως είχαν προέλθει από εκχυλίσματα σε όξινο pH (4.5).

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας έχει διαπιστωθεί αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων μπαχαρικών δεν είναι σπάνια. Τα είδη *Piper* είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις και χρησιμεύουν ως δεξαμενή για την ανακάλυψη φαρμάκων. Βιοδραστικές ενώσεις όπως αμίδια, αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, τανίνες, σαπωνίνες, γλυκοζίτες, τερπενοειδή και φαινολικές ενώσεις έχουν αναφερθεί ευρέως ότι υπάρχουν στους σπόρους, τα φύλλα και το φλοιό του στελέχους των ειδών *Piper*. Οι φαρμακολογικές δραστηριότητες των στεροειδών, των τερπενίων, των χαλκονίων, των διυδροχαλκονίων και των αιθέρια

έλαια από τα είδη *Piper* δείχνουν ότι μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδραστικοί ή/και φαρμακευτικοί παράγοντες. Φαινολικές ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, οι τανίνες, τα σιλβένια και οι λιγνάνες είναι παρούσες στα είδη *Piper* (Mgbeahuruike, Yrjonen, Vuorela, & Holm, 2017).

Η περισσότερο συνηθισμένη ένωση η οποία πάντοτε απομονώνεται από διάφορα είδη *piper* είναι η πιπερίνη και τα ισομερή της (πιπεριδίνη, χαβικίνη, πιπλαρτίνη, γκινεσενσιμίδιο, γκινεσενσίνη, πελλιτορίνη, κ.α. Η πιπερίνη είναι αλκαλοειδές που απομονώθηκε από τους καρπούς του *P. nigrum* το 1819, και βρίσκεται σε όλα τα είδη του γένους *piper* σε διαφορετική συγκέντρωση (Oyemitan, 2017). Ειδικότερα, η πιπερίνη πιστεύεται ότι είναι η κύρια βιοδραστική ένωση με αντιμικροβιακή δράση που απομονώνεται από το *P. nigrum*. Στην καθαρή της μορφή, είναι κίτρινη κρυσταλλική σκόνη πιπερονυλο-πιπεριδίνης, που αντιδρά ως ασθενής βάση σε κατάλληλα διαλύματα. Επιπλέον, η πιπερίνη έχει τις cis-trans ισομερείς δομές, που περιλαμβάνουν την trans-trans (πιπερίνη), cis-trans (ισοπιπερίνη), cis-cis (χαβικίνη) και trans-cis (ισοχαβικίνη). Παρά τις διάφορες θεραπευτικές ιδιότητες της πιπερίνης, οι βιοϊατρικές εφαρμογές της εξακολουθούν να είναι περιορισμένες λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς της και της χαμηλής υδατικής διαλυτότητάς της (Shityakov, Bigdelian, Hussein, Hussain, Trpathi, & Khan, 2019).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Aurelian Corneliu Moraru κ.ά. (2019), συγκρίθηκε η αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμένης πιπερίνης (υδατικά και αλκοολικά εκχυλίσματα) με εκείνη της εμπορικής πιπερίνης, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, του συριγγικού οξέ, L-ασκορβικό οξύ, L-τυροσίνη και συριγγικό οξύ, καθώς και με το συνδυασμό αυτών των ενώσεων με την αμπικιλλίνη και την αμφοτερικίνη Β. Η αντιμικροβιακή δράση μετρήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου σε άγαρ επί των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922 και *Candida albicans* ATCC10231. Η απομονωμένη ένωση δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δραστηριότητα από μόνη της, αλλά βελτίωσε τη δραστηριότητα της αμπικιλλίνης έναντι του *S. aureus* ATCC25923 και ταυτόχρονα μείωσε τη δραστηριότητα της αμφοτερικίνης Β έναντι της *C. albicans* ATCC10231 (Moratu, Rosca, Creasiun, Chiriac, & Voicu, 2019). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η αλκαλική υδρόλυση της πιπερίνης οδηγεί σε πιπεριδίνη και πιπερικό οξύ. Το πιπερικό οξύ έδειξε αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι των Gram θετικών βακτηρίων *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. xylosum*, *S. aureus* and *S. epidermidis*. Επίσης παρατηρήθηκε αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων. Η ίδια έρευνα επίσης,

έδειξε ότι τα αλκοολικά εκχυλίσματα επέδειξαν πολύ καλύτερη ανασταλτική δράση από τα υδατικά εκχυλίσματα μαύρου πιπεριού. Αυτό συνέβη, διότι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις επιτεύχθηκε με μείωση της πολικότητας του διαλύτη που χρησιμοποιείται (Zarai , Boujelbene, Salem, Gargouri, & Sayari, 2013).

Επίσης σε πλήθος μελετών έχει αναφερθεί στην παρουσία φαινολικών ενώσεων σε εκχυλίσματα του είδους *Piper* όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, τανίνες, στυλβένια και λιγνάνες. Τα φλαβονοειδή από τα είδη *Piper* ταξινομούνται ως φλαβόνες ή ισοφλαβόνες με βάση τη θέση του βενζοξειδίου δακτυλίου. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν εξεταστεί ευρέως και αναφέρεται ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, όπως αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Τα φαινολικά οξέα, όπως όπως το βανιλικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το πρωτοκατεχικό και το ροσμαρινικό οξύ υπάρχουν στα είδη *Piper*. Επιπλέον, τα περισσότερα *Piper* είδη περιέχουν φλαβονοειδή όπως κερκετίνη, καεμφερόλη, απιγενίνη και λουτεολίνη. Οι φαινολικές ενώσεις όπως το 5-O-καφεοϋλοκινικό οξύ, το 4-p- κουμαροϋλοκινικό οξύ, 5-p-κουμαροϋλοκινικό οξύ, χαβιμπετόλη και υδροξυχαβικόλη είναι επιπλέον παρούσες στα είδη *Piper* (Zarai , Boujelbene, Salem, Gargouri, & Sayari, 2013).

Αντιμικροβιακή δράση έχει αναφερθεί και για υδατικά διαλύματα μαύρου πιπεριού. Ειδικότερα, η εκχύλιση αποξηραμένου μαύρου πιπεριού με υδατικό διαλύτη έδωσε ακατέργαστο εκχύλισμα που περιείχε κυρίως πιπερίνη και αλκυλοαμίδια, τις πικάντικες βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν σε αυτό. Η μεθανολική εκχύλιση έδωσε εκχύλισμα, με τις ίδιες ενώσεις, που θα μπορούσαν να είχαν εκχυλιστεί με επαναλαμβανόμενη χρήση νερού. Αυτό υποδηλώνει ότι η χρήση οργανικών διαλυτών για την εκχύλιση αυτών των ενώσεων από το μαύρο πιπέρι δεν είναι απαραίτητη. Το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα που προέκυψαν στη μελέτη ήταν πανομοιότυπα ως προς το προφίλ των ενώσεων για την πιπερίνη και τα αλκυλαμίδια (Liu, Yadev, Aggarwal, & Nair, 2010).

Επίσης, οι δευτερογενείς μεταβολίτες του *Piper nigrum*, όπως οι τανίνες και τα αλκαλοειδή που υπάρχουν σε υδατικά εκχυλίσματα συμβάλλουν στις σε αντιβακτηριακή δράση, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και ανοσοενισχυτικές ιδιότητες. Άλλωστε, έχουν αναφερθεί οι αντιβακτηριακές δράσεις των υδατικών εκχυλισμάτων έναντι κοινών παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τη μαστίτιδα, όπως *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Bacillus* spp. (Marwaha, Signh, Kachawa, & Sharma, 2019).

Σε ό,τι αφορά τα εκχυλίσματα καγιέν οι Otunola και Afolayan (2013) προσδιόρισαν



ότι τα υδατικά εκχυλίσματα *C. frutescens* περιλαμβάνουν 7,05 mg/ mL ολικά φλαβονοειδή, 47,18 mg/ml ολικά φαινολικά και 10,66 mg/ml συνολικών προανθοκυανιδινών. Ειδικότερα οι ποσότητες φλαβονοειδών του πιπεριού καγιέν ήταν: μυρικετίνη (8,30 μg/g), κερκετίνη (16,35 μg/g), καμφερόλη (3,35 μg/g), κατεχίνη (46,45 μg/g), ναρινγκίνη (1,00 μg/g) και ναρινγκενίνη (1,30 μg/g). Οι ποσότητες φαινολικών οξέων του πιπεριού καγιέν ήταν το βανιλικό οξύ (3231,15 μg/g), το υδροξυκιναμικό οξύ (168,70 μg/g), το καφεϊκό οξύ (70,80 μg/g), το φερουλικό οξύ (39,95 μg/g) και ροσμαρινικό οξύ (2,85 μg/g) (Keser, και συν., 2018). Πολλές από τις παραπάνω ενώσεις όπως το βανιλικό, το καφεϊκό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ έχουν αντιβακτηριακές ιδιότητες (Ivanov, Kostic, Stojkovic, & Sokovic, 2021). Σε άλλη μελέτη, οι Nagy κ.ά. (2015) διαπίστωσαν ότι οι καρποί *C. frutescens* από δύο διαφορετικές περιοχές περιείχαν από 79,2-101,6 μg/g βανιλικού οξέος, 132,7-175,2 μg/g κατεχίνης, 276,5- 368,8 μg/g ναρινγενίνης, 8-21,1 μg/g κερκετίνης, 31,9-52,9 μg/g μυρικετίνης και 51,1-200,7 μg/g καμφερόλης. Επίσης αρκετές πολλές από τις παραπάνω ενώσεις έχει διαπιστωθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση όπως για παράδειγμα ορισμένες ιονισμένες μορφές του φερουλικού οξέος (Pernin, Guiller, & Dubois - Brissonet, 2018). Οι Serhat Keser κ.ά. (2018) προσδιόρισαν ότι το υδατικό εκχύλισμα *C. frutescens* έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηρίων *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* βακτήρια και τη ζύμη *C. albicans*. Επίσης οι Serhat Keser, 2018 έδειξαν ότι τα υδατικά εκχυλίσματα των καρπών *C. frutescens* έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* και *Vibrio cholerae* (Keser, και συν., 2018).

Όπως έχει αναφερθεί ένα από τα συστατικά της πιπεριάς καγιέν είναι οι προανθοκυανιδίνες. Είναι ολιγομερή και πολυμερή προϊόντα της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών. Τα δομικά στοιχεία των προανθοκυανιδινών περιλαμβάνουν την κατεχίνη και την επικατεχίνη. Τα διμερή των προανθοκυανιδινών έχουν αναφερθεί ως ισχυροί αντιμικροβιακοί παράγοντες, π.χ. εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού πλούσιο σε προανθοκυανιδίνες μείωσε τον αριθμό κυττάρων *Listeria monocytogenes* και *B. cereus*. Οι κατεχίνες από την άλλη, μπορούν να αυξήσουν την περιεκτικότητα των ελεύθερων ριζών στα κύτταρα και να προκαλέσουν ενδογενές οξειδωτικό στρες στην *E. coli*, ασκώντας αντιβακτηριακή δράση μέσω μείωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βακτηρίων (Muhammad, Patel, Pan, Naz, Sanchez - Silva, & Daeed, 2019).

Θα πρέπει παράλληλα να σημειωθεί ότι σε πλείστες των ως άνω περιπτώσεων δεν επρόκειτο για υδατικά εκχυλίσματα αλλά για εκχυλίσματα με οργανικούς διαλύτες ή υδρα-

αλκοολικά εκχυλίσματα ή ακόμα και για υδατικά εκχυλίσματα τα οποία είχαν συμπυκνωθεί.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **Συμπεράσματα**

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα υδατικά εκχυλίσματα του μαύρου πιπεριού, πράσινου πιπεριού και πιπεριάς καγιέν είχαν κατά περίπτωση και ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης ανασταλτική ή μερικώς ανασταλτική δράση έναντι των παθογόνων τροφιμογενών βακτηρίων *S. aureus*, *L. monocytogenes*, και *B. cereus*. Δεν διαπιστώθηκε, όμως, κάποια γενική τάση για συνθήκες εκχύλισης οι οποίες οδηγούν σε αναστολή ή σε περιορισμό της ανάπτυξής τους, πλην των εκχυλίσεων σε όξινες συνθήκες.

Αντίθετα, ήταν ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι σε αρκετές περιπτώσεις το στελέχος *L. monocytogenes* ευνοήθηκε από τα ορισμένα εκχυλίσματα μαύρου και πράσινου πιπεριού.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στις ακόλουθες προτάσεις για τα επόμενα βήματα τις έρευνας στο συγκεκριμένο πεδίο:

- Επέκταση του αριθμού και του είδους των βακτηρίων – τα τρία στελέχη είναι ενδεικτικός αριθμός
- Συστηματική διερεύνηση του φαινομένου όπου ορισμένα εκχυλίσματα μαύρου και πράσινου πιπεριού όχι μόνο δεν περιόρισαν την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* αλλά αντίθετα ενίσχυσαν την ανάπτυξή του.

## Βιβλιογραφία

Abdulawahab, A. (2021, November). Detection of the Active Compounds of the Hot Aqueous

- Extract of Cinnamomum cassia using FTIR Technology and Testing as Anti-bacterial and Antioxidant. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*.
- Abdulazeez, M. A., Sani, I., James, B. D., & Abdullahi, A. S. (2016). Black Pepper (Piper nigrum L.) Oils. Στο *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*.
- Abdulazeez, M. A., Sani, I., James, B. D., & Abdullahi, A. S. (2016). Black Pepper (Piper nigrum L.) Oils. Στο *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*.
- Akthar, M., Birnahu, G., & Demisse, S. (2014, July 18). Antimicrobial activity of Piper nigrum L. and Cassia didymobotrya L. leaf. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*.
- Baenas, N., Belovic, M., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2018, September 10). Industrial use of pepper (Capsicum annum L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chemistry*, σσ. 872-885.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Koraichi Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.
- Banerji, R., Mahamune, A., & Saroj, S. D. (2022, January 15). Aqueous extracts of spices inhibit biofilm in Listeria monocytogenes by downregulating release of eDNA. *LWT*.
- Begot, C., Densier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C., & Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, σσ. 225-232.
- Bor, T., Aljaloud, S. O., Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2016). Antimicrobials from herbs, spices, and plants. Στο R. R. Preedy, *Fruits, Vegetables and Herbs* (σσ. 551-578). Riyadh, Saudi Arabia: North Carolina Agricultural and Technical State University.
- Bosland, P. W., Coon, D., & Reeves, G. (2012, August). *Trinidad Moruga Scorpion Pepper is the Worlds Hottest Measured Chile Pepper at More Than Tow Million Scoville Heat Units*. Ανάκτηση από American Society for Horticultural Science: <https://journals.ashs.org/horttech/view/journals/horttech/22/4/article-p534.xml>
- Cardoso-Ugarte, G. A., Lopez-Malo, A., & Sosa-Morales, M. E. (2016). Cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) Essential Oils. Στο *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*.
- Daud, N. M., Putra, N. R., Jamaludin, R., Norodin, N. S., Sarkawi, N. S., Hamzah, M. H., και συν. (2021, December 5). Valorisation of plant seed as natural bioactive compounds by various extraction methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, σσ. 201-214.
- Davidson, P. M., Cekmer, H., Monu, E. A., & Techathuvanan, C. (2015). The Use of natural antimicrobials in food: an overview. Στο T. Taylor, *A Handbook of natural antimicrobials for Food safety and Quality*. Woodhead Publishing.
- Embuscado, M. E. (2018). Bioactives From Spices and Herbs. *Elsevier Inc*, σσ. 1-14.
- Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., και συν. (2018, July 24). Antimicrobial Properties and Mechanism of action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *frontiers in Microbiology*.
- Goni, M. G., Roura, S. I., Ponce, A. G., & Moreira, M. R. (2016). Clove (Syzygium aromaticum) Oils. Στο *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*.
- Gyawali, R., Hayek, S. A., & Ibrahim, S. A. (2015). Plant extracts as antimicrobials in food products: types. Στο T. Taylor, *A Handbook of natural antimicrobials for Food Safety and Quality*.
- Ismail, M. M., Essam, T. E., Mohamed, A. F., & Mourad, F. E. (2012, 3 3). Screening for the Antimicrobial Activities of Alcoholic and Aqueous Extracts of Common Spices in Egypt. *International Journal of Microbiological Research*.
- Ivanov, M., Kostic, M., Stojkovic, D., & Sokovic, M. (2021, December 8). Rosmarinic acid–Modes of antimicrobial and antibiofilm activities of a common plant polyphenol. *South African Journal of Botany*, σσ. 521-527.
- Jakribettu, R. P., Bolor, R., Bhat, H. P., Thaliath, A., Haniadka, R., Ral, M. P., και συν. (2016). Ginger (Zingiber officinale Rosc.) Oils. Στο V. R. Preedy, *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (σσ. 447-454). Academic Press.
- Keser, S., Kaygili, O., Keser, F., Tekin, S., Yilmaz, O., Demir, E., και συν. (2018, Nov 04). Phytochemical Composition, Antiradical, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of

- Capsicum frutescens* L. *Analytical Chemistry Letters*, σσ. 642-652.
- Kulkarni, Y. A., Suryvanshi, S. V., Auti, S. T., & Gaikwad, A. B. (2017). Capsicum: A Natural Pain Modulator. Στο R. R. Zibadi, *Nutritional Modulators of Pain in the Aging Population* (σσ. 107-119). Tucson, AZ, Tampa, FL, United States: Academic Press.
- Li, Y.-x., Erhumwunsee, F., Liu, M., Yang, K., Zheng, W., & Tian, J. (2022). Antimicrobial mechanisms of spice essential oils and application in food industry. *Food Chemistry*.
- Liu, H., Zeng, F., Wang, Q., Ou, S., Tan, L., & Gu, F. (2013, December 15). The effect of cryogenic grinding and hammer milling on the flavour quality of ground pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Chemistry*.
- Liu, J., Mahmood, M. S., Abbas, R. Z., Dillawar, A., Nawaz, Z., Luqman, M., και συν. (2021). THERAPEUTIC APPRAISAL OF ETHANOLIC AND AQUEOUS EXTRACTS OF CLOVE (*Syzygium aromaticum*) AND GARLIC (*Allium sativum*) AS. *Pakistan Journal of Agricultural Research*.
- Liu, Y., Yadev, V. R., Aggarwal, B. B., & Nair, M. G. (2010). Inhibitory Effects of Black Pepper (*Piper nigrum*) Extracts and Compounds on Human Tumor Cell Proliferation, Cyclooxygenase Enzymes, Lipid Peroxidation and Nuclear Transcription Factor-kappa-B.
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D., & Prajapati, J. B. (2016, May 10). Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.
- Mahfouz, A., & Daigham, C. E. (2020, December). Assessment of Antibacterial, Antifungal, Antioxidant and Antiviral Activities of Black pepper Aqueous Seed Extract. *Al-Azhar University Journal for Virus Research and Studies*.
- Maria - Garcia, C., Gonzalez-Bermudez, C. A., Caballero - Valcarcel, A. M., Santaella-Pascual, M., & Frontela - Saseto, C. (2015, December 11). Use of herbs and spices for food preservation: advantages and limitations. *ScienceDirect*.
- Marwaha, S., Singh, A. P., Kachawa, J. P., & Sharma, P. (2019, December). *Study of therapeutic potential of aqueous and ethanolic extracts of piper nigrum in subclinical mastitis in cattle*. Ανάκτηση από Research Gate: <https://www.researchgate.net/publication/351691860>
- Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2017). Cinnamon Species. Στο V. Kuete, *Medicinal plants and vegetables from Africa, Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* (σσ. 385-395). Dschang, Cameroon: Academic press.
- Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2017). *Syzygium aromaticum*. Στο V. Kuete, *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (σσ. 611-625). Dschang, Cameroon: Academic Press.
- Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2017). *Zingiber officinale*. Στο V. Kuete, *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. Dschang, Cameroon: Academic Press.
- Mgbeahuruike, E. E., Yrjonen, T., Vuorela, H., & Holm, Y. (2017, May 25). Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. *South African Journal of Botany*, σσ. 54-69.
- Moratu, A., Rosca, I., Creasiun, B., Chiriac, A. E., & Voicu, V. (2019). Insights of the antimicrobial activity of piperine extracted from *piper nigrum* L. *Farmacia*, σσ. 1-7.
- Muhammad, A. -R., Patel, I. T.-I.-U.-H., Pan, X., Naz, S., Sanchez - Silva, A., & Daeed, F. (2019, May 14). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.
- Mukhtar, S., & Ghori, I. (2012, MARCH 7). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS OF GARLIC, CINNAMON AND TURMERIC AGAINST ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 AND BACILLUS SUBTILIS DSM 3256. *INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED BIOLOGY AND PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY*.
- Muzolf-Panek, M., & Stuper-Szablewska, K. (2021, June 14). Comprehensive study on the antioxidant capacity and phenolic profiles of black seed and other spices and herbs: effect of solvent and time of extraction. *Journal of Food Measurement and Characterization*, σσ. 4561-4574.
- Oyemitan, I. (2017). African Medicinal Spices of Genus Piper. Στο V. Kuete, *Medicinal Spices and Vegetables from Africa, Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* (σσ. 581-597). Dschang, Cameroon: Academic Press.
- Pernin, A., Guiller, L., & Dubois - Brissonet, F. (2018, December 24). Inhibitory activity of phenolic

- acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiology*, σσ. 18-24.
- Pickersgill, B. (2003). PEPPERS AND CHILLIES. Στο B. Caballero, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (σσ. 4460-4467). Baltimore, Maryland 21205-2179, USA: Academic Press.
- Raghavan, S. (2006). Forms, Functions, and Applications of Spices. Στο S. Raghavan, *Handbook of Spices, Seasonings, and Flavorings* (σσ. 25-53). London: CRC Press.
- Rani, B., Naz, S., Saeed, S., & Clatha, A. (2021). Antibacterial Effects of Common Spices against *Staphylococcus aureus* Under Laboratory Conditions. *Bioscientific Review*.
- Ranjha, M. M., Kanwal, R., Shafique, B., Arshad, R. N., Irfan, S., Kieliszek, M., και συν. (2021, August 12). A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents. *molecules*.
- Sanati, S., Razari, B., & Zadeh, H. (2017). A review of the effects of *Capsicum annum* L. and its constituent, capsaicin, in metabolic syndrome. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.
- Sanchez - Carmago, A. P., Montero, L., Mendiola, J. A., & Herrero, M. (2020). Novel Extraction Techniques for Bioactive Compounds from Herbs and Spices. Στο N. P. Mohammad B. Hossain, *Herbs, Spices and Medicinal Plants: Processing, Health Benefits and Safety*. John Wiley & Sons Ltd.
- Sellami, M., Ghariani, B., Louati, H., Miled, N., & Gargouri, Y. (2013, August 15). Biological Activities of Extracts of Different Spices and Plants. *International Journal of Current Engineering and Technology*.
- Sharif, M. K., Esaj, R., & Pasha, I. (2018). Nutritional and Therapeutic Potential of Spices. Στο A. M. Holban, *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* (σσ. 181-199). Faisalabad, Pakistan: Academic Press.
- Shityakov, S., Bigdelian, E., Hussein, A. A., Hussain, M. B., Trpathi, Y., & Khan, M. (2019, April 5). Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. *European Journal of Medicinal Chemistry*, σσ. 149-161.
- Siddique, M., Tzima, K., Rai, D. K., & Brunton, N. (2020). Conventional Extraction Techniques for Bioactive Compounds from Herbs and Spices. Στο N. P. Mohammad B. Hossain, *Herbs, Spices and Medicinal Plants: Processing, Health Benefits and Safety*. Dublin: John Wiley & Sons Ltd.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Στο S. I. M.M. Tajkarimi, *FOOD CONTROL*.
- Tamokou, J. D., Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2017). Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. Στο V. Kuete, *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (σσ. 329-349). Dschang, Cameroon: Academic Press.
- Tavares da Silva, M., Bernardo, M., Singh, J., & de Mesquita, M. (2019). Chapter 33 - Beneficial Uses of Cinnamon in Health and Diseases: An Interdisciplinary Approach. Στο *The Role of Functional Food Security in Global Health*.
- Waheeda, A., Arshada, L., Tabassuma, S., Zahida, L., Ahmeda, H., Aaramb, S., και συν. (2021). Chapter 29 - Capsaicin. Στο *A Century of Valuable Plant Bioactives*.
- Withowska, A. M., Hichey, D. K., Alonso - Gomez, M., & Wilkinson, M. (2013, June 27). Evaluation of Antimicrobial Activities of Commercial Herb and Spice Extracts Against Selected Food - Borne Bacteria. *Journal of Food Research*.
- Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S. M., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., και συν. (2019, May 31). Supercritical fluid extraction of essential oils. *Trends in Analytical Chemistry*, σσ. 182-193.
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Salem, N., Gargouri, Y., & Sayari, A. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *Food Science and Technology*, σσ. 634-641.
- Zlabur, J. S., Brajer, M., Voca, S., Galic, A., Sanja, R., & Rimac - Brncic, S. (2021, March 25). Ultrasound as a Promising Tool for the Green Extraction of Specialized Metabolites from Culinary Spices Qiang Xia, Zhenzhou Zhu, Nabil Grimi, Francisco J. Barba, and Nataša

Hulak. *molecules*.