

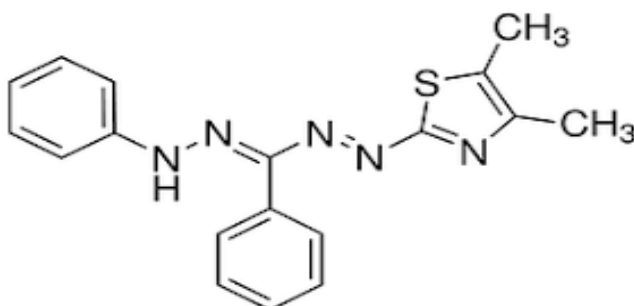
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**INVITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΖΥΜΕΣ**



ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΦΟΥΝΤΑ ΒΙΟΛΕΤΤΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΛΕΤΣΙΟΥ ΣΟΦΙΑ

ΑΙΓΑΛΕΩ – ΑΘΗΝΑ

2022-2023

Έγινε δεκτή,

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει την πτυχιακή εργασία με τίτλο (INVITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΖΥΜΕΣ) που παρουσιάστηκε από τις φοιτήτριες Αποστολάκη Αλεξάνδρα και Φούντα Βιολέττα με αριθμούς μητρώου 18684017 και 18684086 και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία & όνομα επιβλέποντος/μέλους 1 εξεταστικής επιτροπής:

Ημερομηνία & όνομα μέλους 2 εξεταστικής επιτροπής :

Ημερομηνία & όνομα μέλους 3 εξεταστικής επιτροπής :

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθεν υπογραφόμενες Φούντα Βιολέττα και Αποστολάκη Αλεξάνδρα του Βασιλείου και Ευσταθίου αντίστοιχα με αριθμό μητρώου 18684086 και 18684017 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

Είμαστε συγγραφείς αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δική μας, όσο και του Ιδρύματος.

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

Υπογραφή φοιτήτριας:

Violet F.

Υπογραφή φοιτήτριας:

Alexandra A.

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις επιβλέπουσες καθηγήτριές μας κα Λέτσιου Σοφία και κα Μπατρίνου Ανθιμία για την καθοδήγηση που μας προσέφεραν και τον χρόνο που διέθεσαν δίνοντάς μας χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μας εργασίας .

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	8
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Αντιμικροβιακή ικανότητα.....	9
1.2. Η σημασία του προσδιορισμού της αντιμικροβιακής ικανότητας στα φυτά.....	9
1.3. Σχέση μεταξύ αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης και χρησιμότητα τους...	10
1.4. Ζύμες στα τρόφιμα	13
1.4.1 Στέλεχος <i>S. cerevisiae</i> (Turboyeast)	14
1.4.2. Στέλεχος <i>S. cerevisiae</i> (M15)	14
1.4.3. Στέλεχος <i>S. cerevisiae</i> (Magi)	15
1.4.4. Ζύμη <i>Lachancea</i>	16
1.5. In vitro μέθοδοι αξιολόγησης της αντιμικροβιακής και αντιμυκητιακής δράσης.....	17
1.5.1. Μέθοδος διάχυσης δίσκου άγαρ (δοκιμή Kirby- Bauer).....	17
1.5.2. Μέθοδος μικροδιάλυσης ζωμού.....	18
1.5.3. Μέθοδος αραιώσης σε άγαρ.....	18
1.5.4. Κινητική Time-Kill.....	18
1.5.5 Μέθοδος σκακιέρας.....	18
1.5.6. Βιοδοκιμή με επικάλυψη άγαρ.....	18

1.5.7. Μέθοδος διάχυσης.....	19
1.5.8.Θολωσιμετρικές και φασματοφωτομετρικές μέθοδοι	19
1.5.9. Δοκιμές φθορισμού.....	19
1.5.10. Δοκιμές ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης (MFC).....	20
1.6. Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση των προς μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων....	20
1.6.1.Φυτικό εκχύλισμα S-arom.....	21
1.6.2.Φυτικό εκχύλισμα Rosemary.....	21
1.6.3.ΦυτικόεκχύλισμαVanilla	22
1.6.4.ΦυτικόεκχύλισμαStJohn’swort.....	23
1.6.5.Φυτικό εκχύλισμα Mastic.....	24
1.6.6. Φυτικό εκχύλισμα GreenPod.....	25
1.7.Χρησιμοποιούμενο μοντέλοεκτίμησης της αντιμικροβιακήςικανότητας.....	25
1.7.1 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα μεθόδου.....	28
1.8 Εφαρμογές της χρησιμοποιούμενης μεθόδου	30
2. Σκοπός	32
3.Μέθοδοι και υλικά.....	33
3.1. Υλικά	33
3.2. Πειραματική Πορεία	35
3.2.1.Επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης εμβολιασμένων δειγμάτων ζυμών	35
3.2.2. Παρασκευή εμβολιασμένου υποστρώματος με ζύμες.....	36

3.2.3. Καταμέτρηση αποικιών με τη μέθοδο διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.....	37
3.2.4 Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων ζυμών.....	38
3.2.5 Αποστείρωση θρεπτικού υποστρώματος και εμβολιασμός.....	39
3.2.6 Παρασκευή αντιδραστηρίων (INT/TTC).....	39
3.3 Διερεύνηση αντιδραστηρίων (INT/TTC)	40
3.4 Διερεύνηση αντιμικροβιακής δράσης	44
3.4.1. Πλήρωση της μικρόπλακας	46
3.4.2 Επώαση της μικρόπλακας και οπτική παρατήρηση.....	49
3.4.3 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας.....	49
3.4.4. Κατασκευή Ραβδογραμμάτων.....	50
3.5 Καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλίαPetri.....	51
4. Αποτελέσματα.....	54
4.1. Αποτελέσματα καταμέτρησης τρυβλίων.....	55
4.2. Ραβδογράμματα οπτικής πυκνότητας	60
4.3.Αποτελέσματα % inhibition.....	62
4.3.1Συγκεντρωτικά αποτελέσματα με βάση τις μετρήσεις του % inhibition.....	64
5. Συμπεράσματα.....	65
5.1. Αναφορικά με τα εκχυλίσματα.....	66
5.2 Αναφορικά με τις ζύμες.....	67
Βιβλιογραφία	68

Κατάλογος πινάκων :

Πίνακας 1 : Ενδεικτική απεικόνιση εναπόθεσης των συστατικών στην πλάκα ELISA (σελ 39)

Πίνακας 2 : Ενδεικτική σχηματική αναπαράσταση της πλάκας ELISA σύμφωνα με την εναπόθεση των συστατικών (σελ 43)

Πίνακας 3 : Δείγματα από κυψελίδες της πλάκας ELISA που χρησιμοποιήθηκαν για την επίστρωση τρυβλίων (σελ 50)

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα από την καταμέτρηση των τρυβλίων εκφρασμένα σε λογαριθμική κλίμακα (σελ51)

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα % inhibition (V1) (σελ 58)

Πίνακας 5.1. : Αποτελέσματα % inhibition (V2) (σελ 58)

Πίνακας 5.2. : Αποτελέσματα % inhibition (V3) (σελ 58)

Πίνακας 5.3. : Αποτελέσματα % inhibition (S-arom) (σελ 59)

Πίνακας 5.4. : Αποτελέσματα % inhibition (S-arom 1:2) (σελ 59)

Πίνακας 5.5. : Αποτελέσματα % inhibition (StJohn'swort) (σελ 59)

Πίνακας 5.6. : Αποτελέσματα % inhibition (Mastic) (σελ60)

Πίνακας 5.7. : Αποτελέσματα % inhibition (Rosemary) (σελ60)

Πίνακας 5.8. : Αποτελέσματα % inhibition (GreenPod 100% H₂O) (σελ60)

Πίνακας 5.9. : Αποτελέσματα % inhibition (GreenPod 10% ETOH) (σελ61)

Πίνακας 6 : Αποτίμηση δραστηριότητας εκχυλισμάτων (V1,V2,V3) (σελ61)

Πίνακας 6.1. : Αποτίμηση δραστηριότητας εκχυλισμάτων (S-arom&S-arom 1:2) (σελ 62)

Πίνακας 6.2. : Αποτίμηση δραστηριότητας εκχυλισμάτων (StJohn'swort, Mastic, Rosemary, GreenPod 100% H₂O, GreenPod 10% ETOH) (σελ 62)

Πίνακας 7: Αποτίμηση ανθεκτικότητας των επιλεγμένων στελεχών ζυμών έναντι στα χρησιμοποιούμενα φυτικά εκχυλίσματα. (σελ 65)

Κατάλογος εικόνων :

Εικόνα 1 : Συσκευασμένη ζύμη TurboYeast (σελ 12)

Εικόνα 1.2.: Συσκευασμένη ζύμη M15 (σελ 12)

Εικόνα 1.3.: Συσκευασμένη ζύμη Magic(σελ 13)

Εικόνα 1.4.: Συσκευασμένη ζύμη Lachancea(σελ 14)

Εικόνα 2: Χημικός τύπος της χρωστικής INT(σελ 24)

Εικόνα 2.1.: Χημικός τύπος της χρωστικής TTC(σελ 24)

Εικόνα 2.2.: Χημική αντίδραση INT – μικροοργανισμών και παραγωγή φορμαζάνης(σελ 24)

Εικόνα 2.3.: Χημική αντίδραση TTC – μικροοργανισμών και παραγωγή φορμαζάνης(σελ 25)

Εικόνα 3 : Biotek Epoch Microplate spectrophotometer(σελ 35)

Εικόνα 3.1. : Πιπέτες και πολυκάναλη πιπέτα (Eppendorf)(σελ 35)

Εικόνα 3.2.: Χλωριούχο τριφαινυλτετραζόλιο (TTC) (σελ 35)

Εικόνα 3.3.: Ιωδονιτροτετραζόλιο (INT)(σελ 35)

Εικόνα 4: Θρεπτικό στερεό υπόστρωμα (σελ 38)

Εικόνα 4.1.: Παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα υπό στείρες συνθήκες με τη χρήση λύχνου Bunsen (σελ 38)

Εικόνα 5: Πραγματική απεικόνιση της πλάκας ELISA (σελ 40)

Εικόνα 6: Φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν (Vanilla Tahitensis, S-arom, Vanilla Planifolia, Vanilla Absolut) (σελ 42)

Εικόνα 7: Πραγματική απεικόνιση επωασμένης πλάκας ELISA (σελ 52)

Εικόνα 8: ΤρυβλίαPetri με θρεπτικό υπόστρωμα RoseBengal(σελ53)

Εικόνα 8.1.: Εμβολιασμένα τρυβλία με τα δείγματα από την εικονιζόμενη πλάκα ELISA (σελ 53)

Εικόνα 9: Επωασμένη πλάκα ELISA με την προσθήκη εκχυλισμάτων V1,V2,V3, S-arom πυκνό (σελ 57)

Εικόνα 9.1.: Επωασμένη πλάκα ELISA με τα φυτικά εκχυλίσματα (StJohn'swort,Rosemary, Mastic, GreenPod) (σελ 59)

Κατάλογος γραφημάτων :

Γράφημα 1 : Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος (V1)(σελ 54)

Γράφημα 2: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος(V2)(σελ 54)

Γράφημα 3: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος(V3)(σελ 56)

Γράφημα 4: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος (S-arom)(σελ 56)

Γράφημα 5: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος(S-arom 1:2)(σελ 57)

Γράφημα 6: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος(StJohn'swort)(σελ 57)

Γράφημα 7: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος(Rosemary)(σελ 58)

Γράφημα 8 : Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος(Mastic) (σελ 59)

Γράφημα 9: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος(GreenPod 100% H2O&GreenPod 10% ΕΤΟΗ) (σελ 59)

Κατάλογος σχημάτων :

Σχήμα 1 : Αναπαράσταση παρασκευής δεκαδικών αραιώσεων σε δοκιμαστικούς σωλήνες και σε τρυβλίαPetri (σελ 34)

Περίληψη

Η πτυχιακή αυτή αναλύει την αντιμικροβιακή δράση φυτικών εκχυλισμάτων σε στελέχη ζυμών. Πέρα από το θεωρητικό κομμάτι όμως, πραγματοποιείται και εργαστηριακή έρευνα της αντιμικροβιακής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω μιας In vitro χρωματομετρικής δοκιμής με τη χρήση αλάτων τετραζολίου (INT/TTC). Αρχικά γίνεται αναφορά στην αντιμικροβιακή δράση και στη σημασία της μελέτης της στα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα. Αποσαφηνίζεται η έννοια της αντιοξειδωτικής ικανότητας και το πώς αυτή σχετίζεται με την αντιμικροβιακή δράση. Αναλύεται ο ρόλος των μικροοργανισμών της κατηγορίας των ζυμών στα τρόφιμα και περιγράφονται αναλυτικά η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, τα στελέχη που μελετήθηκαν καθώς και η μαγιά *Lachancea* τα οποία αποτελούν τους μικροοργανισμούς στόχους του πειράματος. Στη συνέχεια περιγράφονται η αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν. Παραθέτονται διάφορες In vitro κατεργασίες για την παρατήρηση της αντιμικροβιακής και αντιμυκητιακής δράσης, δίνοντας έμφαση στο χρησιμοποιούμενο μοντέλο και στα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής. Έπειτα, στο ερευνητικό μέρος, περιγράφεται η προετοιμασία όλων των δειγμάτων για την εναπόθεση τους στην πλάκα ELISA. Τέλος, πραγματοποιείται αναλυτική περιγραφή των πειραμάτων και των μετρήσεων που έγιναν με τα συμπεράσματά τους να αναλύονται.

Abstract

This thesis analyzes the antimicrobial activity of plant extracts on yeast strains. Apart from the theoretical part, however, laboratory research of the antimicrobial activity of plant extracts is carried out through an in vitro colorimetric test using tetrazolium salts (INT / TTC). Initially, reference is made to antimicrobial activity and the importance of its study in various plant extracts. The concept of antioxidant capacity and how it relates to antimicrobial activity is clarified. The role of microorganisms of the yeast class in food is analyzed and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the strains studied as well as the *Lachancea* yeast which are the target microorganisms of the experiment are described in detail. The antimicrobial and antioxidant activity of the plant extracts studied is described below. Various In vitro treatments are presented for the observation of antimicrobial and antifungal activity, emphasizing the model used and the advantages of this method. Then, in the research part, the preparation of all samples for deposition on the ELISA plate is described. Finally, a detailed description of the experiments and measurements made is carried out with their conclusions being analyzed.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ)

1.1 Αντιμικροβιακή ικανότητα

Η αντιμικροβιακή δράση μιας ουσίας αξιολογείται συνήθως μέσω εργαστηριακών δοκιμών, συμπεριλαμβανομένων μεθόδων όπως οι δοκιμές διάχυσης σε άγαρ, οι δοκιμές αραίωσης σε ζωμό και οι δοκιμές ευαισθησίας. Τα αποτελέσματα βοηθούν στον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, η οποία είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας ουσίας που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Dorman, H. D., & Deans, S. G., 2000). Η αντιμικροβιακή δράση είναι ζωτικής σημασίας σε διάφορους τομείς, όπως η ιατρική (για την ανάπτυξη αντιβιοτικών και αντικών φαρμάκων), η συντήρηση τροφίμων (για την πρόληψη της αλλοίωσης και των τροφιμογενών ασθενειών) και η υγιεινή (για τον καθαρισμό και την απολύμανση των επιφανειών και των χεριών). Διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην πρόληψη και τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών και στη διατήρηση της δημόσιας υγείας (Bosnić T. et al., 2006)

1.2 Σημασία προσδιορισμού αντιμικροβιακής ικανότητας στα φυτά

Πολλά είδη φυτών χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική εδώ και αιώνες λόγω των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων. Η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των φυτών βοηθά στον εντοπισμό πιθανών πηγών νέων φαρμακευτικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη αντιβιοτικών και άλλων φαρμακευτικών προϊόντων. Σημαντική κρίνεται η συμβολή τους στην καταπολέμηση των ανθεκτικών στα φάρμακα παθογόνων μικροοργανισμών. Η αύξηση των ανθεκτικών στα φάρμακα βακτηρίων και μυκήτων αποτελεί παγκόσμια ανησυχία για την υγεία. Τα φυτά μπορεί να προσφέρουν μια πηγή νέων αντιμικροβιακών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση αυτών των ανθεκτικών στα φάρμακα παθογόνων μικροοργανισμών. (HemrajVashistetal., 2012). Τα αντιμικροβιακά φάρμακα που συντίθενται στα εργαστήρια μπορεί να έχουν παρενέργειες και μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι αντιμικροβιακές ενώσεις φυτικής προέλευσης μπορούν να χρησιμεύσουν ως εναλλακτικές λύσεις με δυνητικά λιγότερες παρενέργειες. Σε

πολλούς πολιτισμούς, τα φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα για διάφορες λοιμώξεις και ασθένειες. Η επιστημονική αξιολόγηση αυτών των παραδοσιακών χρήσεων μπορεί να βοηθήσει στην επικύρωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειάς τους. Οι αντιμικροβιακές ενώσεις από φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συντήρηση τροφίμων για την παράταση της διάρκειας ζωής των ευπαθών τροφίμων και την πρόληψη τροφιμογενών ασθενειών. (Silva NCC; Fernandes Júnior, 2010) .Οι αντιμικροβιακές ενώσεις φυτικής προέλευσης μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στη γεωργία για την ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον φυτοφαρμάκων και μυκητοκτόνων, μειώνοντας την ανάγκη για συνθετικές χημικές ουσίες. Η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών φυτικής προέλευσης μπορεί να έχει μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο σε σύγκριση με τις συνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες μπορεί να παραμείνουν στο περιβάλλον και να βλάψουν τους μη στοχευόμενους οργανισμούς. Ο εντοπισμός φυτών με αντιμικροβιακές ιδιότητες μπορεί να συμβάλει στην προώθηση της διατήρησης αυτών των ειδών και των ενδιαιτημάτων τους, καθώς και στην παροχή οικονομικών κινήτρων για βιώσιμη συγκομιδή. Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των φυτών μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων ενώσεων και μηχανισμών δράσης, συμβάλλοντας στην κατανόηση της μικροβιολογίας και της ανάπτυξης φαρμάκων. (Rios, J. L., & Recio, M. C., 2005). Τα αντιμικροβιακά με βάση τα φυτά μπορούν να είναι ιδιαίτερα πολύτιμα σε περιοχές με περιορισμένη πρόσβαση σε σύγχρονες εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης και αντιβιοτικά, προσφέροντας προσιτές και προσβάσιμες θεραπευτικές επιλογές. Συνοψίζοντας, ο προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης στα φυτά είναι απαραίτητος τόσο για την επιστημονική έρευνα όσο και για τις πρακτικές εφαρμογές, που κυμαίνονται από την ανακάλυψη φαρμάκων έως τη δημόσια υγεία και την περιβαλλοντική βιωσιμότητα. (Saúl Redondo-Blanco et al., 2020).

1.3 Σχέση μεταξύ αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης και χρησιμότητά τους

Η αντιμικροβιακή δράση και η αντιοξειδωτική δράση είναι δύο διαφορετικές ιδιότητες ενώσεων ή ουσιών, αλλά μπορεί να υπάρχουν κάποιες συνδέσεις ή επικαλύψεις μεταξύ τους, κυρίως λόγω του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρούν με τα βιολογικά συστήματα. Ορισμένες ενώσεις που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση διαθέτουν επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, ορισμένα φυτοχημικά που βρίσκονται στα φυτά, όπως τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες, μπορούν να έχουν τόσο αντιμικροβιακή όσο και αντιοξειδωτική δράση. Αυτή η επικάλυψη οφείλεται συχνά στην παρουσία συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων στη χημική τους δομή που τους επιτρέπουν να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες (αντιοξειδωτική δράση) και να διαταράσσουν την ανάπτυξη των μικροβίων (αντιμικροβιακή δράση). (Alkadi, H. ,2020). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία των κυττάρων και των ιστών από βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες, το οποίο εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής επιβλαβών αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και της ικανότητας του οργανισμού να τα εξουδετερώνει (KhalidRahman , 2007). Μειώνοντας το οξειδωτικό στρες, τα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν έμμεσα στη συνολική υγεία και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό μπορεί, με τη σειρά του, να υποστηρίξει την ικανότητα του οργανισμού να καταπολεμά τις λοιμώξεις. (Halliwell B. Etal., 1990). Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι αντιμικροβιακές και οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορεί να συνεργάζονται συνεργατικά. Για παράδειγμα, στην παραδοσιακή ιατρική, ορισμένα βότανα ή φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων. Οι ουσίες αυτές μπορεί να περιέχουν έναν συνδυασμό αντιμικροβιακών παραγόντων που καταπολεμούν άμεσα τους παθογόνους μικροοργανισμούς και αντιοξειδωτικών που συμβάλλουν στη μείωση της φλεγμονής και υποστηρίζουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού (GregoriaMitropoulouetal., 2015). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να υποστηρίξουν το ανοσοποιητικό σύστημα προστατεύοντας τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος από οξειδωτικές βλάβες. Ένα ισχυρό και υγιές ανοσοποιητικό σύστημα είναι απαραίτητο για την καταπολέμηση των λοιμώξεων. Επομένως, οι ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες συμβάλλουν έμμεσα στην αντιμικροβιακή άμυνα διατηρώντας την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος. Πολλά τρόφιμα και φυσικές ουσίες που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες,

όπως το σκόρδο, το μέλι και ορισμένα αιθέρια έλαια, περιέχουν επίσης αντιοξειδωτικά. Η κατανάλωση αυτών των τροφίμων ή η χρήση αυτών των ουσιών μπορεί να παρέχει διπλό όφελος, καθώς καταπολεμά τις λοιμώξεις και παρέχει αντιοξειδωτική υποστήριξη. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, ενώ υπάρχουν συνδέσεις μεταξύ των αντιμικροβιακών και των αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων, οι δύο έννοιες δεν πρέπει να συγχέονται. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα αναφέρεται συγκεκριμένα στην ικανότητα αναστολής ή θανάτωσης μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα, από την άλλη πλευρά, αναφέρεται στην ικανότητα εξουδετέρωσης των επιβλαβών ελεύθερων ριζών και στη μείωση του οξειδωτικού στρες. Αυτές οι δραστηριότητες μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται στην υποστήριξη της συνολικής υγείας, αλλά εξυπηρετούν διαφορετικές πρωταρχικές λειτουργίες.(BalzFrel , 2012).

1.4 Ζύμες στα τρόφιμα

Οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τροφίμων και χρησιμοποιούνται συνήθως σε διάφορες μαγειρικές διαδικασίες για τη ζύμωση και την προζύμωση των τροφίμων. Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι μύκητες που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* και το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είδος σε εφαρμογές τροφίμων είναι το *Saccharomyces cerevisiae*. Αυτοί οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια από τον άνθρωπο για την παραγωγή ενός ευρέος φάσματος τροφίμων και ποτών.(Graham H Fleet, 2007). Ορισμένες χρήσεις των ζυμών αυτών αποτελούν:

1. Ζύμωση: Οι ζύμες είναι απαραίτητες στη διαδικασία της ζύμωσης, όπου μεταβολίζουν τα σάκχαρα και παράγουν διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη ως υποπροϊόντα. Η διαδικασία αυτή είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή διαφόρων τροφίμων και ποτών, όπως το ψωμί, η μπίρα, το κρασί και άλλα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση (FleetG. H., 2007).
2. Ψήσιμο: Στην αρτοποιία, οι ζύμες είναι υπεύθυνες για τη ζύμωση της ζύμης, την κάνουν να φουσκώνει και δημιουργούν μια ελαφριά και αέρινη υφή στο τελικό προϊόν. Όταν η μαγιά ζυμώνει τα σάκχαρα στη ζύμη, απελευθερώνεται αέριο διοξείδιο του άνθρακα, με αποτέλεσμα η ζύμη να διαστέλλεται και να αυξάνεται σε όγκο.(Delphine Sicard,Jean-LucLegras ,2011)

3. Ζυθοποίηση: Οι ζύμες είναι απαραίτητες στις διαδικασίες παρασκευής ζύμης, είτε πρόκειται για μύρα, κρασί ή άλλα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση. Μετατρέπουν τα σάκχαρα των πρώτων υλών (όπως κριθάρι, σταφύλια ή άλλα φρούτα) σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, με αποτέλεσμα την επιθυμητή περιεκτικότητα σε αλκοόλ και το επιθυμητό προφίλ γεύσης. (Delphine Sicard, Jean-Luc Legras, 2011)

4. Μη αλκοολούχα ποτά: Οι ζύμες συμμετέχουν επίσης στην παραγωγή μη αλκοολούχων ποτών όπως το κεφίρ, η κομπούτσα και η μύρα τζίντζερ. Αυτά τα ποτά ζυμώνονται από διάφορα στελέχη ζυμών και βακτηρίων, δημιουργώντας μοναδικές γεύσεις και προωθώντας τα προβιοτικά οφέλη (Fleet G. H., 2007).

5. Έλεγχος και ποιότητα: Στην παραγωγή τροφίμων, ο έλεγχος του τύπου και της δραστηριότητας των στελεχών ζύμης είναι απαραίτητος για την επίτευξη σταθερών και επιθυμητών αποτελεσμάτων. Διαφορετικά στελέχη ζύμης μπορούν να παράγουν διαφορετικές γεύσεις, αρώματα και υφές στο τελικό προϊόν. (Fleet G. H., 2007).

6. Αλλεργίες και ευαισθησίες: Ορισμένα άτομα μπορεί να έχουν αλλεργίες ή ευαισθησίες σε ορισμένα συστατικά της ζύμης ή σε προϊόντα που σχετίζονται με τη ζύμη. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν καταναλώνονται τρόφιμα που περιέχουν μαγιά. Συνολικά, οι ζύμες έχουν φέρει επανάσταση στον κόσμο της μαγειρικής, επιτρέποντας την παραγωγή ενός ευρέος φάσματος τροφίμων και ποτών, ενισχύοντας τις γεύσεις και συμβάλλοντας στην ανάπτυξη διάφορων διατροφικών πολιτισμών παγκοσμίως (Graham H Fleet, 2007).

Ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας τύπος μικροοργανισμού που ανήκει στο είδος των *Saccharomyces*. Είναι ο πιο γνωστός τύπος ζύμης και ευρέως χρησιμοποιείται στην παραγωγή ψωμιού, αλλαντικών, αλκοολούχων ποτών (όπως η μύρα και το κρασί) και άλλων φαρμακευτικών και βιομηχανικών προϊόντων. Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* είναι γνωστός για τη δυνατότητά του να παράγει αλκοόλ και διοξείδιο του άνθρακα μέσω της ζύμωσης, μιας βιοχημικής διαδικασίας κατά την οποία ζυμαρικά υλικά, όπως αλεύρι, μετατρέπονται σε προϊόντα με αλκοολική περιεκτικότητα. Ακόμη, αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης στην βιολογία και την ερευνητική κοινότητα. Οι ερευνητές τον χρησιμοποιούν ως μοντέλο οργανισμού για να κατανοήσουν διάφορες βιολογικές διεργασίες, καθώς η γενετική του δομή έχει

ερευνηθεί λεπτομερώς και είναι σχετικά εύκολο να προσαρμοστεί γενετικά. Συνοψίζοντας, η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας σημαντικός μικροοργανισμός στην τροφική, βιομηχανική και ερευνητική βιολογία, και παίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας (Walker G et al., 2016).

1.4.1 Στέλεχος *S. cerevisiae* Turbo yeast

Η μαγιά Turbo yeast είναι ένα στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* και αποτελεί ένα τύπο μαγιάς που έχει σχεδιαστεί ειδικά για χρήση σε ζυμώσεις με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη. Χρησιμοποιείται συνήθως στην παραγωγή αποσταγμένων αλκοολούχων ποτών, όπως ουίσκι, βότκα και ρούμι, καθώς και στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Η μαγιά Turbo περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων μαγιάς και θρεπτικών συστατικών από την κανονική μαγιά, γεγονός που της



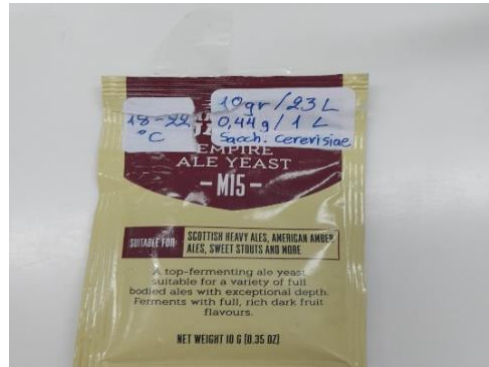
Εικόνα 1: Συσκευασμένη Ζύμη

TurboYeast

επιτρέπει να ζυμώνει ταχύτερα και να παράγει υψηλότερα επίπεδα αλκοόλης. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χρήση της μαγιάς Turbo μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αλλοιωμένες γεύσεις στο τελικό προϊόν, εάν δεν χρησιμοποιηθεί σωστά. Είναι σημαντικό να ακολουθούνται προσεκτικά οι οδηγίες του κατασκευαστή και να διασφαλίζεται ότι η θερμοκρασία ζύμωσης διατηρείται εντός του συνιστώμενου εύρους. Επιπλέον, είναι σημαντικά ο έλεγχος και η παρακολούθηση της διαδικασίας ζύμωσης για να αποφεύγονται τυχόν προβλήματα (A.J. Buglass et al., 2012; T Phillipset al., 2006.)

1.4.2 Στέλεχος *S. cerevisiae* M15

Ο ζυμομύκητας M15 είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* στην έρευνα μοριακής βιολογίας, ιδίως στη μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Αυτό το στέλεχος έχει τροποποιηθεί γενετικά ώστε να μην έχει την ενδογενή δραστηριότητα πρωτεάσης, γεγονός που το καθιστά ιδανικό για την έκφραση και τον καθαρισμό



Εικόνα 1.2. :Συσκευασμένη Ζύμη M15

ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Το στέλεχος ζύμης M15 περιέχει το πλασμίδιο pQE30, το οποίο φέρει το γονίδιο για μια ετικέτα δχιστιδίνης που επιτρέπει τον εύκολο καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με τη χρήση ακινητοποιημένης χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων μετάλλων (IMAC). Επιπλέον, το πλασμίδιο περιέχει το γονίδιο για μια πρωτεάση (που ονομάζεται PreScission πρωτεάση) που επιτρέπει την αφαίρεση της ετικέτας ιστιδίνης μόλις ολοκληρωθεί ο καθαρισμός. Η ζύμη M15 είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα έκφρασης επειδή μπορεί να παράγει υψηλά επίπεδα διαλυτής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και η διαδικασία καθαρισμού είναι σχετικά απλή. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η έκφραση και ο καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται. (Peltier, Emilien et al., 2018).

1.4.3. Στέλεχος *S. cerevisiae* Magic

Η ξηρή μαγιά **Magic** είναι επίσης ένα στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* και πρόκειται



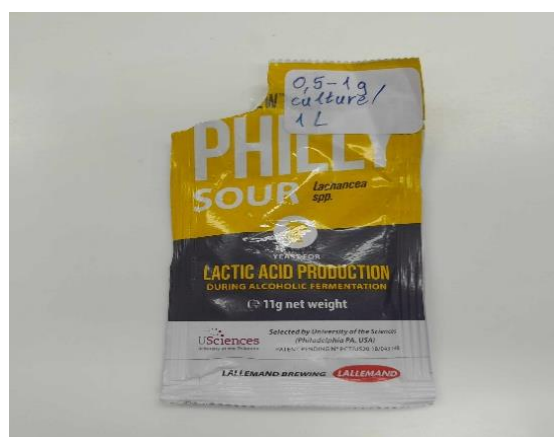
Εικόνα 1.3. :Συσκευασμένη ζύμη Magic

για τον τύπο μαγιάς που χρησιμοποιείται συνήθως στην αρτοποιία και τη ζυθοποιία. Αποτελείται από μικροσκοπικούς κόκκους που είναι ένας τύπος αδρανούς ζύμης, δηλαδή είναι ζωντανοί αλλά σε κατάσταση χειμέριας νάρκης. Η ξηρή μαγιά διαφέρει από τη φρέσκια μαγιά, η οποία είναι μια πιο ευπαθής μορφή μαγιάς που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά τη

συγκομιδή της. Η ξηρή μαγιά χρησιμοποιείται συνήθως στο ψήσιμο του ψωμιού, καθώς βοηθά στο προζύμι της ζύμης και της δίνει μια ελαφριά, αέρινη υφή. Χρησιμοποιείται επίσης στην παραγωγή μύρας, κρασιού και άλλων ζυμωμένων τροφίμων και ποτών. Ένα από τα πλεονεκτήματα της ξηρής μαγιάς έναντι της φρέσκιας μαγιάς είναι ότι έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και μπορεί να αποθηκευτεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Απαιτεί επίσης λιγότερη προετοιμασία, καθώς μπορεί να προστεθεί απευθείας στη ζύμη ή στον μούστο χωρίς να ενεργοποιηθεί πρώτα. Ωστόσο, ορισμένοι αρτοποιοί και ζυθοποιοί προτιμούν τη γεύση και την υφή που προσφέρει η φρέσκια μαγιά. (Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreir, C., 2013)

1.4.4. Ζύμη *Lachancea*

Η *Lachancea* είναι ένα γένος ζύμης που ανήκει στην οικογένεια *Saccharomycetaceae*. Πρόκειται για ένα είδος μαγιάς μη σακχαρομύκητα, που σημαίνει ότι δεν είναι το τυπικό στέλεχος μαγιάς που χρησιμοποιείται για την αρτοποιία και τη ζυθοποιία, αλλά αντίθετα βρίσκεται συνήθως σε διάφορα



Εικόνα 1.4. : Συσκευασμένη Ζύμη *Lachancea*

περιβάλλοντα, όπως σταφύλια, γλεύκος κρασιού και άλλα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση. Τα στελέχη ζύμης *Lachancea* έχουν μελετηθεί για τη δυνητική χρήση τους στην οινοποίηση, καθώς μπορούν να συμβάλουν στο άρωμα και τη γεύση του κρασιού και μπορούν επίσης να βοηθήσουν στη ζύμωση. Ορισμένα είδη *Lachancea* έχουν επίσης βρεθεί ότι έχουν προβιοτικές ιδιότητες και μπορεί να έχουν δυνατότητες χρήσης στη βιομηχανία τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής. (Porter T. et al., 2019)

1.5. Invitromέθοδοι αξιολόγησης της αντιμικροβιακής και αντιμυκητιακής δράσης

Οι μέθοδοι invitro χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής και αντιμυκητιασικής δράσης ουσιών, όπως φάρμακα, φυσικές ενώσεις ή χημικές ουσίες. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν τη δοκιμή της αποτελεσματικότητας αυτών των ουσιών έναντι βακτηρίων, μυκήτων ή άλλων μικροοργανισμών σε ελεγχόμενο εργαστηριακό περιβάλλον. Ακολουθούν ορισμένες

συχνά χρησιμοποιούμενες invitro μέθοδοι για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής και αντιμυκητιακής δράσης:

1.5.1.Μέθοδος διάχυσης δίσκου άγαρ (δοκιμή Kirby-Bauer):

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την τοποθέτηση δίσκων από διηθητικό χαρτί που περιέχουν την εξεταζόμενη ουσία σε πλάκα άγαρ εμβολιασμένη με τον μικροοργανισμό ενδιαφέροντος. Η ουσία διαχέεται στο άγαρ, δημιουργώντας μια βαθμίδα συγκέντρωσης. Το μέγεθος της ζώνης αναστολής (καθαρή ζώνη όπου αναστέλλεται η ανάπτυξη μικροβίων) μετράται και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής ή αντιμυκητιακής δράσης της ουσίας.(Biemer, J. J. 1973).

1.5.2.Μέθοδος μικροδιάλυσης ζωμού:

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) μιας ουσίας. Παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις της ουσίας σε υγρό μέσο ανάπτυξης σε πλάκες μικροτιτλοδότησης και ο μικροοργανισμός εμβολιάζεται σε κάθε φρεάτιο. Η χαμηλότερη συγκέντρωση που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη θεωρείται MIC (ManjuanLiuetal., 2007).

1.5.3.Μέθοδος αραίωσης σε άγαρ:

Παρόμοια με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό, αλλά η εξεταζόμενη ουσία ενσωματώνεται στο ίδιο το άγαρ σε μια βαθμίδα συγκεντρώσεων. Η χαμηλότερη συγκέντρωση χωρίς ορατή ανάπτυξη αποτελεί τη MIC (Anja Klančniketal., 2010).

1.5.4. Κινητική Time-Kill:

Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την έκθεση μικροοργανισμών σε διάφορες συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα. Λαμβάνονται δείγματα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και τοποθετούνται σε άγαρ για να προσδιοριστεί εάν οι μικροοργανισμοί θανατώνονται ή αναστέλλονται (SurachaiTechaoei,2022).

1.5.5. Μέθοδος σκακιάρας:

Η μέθοδος αυτή αξιολογεί τις συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές επιδράσεις συνδυασμών αντιμικροβιακών παραγόντων. Συνδυάζονται διάφορες συγκεντρώσεις δύο ουσιών σε σχήμα σκακιάρας και προσδιορίζεται η MIC για κάθε συνδυασμό. Η συνέργεια υποδεικνύεται εάν η συνδυασμένη MIC είναι σημαντικά χαμηλότερη από τη MIC οποιασδήποτε ουσίας μόνη της (Zsuzsanna Schelzetal., 2006).

1.5.6. Βιοδοκιμή με επικάλυψη άγαρ:

Χρησιμοποιείται για αντιμυκητιασικές δοκιμές, η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός στρώματος άγαρ που περιέχει την εξεταζόμενη ουσία πάνω από ένα μυκητιασικό χλοοτάπητα σε μια πλάκα άγαρ. Η ανάπτυξη του μύκητα αξιολογείται για τον προσδιορισμό της αντιμυκητιακής δράσης (M Balouirietal., 2016)

1.5.7. Μέθοδος διάχυσης: Παρόμοια με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων, αλλά αντί για δίσκους, δημιουργούνται φρεάτια στο άγαρ και η εξεταζόμενη ουσία προστίθεται στα φρεάτια. Η ζώνη αναστολής μετράται ως δείκτης της αντιμικροβιακής δράσης (Ze – HuaCuietal., 2021).

1.5.8. Θολωσιμετρικές και φασματοφωτομετρικές μέθοδοι:

Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μέτρηση της θολερότητας ή της οπτικής πυκνότητας μιας μικροβιακής καλλιέργειας με την πάροδο του χρόνου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της εξεταζόμενης ουσίας. Η μείωση της θολερότητας ή της οπτικής πυκνότητας υποδηλώνει μικροβιακή αναστολή (Angel Medinaetal., 2012).

1.5.9 Δοκιμές φθορισμού:

Ορισμένες δοκιμασίες χρησιμοποιούν φθορίζοντες δείκτες που ενσωματώνονται στα μικροβιακά κύτταρα. Όταν τα κύτταρα καταστραφούν ή θανατωθούν από την εξεταζόμενη ουσία, απελευθερώνουν αυτούς τους δείκτες, οδηγώντας σε αλλαγές στο φθορισμό που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν (An, W. F. 2009).

1.5.10. Δοκιμές ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης (MFC):

Παρόμοια με τη δοκιμή MIC για τα βακτήρια, η μέθοδος αυτή προσδιορίζει τη χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιμυκητιασικού παράγοντα που σκοτώνει τα μυκητιακά κύτταρα και όχι απλώς αναστέλλει την ανάπτυξή τους (Espinel-Ingroff, et al., 2002)

Αυτές οι μέθοδοι *in vitro* παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών και αντιμυκητιασικών παραγόντων υπό ελεγχόμενες συνθήκες πριν την πραγματοποίηση πιο σύνθετων μελετών *in vivo*. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, τον τύπο της ουσίας που εξετάζεται και τους ερευνητικούς στόχους.

1.6 Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση των προς μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων

Τα φυτικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια είναι φυσικές ουσίες που προέρχονται από διάφορα μέρη των φυτών, όπως φύλλα, άνθη, στελέχη, ρίζες ή σπόρους. Αυτά τα εκχυλίσματα και έλαια χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική, τα καλλυντικά, την αρωματοθεραπεία και τις μαγειρικές εφαρμογές λόγω των πολυάριθμων θεραπευτικών και αρωματικών ιδιοτήτων τους. Τόσο τα αιθέρια έλαια όσο και τα φυτικά εκχυλίσματα έχουν μοναδικές ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν με συμπληρωματικούς τρόπους.

1.6.1. Φυτικό εκχύλισμα S- Arom

Το ξύδι περιέχει οξικό οξύ, το οποίο είναι γνωστό ότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες επιδράσεις του ξυδιού στις ζύμες μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο της ζύμης και τη συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου ξυδιού. Αποτελεί ένα ασθενές οργανικό οξύ το οποίο έχει και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το οξικό οξύ διαταράσσει τις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Επίσης, μειώνει το pH του περιβάλλοντος, δημιουργώντας μια αφιλόξενη κατάσταση για πολλούς μικροοργανισμούς. Αυτό το όξινο περιβάλλον αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών, καθώς τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες προτιμούν ένα ουδέτερο ή ελαφρώς αλκαλικό pH για βέλτιστη ανάπτυξη. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δραστηριότητα, μια μελέτη

που δημοσιεύθηκε στο *Journal of Agricultural and Food Chemistry* διαπίστωσε ότι το ξύδι δαμάσκηνου είχε αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ήταν σε θέση να προστατεύσει τα κύτταρα της ζύμης από το οξειδωτικό στρες (Matsuura, R., Moriyama, H., Takeda, N., Yamamoto, K., Morita, Y., Shimamura, T., & Ukeda, H. (2008). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ενώ το ξύδι μπορεί να έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δεν αντικαθιστά μια υγιεινή διατροφή που είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά. Συνοπτικά, η αντιμικροβιακή δράση του ξυδιού οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητά του σε οξικό οξύ και στο χαμηλό pH, καθιστώντας το αποτελεσματικό στην αναστολή της ανάπτυξης ορισμένων βακτηρίων, μυκήτων και μούχλας. Επιπλέον, το πολύ ξύδι μπορεί να είναι επιβλαβές, καθώς είναι εξαιρετικά όξινο και μπορεί να βλάψει το πεπτικό σύστημα αν καταναλωθεί σε υπερβολική ποσότητα. (Sakanaka Senji et al., 2008).

1.6.2. Φυτικό εκχύλισμα Rosemary

Το δενδρολίβανο είναι ένα γνωστό βότανο με αντιοξειδωτικές ιδιότητες και έχει μελετηθεί για τα πιθανά οφέλη του σε διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης τροφίμων. Η κινεόλη είναι ένα σημαντικό συστατικό του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου και έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων, καθιστώντας το αποτελεσματικό κατά των κοινών παθογόνων μικροοργανισμών. (Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J. & Liu, X. L. (2011). Έρευνες έχουν δείξει ότι το εκχύλισμα δενδρολίβανου μπορεί να έχει αντιοξειδωτική δράση στις ζύμες. Για παράδειγμα, μια μελέτη που δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Food Chemistry* το 2017 (Alamprese Cristina et al., 2017) διερεύνησε την επίδραση του εκχυλίσματος δενδρολίβανου στην οξειδωτική σταθερότητα του ψωμιού που προζυμώνεται με μαγιά. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η προσθήκη εκχυλίσματος δενδρολίβανου στη ζύμη του ψωμιού βελτίωσε την οξειδωτική του σταθερότητα, όπως αποδεικνύεται από χαμηλότερο ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Συνολικά, οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι το εκχύλισμα δενδρολίβανου έχει τη δυνατότητα να είναι ένα χρήσιμο αντιοξειδωτικό στις ζύμες και μπορεί να έχει εφαρμογές στην επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων και ποτών (Andriana M. Ojeda-Sana et al., 2013).

1.6.3 Φυτικά εκχυλίσματα Vanilla

- *Vanillaplanifolia*

Τα εκχυλίσματα βανίλιας, που προέρχονται από το φασόλι βανίλιας (*Vanillaplanifolia*), έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων μικροοργανισμών. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των εκχυλισμάτων βανίλιας αποδίδονται κυρίως στις βιοδραστικές ενώσεις τους, όπως η βανιλίνη, το βανιλικό οξύ και άλλες φαινολικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες λόγω της ικανότητάς τους να διαταράσσουν την ακεραιότητα των μικροβιακών κυτταρικών τοιχωμάτων ή των κυτταρικών μεμβρανών, να αναστέλλουν τα μικροβιακά ένζυμα και να παρεμβαίνουν στις μεταβολικές οδούς των μικροβίων. Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων βανίλιας έναντι διαφόρων τύπων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και ζυμομυκήτων. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι τα εκχυλίσματα βανίλιας αναστέλλουν την ανάπτυξη κοινών τροφιμογενών βακτηρίων, όπως η *Escherichiacoli*, ο *Staphylococcus aureus* και τα είδη *Salmonella*. Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα εκχυλίσματα βανίλιας παρουσιάζουν αντιμυκητιασική δράση έναντι διαφόρων ειδών μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *Candidaalbicans*, *Aspergillus flavus* και *Trichophyton mentagrophytes*. (Shyamala B. Etal., 2007).

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα της *Vanillaplanifolia*, έχουν αντιοξειδωτική δράση και μπορούν να συμβάλουν στη μείωση του οξειδωτικού στρες στο σώμα. (Kamath A. Etal., 2022). Τα εκχυλίσματα βανίλιας μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία από οξειδωτικές βλάβες στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να συμβάλουν σε διάφορες χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Συνολικά, ενώ απαιτούνται περισσότερες έρευνες για την πλήρη κατανόηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της *Vanillaplanifolia*, και των πιθανών οφελών της για την υγεία, είναι σαφές ότι το φυτό αυτό περιέχει ενώσεις που έχουν τη δυνατότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικά και μπορεί να προσφέρουν κάποια προστατευτικά αποτελέσματα κατά του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό.

- *Vanillatahitensis*

Η *Vanillatahitensis* είναι ένας τύπος βανίλιας που καλλιεργείται κυρίως στην Ταϊτή και σε άλλα νησιά του Νότιου Ειρηνικού. Είναι γνωστή για την ξεχωριστή γεύση και το άρωμά της, που διαφέρει από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ποικιλίες βανίλιας. Υπάρχουν κάποιες έρευνες που δείχνουν ότι η *Vanillatahitensis* μπορεί να έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα εκχυλίσματα *Vanillatahitensis* είχαν αντιοξειδωτική δράση όταν δοκιμάστηκαν in vitro. (Shyamala BN, Naidu M, Sulochanamma G, Srinivas P (2007). Οι ερευνητές ανέφεραν ότι τα εκχυλίσματα ήταν ικανά να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, που είναι και οι δύο δείκτες αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Συνολικά, ενώ υπάρχουν κάποια στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η *Vanillatahitensis* μπορεί να έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, χρειάζονται περισσότερες έρευνες για να κατανοηθεί πλήρως η έκταση της αντιοξειδωτικής της δραστηριότητας και τα πιθανά οφέλη για την υγεία (Krushnamurthy Anuradha et al., 2013).

Η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων βανίλιας μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, ο τύπος του μικροοργανισμού στον οποίο στοχεύει και η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται για τη λήψη του εκχυλίσματος βανίλιας. Γενικά, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων βανίλιας τείνουν να παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, διαφορετικοί μικροοργανισμοί μπορεί να έχουν διαφορετική ευαισθησία στα εκχυλίσματα βανίλιας και η αντιμικροβιακή δράση μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την παρουσία άλλων ουσιών στο περιβάλλον ή στο μέσο στο οποίο καλλιεργούνται οι μικροοργανισμοί. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, ενώ τα εκχυλίσματα βανίλιας έχουν αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση in vitro (στο εργαστήριο), η αποτελεσματικότητά τους σε πραγματικές εφαρμογές μπορεί να ποικίλλει και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να προσδιοριστεί η δυνατότητα χρήσης τους ως φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως η συντήρηση τροφίμων ή οι κλινικές εφαρμογές. Επιπλέον, είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη πτυχές της ασφάλειας, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής τοξικότητας και αλλεργιογένεσης, όταν χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα βανίλιας ή οποιοδήποτε φυσικό προϊόν για αντιμικροβιακούς σκοπούς. Συνιστάται η διαβούλευση με εξειδικευμένο εμπειρογνώμονα ή η διεξαγωγή κατάλληλων δοκιμών και αξιολογήσεων πριν από τη

χρήση εκχυλισμάτων βανίλιας ή οποιουδήποτε φυσικού προϊόντος για αντιμικροβιακούς σκοπούς.(Buccellato, F. (Ed.). (2018).

1.6.4. Φυτικό εκχύλισμα StJohn'swort

Το βαλσαμόχορτο (*Hypericum perforatum*) είναι ένα φαρμακευτικό βότανο που χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της κατάθλιψης, του άγχους και της φλεγμονής. Είναι γνωστό ότι περιέχει μια ποικιλία φυτοχημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών και της υπερικίνης, οι οποίες πιστεύεται ότι έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Υπάρχουν ορισμένα στοιχεία που υποδηλώνουν ότι το βαλσαμόχορτο μπορεί να έχει αντιοξειδωτική δράση σε ζυμομύκητες. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τις επιδράσεις των εκχυλισμάτων βαλσαμόχορτου στα κύτταρα ζύμης.(P. Avatoetal., 2004). Για παράδειγμα, μια μελέτη διαπίστωσε ότι ένα εκχύλισμα αιθανόλης του βαλσαμόχορτου είχε προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από υπεροξειδίο του υδρογόνου σε κύτταρα ζύμης. Το εκχύλισμα βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα ROS και την υπεροξειδωση των λιπιδίων, που αποτελούν δείκτες οξειδωτικής βλάβης(Silva, B. A., Malva, J. O., &Dias, A. C.,2008). Μια άλλη μελέτη διερεύνησε τις επιδράσεις της υπερικίνης, μιας ένωσης που βρίσκεται στο βαλσαμόχορτο, σε κύτταρα ζύμης. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η υπερικίνη αύξησε τη διάρκεια ζωής των κυττάρων ζύμης και τα προστατεύσε από το οξειδωτικό στρες. Η προστατευτική δράση της υπερικίνης αποδόθηκε στην ικανότητά της να αυξάνει τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η υπεροξειδικήδισμουτάση και η καταλάση. Συνολικά, οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι το βαλσαμόχορτο μπορεί να έχει αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακήδράση σε ζυμομύκητες, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία φυτοχημικών ουσιών, όπως τα φλαβονοειδή και η υπερικίνη. (JBarnesetal., 2001, J.Reichlingetal., 2001). Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες έρευνες για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν αυτές τις επιδράσεις και για να καθοριστεί εάν παρόμοιες επιδράσεις παρατηρούνται και σε άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. (Reyes-CerpaSebastiánetal., 2018).

1.6.5. Φυτικό εκχύλισμα Mastic

Η μαστίχα είναι μια φυσική ρητίνη που προέρχεται από το δέντρο *Pistacia lentiscus* και χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες για ιατρικούς σκοπούς.Ακόμη, η μαστίχα έχει

μελετηθεί για τις αντιμυκητιακές της ιδιότητες. Η μαστίχα έχει επιδείξει αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι διαφόρων στελεχών βακτηρίων. Έρευνες έχουν δείξει ότι το εκχύλισμα μαστίχας μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη βακτηρίων όπου σχετίζονται με το έλκος του στομάχου και τη γαστρεντερίτιδα.(Al-Zaben, M., Zaban, M. A., Naghmouchi, S., NasserAlsloom, A., Al-Sugiran, N., &Alrokban, A.,2023).Είναι γνωστό ότι έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες λόγω της παρουσίαςπολυφαινολικών ενώσεων όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την αντιοξειδωτική δράση της μαστίχας σε ζύμες (EfstathiaPapadaetal.,2019). Μια μελέτη που δημοσιεύθηκε στο JournalofEssentialoilBearingPlants το 2013 αξιολόγησε την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος μαστίχας σε δύο στελέχη ζύμης, *Saccharomycescerevisiae* και *Zygosaccharomycesbailii*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα μαστίχας παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη αντιοξειδωτική δράση και στα δύο στελέχη ζύμης, με υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος μαστίχας να παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. (EGkogkaetal., 2013). Συνολικά, οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι το εκχύλισμα μαστίχας έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε ζύμες, η οποία μπορεί να έχει πιθανές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία και στις διαδικασίες ζύμωσης τροφίμων. (Milia, EglePatrizia, LuigiSardellitti, andSigrunEick., 2023).

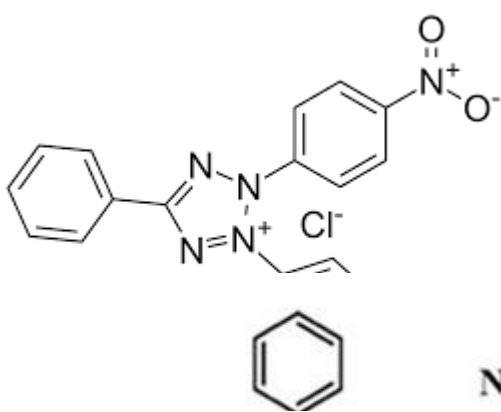
1.6.6. ΦυτικόεκχύλισμαGreenPod

Το αιθέριο έλαιο πράσινου λοβού, το οποίο συχνά εξάγεται από πράσινα φασόλια ή μπιζέλια, μπορεί να έχει κάποιες αντιμικροβιακές ιδιότητες, αλλά ο βαθμός αποτελεσματικότητάς του μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως η συγκεκριμένη φυτική ποικιλία, η μέθοδος εκχύλισης και οι τύποι μικροοργανισμών εναντίον των οποίων δοκιμάζεται. Τα αιθέρια έλαια είναι συμπυκνωμένα φυτικά εκχυλίσματα που περιέχουν μια ποικιλία χημικών ενώσεων, ορισμένες από τις οποίες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμικροβιακήδράση.Ορισμένα αιθέρια έλαια έχουν επιδείξει αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι μιας σειράς βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων τόσο θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram στελεχών. Έρευνες έχουν δείξει ότι ορισμένα αιθέρια έλαια μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη βακτηρίων ή ακόμη και να τα σκοτώσουν.Τα αιθέρια έλαια μπορούν επίσης να παρουσιάσουν αντιμυκητιακές ιδιότητες, οι οποίες μπορεί να είναι αποτελεσματικές κατά διαφόρων ειδών μυκήτων. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη

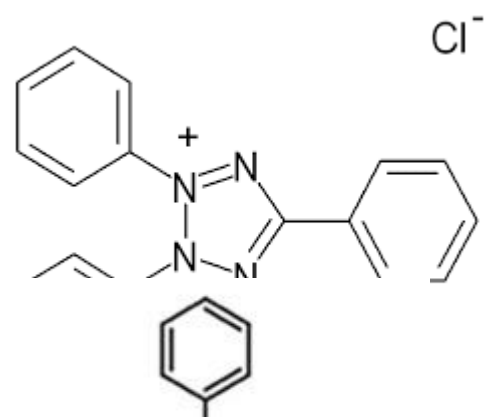
συντήρηση τροφίμων και στη θεραπεία μυκητιακών λοιμώξεων. (Ponnusha, B. S., Subramaniam, S., & Pasupathi, P. (2011).

1.7. Χρησιμοποιούμενο μοντέλο για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων

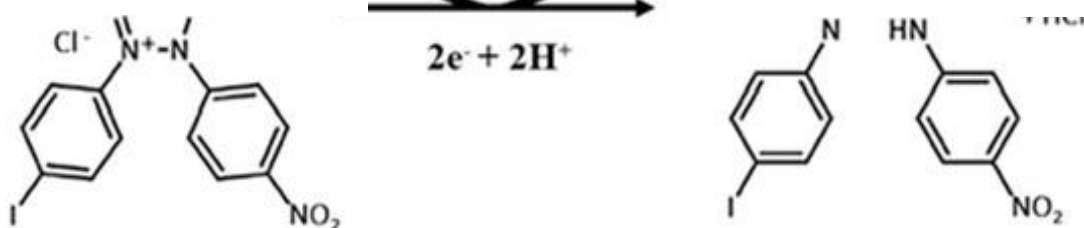
Για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν χρωματομετρικές μέθοδοι *in vitro* με τη χρήση χλωριούχου 2,3,5-τριφαινυλοτετραζολίου (TTC) ή ιώδους ιωδονιτροτετραζολίου (INT). Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην αναγωγή του άχρωμου INT ή της TTC σε έγχρωμο προϊόν φορμαζάνης από βιώσιμα μικροβιακά κύτταρα. Η ένταση της ανάπτυξης χρώματος είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων, επιτρέποντας την ποσοτική αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης. Η δοκιμασία μικροβιακής βιωσιμότητας με τη χρήση αλάτων τετραζολίου είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας και της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών. Η χρωματομετρική δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης είναι μια εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας αντιμικροβιακών παραγόντων (όπως αντιβιοτικά ή απολυμαντικά) στην αναστολή της ανάπτυξης ή τη θανάτωση μικροοργανισμών (βακτηρίων, μυκήτων ή άλλων μικροβίων). Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στις μεταβολές του χρώματος για την ποσοτικοποίηση της αντιμικροβιακής δράσης.



Εικόνα 2 :Χημικός τύπος της χρωστικής INT

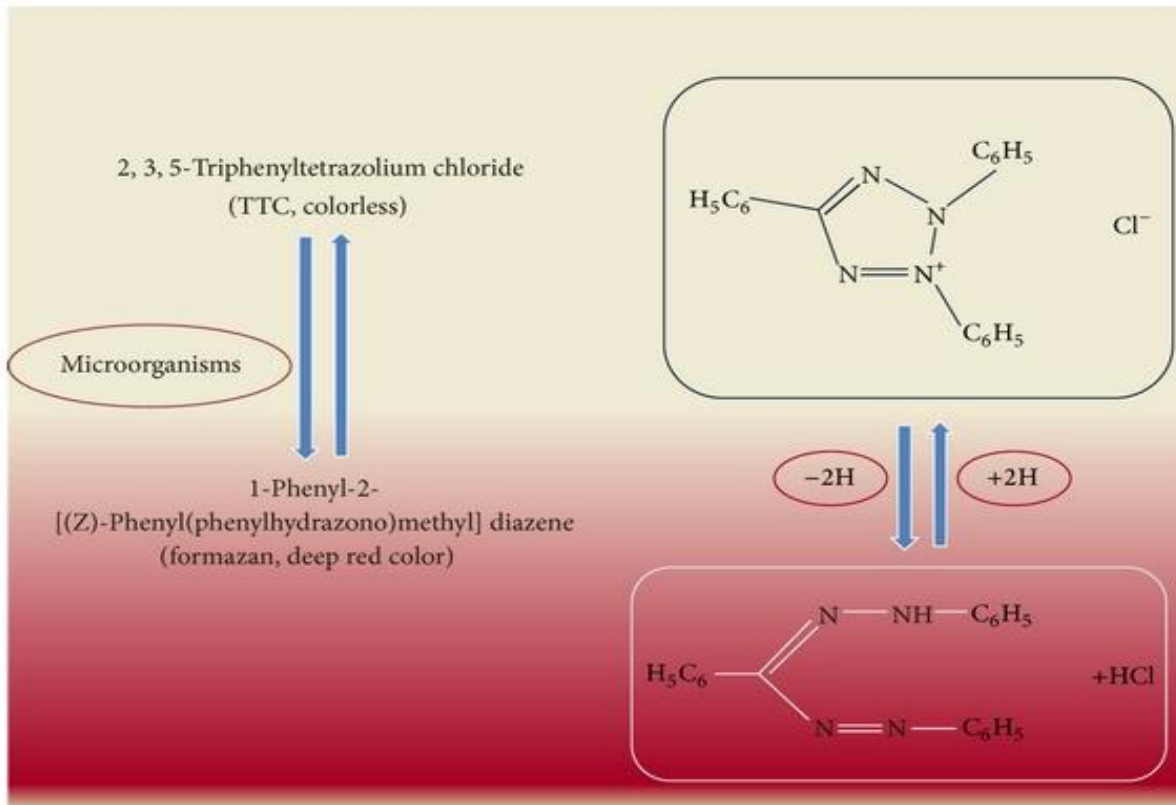


Εικόνα 2.1 :Χημικός τύπος της χρωστικής TTC



Εικόνα 2.2. :Χημική αντίδραση INT – μικροοργανισμών και παραγωγή φορμαζάνης

Το NAD (δινουκλεοτίδιονικοτιναμίδηςαδενίνης) είναι ένα συνένζυμο κεντρικό στο μεταβολισμό. Βρίσκεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα, το NAD ονομάζεται δινουκλεοτίδιο επειδή αποτελείται από δύο νουκλεοτίδια που ενώνονται μέσω των φωσφορικών τους ομάδων.



Εικόνα 2.3. :Χημική αντίδραση TTC – μικροοργανισμών και παραγωγή φορμαζάνης

Οι In vitro χρωματομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν ενώσεις όπως το χλωριούχο 2,3,5-τριφαινυλοτετραζόλιο (TTC) ή το p-ωδονιτροτετραζόλιο (INT) προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα για διάφορες επιστημονικές και κλινικές εφαρμογές. Αυτές οι χρωματομετρικές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται συνήθως στη βιολογία, τη μικροβιολογία και σε συναφείς τομείς για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, της μεταβολικής δραστηριότητας και άλλων φυσιολογικών διεργασιών. Ακολουθούν ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης χρωματομετρικών μεθόδων με βάση την TTC ή το INT :

- Ποσοτική αξιολόγηση:

Οι δοκιμασίες TTC και INT παρέχουν ποσοτικό μέτρο της βιωσιμότητας των κυττάρων και της μεταβολικής δραστηριότητας. Παράγουν αριθμητικά δεδομένα,

καθιστώντας εύκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε διαφορετικά δείγματα ή πειραματικές συνθήκες.

- Μη επεμβατικές:

Αυτές οι δοκιμασίες είναι μη επεμβατικές και μη καταστροφικές, πράγμα που σημαίνει ότι δεν βλάπτουν τα κύτταρα που μελετώνται. Αυτό επιτρέπει διαχρονικές μελέτες, όπου το ίδιο δείγμα μπορεί να αξιολογηθεί σε πολλαπλά χρονικά σημεία.

- Υψηλή ευαισθησία:

Η TTC και το INT είναι ευαίσθητοι δείκτες της μιτοχονδριακής δραστηριότητας και του κυτταρικού δυναμικού οξειδοαναγωγής. Μπορούν να ανιχνεύσουν λεπτές αλλαγές στην υγεία των κυττάρων και τη μεταβολική δραστηριότητα, καθιστώντας τα χρήσιμα για τη μελέτη διαφόρων κυτταρικών διεργασιών (MarkG. Stevens et al., 1991).

- Απλό πρωτόκολλο:

Τα πρωτόκολλα για τις δοκιμασίες TTC και INT είναι σχετικά απλά και δεν απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό. Είναι προσιτά σε ερευνητές με βασικές εργαστηριακές δεξιότητες και πόρους.

- Χαμηλό κόστος:

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες TTC και INT είναι συνήθως φθηνά, καθιστώντας αυτές τις μεθόδους οικονομικά αποδοτικές για διαλογή υψηλής απόδοσης ή εργαστηριακές δοκιμές ρουτίνας (MarkG. Stevens et al., 1991).

- Διαφορετικότητα:

Οι δοκιμασίες TTC και INT μπορούν να προσαρμοστούν για χρήση με διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και κυττάρων θηλαστικών. Αυτή η ευελιξία τις καθιστά πολύτιμες σε ένα ευρύ φάσμα ερευνητικών τομέων (VonMersi, W., &Schinner, F., 1991).

- **Γρήγορα αποτελέσματα:**
Αυτές οι δοκιμασίες παρέχουν αποτελέσματα σχετικά γρήγορα, συχνά εντός λίγων ωρών (3h). Αυτή η ταχύτητα είναι ιδιαίτερα επωφελής για πειράματα που απαιτούν χρόνο ή κλινικές εφαρμογές.(MarkG. Stevens etal., 1991).
- **Συμβατότητα:**
Οι δοκιμασίες TTC και INT μπορούν να συνδυαστούν με άλλες δοκιμασίες ή τεχνικές, όπως ενζυμικά συνδεδεμένες ανοσοπροσοφοητικές δοκιμασίες (ELISA) ή τεχνικές μοριακής βιολογίας, για να ληφθούν πιο ολοκληρωμένα δεδομένα σχετικά με την κυτταρική λειτουργία.(JennyGabrielsonetal, 2002).
- **Μακροβιότητα του χρώματος:**
Τα προϊόντα φορμαζάνης που σχηματίζονται στις δοκιμασίες TTC και INT είναι σταθερά και διατηρούν το χρώμα τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων με την πάροδο του χρόνου ή την αποθήκευσή τους για μεταγενέστερη ανάλυση (Duncan, D. R., &Widholm, J. M. (2004).
- **Ευρύ φάσμα εφαρμογών:**
Οι εν λόγω δοκιμασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε διάφορα πλαίσια, όπως η διαλογή φαρμάκων, ο έλεγχος τοξικότητας, οι μικροβιολογικές μελέτες και η κλινική διάγνωση.G Eisenbrandetal., (2002).

Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι δοκιμασίες TTC και INT έχουν επίσης περιορισμούς. Για παράδειγμα, πρόκειται για δοκιμασίες τελικού σημείου, που σημαίνει ότι παρέχουν μια μοναδική μέτρηση σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, και ενδέχεται να μην παρέχουν δυναμική των κυτταρικών διεργασιών σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον, η επιλογή μεταξύ TTC και INT μπορεί να εξαρτάται από τις ειδικές απαιτήσεις του πειράματός, καθώς μπορεί να έχουν διαφορετικές ευαισθησίες και πεδία εφαρμογής.

1.8. Εφαρμογές της χρησιμοποιούμενης μεθόδου εκτίμησης της αντιμικροβιακής δράσης

Η μέθοδος των Ινβίτροχρωματομετρικών δοκιμών με τη χρήση χλωριούχου 2,3,5-τριφαινυλοτετραζολίου (TTC) ή ιωδονιτροτετραζολίου (INT) εφαρμόζεται συνήθως σε διάφορους τομείς της βιολογικής και βιοχημικής έρευνας. Οι δοκιμασίες αυτές χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, της μεταβολικής δραστηριότητας και διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων. Ακολουθούν ορισμένες ειδικές εφαρμογές αυτών των χρωματομετρικών μεθόδων:

- Δοκιμές κυτταρικής βιωσιμότητας:
Οι δοκιμασίες TTC και INT χρησιμοποιούνται συχνά για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων σε καλλιέργειες. Τα ζωντανά κύτταρα αναγάγουν αυτά τα άλατα τετραζολίου σε κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι μπορούν να ποσοτικοποιηθούν φασματοφωτομετρικά. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε τομείς όπως η έρευνα για τον καρκίνο, οι δοκιμές φαρμάκων και η τοξικολογία για την αξιολόγηση των επιδράσεων των ενώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων.(Clarke, J. M., Gillings, M. R., Altavilla, N., & Beattie, A. J. ,2001).
- Αξιολόγηση της μικροβιακής ανάπτυξης:
Στη μικροβιολογία, οι δοκιμασίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της ανάπτυξης και της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών. Μετρώντας τη μείωση της TTC ή του INT από μικροοργανισμούς, οι ερευνητές μπορούν να παρακολουθούν την κινητική της ανάπτυξης και τη μεταβολική δραστηριότητα βακτηρίων, μυκήτων ή άλλων μικροβίων.(Tarafdar, J. C. (2003).
- Δοκιμές ενζυμικής δραστηριότητας:
Οι δοκιμασίες TTC και INT μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της δραστηριότητας διαφόρων ενζύμων. Τα ένζυμα που ανάγουν αυτά τα άλατα τετραζολίου ως μέρος της καταλυτικής τους αντίδρασης μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, επιτρέποντας στους ερευνητές να μελετήσουν την ενζυμική κινητική και να ελέγξουν για ενζυμικούς αναστολείς ή ενεργοποιητές(Mambu, S. M. ,2014).
- Μιτοχονδριακή λειτουργία:

Οι ερευνητές χρησιμοποιούν αυτές τις δοκιμασίες για να αξιολογήσουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, της “ατμομηχανής” του κυττάρου. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική αναπνοή και η δυσλειτουργία τους σχετίζεται με διάφορες ασθένειες. Οι δοκιμασίες TTC ή INT μπορούν να βοηθήσουν στη μελέτη της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και στην αξιολόγηση των επιπτώσεων των φαρμάκων ή των γενετικών μεταλλάξεων.(Cao, M., Yu, C., Yao, Z., Gao, X., &Wu, S. (2019).

- Βιοχημικές αναλύσεις:

Αυτές οι δοκιμασίες μπορούν να προσαρμοστούν για διάφορες βιοχημικές αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης της δραστηριότητας ενζύμων που εξαρτώνται από το NADH/NADPH ή της αξιολόγησης αντιδράσεων οξειδοαναγωγής σε βιολογικά δείγματα.(Czerlinski, G. H., Anderson, B., Tow, J., &Reid, D. S. (1988).

- Περιβαλλοντική παρακολούθηση:

Οι δοκιμασίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στις μικροβιακές κοινότητες ή της μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών σε δείγματα εδάφους, νερού ή ιζήματος. (Bandyopadhyay, S., &Maiti, S. K., 2021).

Συνοπτικά, οι In vitroχρωματομετρικές μέθοδοι με χρήση TTC ή INT βρίσκουν εφαρμογές σε ευρύ φάσμα τομέων, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής βιολογίας, της μικροβιολογίας, της ενζυμολογίας, της ανάπτυξης φαρμάκων και της περιβαλλοντικής επιστήμης, όπου η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, της μεταβολικής δραστηριότητας ή της ενζυμικής δραστηριότητας είναι σχετική.

2. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας περιλαμβάνει την πρόβλεψη της αντιμικροβιακής δράσης διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων (*Vanillaplanifolia*, *Vanillatahitensis*, *Vanillaabs*, *S-arom*, *Rosemary*, *StJohn'swort*, *Mastic*, *GreenPod*) σε επιλεγμένα στελέχη ζυμών (*S.cerevisiae*, *Turboyeast*, *S.cerevisiae M15*, *S.cerevisiae Magic*, *Lachancea*). Συγκεκριμένα, ως μέθοδος ανίχνευσης της αντιμικροβιακής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε μια χρωματομετρική δοκιμή *In vitro* με τη χρήση ιωδονιτροτετραζολίου (INT) σε πλάκα 96 θέσεων τύπου ELISA. Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης πέραν της οπτικής παρατήρησης που παρέχει η συγκεκριμένη μέθοδος πραγματοποιήθηκε και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία έγινε και καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία Petri με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης, σε όποια εκχυλίσματα κρίθηκε απαραίτητο. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκαν υπολογιστικά εργαλεία (ραβδογράμματα με τη χρήση του Excel και υπολογισμός του % Inhibition). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων παρείχε πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης στα συγκεκριμένα φυτικά εκχυλίσματα αλλά και της δράσης τους στα συγκεκριμένα στελέχη ζυμών.

3.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

3.1 ΥΛΙΚΑ

- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ισότονο αραιωτικό διάλυμα
- Αναλυτικός ζυγός
- Αλκοόλη 70%
- Γυάλινοι περιέκτες
- Στατό
- Πολυκάναλη πιπέτα μεταβλητού όγκου (Eppendorf)
- Πλάκα 96 θέσεων τύπου ELISA
- Θρεπτικού πόστρωμα (Nutrient Broth + dextrose 20 g/L)
- Εμβολιασμένα δείγματα ζυμών (*S. Cerevisiae*/M15)
- Άλατα τετραζολίου (INT / TTC) - χρωστικές
- Φυσικό εκχύλισμα βανίλιας (*Planifolia*, *Tahitensis*, Absolut)
- Εκχυλίσματα από δενδρολίβανο, μαστίχα, βαλσαμόχορτο, ξύδι
- Λύχνος Bunsen
- Απαγωγός UV
- Vortex
- Αυτόκλειστος κλίβανος αποστείρωσης.
- Επωαστικός κλίβανος
- Biotek Epoch Microplate spectrophotometer, California 95051
- Μικροπιπέτες
- Εκλεκτικό υπόστρωμα ανάπτυξης ζυμών (RoseBengal)
- Τρυβλία Petri
- Εμβολιασμένα δείγματα από την πλάκα ELISA
- Λύχνος Bunsen
- Αλκοόλη
- Επωαστικός θάλαμος
- Μικροπιπέτες
- Γυάλινη ράβδος επίστρωσης

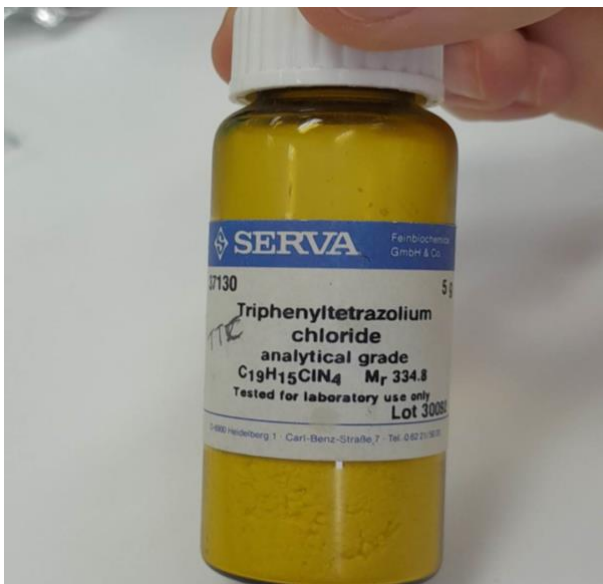
- Ποτήρι ζέσεως
- Όργανο καταμέτρησης αποικιών
- Τα προς μελέτη στελέχη ζυμών (*S.cerevisiaeTurboyeast*, *S.cerevisiae M15*, *S.cerevisiae Magic*,*Lachancea*)



Εικόνα3:Biotek Epoch Microplate spectrophotometer



Εικόνα 3.1. :Πιπέτες και Πολυκάναληπιπέτα μεταβλητού όγκου (Eppendorf)



Εικόνα 3.2.:Χλωριούχο τριφαινυλτετραζόλιο (TTC)



Εικόνα 3.3. :Ιωδονιτροτετραζόλιο (INT)

3.2 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή σε πλάκα ELISA, με τη χρήση αλάτων τετραζολίου (INT(Ιωδονιτροτετραζόλιο)/TTC(Χλωριούχο τριφαινυλτετραζόλιο) ως χρωστικές. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 δοκιμές. Για την πραγματοποίηση των δοκιμών αυτών προηγήθηκαν ορισμένες κατεργασίεςόπως αναλύονται παρακάτω :

3.2.1 Επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης εμβολιασμένων δειγμάτων ζυμών

Πολλά μικροβιολογικά tests έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν ποσοτικά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει τη σωστή αραιώση του προς εξέταση δείγματος. Συνεπώς για την επιλογή της κατάλληλης αραιώσης για την λήψη ορθών αποτελεσμάτων στο πείραμα που ακολουθήθηκε πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση αποικιών από διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων των επιλεγμένων ζυμών σε τρυβλίαPetri με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης.

3.2.2 Παρασκευή εμβολιασμένου υποστρώματος με ζύμες

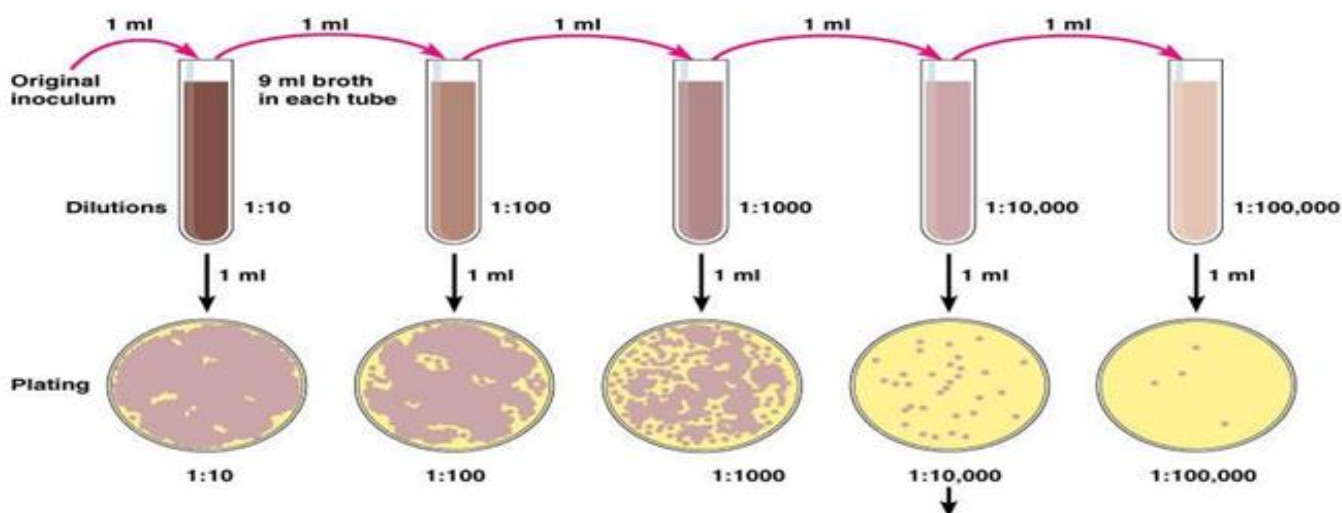
Για την παραλαβή των εμβολιασμένων δειγμάτων των επιλεγμένων ζυμών παρασκευάστηκεNutrientBroth σύμφωνα με τις αναγραφόμενες στη συσκευασία οδηγίες. Αφού αποστειρώθηκε και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου ζυγίστηκαν με τον ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας 0,1g από κάθε ζύμη και προστέθηκαν σε 9mlθρεπτικού υποστρώματος σε μικρούς γυάλινους περιέκτες με πλαστικό πώμα. Αφού κλείστηκαν οι περιέκτες τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 24h.

3.2.3 Καταμέτρηση αποικιών με τη μέθοδο διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων

Για την καταμέτρηση των αποικιών πρέπει πρώτα να γίνουν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Για να γίνει σωστή αραιώση απαιτείται ένα κατάλληλο αραιωτικό υγρό .Τα αραιωτικά υγρά, είναι αραιά διαλύματα αλάτων ή και άλλων ουσιών, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αραιώσεων σε μικροβιολογικά δείγματα. Η συγκέντρωση των αλάτων σε αυτά τα διαλύματα είναι τέτοια ώστε να προφυλάσσουν τα κύτταρα των μικροοργανισμών από το οσμωτικό στρες, προκειμένου αυτά να μην τραυματίζονται ή καταστρέφονται, κάτι που θα μπορούσε να συμβεί με τη χρήση αποσταγμένου νερού ή πυκνού αραιωτικού υγρού. Επίσης τα αραιωτικά υγρά δεν πρέπει να περιέχουν θρεπτικά στοιχεία που να επιτρέπουν την ανάπτυξη και τον

πολλαπλασιασμό των μικροβίων, μπορούν όμως να έχουν ουσίες (όπως άλατα, πεπτόνη) που επιτρέπουν την επιδιόρθωση τυχόν κυτταρικών βλαβών σε τραυματισμένα κύτταρα, με συνέπεια την σωστή ανάπτυξη αυτών σε θρεπτικά υποστρώματα μετά τον εμβολιασμό. Στην εν λόγω δοκιμή έγινε χρήση ισότονου αραιωτικού υγρού.

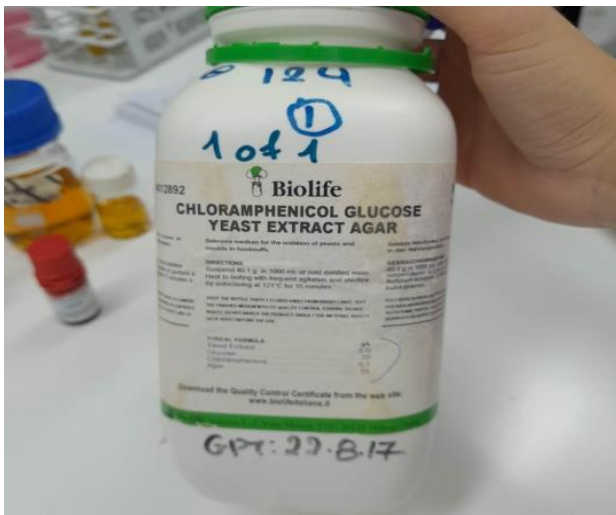
Μετά από 24h επώαση έγινε ανάδευση των δειγμάτων με το Vortex και ακολούθησε η παρασκευή της αρχικής αραιώσεως και σε σύντομο χρονικό διάστημα παρασκευάστηκαν και οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις με τη μεταφορά 1ml δείγματος και 9-πλάσια ποσότητα αραιωτικού υγρού, όπως φαίνεται στο [Σχήμα 1](#). Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις μέχρι συγκεντρώσεως $C \rightarrow 10^{-6}$.



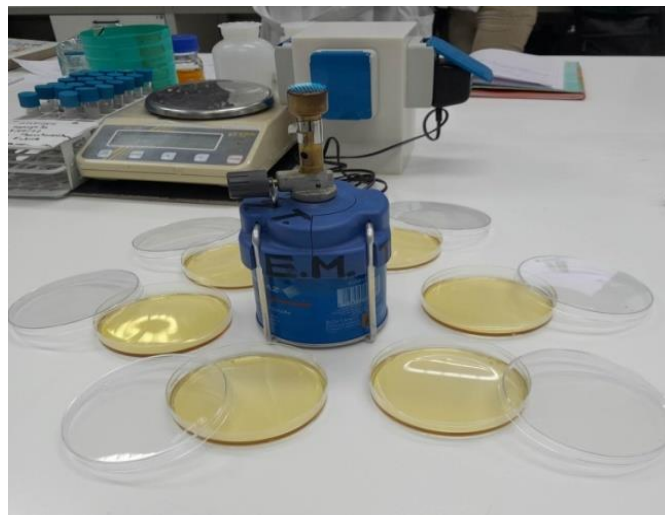
Σχήμα 1: Αναπαράσταση παρασκευής δεκαδικών αραιώσεων σε δοκιμαστικού σωλήνες και σε τρυβλία Petri

Η καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλίο μπορεί να είναι ακριβής όταν ο αριθμός τους κυμαίνεται από 30 έως 300 ώστε να αναπτυχθούν ορατές μεμονωμένες αποικίες και να καταμετρηθούν με ακρίβεια. Επειδή ο αριθμός των βακτηρίων σε ένα δείγμα είναι εξαιρετικά μεγάλος πρέπει να γίνει αραιώση του δείγματος και στη συνέχεια να εμβολιασθεί για την ανάπτυξη των αποικιών. Γι' αυτό γίνεται αρχικά η αραιώση του δείγματος με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Επιτυχής αραιώση θεωρείται όταν προκύπτει τρυβλίο με 30-300 αποικιών βακτηρίων-ζυμών ανά τρυβλίο. Αν ο αριθμός των αποικιών είναι μικρότερος από 30, τα μικρά λάθη κατά την τεχνική της αραιώσεως θα έχουν σημαντική επίπτωση στην τελική καταμέτρηση (αύξηση σφάλματος) και αν είναι πάνω από 300, θα είναι δύσκολη η καταμέτρηση τους και επί πλέον αποικίες που

θα αναπτυχθούν κοντά θα μεγαλώσουν μαζί τελικά και θα καταμετρηθούν ως μία αποικία. Μετά την επώαση παρατηρήθηκαν τα τρυβλία, έγινε καταμέτρηση και επιλέχθηκε η συγκέντρωση 10^{-2} ως η πλέον κατάλληλη για τις ανάγκες του πειράματος και την διευκόλυνση της διεξαγωγής των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 4: Θρεπτικό στερεό υπόστρωμα



Εικόνα 4.1 : Παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα υπό στείρες συνθήκες με τη χρήση λύχνου Bunsen

3.2.4 Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων ζυμών

Αρχικά παρασκευάστηκε το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο έγινε η ανάπτυξη των επιλεγμένων στελεχών. Παρασκευάστηκαν 200ml Nutrient Broth με προσθήκη δεξτρόζης σε συγκέντρωση 20 g/L. Η δεξτρόζη προστέθηκε για να ευνοήσει την ανάπτυξη των ζυμών.

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη δεξτρόζη μέσω της γλυκόλυσης ή άλλων μεταβολικών διαδρόμων για να παράγουν ενέργεια και να συνθέτουν τα απαραίτητα μόρια για την ανάπτυξή τους. Συνολικά, η προσθήκη δεξτρόζης σε θρεπτικά υποστρώματα μικροοργανισμών, εξασφαλίζει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, καθιστώντας την καλλιέργεια και τη μελέτη τους πιο εύκολη και επιτρέποντας την παραγωγή απαιτούμενων μεταβολιτών για την επιβίωσή τους.

3.2.5 Αποστείρωση θρεπτικού υποστρώματος και εμβολιασμός

Υγρή αποστείρωση:

Το θρεπτικό υπόστρωμα μεταγγίστηκε σε γυάλινο περιέκτη με πλαστικό πώμα και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε αυτόκλειστο κλίβανο αποστείρωσης όπου πραγματοποιήθηκε η αποστείρωση στους 121°C για 15-λεπτά. Το αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.

Στη συνέχεια εμβολιάστηκε το αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα με αραιώση 1:100 (0,1 ml ζύμης σε 9 ml υποστρώματος) σε υάλινους περιέκτες. Εξασφαλίστηκαν στείρες συνθήκες με την απολύμανση όλου του εξοπλισμού και του πάγκου εργασίας με αλκοόλη καθώς και με τη χρήση λύχνου Bunsen.

Τα δείγματα των ζυμών τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο του εργαστηρίου και αφέθηκαν για επώαση στους 31°C για 24 h.

3.2.6 Παρασκευή αντιδραστηρίων (INT / TTC)

INT: Διάλυση σε αποστειρωμένο νερό σε συγκέντρωση 1, 4 mg/ml.

TTC: Διάλυση σε αποστειρωμένο νερό σε συγκέντρωση 3, 7 mg/ml.

Τα διαλύματα των χρωστικών αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο μέχρι την χρήση.

3.3 Διερεύνηση αντιδραστηρίων INT/TTC

Η δοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί ποια από τις δύο χρωστικές (TTC/INT) ανταποκρίνεται καλύτερα στις συνθήκες του πειράματος για την ορθή διεξαγωγή του, καθώς και για τη λήψη όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων .

Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην 1 ^η κατεργασία		
Ζύμες	Εκχυλίσματα	Χρωστικές
Z1 (<i>S.cerevisiae</i>)	<i>Vanillaplanifolia</i>	Ιωδονιτροτετραζόλιο(INT)
Z2 (<i>S.cerevisiae</i> M15)		Χλωριούχο τριφαινυλτετραζόλιο (TTC)

Αρχικά μέσω διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε ισότονο αραιωτικό διάλυμα ελήφθησαν αντίστοιχα από τις ζύμες *S.cerevisiae*(**Z1**) και *S.cerevisiae*M15(**Z2**) τέσσερα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης. Οι αραιώσεις έγιναν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με τη βοήθεια μικροπιπέτας. Στη συνέχεια αναδεύτηκαν με τη χρήση Vortex. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό στείρες συνθήκες με τη χρήση λύχνου Bunsen:

Αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν :

C1→ πυκνό δ/μα ζύμης

C2→ αραιώση 10^{-1}

C3→ αραιώση 10^{-2}

C4→ αραιώση 10^{-3}

Έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις σε αποστειρωμένη πλάκα ELISA.

Η προετοιμασία της πλάκας διεξήχθη μέσα στον BiosafetyCabinClassII του εργαστηρίου για διασφάλιση στείρων συνθηκών. Τα διαλύματα διανεμήθηκαν στην πλάκα ELISA 96 πηγαδιών σε καθορισμένη αναλογία μέχρι τελικό όγκο κυψελίδας 270 μL , με τη βοήθεια μικροπιπέτας και πολυκάναλης. Πριν την τοποθέτηση των διαλυμάτων των ζυμών στην πλάκα πραγματοποιούνταν ανάδευση τους με τη χρήση του Vortex ώστε να ληφθεί επαρκής ποσότητα κυττάρων και να εξασφαλιστεί ο εμβολιασμός της πλάκας.

Συγκεκριμένα για τις κυψελίδες που περιείχαν μόνο χρωστική ισχύει η αναλογία :

- θρεπτικό υπόστρωμα \rightarrow **200 μL**
- (Z1) ή (Z2) (στις διάφορες συγκεντρώσεις C1 – C4) \rightarrow **50 μL**
- INT ή TTC αντίστοιχα \rightarrow **20 μL**
- V (συνολικό) = **270 μL**

Ενώ για τις κυψελίδες που περιείχαν χρωστική και εκχύλισμα (παράγοντα) ισχύει η αναλογία :

- θρεπτικό υπόστρωμα \rightarrow **200 μL**
- (Z1) ή (Z2) (στις διάφορες συγκεντρώσεις C1 – C4) \rightarrow **50 μL**
- TTC \rightarrow **20 μL**
- VanillaExtract \rightarrow **50 μL**
- V (συνολικό) = **320 μL**

	INT			TTC			INT/V			TTC/V			
C 1	Z1/C 1/IN T	Z1/C 1/IN T	Z1/C 1/IN T	Z1/C 1/TT C	Z1/C 1/TT C	Z1/C 1/TT C	Z1/C1/ INT/V	Z1/C1/ INT/V	Z1/C1/ INT/V	Z1/C1/ TTC/V	Z1/C1/ TTC/V	Z1/C1/ TTC/V	Z 1
C 2	Z1/C 2/IN T	Z1/C 2/IN T	Z1/C 2/IN T	Z1/C 2/TT C	Z1/C 2/TT C	Z1/C 2/TT C	Z1/C2/ INT/V	Z1/C2/ INT/V	Z1/C2/ INT/V	Z1/C2/ TTC/V	Z1/C2/ TTC/V	Z1/C2/ TTC/V	
C 3	Z1/C 3/IN T	Z1/C 3/IN T	Z1/C 3/IN T	Z1/C 3/TT C	Z1/C 3/TT C	Z1/C 3/TT C	Z1/C3/ INT/V	Z1/C3/ INT/V	Z1/C3/ INT/V	Z1/C3/ TTC/V	Z1/C3/ TTC/V	Z1/C3/ TTC/V	
C 4	Z1/C 4/IN T	Z1/C 4/IN T	Z1/C 4/IN T	Z1/C 4/TT C	Z1/C 4/TT C	Z1/C 4/TT C	Z1/C4/ INT/V	Z1/C4/ INT/V	Z1/C4/ INT/V	Z1/C4/ TTC/V	Z1/C4/ TTC/V	Z1/C4/ TTC/V	
C 1	Z2/C 1/IN T	Z2/C 1/IN T	Z2/C 1/IN T	Z2/C 1/TT C	Z2/C 1/TT C	Z2/C 1/TT C	Z2/C1/ INT/V	Z2/C1/ INT/V	Z2/C1/ INT/V	Z2/C1/ TTC/V	Z2/C1/ TTC/V	Z2/C1/ TTC/V	Z 2
C 2	Z2/C 2/IN T	Z2/C 2/IN T	Z2/C 2/IN T	Z2/C 2/TT C	Z2/C 2/TT C	Z2/C 2/TT C	Z2/C2/ INT/V	Z2/C2/ INT/V	Z2/C2/ INT/V	Z2/C2/ TTC/V	Z2/C2/ TTC/V	Z2/C2/ TTC/V	
C 3	Z2/C 3/IN T	Z2/C 3/IN T	Z2/C 3/IN T	Z2/C 3/TT C	Z2/C 3/TT C	Z2/C 3/TT C	Z2/C3/ INT/V	Z2/C3/ INT/V	Z2/C3/ INT/V	Z2/C3/ TTC/V	Z2/C3/ TTC/V	Z2/C3/ TTC/V	
C 4	Z2/C 4/IN T	Z2/C 4/IN T	Z2/C 4/IN T	Z2/C 4/TT C	Z2/C 4/TT C	Z2/C 4/TT C	Z2/C4/ INT/V	Z2/C4/ INT/V	Z2/C4/ INT/V	Z2/C4/ TTC/V	Z2/C4/ TTC/V	Z2/C4/ TTC/V	

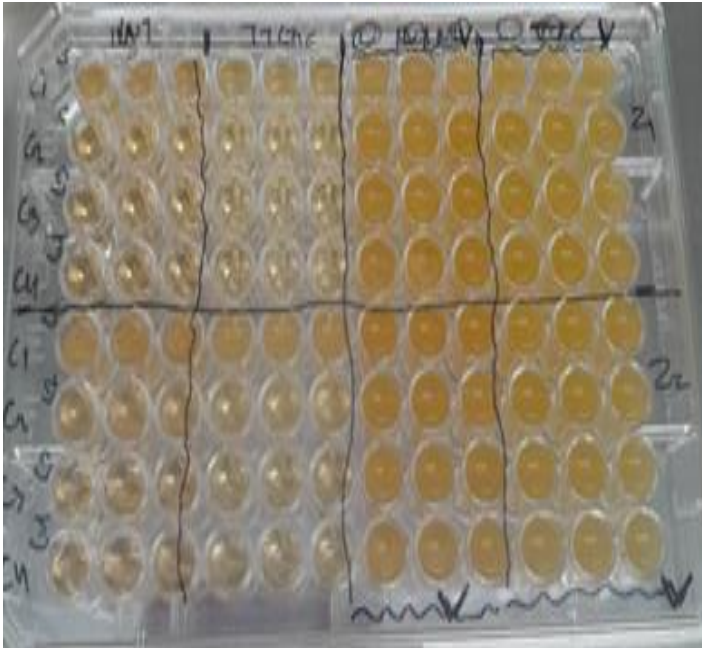
Πίνακας 1 : Ενδεικτική απεικόνιση εναπόθεσης των συστατικών στην πλάκα ELISA

Σχετικά με τον ανωτέρω πίνακα (πίνακας 1), όλα τα κελιά με εξαίρεση αυτά της πρώτης γραμμής καθώς και της πρώτης και τελευταίας στήλης αντιστοιχούν σε μια κυψελίδα της πλάκας **ELISA**.

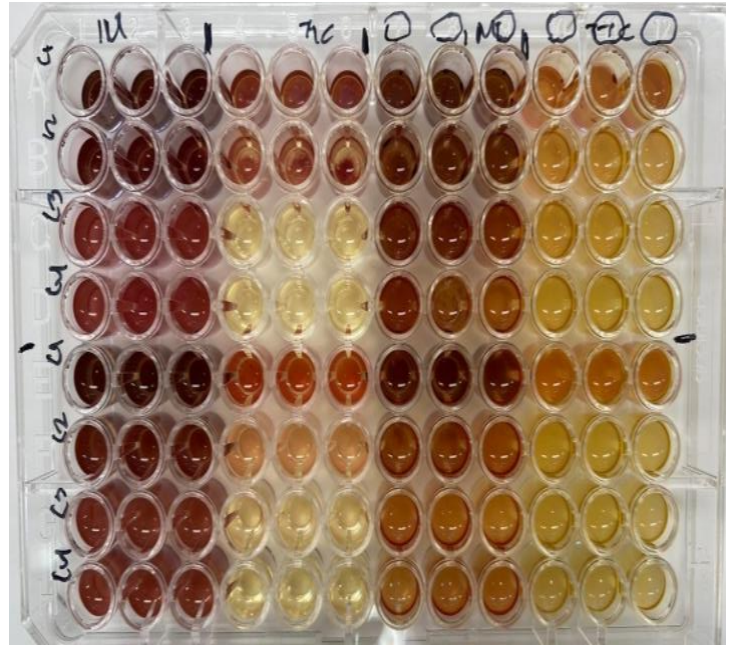
Η πρώτη στήλη του πίνακα χαρακτηρίζει τη συγκέντρωση του διαλύματος της ζύμης που προστίθεται κάθε φορά. Η πρώτη γραμμή του πίνακα δείχνει την χρωστική ή τον συνδυασμό χρωστικής και εκχυλίσματος που περιέχεται στα αντίστοιχα κελιά – πηγάδια ίδιου χρώματος. Η τελευταία στήλη του πίνακα δείχνει σε ποια κελιά – πηγάδια περιέχεται η κάθε ζύμη.

Αφού ολοκληρώθηκε το γέμισμα της πλάκας κλείστηκε με το ειδικό καπάκι και μεταφέρθηκε για επώαση στον επωαστικό θάλαμο του εργαστηρίου σε θερμοκρασία 30° C. Μετά το πέρας 24 ωρών παρατηρήθηκαν οι μεταβολές.

Εικόνα 5: Πραγματική απεικόνιση πλάκας ELISA



Πλάκα ELISA πριν την επώαση (0 h)



Πλάκα ELISA μετά την επώαση (24 h) Το έντονο κόκκινο χρώμα υποδηλώνει μεγάλη μικροβιακή ανάπτυξη ενώ το κίτρινο χρώμα υποδηλώνει αναστολή της ανάπτυξης δηλαδή αντιμικροβιακή δράση

Οπτική παρατήρηση

Ως προς τις χρωστικές (INT/TTC) :

Είναι εμφανές ότι η χρωστική INT έχει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την TTC καθώς παρατηρείται χρωματισμός των κυττάρων και στις μεγαλύτερες αραιώσεις στις οποίες η TTC δεν χρωματίζει τα κύτταρα. Συνεπώς επιλέχθηκε το INT ως χρωστική για τις κατεργασίες που ακολούθησαν.

3.4 Διερεύνηση αντιμικροβιακής δράσης

Στις υπόλοιπες τρεις κατεργασίες, ακολουθήθηκε η ίδια βασική μεθοδολογία με στόχο τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τα τρία στελέχη της ζύμης *S.cerevisiae* (M15, Turboyeast, Magic) και για *Lachancea*, με εναλλαγή στα προς μελέτη φυτικά εκχυλίσματα και χρήση μόνο του άλατος **INT** το οποίο κρίθηκε καταλληλότερο. Συγκριμένα στην δεύτερη κατεργασία μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα *Vanillaplanifolia*, *Vanillatahitensis* και *Vanillaabs*, το ξύδι (S-arom) και το βαλσαμόχορτο (StJohn'swort). Στην τρίτη χρησιμοποιήθηκαν ξανά τα εκχυλίσματα βανίλιας και ο παράγοντας (S-arom) στην ίδια αλλά και σε αραιωμένη συγκέντρωση (S-arom 1:2 σε H₂O). Στην τέταρτη και τελευταία κατεργασία έγινε μελέτη των εκχυλισμάτων βαλσαμόχορτο (StJohn'swort), δενδρολίβανο (Rosemary), μαστίχα (Mastic), GreenPod (100% H₂O) και GreenPod (10% ETOH). Οι μετρήσεις έγιναν σε αναγνώστη μικροπλακών (Biotek Epoch Microplate Spectrophotometer, California 95051) όπου αποτελεί ένα ειδικό φασματοφωτόμετρο που μετρά την οπτική πυκνότητα.

Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις κατεργασίες 2 έως 4		
Ζύμες	Εκχυλίσματα	Χρωστικές
Z1 (<i>S.cerevisiae</i> Turbo yeast)	<i>Vanillaplanifolia</i>	Ιωδονιτροτετραζόλιο(INT)
	<i>Vanillatahitensis</i>	
	<i>Vanillaabs</i>	
Z2 (<i>S.cerevisiae</i> M15)	S-arom	
	S-arom 1:2 σε H ₂ O	
Z3 (<i>Lachancea</i>)	Rosemary	
	StJohn'swort	
	Mastic	
Z4 (<i>S.cerevisiae</i> Magic)	Green pod 100% H ₂ O	
	Green pod 10% ETOH	



Εικόνα 6 : Φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν (Vanilla Tahitensis , S-rom , Vanilla Planifolia, Vanilla Absolut)

3.4.1 Πλήρωση της μικρόπλακας

Η διαδικασία και η ποσότητα πλήρωσης των πηγαδιών της μικρόπλακας που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτή της 1^{ης} κατεργασίας. Ο τρόπος εναπόθεσης τους στην μικρόπλακα αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα:

Z1/ IN T	Z1/IN T/EK X1	Z1/IN T/EK X2	Z1/IN T/EK X3	Z1/IN T/EK X4	Z1/IN T/EK X5	Z3/ IN T	Z3/IN T/EK X1	Z3/IN T/EK X2	Z3/IN T/EK X3	Z3/IN T/EK X4	Z3/IN T/EK X5
Z1/ IN T	Z1/IN T/EK X1	Z1/IN T/EK X2	Z1/IN T/EK X3	Z1/IN T/EK X4	Z1/IN T/EK X5	Z3/ IN T	Z3/IN T/EK X1	Z3/IN T/EK X2	Z3/IN T/EK X3	Z3/IN T/EK X4	Z3/IN T/EK X5
Z1/ IN T	Z1/IN T/EK X1	Z1/IN T/EK X2	Z1/IN T/EK X3	Z1/IN T/EK X4	Z1/IN T/EK X5	Z3/ IN T	Z3/IN T/EK X1	Z3/IN T/EK X2	Z3/IN T/EK X3	Z3/IN T/EK X4	Z3/IN T/EK X5
Z2/ IN T	Z2/IN T/EK X1	Z2/IN T/EK X2	Z2/IN T/EK X3	Z2/IN T/EK X4	Z2/IN T/EK X5	Z4/ IN T	Z4/IN T/EK X1	Z4/IN T/EK X2	Z4/IN T/EK X3	Z4/IN T/EK X4	Z4/IN T/EK X5
Z2/ IN T	Z2/IN T/EK X1	Z2/IN T/EK X2	Z2/IN T/EK X3	Z2/IN T/EK X4	Z2/IN T/EK X5	Z4/ IN T	Z4/IN T/EK X1	Z4/IN T/EK X2	Z4/IN T/EK X3	Z4/IN T/EK X4	Z4/IN T/EK X5
Z2/ IN T	Z2/IN T/EK X1	Z2/IN T/EK X2	Z2/IN T/EK X3	Z2/IN T/EK X4	Z2/IN T/EK X5	Z4/ IN T	Z4/IN T/EK X1	Z4/IN T/EK X2	Z4/IN T/EK X3	Z4/IN T/EK X4	Z4/IN T/EK X5

Πίνακας 2 :Ενδεικτική σχηματική αναπαράσταση της πλάκας ELISA σύμφωνα με την εναπόθεση των συστατικών

Σχετικά με τον ανωτέρω πίνακα (πίνακας 2), όλα τα κελιά αντιστοιχούν σε μια κυψελίδα της πλάκας **ELISA**.

Λόγω του ότι πλέον γίνεται χρήση τεσσάρων διαλυμάτων ζυμών, η πλάκα χωρίστηκε σε 4 ίσα μέρη. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει το μέρος της πλάκας στο οποίο έχει τοποθετηθεί η κάθε ζύμη. Για τη λήψη στατιστικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε επανάληψη 3 φορές για τα αρνητικά control(στήλες 1 και 7) καθώς και για κάθε νέο εκχύλισμα.Ως αρνητικό controlορίζεται ένα δείγμα χωρίς αντιμικροβιακή δραστηριότητα, στην προκειμένη περίπτωση δ/μα χρωστικής, ζύμης και υποστρώματος χωρίς την παρουσία φυτικού εκχυλίσματος, που χρησιμοποιείται για να εξασφαλιστεί ότι η απορρόφηση που μετράται, πραγματικά προέρχεται από την αντίδραση του INT με την αντιμικροβιακή ικανότητα του δείγματος και όχι από άλλους παράγοντες αλλά δίνει και τη δυνατότητα της οπτικής

παρατήρησης. Έτσι, προκύπτει ότι για κάθε ζύμη υπάρχουν τρία πηγάδια για το αρνητικό Control και τρία πηγάδια για το κάθε εκχύλισμα αντίστοιχα.

Επεξήγηση συμβόλων πίνακα:

Z1 :Εμβολιασμένο δείγμα θρεπτικού υποστρώματος με ζύμη *Turboyeast*

Z2 :Εμβολιασμένο δείγμα θρεπτικού υποστρώματος μεζύμη *M15*

Z3:Εμβολιασμένο δείγμα θρεπτικού υποστρώματος μεζύμη *Lachancea*

Z4:Εμβολιασμένο δείγμα θρεπτικού υποστρώματος μεζύμη *Magic*

INT:Διάλυμα χρωστικής συγκέντρωσης 1, 4 mg/ml σε αποστειρωμένο νερό

Αναφορικά με τα εκχυλίσματα :

	2 ^η κατεργασία	3 ^η κατεργασία	4 ^η κατεργασία
EKX1:	Εκχύλισμα <i>Vanillaplanifolia</i>	Εκχύλισμα <i>Vanillaplanifolia</i>	Εκχύλισμα StJohn'swort
EKX2:	Εκχύλισμα <i>Vanillatahitensis</i>	Εκχύλισμα <i>Vanillatahitensis</i>	Εκχύλισμα Rosemary
EKX3:	Εκχύλισμα VanillaAbsolut	Εκχύλισμα VanillaAbsolut	Εκχύλισμα Mastic
EKX 4:	Εκχύλισμα S-arom	Εκχύλισμα S-arom	Εκχύλισμα Green Pod 100% H₂O
EKX5:	Εκχύλισμα St John's wort	Εκχύλισμα S-arom 1:2 σε H₂O	Εκχύλισμα Green Pod 10% ETOH

Τα παραπάνω διαλύματα προστέθηκαν στις κυψελίδες σε συγκεκριμένες αναλογίες :

Συγκεκριμένα για τις κυψελίδες που χρησιμοποιήθηκαν ως control ισχύει η αναλογία:

- θρεπτικό υπόστρωμα → **200 μL**
- Εμβολιασμένο δείγμα θρεπτικού υποστρώματος με μία από τις επιλεγμένες ζύμες → **50 μL**

- INT: → **20 μL**
- Αποστειρωμένο H₂O → **50 μL** (για εξισορρόπηση των όγκων).
- V (συνολικό) = **320 μL**

Ενώ για τις κυψελίδες που περιείχαν χρωστική και εκχύλισμα (παράγοντα) ισχύει η αναλογία :

- θρεπτικό υπόστρωμα → **200 μL**
- Εμβολιασμένο δείγμα θρεπτικού υποστρώματος με μία από τις επιλεγμένες ζύμες → **50 μL**
- INT → **20 μL**
- Extract → **50 μL**

V (συνολικό) = **320 μL**

Επιπρόσθετα σε τρεις κυψελίδες στην τελευταία σειρά της πλάκας, προστέθηκε τυφλό διάλυμα. Στο πλαίσιο της χρωματομετρικής δοκιμής ELISA, ο όρος “τυφλό διάλυμα” αναφέρεται σε μια διαδικασία που πραγματοποιείται για τη μείωση πιθανών συστηματικών λαθών και τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των μετρήσεων. Το τυφλό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 150 μL θρεπτικού υποστρώματος και 20 μL INT και χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό άλλων παραγόντων που ενδέχεται να επηρεάζουν τη μέτρηση της απορρόφησης, εκτός από την παρουσία του αντιμικροβιακού εκχυλίσματος όπως για παράδειγμα μια πιθανή επιμόλυνση του θρεπτικού υποστρώματος ή του δ/τος της χρωστικής.

3.4.2 Επώαση της μικρόπλακας και οπτική παρατήρηση

Αφού ολοκληρώθηκε το γέμισμα της πλάκας κλείστηκε με το ειδικό καπάκι και μεταφέρθηκε για επώαση στον επωαστικό θάλαμο του εργαστηρίου σε θερμοκρασία 30° C. Μετά το πέρας 24 ωρών παρατηρήθηκαν οι μεταβολές.

3.4.3 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση της πλάκας στο Biotek για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 490 nm πριν και μετά την επώαση και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα ραβδογράμματα.

Η οπτική πυκνότητα καθορίζει τον βαθμό που το φως απορροφάται, διασπάται ή διέρχεται μέσα από ένα δείγμα και μετριέται συνήθως σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD) ή οπτικές μονάδες (AU). Με τη χρήση του φωτόμετρου, καταγράφεται η οπτική πυκνότητα ενός δείγματος και μπορεί να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα με βάση τις προηγούμενες μετρήσεις ή τα πρότυπα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση.(PortiaMira, PamelaYeh, Barry G. Hall, 2022). Στην συγκεκριμένη εργασία η μέτρηση έγινε στο Biotek του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης και οι τιμές οπτικής πυκνότητας που προέκυψαν φαίνονται στο παραπάνω σχήμα. Οι απαιτούμενοι υπολογισμοί και τα ραβδογράμματα έγιναν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος excel. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 490 nm που είναι το χαρακτηριστικό μήκος κύματος απορρόφησης των χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν, και από τα δεδομένα κατασκευάστηκαν κατάλληλα ραβδογράμματα.

3.4.4 Κατασκευή ραβδογραμμάτων

Κατά την εξέταση της επίδρασης αντιμικροβιακών ή αντιοξειδωτικών ουσιών με τη μέθοδο του εν λόγω πειράματος ή με παρόμοιες μεθόδους, μέσω των ραβδογραμμάτων διαπιστώνεται αν η προσθήκη αυτών των ουσιών έχει επιπτώσεις στην οπτική πυκνότητα και κατ'επέκταση εάν οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ή αντιμικροβιακή δράση. Ελάττωση της οπτικής πυκνότητας όπου αντιστοιχεί σε μικρότερο ύψος μπάρας στο ραβδογράμμα, υποδηλώνει ύπαρξη αντιμικροβιακών ή αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων.Για τον σχεδιασμό του ραβδογραμματος έγιναν οι εξής χειρισμοί:

- Υπολογισμός μέσου όρου των τιμών οπτικής πυκνότητας για κάθε κατηγορία δείγματος.

- Υπολογισμός τυπικής απόκλισης των τιμών οπτικής πυκνότητας για κάθε κατηγορία δείγματος για έλεγχο της αξιοπιστίας των μετρήσεων.
- Σχεδιασμός ραβδογράμματος με τις κατηγορίες των δειγμάτων στον άξονα των x και τις μέσες τιμές οπτικής πυκνότητας στον άξονα των y.
- Προσθήκη γραμμών σφάλματος.

3.4.5 Υπολογισμός του % inhibition

Για να φανεί με ακρίβεια η αντιμικροβιακή ικανότητα των χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων υπολογίστηκε και το % inhibition. Το ποσοστό αναστολής που συχνά συμβολιζόμενο ως %inhibition, είναι μια μέτρηση που χρησιμοποιείται σε διάφορα επιστημονικά πεδία για την εκτίμηση του βαθμού στον οποίο μια ουσία ή διαδικασία μειώνει ή αναστέλλει μια συγκεκριμένη δραστηριότητα ή απόκριση. Εκφράζεται συνήθως ως ποσοστό και παρέχει έναν τρόπο ποσοτικοποίησης της αποτελεσματικότητας ενός αναστολέα ή της επίδρασης μιας επεξεργασίας σε ένα βιολογικό, χημικό ή φυσικό σύστημα. Ακολουθεί ο τρόπος υπολογισμού του και τι δείχνει:

Ο τύπος για τον υπολογισμό του % inhibition εξαρτάται από το συγκεκριμένο πλαίσιο, αλλά σε γενικές γραμμές μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

% inhibition = [(οπτική πυκνότητα δείγματος ελέγχου–οπτική πυκνότητα δείγματος με αντιμικροβιακό παράγοντα («θεραπεία»)) / οπτική πυκνότητα δείγματος ελέγχου] × 100

- Ο "έλεγχος" αντιπροσωπεύει τη μέτρηση ή την απόκριση απουσία οποιασδήποτε θεραπείας ή αναστολέα ή αλλιώς το control.
- Η "θεραπεία" αντιπροσωπεύει τη μέτρηση ή την απόκριση όταν εφαρμόζεται η θεραπεία ή ο αναστολέας, στην προκειμένη περίπτωση τα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα.

Το ποσοστό αναστολής δείχνει τη σχετική μείωση της δραστηριότητας ή της απόκρισης που ενδιαφέρει λόγω της παρουσίας μιας θεραπείας ή ενός αναστολέα. Στη βιοχημεία και τη φαρμακολογία, το % inhibition χρησιμοποιείται συχνά για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των ενζυμικών αναστολέων. Ένα υψηλό %

inhibition δείχνει ότι ο αναστολέας μειώνει αποτελεσματικά τη δραστηριότητα του ενζύμου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση της ισχύος διαφορετικών αναστολέων. Συνοπτικά, το % inhibition είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση του βαθμού στον οποίο μια επεξεργασία ή ένας αναστολέας επηρεάζει ένα σύστημα ή μια διεργασία. Έτσι, ένα υψηλότερο ποσοστό αναστολής υποδηλώνει μια πιο σημαντική ανασταλτική επίδραση. Ένα χαμηλότερο ποσοστό αναστολής υποδηλώνει ασθενέστερη ανασταλτική επίδραση ή καθόλου αναστολή, εάν η τιμή είναι κοντά στο μηδέν. Τέλος, ένα αρνητικό ποσοστό αναστολής σημαίνει ότι το δείγμα με το εκχύλισμα σχηματίζει μεγαλύτερη θολερότητα από το δείγμα ελέγχου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί το εκχύλισμα μπορεί να δημιουργεί συσσωματώματα τα οποία αυξάνουν την θολερότητα του δείγματος χωρίς όμως να έχει αυξηθεί ο πληθυσμός των κυττάρων σε σχέση με τον πληθυσμό του control. (Saboury, A. A. (2009).

Συγκεκριμένα :

% inhibition	Αναστολή
>75	ΙΣΧΥΡΗ
40-75	ΜΕΤΡΙΑ
<40	ΗΠΙΑ
< 0	ΕΝΙΣΧΥΣΗ -ΔΙΕΓΕΡΣΗ

3.5.Καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλίαPetri

Σε μερικά εκχυλίσματα δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων μέσω της οπτικής παρατήρησης λόγω της εμφάνισης θολερότητας αλλά και ιζήματος στις κυψελίδες τα οποία δεν ήταν σαφές εάν προκλήθηκαν από μικροβιακή ανάπτυξη ή εάν σχετίζονταν με τη σύσταση των φυτικών εκχυλισμάτων. Έτσι για την διαπίστωση και την επιβεβαίωση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε



και καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλίαPetri με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης.

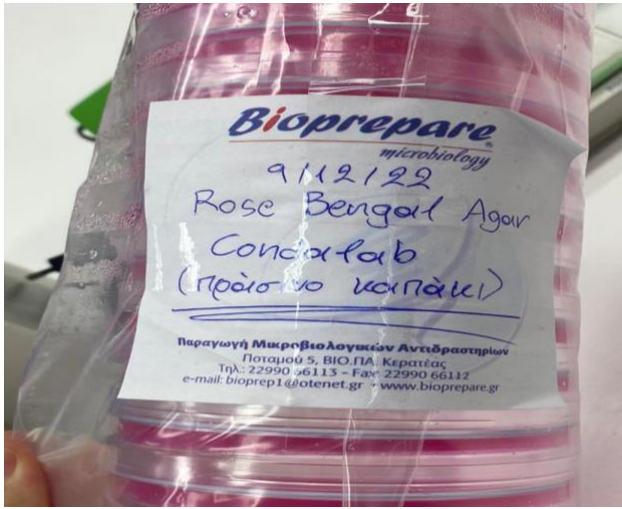
Μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης

- Ρευστοποίηση του εκλεκτικού γιαζύμεθρεπτικού υλικού (chloramphenicolglucoseyeastextractagar) στα μικροκύματα με θέρμανση 2 min.
- Ψύξη στους 45 - 47 °C.
- Απόχυση ποσότητας θρεπτικού υλικού 12-15 ml σε κάθε τρυβλίο.
- Παραμονή των τρυβλίων, για στερεοποίηση, σε απόλυτα οριζόντια θέση.
- Εξάπλωση με την γυάλινη ράβδο 0.1ml δείγματος σε όλη την επιφάνεια του στερεού υποστρώματος κάνοντας κυκλικές κινήσεις.
- Επώαση των τρυβλίων στους 31 °C για τουλάχιστον 48h.
- Καταμέτρηση αποικιών.

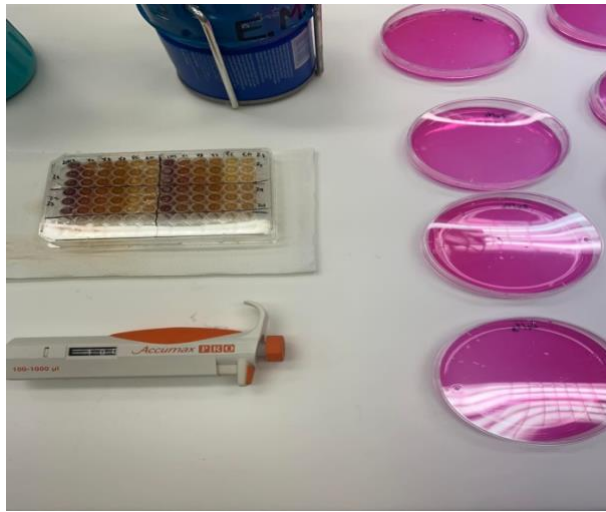
Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 20 αποστειρωμένα τρυβλία, 5 για κάθε στέλεχος στα οποία έγινε επίστρωση με 0,1 ml από τις κυψελίδες που περιείχαν τα ακόλουθα :

Z1 (control)	Z2 (control)	Z3 (control)	Z4 (control)
Z1/V1	Z2/V1	Z3/V1	Z4/V1
Z1/V2	Z2/V2	Z3/V2	Z4/V2
Z1/V3	Z2/V3	Z3/V3	Z4/V3
Z1/ S-arom	Z2/ S-arom	Z3/ S-arom	Z4/ S-arom

Πίνακας 3 : Δείγματα από τις κυψελίδες της πλάκας ELISA που χρησιμοποιήθηκαν για την επίστρωση των τρυβλίων αποικιών και καταγράφηκαν τα αποτελέσματά.



Εικόνα 8 : Τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα Rose Bengal



Εικόνα 8.1. : Εμβολιασμένα τρυβλία με τα δείγματα από την εικονιζόμενη πλάκα ELISA

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Καταμέτρηση τρυβλίων

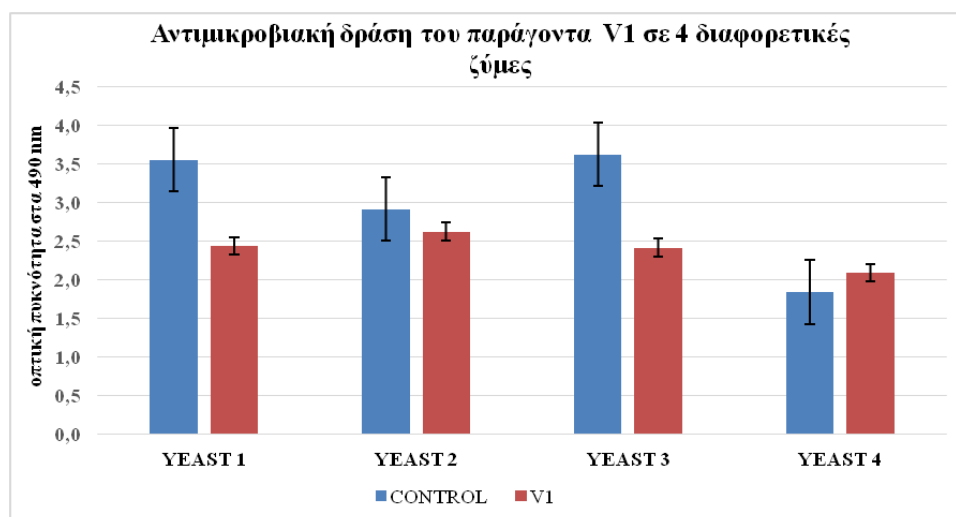
ROSE BENGAL(LOG)	CONTROL	V1	V2	V3	S-AROM (ΠΥΚΝΟ)
Z1	7,5log	5,5log	3,255 log	0	3,819 log
Z2	7,5log	2,929 log	5,5log	0	3,505 log
Z3	7,5log	5,5log	5,5log	0	2,806 log
Z4	7,5log	5,5log	5,5log	0	0

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα από την καταμέτρηση των τρυβλίων εκφρασμένα σε λογαριθμική κλίμακα

Η έκφραση του αριθμού των μικροοργανισμών στη λογαριθμική κλίμακα γίνεται για την διευκόλυνση της διεξαγωγής των συμπερασμάτων καθώς γίνεται διακριτή η πτώση των λογαριθμικών κύκλων στον αριθμό των μικροβίων και έτσι η σύγκριση των αποτελεσμάτων καθίσταται ευκολότερη.

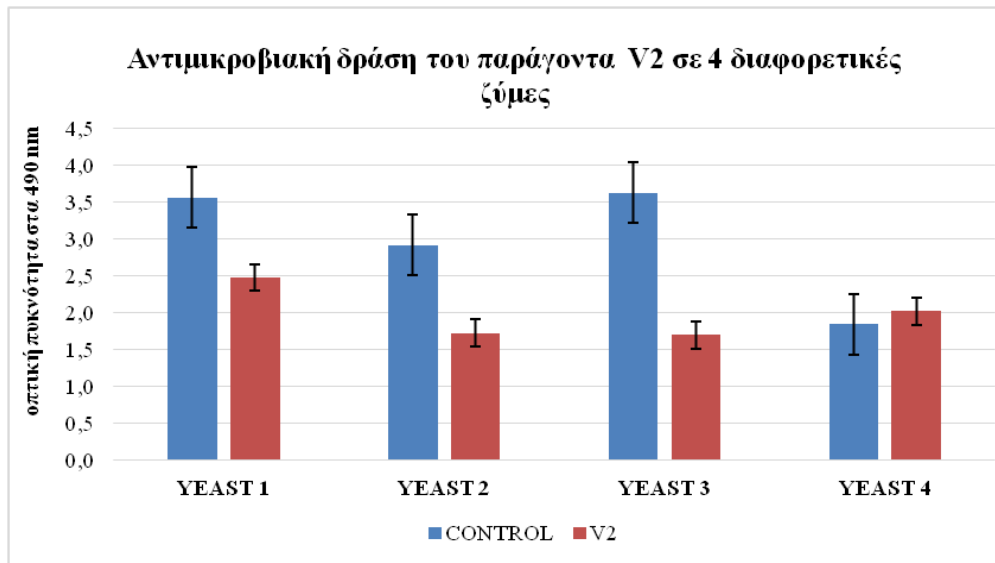
4.2. Ραβδογράμματα οπτικής πυκνότητας

Εκχύλισμα *Vanillaplanifolia*(V1)



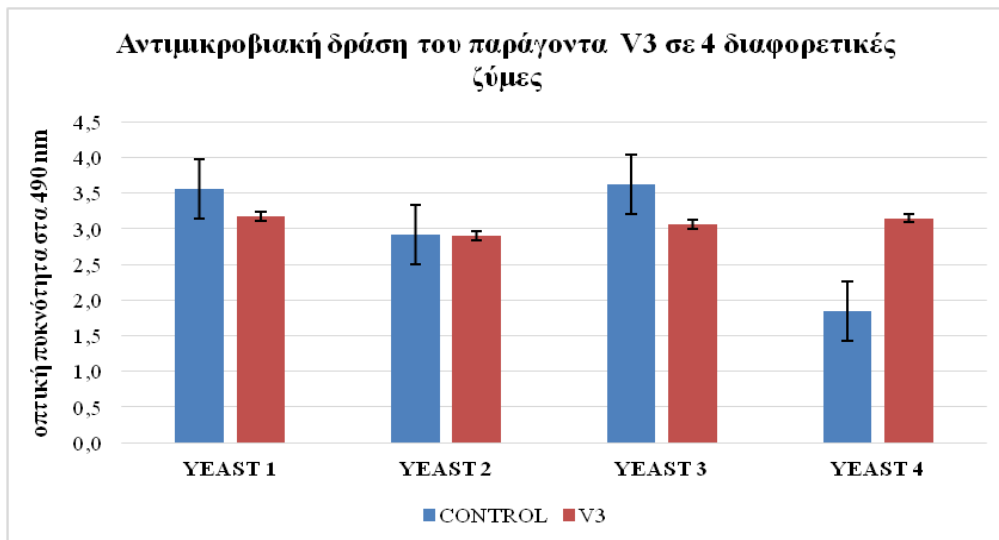
Γράφημα 1: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος V1

Εκχύλισμα *Vanillatahitensis* (V2)



Γράφημα 2: Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος V2

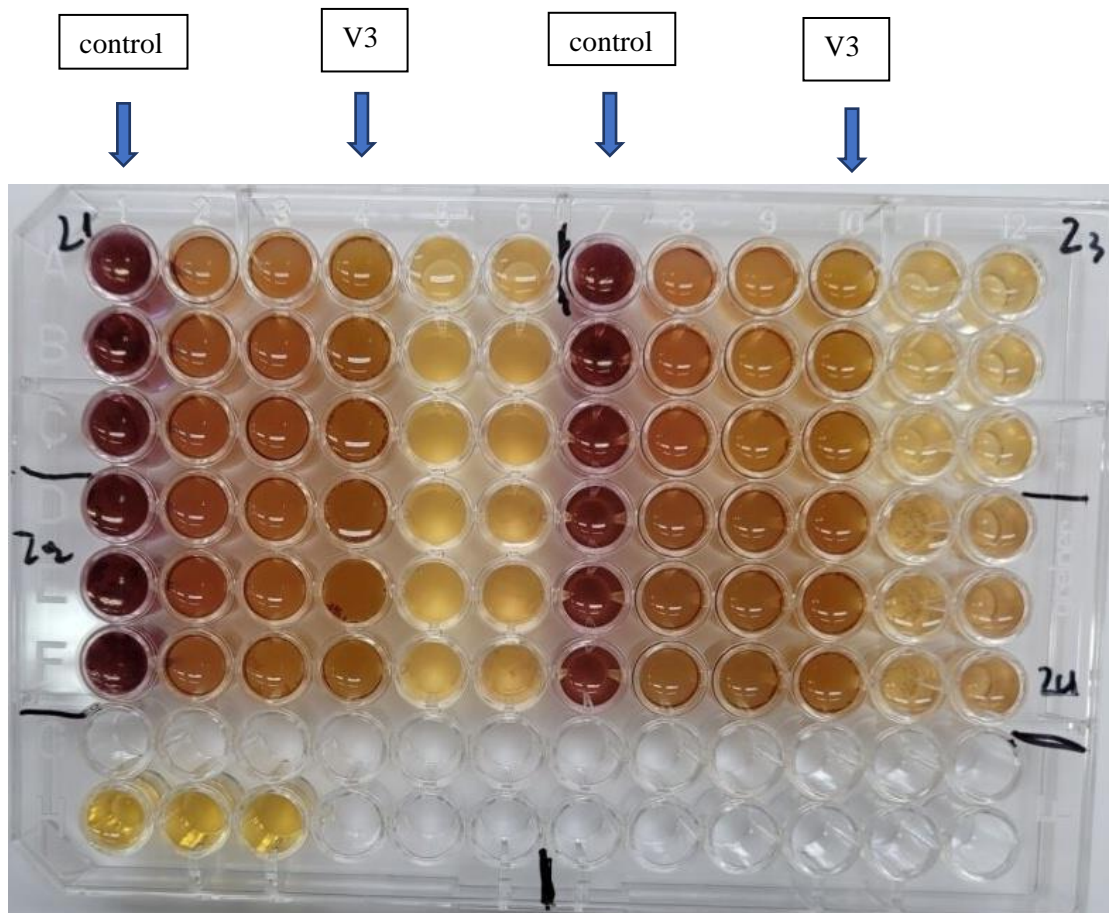
Εκχύλισμα Vanilla Absolut (V3)



Γράφημα 3 : Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος V3

Ο παράγοντας V3 (εκχύλισμα καθαρής βανίλιας σε γλυκερίνη και αιθανόλη) φαίνεται να μην παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, όπως δείχνει το διάγραμμα. Όμως, σύμφωνα με την χρωματική αλλαγή παρατηρούμε στην πλάκα ότι τα φρεάτια με το V3 έχουν πολύ ασθενέστερο κόκκινο χρώμα από ότι

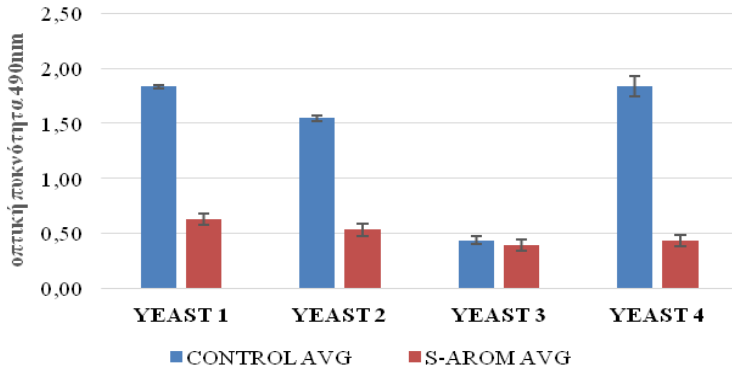
τα φρεάτια ελέγχου (βαθύ κόκκινο χρώμα) και αυτό σημαίνει ότι υπάρχει αντιμικροβιακή δράση, όπως επιβεβαιώθηκε και με την μικροβιολογική μέτρηση.



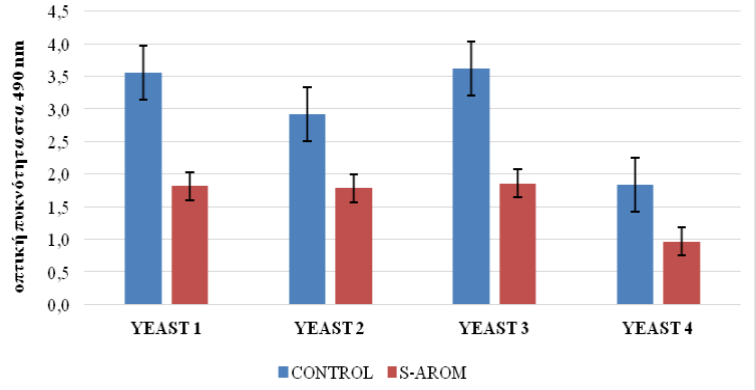
Εικόνα 9 : Εποασμένη πλάκα ELISA με την προσθήκη εκχυλισμάτων V1, V2, V3, S-arom πυκνό

Εκχύλισμα S-arom

Αντιμικροβιακή δράση του παράγοντα S-arom σε 4 διαφορετικές ζύμες



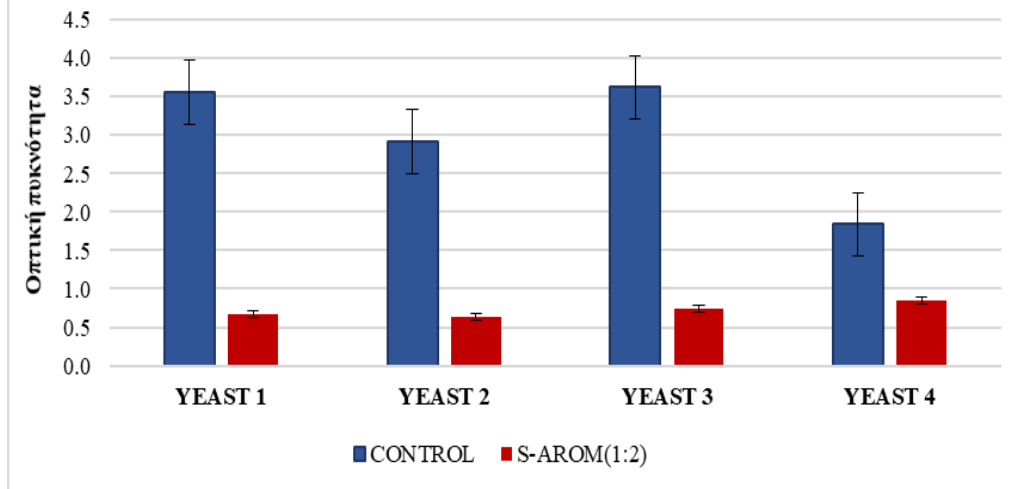
Αντιμικροβιακή δράση του παράγοντα S-AROM σε 4 διαφορετικές ζύμες



Γράφημα4 : Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος S-arom

Εκχύλισμα S-arom 1:2 σε H2O

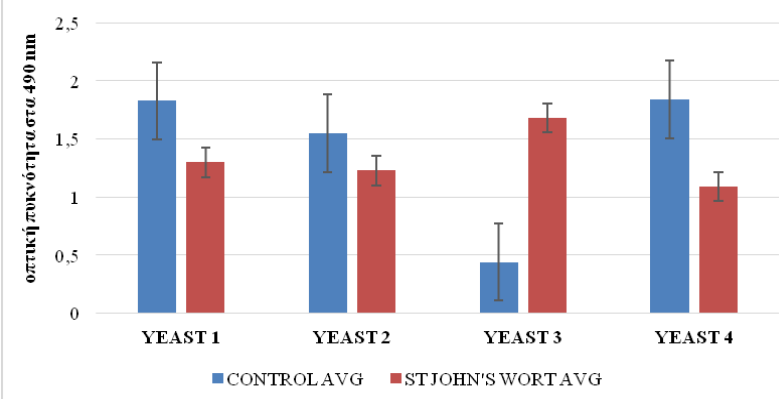
Αντιμικροβιακή δράση του παράγοντα S-AROM (1:2) σε 4 διαφορετικές ζύμες



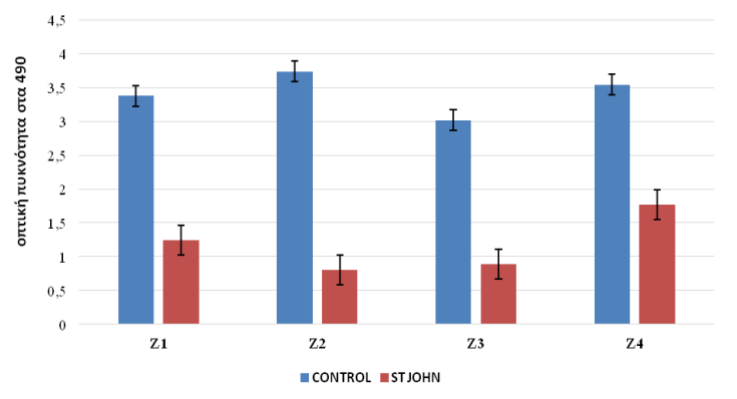
Γράφημα5 : Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος S-arom 1:2 σε H2O

Εκχύλισμα St John's wort

Αντιμικροβιακή δράση του παράγοντα St John's Wort σε 4 διαφορετικές ζύμες



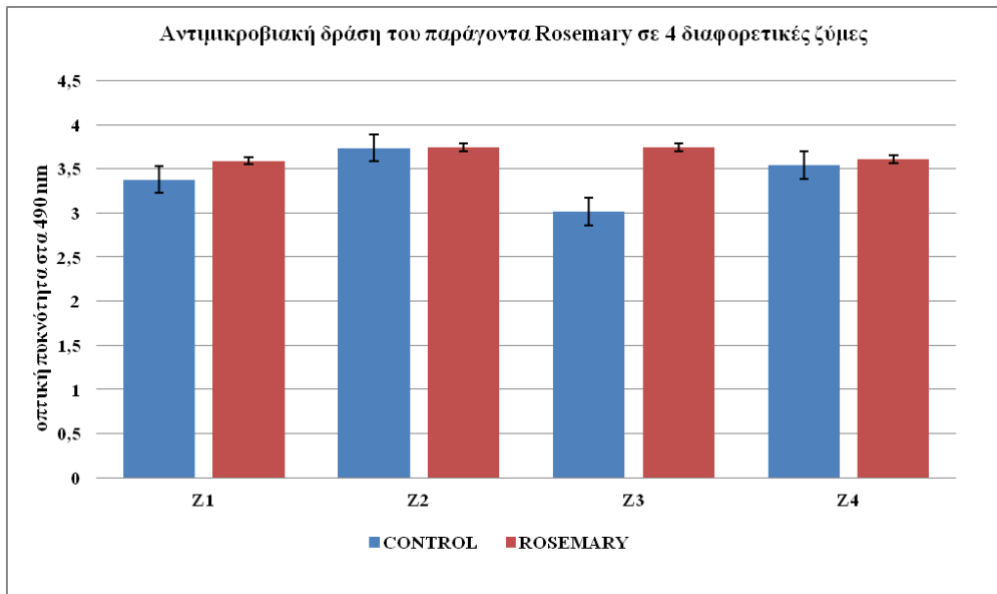
Αντιμικροβιακή δράση του παράγοντα ST JOHN σε 4 διαφορετικές ζύμες



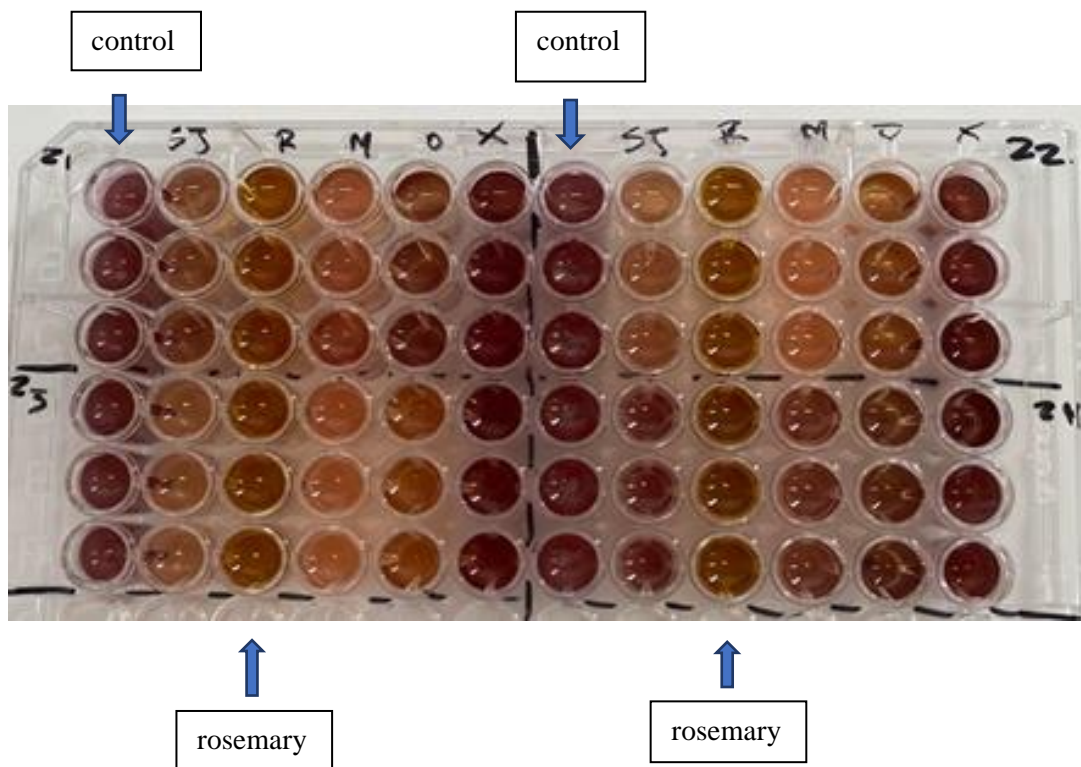
Γράφημα 6 : Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος StJohn'swort

Εκχύλισμα Rosemary

Αντιμικροβιακή δράση του παράγοντα Rosemary σε 4 διαφορετικές ζύμες



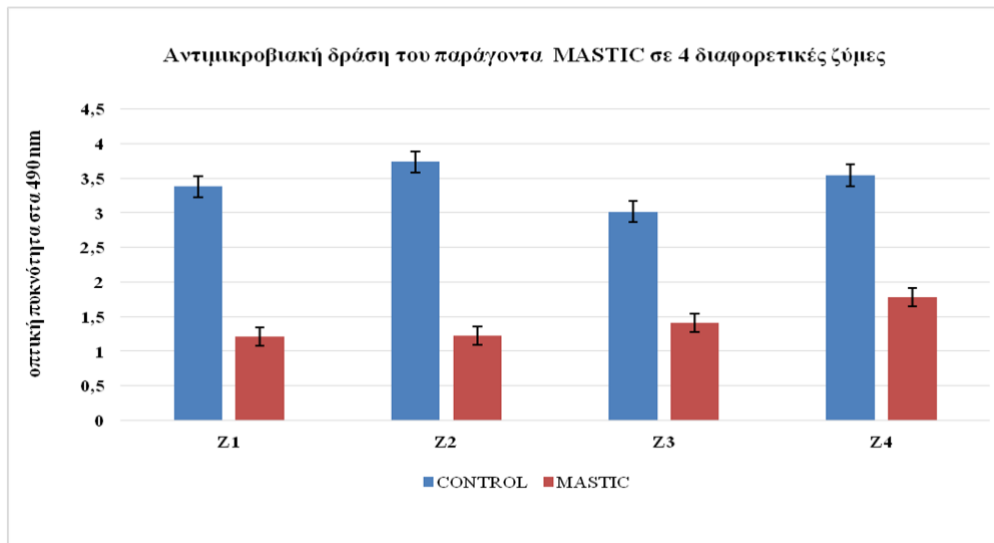
Γράφημα 7 : Οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος Rosemary



Εικόνα 9.1.:Επωασμένη πλάκα ELISA με τα φυτικά εκχυλίσματα (StJohn'swort,Rosemary,Mastic, GreenPod)

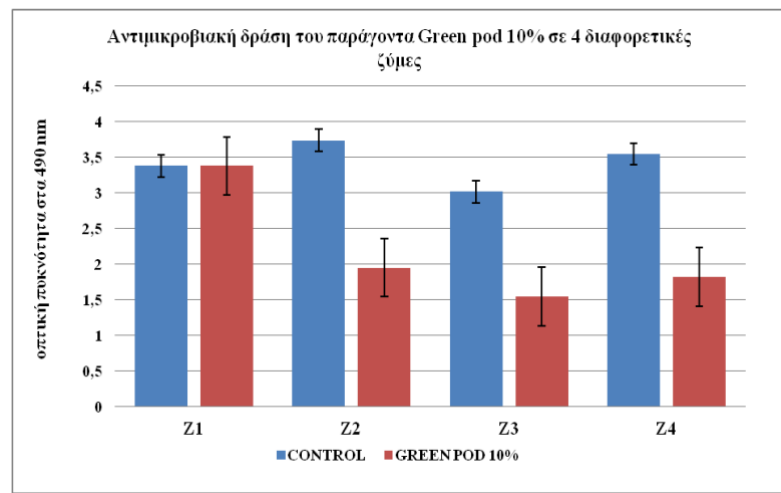
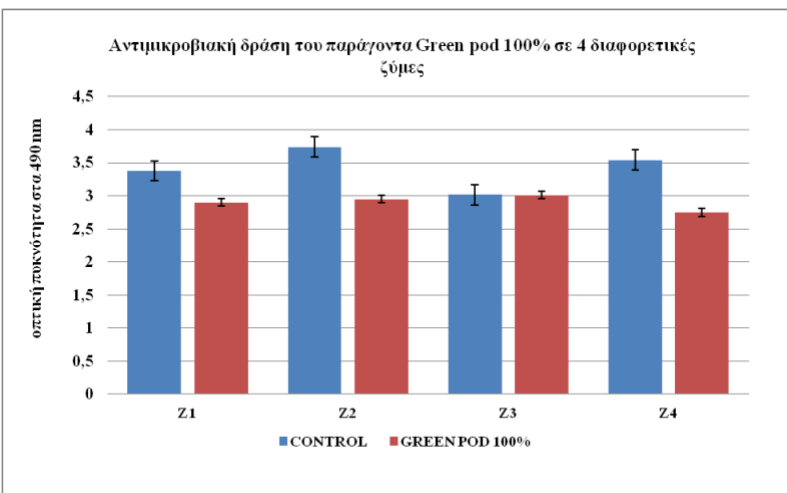
Στην περίπτωση του εκχυλίσματος Rosemary, ενώ η θολερότητα που σχηματίστηκε μετά την επώαση όπως μετρήθηκε από το φασματοφωτόμετρο, δεν υποδηλώνει αντιμικροβιακή δράση (διότι οι τιμές είναι πολύ κοντινές), ο σχηματισμός του κόκκινου χρώματος είναι πολύ ασθενέστερος σε σχέση με το control. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να υπάρξει αντιμικροβιακή δράση που υποτιμάται με την μέθοδο της μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

Εκχύλιμα Mastic



Γράφημα 8: Οπτική πυκνότητα εκχυλίματος Mastic

Εκχύλιμα GreenPod 100% H₂O Εκχύλιμα GreenPod 10% ETOH



Γράφημα 9: Οπτική πυκνότητα εκχυλίματος GreenPod 100% H₂O & GreenPod 10% ETOH

4.3. Αποτελέσματα % Inhibition

Zόμη	<i>Vanillaplanifolia</i> (V1)
Z1	31,38
Z2	9,96
Z3	33,26
Z4	-

Πίνακας 5 :Αποτελέσματα % Inhibition (V1)

Zόμη	<i>Vanilla tahitensis</i> (V2)
Z1	30,42
Z2	40,88
Z3	53,22
Z4	-

Πίνακας 5.1.:Αποτελέσματα % Inhibition (V2)

Zόμη	<i>Vanilla Absolut</i> (V3)
Z1	10,68
Z2	0,51
Z3	15,58
Z4	-

Πίνακας 5.2.:Αποτελέσματα % Inhibition(V3)

Zύμη	S-arom
Z1	99,97
Z2	99,97
Z3	77,27
Z4	99,98

Πίνακας 5.3. :Αποτελέσματα % InhibitionS-arom

Zύμη	S-arom1:2
Z1	80,99
Z2	78,39
Z3	79,58
Z4	54,36

Πίνακας 5.4. :Αποτελέσματα % InhibitionS-arom1:2

Zύμη	St John's wort
Z1	63,24
Z2	78,49
Z3	70,64
Z4	50,00

Πίνακας 5.5. :Αποτελέσματα% Inhibition St John's wort

Ζύμη	Mastic
Z1	64,07
Z2	67,36
Z3	53,37
Z4	49,88

Πίνακας 5.6. :Αποτελέσματα % Inhibition Mastic

Ζύμη	Rosemary
Z1	-
Z2	-
Z3	-
Z4	-

Πίνακας 5.7. :Αποτελέσματα % Inhibition Rosemary

Ζύμη	Green pod 100% H2O
Z1	14,16
Z2	11,14
Z3	0,09
Z4	22,42

Πίνακας 5.8. :Αποτελέσματα % Inhibition Green Pod 100% H2O

Ζύμη	Green pod 10% ΕΤΟΗ
Z1	29,18
Z2	49,70
Z3	50,62
Z4	49,88

Πίνακας 5.9. :Αποτελέσματα % Inhibition Green pod 10% ΕΤΟΗ

4.3.1. Συγκενρωτικά αποτελέσματα με βάση τις μετρήσεις του % inhibition

Εκχυλίσματα Βανίλιας	Vanilla Planifolia	Vanilla Tahitensis	Vanilla Absolut
Z1	ΗΠΙΑ	ΗΠΙΑ	ΗΠΙΑ
Z2	ΗΠΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΗΠΙΑ
Z3	ΗΠΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΗΠΙΑ
Z4	ΚΑΜΙΑ	ΚΑΜΙΑ	ΚΑΜΙΑ

Πίνακας 6 :Αποτίμηση δραστηκότητας εκχυλισμάτων V1, V2, V3

Ξύδι	S-AROM	S-AROM (1:2)
Z1	ΙΣΧΥΡΗ	ΙΣΧΥΡΗ
Z2	ΙΣΧΥΡΗ	ΙΣΧΥΡΗ
Z3	ΗΠΙΑ	ΙΣΧΥΡΗ
Z4	ΙΣΧΥΡΗ	ΜΕΤΡΙΑ

Πίνακας 6.1. :Αποτίμηση δραστηκότητας εκχυλισμάτων S-arom&S-arom (1:2)

Φυτικά Εκχυλίσματα	St John's wort	Mastic	Rosemary	Green pod 10% alc	Green pod 100% H ₂ O
Z1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣ ΙΣΧΥΡΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΗΠΙΑ ΕΩΣ ΚΑΜΙΑ	ΗΠΙΑ	ΗΠΙΑ
Z2	ΙΣΧΥΡΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΚΑΜΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΗΠΙΑ
Z3	ΜΕΤΡΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΚΑΜΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΗΠΙΑ
Z4	ΜΕΤΡΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΚΑΜΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΗΠΙΑ

Πίνακας 6.2. :Αποτίμηση δραστηρότητας εκχυλισμάτων Συζήτηση:

5.1. Συμπεράσματα για τα εκχυλίσματα

Για τα εκχυλίσματα βανίλιας χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της οπτικής παρατήρησης και όχι της οπτικής πυκνότητας η οποία δεν δίνει ικανοποιητικές μετρήσεις λόγω της υψηλής θολερότητας και δημιουργίας ιζημάτων στα πηγαδάκια.

Για τις βανίλιες επομένως προκύπτει ότι :

- Η *Vanilla Planifolia* δεν εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών Z1, Z3, Z4 ενώ παρουσίασε υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι του στελέχους Z2.
- Η *Vanilla Tahitensis* εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση μόνο έναντι στο στέλεχος Z1 η οποία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί έντονη.
- Η *Vanilla Absoluta* εμφάνισε πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι σε όλα τα στελέχη, καθώς μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος προέκυψε μηδενική ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρυβλία.

Για το πυκνό ξύδι **S-rom** τα συμπεράσματα εξάγονται και από τα αποτελέσματα των τρυβλίων αλλά και από την οπτική πυκνότητα , μέσω των ραβδογραμμάτων που έγιναν. Όπως φαίνεται από την καταμέτρηση των αποικιών το πυκνό ξύδι εμφάνισε

αντιμικροβιακή δράση σε όλα τα στελέχη και εντονότερη έναντι στο στέλεχος Z4. Επιπρόσθετα από τις μετρήσεις για το S-arom προκύπτουν συμπεράσματα και για την ευαισθησία των ζυμών έναντι στο συγκεκριμένο εκχύλισμα. Η ευαισθησία των στελεχών όπως φαίνεται από την πτώση των λογαριθμικών κύκλων είναι κατά φθίνουσα σειρά,

Z4 > Z3 > Z2 > Z1.

Τέλος όπως φαίνεται από τα ραβδογράμματα και από τον υπολογισμό του % inhibition που φτάνει σε όλα τα στελέχη πάνω από 90%, δηλαδή παρουσιάζει πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση.

Σχετικά με το **S-arom 1:2** (αραιωμένο ξύδι σε αποστειρωμένο νερό), παρατηρείται και πάλι ισχυρή αντιμικροβιακή δράση σε όλα τα στελέχη με τις τιμές του % inhibition να κυμαίνονται από 54% - 81%, λίγο χαμηλότερα δηλαδή σε σχέση με το πυκνό διάλυμα το οποίο ήταν το αναμενόμενο λόγω της σχετικής αραιώσης. Συνεπώς επιβεβαιώνεται η αντιμικροβιακή δράση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος αλλά και η εγκυρότητα των μετρήσεων.

Όσον αφορά το εκχύλισμα **StJohn'swort** φαίνεται να έχει ισχυρή προς μέτρια αντιμικροβιακή δράση σύμφωνα με τις τιμές του % inhibition που κυμαίνονται από 53% - 78%.

Το εκχύλισμα **Mastic** έχει μέτρια αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι των συγκεκριμένων στελεχών ζυμών με τιμές % inhibition από 49% - 67%.

Το εκχύλισμα **Rosemary** δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι των συγκεκριμένων στελεχών σύμφωνα με την μέθοδο της οπτικής πυκνότητας, όμως παρατηρήθηκε ασθενέστερος σχηματισμός κόκκινου χρώματος (πορτοκαλί) μετά την προσθήκη INT, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει αντιμικροβιακή δράση η οποία δεν μπορεί να εκτιμηθεί με την μέθοδο της οπτικής πυκνότητας.

Τέλος τα εκχυλίσματα **GreenPod** δεν παρουσίασαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, το εκχύλισμα **GreenPod 10% ETOH** κατέληξε να εμφανίζει καλύτερες τιμές ανατολής το οποίο ήταν αναμενόμενο λόγω της γνωστής αντιμικροβιακής δράσης της αλκοόλης.

Εν κατακλείδι με βάση την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε προέκυψε ότι από τα προς μελέτη φυτικά εκχυλίσματα την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση εμφάνισε το ξύδι (**S-arom**) αμέσως μετά το εκχύλισμα **Vanilla Absolut** με σημαντική διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Την αμέσως καλύτερη αντιμικροβιακή δράση με φθίνουσα σειρά εμφάνισαν τα εκχυλίσματα **StJohn'swort**, **Mastic**, **GreenPod**, **Vanilla Planifolia**, **Vanilla Tahitensis**. Τέλος το εκχύλισμα **Rosemary** δεν παρουσίασε καμία αντιμικροβιακή δράση.

5.2. Συμπεράσματα για τις ζύμες

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχαν διαφορές στην ευαισθησία των ζυμών στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, παρόλο που οι 3 από τις 4 ζύμες ήταν εμπορικές του ίδιου είδους (*Saccharomyces cerevisiae*).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται συγκεντρωτικά με βάση τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα η ανθεκτικότητα του κάθε στελέχους έναντι στα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα. Για τα εκχυλίσματα βανίλιας και για το εκχύλισμα (S-aromπυκνό) χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από την καταμέτρηση των τρυβλίων ενώ για τα υπόλοιπα χρησιμοποιήθηκαν τα ραβδογράμματα και ο υπολογισμός του % Inhibition.

ZYMH /EKX	V1	V2	V3	ST JOHN'S WORT	S-AROM	S-AROM (1:2)	MASTIC	GREEN POD 10% ETOH	GREEN POD 100% H ₂ O
Z1	-	×	-	-	□	-	-	□	-
Z2	×	-	-	×	-	-	×	-	×
Z3	-	-	-	-	-	-	-	×	□
Z4	-	-	-	□	×	□	□	-	-

Πίνακας 7: Αποτίμηση ανθεκτικότητας των επιλεγμένων στελεχών ζυμών έναντι στα χρησιμοποιούμενα φυτικά εκχυλίσματα

×: Λιγότερο ανθεκτικό στέλεχος

□: Πιο ανθεκτικό στέλεχος

Συνεπώς, προκύπτει ότι την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε όλα τα εκχυλίσματα την έχει το στέλεχος Z4 αμέσως μετά το στέλεχος Z1 στη συνέχεια το Z3 και τέλος το λιγότερο ανθεκτικό στέλεχος είναι το Z2.

Βιβλιογραφία

References (APA)

1. Saboury, A. A. (2009). Enzyme inhibition and activation: a general theory. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 6, 219-229.
2. Bandyopadhyay, S., & Maiti, S. K. (2021). Different soil factors influencing dehydrogenase activity in mine degraded lands—state-of-art review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(9), 360.
3. Czerlinski, G. H., Anderson, B., Tow, J., & Reid, D. S. (1988). Coupling of redox indicator dyes into an enzymatic reaction cycle. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 15(5), 241-247.
4. Cao, M., Yu, C., Yao, Z., Gao, X., & Wu, S. (2019). Atractylodesin III maintains mitochondrial function and inhibits caspase-3 activity to reverse apoptosis of cardiomyocytes in AMI rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(1), 198.
5. Mambu, S. M. (2014). Soil Dehydrogenase Activity: A Comparison Between the TTC and INT Method. A review. *Jurnal Ilmiah Sains*, 14(2), 87-94.
6. Tarafdar, J. C. (2003). 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. *Biology and fertility of soils*, 38, 186-189.
7. Clarke, J. M., Gillings, M. R., Altavilla, N., & Beattie, A. J. (2001). Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural

products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 46(3), 261-267.

8. Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., ... & Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and chemical toxicology*, 40(2-3), 193-236.
9. Duncan, D. R., & Widholm, J. M. (2004). Osmotic induced stimulation of the reduction of the viability dye 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride by maize roots and callus cultures. *Journal of plant physiology*, 161(4), 397-403.
10. Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., & Möllby, R. (2002). Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50(1), 63-73.
11. Stevens, M. G., Kehrl Jr, M. E., & Canning, P. C. (1991). A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Veterinary immunology and immunopathology*, 28(1), 45-56.
12. Von Mersi, W., & Schinner, F. (1991). An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodonitrotetrazolium chloride. *Biology and fertility of soils*, 11, 216-220.
13. Ponnusha, B. S., Subramaniam, S., & Pasupathi, P. (2011). Antioxidant and Antimicrobial properties of Glycine Max-A review. *Int J CurBioMedSci.*, 1(2), 49-62.
14. Milia, E. P., Sardellitti, L., & Eick, S. (2023). Antimicrobial Efficiency of Pistacia lentiscus L. Derivates against Oral Biofilm-Associated Diseases—A Narrative Review. *Microorganisms*, 11(6), 1378.

15. Gkogka, E., Hazeleger, W. C., Posthumus, M. A., & Beumer, R. R. (2013). The antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(6), 714-729.
16. Papada, E., & Kaliora, A. C. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory properties of mastiha: A review of preclinical and clinical studies. *Antioxidants*, 8(7), 208.
17. Al-Zaben, M., Zaban, M. A., Naghmouchi, S., Nasser Alsaloom, A., Al-Sugiran, N., & Alrokban, A. (2023). Comparison of Phytochemical Composition, Antibacterial, and Antifungal Activities of Extracts from Three Organs of *Pistacia lentiscus* from Saudi Arabia. *Molecules*, 28(13), 5156.
18. Reyes-Cerpa, S., Vallejos-Vidal, E., Gonzalez-Bown, M. J., Morales-Reyes, J., Pérez-Stuardo, D., Vargas, D., ... & Reyes-López, F. E. (2018). Effect of yeast (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) and plant (Saint John's wort, lemon balm, and rosemary) extract based functional diets on antioxidant and immune status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to crowding stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 74, 250-259.
19. Reichling, J., Weseler, A., & Saller, R. (2001). A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 34(Sup. 1), 116-118.4
20. Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(5), 583-600.
21. Silva, B. A., Malva, J. O., & Dias, A. C. (2008). St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. *Food Chemistry*, 110(3), 611-619.
22. Avato, P., Raffo, F., Guglielmi, G., Vitali, C., & Rosato, A. (2004). Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy Research: An*

23. Buccellato, F. (Ed.). (2018). Vanilla in perfumery and beverage flavors. *Handbook of vanilla science and technology*, 367-373.
24. Anuradha, K., Shyamala, B. N., & Naidu, M. M. (2013). Vanilla-its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties. *Critical reviews in foodscience and nutrition*, 53(12), 1250-1276.
25. Kamath, A. K., Nasim, I., Muralidharan, N. P., & Kothuri, R. N. (2022). Anti-microbial efficacy of Vanilla planifolia leaf extract against common oral microbiomes: A comparative study of two different antibiotic sensitivity tests. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 26(3), 330.
26. Shyamala, B. N., Naidu, M. M., Sulochanamma, G., & Srinivas, P. (2007). Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of agricultural and foodchemistry*, 55(19), 7738-7743.
27. Ojeda-Sana, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., & Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Foodcontrol*, 31(1), 189-195.
28. Alamprese, C., Cappa, C., Ratti, S., Limbo, S., Signorelli, M., Fessas, D., & Lucisano, M. (2017). Shelf life extension of whole-wheat breadsticks: Formulation and packaging strategies. *Foodchemistry*, 230, 532-539.
29. Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., ... & Liu, X. L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32(1), 63-68.

30. Sakanaka, S., & Ishihara, Y. (2008). Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Food Chemistry*, *107*(2), 739-744.
31. Matsuura, R., Moriyama, H., Takeda, N., Yamamoto, K., Morita, Y., Shimamura, T., & Ukeda, H. (2008). Determination of antioxidant activity and characterization of antioxidant phenolics in the plum vinegar extract of cherry blossom (*Prunus lannesiana*). *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(2), 544-549.
32. Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. G., & Walsh, T. J. (2002). Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *Journal of clinical microbiology*, *40*(9), 3204-3208.
33. An, W. F. (2009). Fluorescence-based assays. *Cell-based assays for high-throughput screening: methods and protocols*, 97-107.
34. Medina, A., Lambert, R. J., & Magan, N. (2012). Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: a tool for screening antifungal compounds. *Fungal biology*, *116*(1), 161-169.
35. Du Toit, E. A., & Rautenbach, M. (2000). A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of microbiological methods*, *42*(2), 159-165.
36. Cui, Z. H., He, H. L., Wu, S. B., Dong, C. L., Lu, S. Y., Shan, T. J., ... & Sun, J. (2021). Rapid screening of essential oils as substances which enhance antibiotic activity using a modified well diffusion method. *Antibiotics*, *10*(4), 463.

37. Rios, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84.
38. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219-236.
39. Buglass, A. J., & Caven-Quantrill, D. J. (2012). Applications of natural ingredients in alcoholic drinks. *Natural food additives, ingredients and flavourings*, 358-416.
40. Peltier, E., Bernard, M., Trujillo, M., Prodhomme, D., Barbe, J. C., Gibon, Y., & Marullo, P. (2018). Wine yeast phenomics: A standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions. *PLoS One*, 13(1), e0190094.
41. Peltier, E., Sharma, V., Martí Raga, M., Roncoroni, M., Bernard, M., Jiranek, V., ... & Marullo, P. (2018). Dissection of the molecular bases of genotype x environment interactions: a study of phenotypic plasticity of *Saccharomyces cerevisiae* in grape juices. *BMC genomics*, 19(1), 1-20.
42. Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 3(2), 135-140.
43. Liu, M., Seidel, V., Katerere, D. R., & Gray, A. I. (2007). Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*, 42(4), 325-329.
44. Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126.
45. Techaoei, S. (2022). Time-kill kinetics and antimicrobial activities of Thai medical plant extracts against fish pathogenic bacteria. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 13(1), 25.

46. Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4), 279-285.
47. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
48. Lall, N., Henley-Smith, C. J., De Canha, M. N., Oosthuizen, C. B., & Berrington, D. (2013). Viability reagent, PrestoBlue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. *International journal of microbiology*, 2013.
49. Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.
50. Redondo-Blanco, S., Fernández, J., López-Ibáñez, S., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2020). Plant phytochemicals in food preservation: Antifungal bioactivity: A review. *Journal of food protection*, 83(1), 163-171.
51. Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. (2019). Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Research International*, 119, 378-389.
52. Mitropoulou, G., Fitsiou, E., Stavropoulou, E., Papavassilopoulou, E., Vamvakias, M., Pappa, A., ... & Kourkoutas, Y. (2015). Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (dittany) essential oil. *Microbiological ecology in health and disease*, 26(1), 265-43.
53. Vashist, H., & Jindal, A. (2012). Antimicrobial activities of medicinal plants—Review. *Int J Res Pharm Biomed Sci*, 3(1), 222-230.
54. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85.
55. Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 170-175.
56. Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreira, C. (2013). Yeast: world's finest chef. In *Food Industry*. IntechOpen.

57. Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
58. Sicard, D., & Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes rendus biologies*, 334(3), 229-236.
59. Bosnić, T., Softić, D., & Grujić-Vasić, J. (2006). Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. *Acta Medica Academica*, 35(1), 9-14.