



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής
ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική
Υγιεινή»

Διπλωματική Εργασία

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΣΙΚΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

ΚΑΡΚΑΝΤΑ Κ. ΦΑΝΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ
ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής
ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική
Υγιεινή»

Διπλωματική Εργασία
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΣΙΚΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

ΚΑΡΚΑΝΤΑ Κ. ΦΑΝΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ
ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Πρώτος Εξεταστής (Επιβλέπων): Κωνσταντίνος Πετρωτός Αναπληρωτής καθηγητής,
Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων, ΤΕΙ Θεσσαλίας

Δεύτερος Εξεταστής: Ιωάννης Γιαβάσης Επίκουρος καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας
Τροφίμων , ΤΕΙ Θεσσαλίας

Τρίτος Εξεταστής: Ιωάννης Μποζιάρης Αναπληρωτής Καθηγητής , Τμήμα Γεωπονίας,
Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος , Σχολή Γεωπονικών Επιστημών,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΣΙΚΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΣΕ
ΣΚΟΝΗ**

ΚΑΡΚΑΝΤΑ ΦΑΝΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής
ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή», 2015

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Κωνσταντίνος Πετρωτός, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων, ΤΕΙ Θεσσαλίας

Στην οικογένειά μου

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΣΙΚΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε παραγωγή πρωτότυπων φυσικών αντιμικροβιακών σε μορφή σκόνης με συνδυασμένη χρήση δύο φυσικών ουσιών και συγκεκριμένα υγρού εκχυλίσματος ελιάς με την εμπορική ονομασία MEDOLIVA και υγρού εκχυλίσματος εσπεριδοειδών με την εμπορική ονομασία CITROX και συν-ενθυλάκωση τους σε μορφή σκόνης σε έκδοχο μαλτοδεξτρίνης με χρήση της καινοτόμου κρυογονικής τεχνολογίας της λυοφιλίωσης. Τα δείγματα σκόνης παρασκευάστηκαν με διαφορετικές αναλογίες μίξης των δύο φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών και στην συνέχεια δοκιμάστηκαν για αντιμικροβιακή δράση αρχικά με *in vitro* δοκιμές σε βακτήρια και μύκητες και στην συνέχεια *in vivo* σε δύο δείγματα τροφίμων και συγκεκριμένα σε λουκάνικα χωριάτικα και σε γιαούρτι. Τα βακτήρια στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές ήταν: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* ενώ οι μύκητες: *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium expansum* και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι στάνταρτ δοκιμές MIC (Minimum Inhibitory Concentration) και MBC (Minimum Bactericidal concentration) καθώς και οι μέθοδος προσδιορισμού της ζώνης αναστολής. Τα κύρια συμπεράσματα στις *in-vitro* δοκιμές ήταν ότι οι σκόνες που προέκυψαν με ενθυλάκωση πολυφαινόλης ή μόνο με ενθυλάκωση CITROX παρουσίαζαν σημαντικά μικρότερη (10 έως και 50 φορές) αντιμικροβιακή δύναμη σε σχέση με τις σκόνες συνεργισμού που προέκυψαν από μίγματα των δύο φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών μετά από ενθυλάκωση σε μαλτοδεξτρίνη με λυοφιλίωση τόσο για την περίπτωση των βακτηρίων όσο και για την περίπτωση των μυκήτων. Η ίδια τάση παρουσιάστηκε και κατά την εφαρμογή των νέων προϊόντων αντιμικροβιακής σκόνης στα δύο τρόφιμα μοντέλα κατά τις *in vivo* δοκιμές και οι άριστες αντιμικροβιακές σκόνες αποδείχθηκε ότι ήταν η σκόνη τύπου 20/16 (σύσταση: 20% στερεά πολυφαινόλης και 80% στερεά CITROX) και η τύπου 40/12 (σύσταση: 40% στερεά πολυφαινόλης και 60% στερεά CITROX). Επιπρόσθετα, από μετρήσεις χρώματος στα χωριάτικα λουκάνικα διαπιστώθηκε ότι οι παραπάνω δύο σκόνες παρουσιάζουν και θετική επίδραση στην διατήρηση ελκυστικού κόκκινου χρώματος ανάλογη με την αντίστοιχη επίδραση των παραδοσιακά χρησιμοποιούμενων νιτρωδών. Το βασικότερο συμπέρασμα της παρούσας εργασίας είναι ότι με συνδυασμό φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών και κατάλληλη ενθυλάκωση τους είναι δυνατόν να παραχθούν ισχυρότατα και ασφαλή φυσικά αυτηρητικά τροφίμων με ανάλογη δράση με τα παραδοσιακά χρησιμοποιούμενα σορβικά άλατα.

Λέξεις Κλειδιά: πολυφαινόλες, εκχυλίσματα, ελιά, εσπεριδοειδή, φυσικά συντηρητικά

PRODUCTION OF NATURAL ANTIMICROBIAL IN POWDER FORM

ABSTRACT

In the context of the present work, production of novel natural antimicrobial powders was carried out by combining two commercially available natural extracts and in particular: an olive fruit extract under the trademark MEDOLIVA and a citrus fruit extract commercialized under the trademark CITROX followed by co-encapsulation of them in maltodextrin carrier and by consequent drying by employing innovative cryogenic freeze drying technology. The above mentioned powder samples formulated at different mixing ratios of the two natural antimicrobial extracts and they were tested against food born bacteria and fungi initially by in-vitro test and as a second step by in vivo tests on model foods and particularly Greek village sausages and yogurt. The tested microorganisms were the food born bacteria: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* and the food born fungi: *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium expansum* and the used methods to test the antimicrobial activity of the powders against them were the standard methods MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal concentration) as well as the agar well method. The main conclusions of the conducted in vitro tests were that the powders containing solely polyphenols or CITROX presented substantially lower (10-fold to 50-fold reduction) antimicrobial power against both bacteria and fungi as compared to the powders formulated by mixing and synergism of the two respective natural antimicrobials. The same trend appeared in the in vivo assessment of the antimicrobial activity of the novel antimicrobial powders in model foods (Greek type village sausages and yogurt) and it was proved that the best performing powder on both bacteria and fungi were the powder type 20/16 (composition: 20% olive polyphenol solids and 80% CITROX solids) and type 40/12 (composition: 40% olive polyphenol solids and 60% CITROX solids). Furthermore, the color measurements carried out to the prepared sausage samples revealed that the use of the two above mentioned optimized natural powders had an identical beneficial effect regarding the preservation of an attractive red color like the traditional nitrate addition. The most important conclusion of the present work was that with combination of natural antimicrobial substances and proper co-encapsulation of them, powerful natural antioxidants can be formulated and produced with similar power to the conventional sorbates.

Keywords: polyphenols, extracts, olive, citrus, natural preservatives

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	i
Κατάσταση πινάκων.....	ii
Κατάσταση διαγραμμάτων.....	iii

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1^ο ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή 1.1 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΕΛΙΑΣ–ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	σελ. 1
1.1.1 Γενική χημική σύσταση.....	σελ. 2
1.2 Πολυφαινόλες.....	σελ. 3
1.3 Φυτικές πολυφαινόλες.....	σελ. 3
1.4 Ανεύρεση πολυφαινολών στη Φύση.....	σελ. 4
1.5 Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων.....	σελ. 5
1.6 Τα απόβλητα ελαιοτριβείων ως Α' ύλη για Παραγωγή πολυφαινολών... ..	σελ. 6
1.7 Πολυφαινόλες στον Κασίγαρο.....	σελ. 12
1.8 CitroX®.....	σελ. 13
1.9 Η ενθυλάκωση φυσικών ουσιών.....	σελ. 14
1.10 Εμπορική σημασία της ενθυλάκωσης-εφαρμογές.....	σελ. 17
1.11 ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΜΠΟΔΙΩΝ (HURDLE TECHNOLOGY).....	σελ. 19
1.11.1 Θεωρία των εμποδίων - η βάση του συνεργισμού αντι-μικροβιακών παραγόντων.....	σελ. 19
1.11.2 Οι φυτικές φαινόλες ως αντι – μικροβιακά.....	σελ. 23

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2^ο ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2 2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ. 25
--	---------

2.1.1.Μικροβιολογικά υποστρώματα και βοηθητικά υλικά μικροβιολογικών μετρήσεων.....	σελ.25
2.1.2. Υλικά παραγωγής λουκάνικων τύπου χωριάτικων.....	σελ. 26
2.1.3. Υλικά παραγωγής γιαουρτιού.....	σελ. 26
2.1.4. Υγρό εκχύλισμα πολυφαινολών ελιάς MEDOLIVA LIQUID®.....	σελ. 26
2.1.5. Υγρό εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX® ProGarda™.....	σελ. 28
2.2. Λυοφιλιωτής και μέθοδος λυοφιλίωσης.....	σελ. 29
2.3. . Όργανα- Εξοπλισμός.....	σελ. 29
2.3.1. Μέθοδος της λυοφιλίωσης.....	σελ. 29
2.3.2 Μέθοδος παραγωγής (formulation) μικτών σκονών συνεργισμού από πολυφαινόλη ελιάς (MEDOLIVA®) και CitroX®	σελ. 30
2.3.3. In vitro μελέτη της αντι-μικροβιακής δράσης σκονών πολυφαινολών & CitroX® σε παθογόνα βακτήρια.....	σελ. 31
2.3.4. In vitro μελέτη της αντι-μικροβιακής δράσης σκονών πολυφαινολών & CitroX® σε μύκητες-Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου (Penicillium expansum, Penicillium nalgiovense) μυκήτων έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντι-μικροβιακών ουσιών σε βοθρία.....	σελ. 32
2.4. Εφαρμογή των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε τρόφιμα.....	σελ. 32
2.4.1. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθυλακωμένων σκονών πολυφαινόλης-Citrox® σε λουκάνικα.....	σελ. 32
2.4.2. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθυλακωμένων δειγμάτων πολυφαινόλης-Citrox® σε γιαούρτια.....	σελ. 33
Κεφάλαιο 3 3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ. 34
3.1.1. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum inhibitory concentration MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος δράση (Minimum bacteriocidal concentration MBC).....	σελ. 34
3.2. Μετρήσεις Οπτικής πυκνότητας για τα διάφορα βακτήρια.....	σελ. 36
3.3. Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου (Penicillium expansum, Penicillium nalgiovense) μυκήτων έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία (Μέθοδος βοθρίων για μύκητες).....	σελ. 41
3.4. In-Vivo Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθυλακωμένων σκονών συνεργισμού πολυφαινόλης-Citrox® σε λουκάνικα.....	σελ. 42

3.5. In-Vivo Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθυλακωμένων σκονών
συνεργισμού πολυφαινόλης - CitroX[®] σε γιαούρτια-Δοκιμές με τον μύκητα
P.exransum..... σελ. 47

Κεφάλαιο 4 4.1 ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ..σελ.49

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... σελ. 51

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑσελ. 57

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια:

Από κοινού στις Εγκαταστάσεις της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στα Εργαστήρια της Σχολής Τεχνολόγων Γεωπόνων του ΤΕΙ Θεσσαλίας.

Για την εκπόνηση και την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα πρώτα απ' όλα, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας μου, αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό, που με τις γνώσεις και το ενδιαφέρον του, με βοήθησε να γράψω σωστά την εργασία μου και να επιλέξω το κατάλληλο θέμα πτυχιακής.

Ευχαριστώ ακόμα τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου: κ. Ιωάννη Γιαβάση, Επίκουρο καθηγητή του ΤΕΙ Θεσσαλίας και τον κ. Ιωάννη Μποζιάρη, Αναπληρωτή καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες υποδείξεις τους κατά την διόρθωση της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης θα ήταν σημαντική παράλειψη να μην ευχαριστήσω την Τεχνολόγο Τροφίμων κ. Χρυσάνθη Μιτσάγγα για την σημαντική βοήθεια και τεχνική υποστήριξη στην διεξαγωγή των μικροβιολογικών αναλύσεων και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων που παρατίθενται στην παρούσα πτυχιακή εργασία

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και όλα τα αγαπημένα μου πρόσωπα για την κατανόηση, την υποστήριξη και την βοήθειά τους, καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Καρκαντά Κ.Φανή Λάρισα, 2018

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας I. Σύσταση του μεσοκαρπίου της ελιάς	Σελ.2
ΠίνακαςII. Ενδεικτική περιεκτικότητα απόνερων σε διάφορα συστατικά	Σελ.2
ΠίνακαςIII. Γενικά χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (Sierra et al., 2001)	Σελ.7
Πίνακας IV : Μέση σύσταση των αποβλήτων ελαιουργείων.	Σελ. 8
ΠίνακαςV: Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων ελαιοτριβείου(Fiestas& Borja1992, Hamdi & Ellouz 1992).	Σελ. 9
Πίνακας VI: Κύρια συστατικά των αποβλήτων ελαιοτριβείου (Zervakis &Balis 1996).	Σελ. 10
Πίνακας VII: Σύγκριση κυρίων χαρακτηριστικών των αποβλήτων ελαιοτριβείου από κλασσικά και φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία (Fiestas & Borja 1992, Μπαλατσούρας 1997).	Σελ.11
Πίνακας VIII. Συγκεντρώσεις πολυφαινολών στον Κατσίγαρο. (Lesage et.al.,2001).	Σελ.12
Πίνακας IX. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των ουσιών στα παρακάτω παθογόνα βακτήρια.	Σελ.34
Πίνακας X. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) των ουσιών στα παρακάτω παθογόνα βακτήρια	Σελ.35
ΠίνακαςXI. Μέτρηση της διαμέτρου του μικκυλίου του μύκητα <i>P.nalgiovense</i> (cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία στο κέντρο του τρυβλίου.	Σελ.41
Πίνακας XII. Μέτρηση της διαμέτρου του μικκυλίου του μύκητα <i>P.expansum</i> (cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία στο κέντρο του τρυβλίου.	Σελ.42

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα I. Αριθμός αναφορών από τα αποτελέσματα	Σελ.11
Διάγραμμα II. Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου E.coli έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.	Σελ.37
Διάγραμμα III: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου S.typhimurium έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις	Σελ.37
Διάγραμμα IV: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου B.cereus έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.	Σελ.38
Διάγραμμα V : Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου S.aureus έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.	Σελ.38
Διάγραμμα VI: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου L.monocytogenes έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.	Σελ.39
Διάγραμμα VII: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου Cl.perfringens έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.	Σελ.39
Διάγραμμα VIII : Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου C.jejuni έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.	Σελ.40
Διάγραμμα IX : Τα log cfu/gr του πληθυσμού των Enterobacteriaceae στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα	Σελ.43
Διάγραμμα X : Τα log cfu /gr του πληθυσμού για ζύμες/Μύκητες στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα	Σελ.44
Διάγραμμα XI : Τα log cfu/gr του πληθυσμού Brochontrix thermosphacta στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των	Σελ.44

φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα	
Διάγραμμα XII : Τα log cfu/gr Θειαναγωγικά Clostridium στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα	Σελ.45
Διάγραμμα XIII: Μέτρηση pH των δειγμάτων που προέρχεται από την προσθήκη των αντι-μικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα στις διαφορετικές μέρες της δειγματοληψίας	Σελ.45
Διάγραμμα XIV: Μέτρηση της τιμής L των δειγμάτων που προέρχεται από την προσθήκη των αντι-μικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα στις διαφορετικές μέρες της δειγματοληψίας	Σελ.46
Διάγραμμα XV : Μέτρηση της τιμής a των δειγμάτων που προέρχεται από την προσθήκη των αντι-μικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα στις διαφορετικές μέρες της δειγματοληψίας	Σελ.46
Διάγραμμα XVI: Μέτρηση της διαμέτρου του μικκυλίου του μήκητα P.expansum (cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών και συντήρηση τους στους 4°C	Σελ.47
Διάγραμμα XVII : Μέτρηση της διαμέτρου του μικκυλίου του μήκητα P.expansum (cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών και συντήρηση τους στους 8 °C	Σελ.48

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΕΛΙΑΣ–ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

1.1.1. Γενική χημική σύσταση

Ο καρπός της ελιάς της Ευρωπαϊκής, που έχει ωοειδές σχήμα, αποτελείται από το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο (πυρήνας). Κατά μέσο όρο ζυγίζει 2-12 g αν και ο καρπός κάποιων ποικιλιών μπορεί να έχει βάρος μέχρι 20 g. Το περικάρπιο αποτελείται από το επικάρπιο (φλοιό ή επιδερμίδα) και το μεσοκάρπιο (ή σάρκα). Το μεσοκάρπιο αποτελεί 65-83 % του συνολικού βάρους του περικαρπίου και περιέχει το ελαιόλαδο στα ελαιосώματα . Το επικάρπιο περιβάλλεται από κηρούς και το χρώμα του μεταβάλλεται από πράσινο σε μαύρο κατά την ωρίμανση του καρπού (Εγκυκλοπαίδεια της Ελιάς, 1996). Ο ελαιόκαρπος είναι πλούσιος σε νερό(μέχρι 70 %). Η σύσταση του ελαιόκαρπου δίνεται στον **Πίνακα I**. Μερικά από τα υδατοδιαλυτά συστατικά ή τα προϊόντα της υδρόλυσής τους,όπως οι απλές και σύνθετες φαινόλες, μεταφέρονται και στο ελαιόλαδο κατά την παραλαβή του από τον ελαιόκαρπο. Τα περισσότερα όμως από αυτά απομακρύνονται κατά τη φυγοκέντρηση του ελαίου

Πίνακας I Σύσταση του μεσοκαρπίου της ελιάς

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΟΣΟΣΤΟ (%)	
Υγρασία	60-75
Ολικά λιπίδια (λίπος)	10-25
Ανάγοντα σάκχαρα	3-6
Μη ανάγοντα σάκχαρα	<0,3
Μαννιτόλη	0,5-1,0
διαιτητικές ίνες	1-4
Ολικές πρωτεΐνες (N x 6,25)	1-2
Τέφρα	<1.0
Ολικές φαινόλες	2-3
Πηκτινικές ύλες	<0,6
Άλλα συστατικά	3-7

ΠΗΓΗ : Ferdando Diez *et al.*, 1985; Garrido Fernandez *et al.*, 1997

Πίνακας II. Ενδεικτική περιεκτικότητα अपόνερων σε διάφορα συστατικά

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (%)	
Νερό	87,5
Σάκχαρα	2,8
Αζωτούχες ουσίες	2,4
Οργανικά οξέα	1,5
Πηκτίνες	1,5
Ελαιόλαδο	1,0
Άλατα	0,8

ΠΗΓΗ : Εγκυκλοπαίδεια της Ελιάς, 1996; Garrido Fernandez *et al.*, 1997).

Κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου στο ελαιουργείο, πραγματοποιείται διάλυση των κολλοειδών ουσιών (πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών) οι οποίες είναι υδατοδιαλυτές και συνυπάρχουν με τις φαινολικές και αυτό συντελεί στη μερική διάλυση των φαινολικών ουσιών. Η διάλυση αυτή έχει ως συνέπεια ένα μεγάλο μέρος των φαινολικών ουσιών, οι οποίες υπάρχουν στη σάρκα του καρπού, να απομακρύνονται με τα απόνερα (Ninfali *et al.*, 2001). Για το λόγο αυτό προσδιορίζονται στα απόνερα το σύνολο των απλών και πολύπλοκων φαινολικών ουσιών οι οποίες περιέχονται στον καρπό. Γι' αυτό έχουν αναπτυχθεί τεχνολογίες παραλαβής των πολυφαινολών από τα απόνερα (Visioli *et al.*, 1999; Skaltsounis *et al.*, 2004; Crea, 2005). Η σύσταση των απόνερων δίνεται στο Πίνακα. Στα κλασικά συγκροτήματα όπου εφαρμόζεται υψηλή πίεση στην ελαιοζύμη, το έλαιο διαχωρίζεται μηχανικά σε υδραυλικές πρέσες (σε πιέσεις που μπορεί να ανέλθουν ακόμη και σε 400 atm). Η τεχνική αυτή είναι η παλαιότερη και η χρήση της σήμερα είναι πολύ περιορισμένη. Στην περίοδο 1970-80 τα κλασικά συγκροτήματα αντικαταστάθηκαν σε μεγάλο βαθμό από τα φυγοκεντρικά συγκροτήματα τριών φάσεων, ενώ πιο πρόσφατη είναι η χρήση των φυγοκεντρικών συγκροτημάτων δυο φάσεων. Για το διαχωρισμό του ελαίου από την ελαιοζύμη χρησιμοποιείται και η τεχνική της συνάφειας. Συγκρότημα τριών φάσεων. Στο συγκρότημα αυτό προστίθεται στη φυγόκεντρο απόχυσης (decanter) άφθονο νερό (περίπου το 40-60 % του βάρους της ελαιοπάστας) θερμοκρασίας 28-35°C. Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτουν τρεις φάσεις. Η ελαιώδης φάση, τα υγρά του καρπού (vegetation water) διαλυμένα στο επιπλέον νερό που προστέθηκε (η φάση αυτή είναι και τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου) και τα στερεά του καρπού (πούλπα). Μειονέκτημα των συγκροτημάτων αυτού του τύπου είναι τα αυξημένα απόβλητα του ελαιοτριβείου, η αυξημένη κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας και η απομάκρυνση σε μεγαλύτερο βαθμό πολύτιμων ησσόνων συστατικών του ελαιολάδου, όπως οι πολικές φαινόλες, μαζί με τα απόβλητα. Συγκρότημα δυο φάσεων. Στο συγκρότημα αυτό δεν

προστίθεται νερό στη φυγόκεντρο απόχυσης. Μετά τη φυγοκέντρωση προκύπτουν δυο φάσεις, το έλαιο (40 %) και η υγρή πούλπα (60 % νερό). Η ανάκτηση του ελαίου είναι χαμηλότερη στα συγκροτήματα δυο φάσεων σε σχέση με αυτή στα συγκροτήματα τριών φάσεων, αλλά το ελαιόλαδο που παραλαμβάνεται είναι υψηλότερης ποιότητας (πλουσιότερο σε πολικές φαινόλες και ο-φαινόλες που συμβάλλουν στην οξειδωτική σταθερότητά του). Παράλληλα, μειώνονται κατά πολύ τα υγρά απόβλητα (απόνερα) του ελαιοτριβείου, παράγεται όμως μια μεγάλη ποσότητα υγρής «πούλπας» ή “alreogujó” (όπως είναι γνωστή στην ισπανική γλώσσα) που η διαχείρισή της είναι δύσκολη από οικονομική και οικολογική άποψη (Petraakis, 2006). Συγκροτήματα διαχωρισμού με την αρχή της συνάφειας. Τα συγκροτήματα αυτά αποτελούνται από χαλύβδινα κωνικά ελάσματα που βυθίζονται στην ελαιοζύμη. Εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς μεταξύ της επιφανειακής τάσης του ελαίου και της επιφανειακής τάσης του νερού, τα σταγονίδια του ελαίου προσκολλώνται στα ελάσματα με την επίδραση των δυνάμεων συνάφειας. Το πιο επιτυχημένο συγκρότημα, που πρωτοπαρουσιάστηκε το 1972 και από τότε βελτιώνεται συνεχώς, είναι το συγκρότημα «Sinolea» όπου σε συνεχή διεργασία συνδυάζεται ο διαχωρισμός με συνάφεια με τη φυγοκέντρωση. Το ελαιόλαδο που παραλαμβάνεται είναι υψηλής ποιότητας αφού έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες και εξαιρετικά οργανοληπτικά είναι πλουσιότερες από τις ελληνικές σε πολικές φαινόλες), το σύστημα θραύσης που θα χρησιμοποιηθεί και το χρόνο μάλαξης, είναι δυνατό να παραληφθεί ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες. Η χρήση άλλων μεθόδων για τη βελτίωση της ποιότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, π.χ. με χρήση πηκτινολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων, δεν είναι αποδεκτή από το διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, αφού το ελαιόλαδο παράγεται εξ’ ορισμού μόνο με χρήση φυσικών και μηχανικών μέσων.

1.2 Πολυφαινόλες

Με τον όρο πολυφαινόλες χαρακτηρίζεται μια μεγάλη ετερογενής ομάδα ενώσεων με κοινό χαρακτηριστικό το ότι φέρουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απευθείας σε ένα ή περισσότερους αρωματικούς και ή και ετεροκυκλικούς πυρήνες. Είναι γνωστές ως τώρα περισσότερες από 8000 πολυφαινόλες και στα φυτά περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. (Χριστοφορίδου Σ., 2001).

1.3 Φυτικές πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες προκύπτουν ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Τις συναντάμε στην φύση συνδεδεμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα συζευγμένα ζάχαρα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή και ολιγοσακχαρίτες. Το πιο κοινό σάκχαρο είναι η γλυκόζη ενώ άλλα σάκχαρα είναι η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη κ.

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών, οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά:

Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά με σημαντική βιολογική δράση. Δρουν ως αντιοξειδωτικά και με παρόμοια δράση με αυτή των ορμονών. Παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, του χρώματος και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών. Τα φρούτα, τα λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, ο καφές και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινολών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές

πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et. al., 2005).

Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν για κάθε είδος φυτού και στα διάφορα μέρη του. Οι ταννίνες, οι λιγνίνες και τα φλαβονοειδή είναι υποκατηγορίες των πολυφαινολών

1.4 Ανεύρεση πολυφαινολών στη Φύση

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στα εδώδιμα φυτά όπως στα λαχανικά, στα δημητριακά, στα όσπρια, στα φρούτα, στους ξηρούς καρπούς, κλπ. και στα ποτά όπως στο κρασί, μύρα, τσάι, κακάο, κλπ. Βέβαια, διαφορές στη συγκέντρωση πολυφαινολών υπάρχουν ακόμη και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους, καθώς η παρουσία των πολυφαινολών στα φυτά όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα επηρεάζεται πολύ από παράγοντες όπως οι γενετικοί, η βλάστηση, ο βαθμός ωρίμανσης, η ποικιλία, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Hermann, 1988; Porter, 1989; Mazza, 1995).

Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες των φυτικών τροφίμων μπορεί να κυμαίνεται σε αρκετά ευρύ όρια. Στα όσπρια και τα δημητριακά, οι κυριότερες πολυφαινόλες είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, και οι ταννίνες, με την περιεκτικότητα συνήθως να είναι λιγότερη από το 1% της ξηρής ύλης. Όσον αφορά στα όσπρια, την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχουν οι σκούρες ποικιλίες, όπως τα κόκκινα και τα μαύρα φασόλια. Οι ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη, ανευρίσκονται στα περισσότερα όσπρια, ενώ τα λαχανικά περιέχουν κυρίως τους φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Επιπλέον, φρούτα όπως τα μήλα και τα εσπεριδοειδή είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, ενώ οι φλαβανόνες είναι άφθονες σε εσπεριδοειδή και δαμάσκηνα. Η κύρια φαινολική ένωση στα φρούτα είναι η φλαβονόλη και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συναντώνται στο φλοιό (Kuhnau, 1976).

Ακολούθως, το τσάι περιέχει κυρίως κατεχίνες οι κυριότερες από τις οποίες είναι: ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), η επιγαλλοκατεχίνη (EGC), ο γαλλικός εστέρας επικατεχίνης (ECG) και η επικατεχίνη (EC), ενώ οι κύριες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η μυρισετίνη και ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες από τις κατεχίνες. Η EGCG είναι η πιο άφθονη κατεχίνη στο τσάι (50-60% του συνόλου των κατεχινών) και θεωρείται το δραστικό συστατικό του. Αναλυτικότερα, το πράσινο τσάι είναι πολύ πλούσιο σε φλαβανόλες, ενώ το μαύρο περιέχει μεγάλες ποσότητες οξειδωμένων πολυφαινολών όπως είναι οι θεαφλαβίνες και οι θεαρουμπιγίνες (Shao, et. al., 1995). Στο κακάο τώρα, η κυριότερη πολυφαινόλη στους σπόρους, είναι η φλαβανόλη επικατεχίνη, ενώ παρουσιάζεται υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και ταννίνες. Τέλος στο κρασί, οι πολυφαινόλες αποτελούνται από φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, ταννίνες και άλλα.

Στο ελαιόλαδο τώρα, περιέχονται φαινολικά οξέα και υδρολυόμενες ταννίνες (Visioli & Galli, 1998). Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν το πολικό κλάσμα του και εμποδίζουν την αυτοοξείδωσή του, αποδίδοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την εξαιρετική θερμική σταθερότητά του και συνεισφέροντας στο χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση (Tsimidou, et. al., 1992; Ντζιαδήμας Βασίλειος 2013).

1.5 Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης στις ελαιοκομικές περιοχές αλλά και ένα σημαντικό πρόβλημα προς επίλυση για τη γεωργική βιομηχανία. Οι κυριότεροι λόγοι είναι:

1. Η μεγάλη παραγωγή αποβλήτων μέσα σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, τα οποία θα πρέπει, ιδανικά, να κατεργαστούν ή να διατεθούν με ασφάλεια για το περιβάλλον πριν αρχίσει η επόμενη παραγωγική περίοδος. Αν και οι παραγόμενοι όγκοι αποβλήτων εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως την ποικιλία του ελαιόκαρπου, το στάδιο ωριμότητας, το χρόνο αποθήκευσης πριν την ελαιοποίηση, το χρόνο διαχωρισμού του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη, το διαθέσιμο νερό στο ελαιοτριβείο και το κόστος προμήθειάς του, σε γενικές γραμμές για κάθε 100 κιλά ελαιόκαρπου παράγονται 100-120 κιλά υγρών αποβλήτων, με μέση ημερήσια τιμή ανά ελαιοουργείο 15-20 τόνους.
2. Τα φυσικό-χημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων, κάποια από τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σημαντική επιβάρυνση στους αποδέκτες που διατίθενται (π.χ. ευτροφισμός, εκδήλωση τοξικών φαινομένων στην υδρόβια πανίδα, φυτοτοξικότητα, αισθητική υποβάθμιση).
3. Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των αποβλήτων, το οποίο αποτελείται από ενώσεις άμεσα διασπώμενες (π.χ. σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα, πρωτεΐνες), από ενώσεις δύσκολα διασπώμενες (π.χ. μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες, πολυφαινόλες). Οι πολυφαινόλες περιέχονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα απόβλητα και είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση βιοτοξικών φαινομένων στους φυσικούς αποδέκτες.

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχουν επίσης πολλά ανόργανα συστατικά (ενώσεις του αζώτου και του φωσφόρου, νάτριο, κάλιο, σίδηρο, κ.α.). Αν και τα ανόργανα αυτά συστατικά δεν είναι τοξικά, εν τούτοις η μεγάλη συγκέντρωσή τους και η επαναλαμβανόμενη διάθεσή τους μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στο περιβάλλον.

Τα απόβλητα χαρακτηρίζονται από :

- Έντονα ιώδες-σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα
- Πολύ έντονη μυρωδιά ελαιόλαδου
- Πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο(τιμές COD μέχρι και 220 g/l)
- Τιμές PH μεταξύ 3 και 6
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινόλικων ενώσεων (από 0,5 έως 24g/l)
- Μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία

Όσον αφορά τη σύσταση των υγρών και των στερεών αποβλήτων της ελαιοουργίας θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι τιμές που δίνονται στη βιβλιογραφία διαφέρουν. Αυτό είναι λογικό αν σκεφτεί κανείς ότι τα ελαιοουργεία έχουν εποχιακή λειτουργία, καθημερινά παραλαμβάνουν και ελαιοποιούν ελαιόκαρπο διαφορετικής προέλευσης-μεταχείρισης- ποικιλίας αλλά και χρησιμοποιούν διαφορετική τεχνολογία. Συνεπώς μόνο μία ιδέα μπορεί να σχηματιστεί και αυτή αφορά κυρίως το εύρος διακύμανσης των παραμέτρων.

1.6 Τα απόβλητα ελαιοτριβείων ως Α' ύλη για Παραγωγή πολυφαινολών

Τα απόβλητα ελαιοτριβείων, συγκαταλέγονται στα κατ' εξοχήν βεβαρημένα από πλευράς ρυπαντικού φορτίου γεωργικά βιομηχανικά απόβλητα. Συγκεκριμένα, ένα μεσαίου μεγέθους ελαιοτριβείο παράγει περίπου 1.000 tn απόβλητα ανά περίοδο συγκομιδής ελαιοκάρπου με οργανικό φορτίο το οποίο ισοδυναμεί με τα ετήσια απόβλητα μιας πόλης 30.000 κατοίκων. Σχετικά με τη σύσταση και την παραγωγή του κατσίγαρου έχουν γίνει μελέτες σε διαφορετικές περιοχές και συνθήκες λειτουργίας. Οι μελέτες αυτές συμφωνούν ως προς τα γενικά χαρακτηριστικά, όπως την υψηλή τοξικότητα και το οργανικό φορτίο, τις εμπεριεχόμενες ουσίες και το μέγεθος της παραγωγής. Παρουσιάζουν όμως κάποιες όχι μεγάλες διαφορές στα ποσοτικά αποτελέσματα. Μέρος των διαφορών αυτών οφείλεται στους εναλλακτικούς τρόπους επεξεργασίας του ελαιοκάρπου (π.χ. κλασσικό ή φυγοκεντρικό ελαιοτριβείο). Επιπλέον, η σύστασή τους ποικίλει ανάλογα με τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες, την ποικιλία των ελαιοκάρπων, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, τη χρήση παρασιτοκτόνων και λιπασμάτων, τον τρόπο συγκομιδής και αποθήκευσης του (Cabreza et al., 1996).

Επίσης, οι μετρούμενες διαφορές ίσως να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες δειγματοληψίας του κατσίγαρου, π.χ. αμέσως μετά την παραγωγή ή αφού περάσουν κάποιες ημέρες, από ανοιχτή ή κλειστή δεξαμενή απόθεσης, δείγμα επιφανειακό ή βάθους. Στους (Πίνακες III, IV) που ακολουθούν φαίνονται τα γενικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων τριών φάσεων, όπως ανέκυψαν από διάφορες ερευνητικές εργασίες.

Πίνακας III. Γενικά χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (Sierra et al., 2001).

Παράμετροι	Τιμές
PH	4.5-6
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο, (BOD 5 g/l)	35-100
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, (COD g/l)	40-195
Ολικός οργανικός άνθρακας, (TOC g/l)	22-64
Λίπη (g/l)	0.3-23
Ανόργανα στοιχεία (g/l)	5-14
Πολυφαινόλες (g/l)	3-24
N (g/l)	5-15
P (g/l)	0.3-1.1
K (g/l)	2.7-7.2
Ca (g/l)	0.12-0.75
Mg (g/l)	0.10-0.40
Na (g/l)	0.04-0.90
Στερεά %	5.5-17.6

Πίνακας IV : Μέση σύσταση των αποβλήτων ελαιουργείων.

Παράμετρος	Τιμή	Οργανικές ουσίες	Τιμή	Ανόργανα στοιχεία	Τιμή
pH		Ολικά σάκχαρα	1 %	P	96 ppm
BOD(Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο)	30.000-40.000 ppm	Αζωτούχες ενώσεις	0.28 %	K	1200 ppm
COD(Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο)	45.000-60.000 ppm	Οργανικά οξέα	0.3 %	Ca	120 ppm
Στερεά αιωρούμενα	0.9	Πολυαλκοόλες	1.1 %	Mg	48 ppm
Στερεά ολικά	4.0 %	Πολυπηκτίνες, τανίνες κλπ	1.37 %	Na	245 ppm
Στερεά οργανικά	3.5 %	Πολυφαινόλες	0.5 %	Fe	16 ppm
Στερεά ανόργανα	0.5 %				

Πίνακας V : Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων ελαιοτριβείου (Fiestas& Borja1992, Hamdi & Ellouz 1992).

Παράμετρος	Όρια τιμών
Νερό %	83-94
Οργανικά συστατικά %	4-16
Ανόργανα συστατικά %	1-2
Πυκνότητα (g/cm³)	1,024
Αγωγιμότητα (μS/ cm)	8.0000-160000
pH	4,5-6,5
Βιολογικά απαιτούμενα οξυγόνο (BOD₅) mg/l	14.000-110.0000
Χημικά απαιτούμενα οξυγόνο (COD) mg/l	41.400-130.000

Πίνακας VI: Κύρια συστατικά των αποβλήτων ελαιολιβεύου(Zervakis & Balis 1996).

Συστατικό	Συγκέντρωση(%)	Κύρια συστατικά
Νερό	83-92	
Λίπη	0,03-1,00	Υπολείμματα ελαίου
Αζωτούχες ουσίες	1,2-2,4	Γλουταμίνη, Γλυκίνη, Αργινίνη, Ιστιδίνη, Προλίνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη, Λυσίνη, Μεθειονίνη, Γλυκοζαμίνη κ.ά.
Σάκχαρα	2,0-8,0	Ραφινόζη, Μανόζη, Σακχαρόζη, Γλυκόζη, Αραβινόζη, Ραμνόζη, Γαλακτόζη, Ξυλόζη,
Οργανικά οξέα	0,5-1,5	Γαλακτικό, Μηλικό, Μηλονικό, Οξαλικό, Τρυγικό, Φουμαρικό
Πολυαλκοόλες	0,5-1,5	Γλυκερίνη, Μανιτόλη
Πηκτίνες, Ταννίνες	0,4-1,5	
Ανόργανα συστατικά	0,4-1,5	K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, S

Πίνακας VII: Σύγκριση κυρίων χαρακτηριστικών των αποβλήτων ελαιοτριβείου από κλασσικά και φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία (Fiestas & Borja 1992, Μπαλατσούρας 1997).

Χαρακτηριστικά	Τύπος Ελαιοτριβείου	
	Κλασσικό	Φυγοκεντρικό
Αλατότητα (mmhos /cm)	8-16	8-16
pH	4.5-5	4.7-5.2
Ρυπογόνο Δυναμικό		
COD (kg/m ³)	120-130	45-60
BOD ₅ (kg/m ³)	190-100	35-48
Αιωρούμενα στερεά (g/l)	1	9
Ολικά στερεά(g/l)	120	60
Στερεά οργανικά (g/l)	15	5

Από τα συστατικά του κατσίγαρου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινόλες, οι οποίες ως αντιοξειδωτικές ουσίες εμποδίζουν τη διάσπαση των γλυκεριδίων προς λιπαρά οξέα και βοηθούν στη διατήρηση του λαδιού (Tsimidou et al., 1992 Ryan and Robards et al., 1998). Είναι όμως και η κύρια ρυπαντική παράμετρος, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων. Τα ανόργανα συστατικά των αποβλήτων του ελαιοτριβείου όπως το Κάλιο, ο Φώσφορος, το Μαγνήσιο καθώς και πολλά ιχνοστοιχεία παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης λιπαντικής τους αξίας. Στα φαινολικά που έχουν ανιχνευθεί θα πρέπει να προστεθούν επίσης πολυμερείς ουσίες καστανόμαυρου χρώματος που παράγονται δευτερογενώς μέσω ενζυμικών αντιδράσεων που αρχίζουν αμέσως μετά την έκθλιψη του ελαιοκάρπου (Saiz-Jimenez et al. 1986). Γενικά οι οργανικές ουσίες των αποβλήτων του ελαιοτριβείου μπορούν να διαχωριστούν σε ενώσεις άμεσα διασπούμενες (π.χ. σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα), βιοαποδομήσιμα πολυμερή (πρωτεΐνες, ημικυταρρίνες) και δύσκολα διασπώμενα συστατικά όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες και φαινολικές ενώσεις (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης, 2000). Οι Visioli & al. (1995) αναφέρουν ότι τα εκχυλίσματα των αποβλήτων ελαιοτριβείου διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια φθηνή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Παρά το ότι το πιο σημαντικό από ποσοτική άποψη τμήμα του οργανικού κλάσματος καταλαμβάνουν τα σάκχαρα από ποιοτική άποψη οι πολυφαινόλες και οι λιπαρές ουσίες είναι τα πιο σημαντικά συστατικά, διότι προσδίδουν στα απόβλητα ελαιοτριβείου ανεπιθύμητες ιδιότητες (χρώμα, φυτοτοξικότητα, εμμονή στο περιβάλλον). Η συγκέντρωση μικροοργανισμών στα απόβλητα του ελαιοτριβείου είναι της τάξης των 10⁵ cfu/ml πιο κοινοί είναι βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ή μικροοργανισμοί που χαρακτηρίζονται από την

ικανότητα τους να μετασχηματίζουν δύσκολα διασπώμενα συστατικά, όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες, και φαινολικά συστατικά. Επίσης συναντάμε ζύμες του γένους *Saccharomyces* και μύκητες *Penicillium* και *Aspegillus*. Άλλοι μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από ελαιόκαρπο είναι στελέχη μυκήτων και βακτηρίων από τα γένη *Aerobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium* (Fiestas & Borja, 1992).

1.7 Πολυφαινόλες στον Κατσίγαρο

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει εκδηλωθεί ένα τεράστιο ενδιαφέρον, που αφορά την εξαγωγή των πολυφαινολών από τα απόβλητα του ελαιοτριβείου. Αυτά είναι ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά κυρίως του κουκουτσιού, τα φύλλα ελιάς που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιόκαρπο και μια σημαντική ποσότητα (σε όγκο και οργανικό φορτίο) υγρών αποβλήτων που είναι γνωστά ως ‘λιοζούμι’ ‘κατσίγαρος’ ή ‘μούργκα’.

Ο κατσίγαρος αποτελεί ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μια σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου.

Οι φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στον κατσίγαρο είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές αλκοόλες (Πίνακας VI) (Πετρωτός Κ.; Γερασόπουλος Κ., 2012).

Πίνακας VIII. Συγκεντρώσεις πολυφαινολών στον Κατσίγαρο. (Lesage et.al.,2001).

Φαινολικά Συστατικά	Εύρος Τιμών (mg/L)
tyrosol	5-100
hydroxytyrosol	35-130
Caffeic acid	4-12
Elenolic acid	17-1430
luteolin	2-623
Cinnamic acid	1-118

1.8 CitroX[®]

Το CitroX[®] είναι ένα φυσικό σκεύασμα που προέρχεται από το εκχύλισμα εσπεριδοειδών (Hopper et al, 2011). Τα προϊόντα CitroX[®] είναι μη τοξικά, υποαλλεργικά, χρησιμοποιούνται ως φυσικά απολυμαντικά για να αντικαταστήσουν τα παραδοσιακά απολυμαντικά σε πολλά τμήματα της τροφικής αλυσίδας (López-Gálvez et al, 2009). Τα βασικά χαρακτηριστικά του CitroX[®] είναι ότι:

- Παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας μόνο φυσικά παραγόμενα, μη τοξικά, υποαλλεργικά και μη-διαβρωτικά συστατικά. Ακόμα είναι μη-μεταλλαξιογόνο, δεν έχει έντονους χρωματισμούς, είναι μη-καρκινογόνο και δεν είναι επικίνδυνο για τον άνθρωπο.
- Είναι πλήρως βιοδιασπώμενο, ασφαλές και φιλικό προς το περιβάλλον
- Είναι οργανικά συμβατό ενεργό αντιμικροβιακό συστατικό
- Εύκολο στο χειρισμό: μη-επιβλαβή για τον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον
- Δεν περιέχει πετροχημικά
- Δεν περιέχει αλλεργιογόνες ουσίες
- Δεν περιέχει συνθετικά αρώματα ή χρωστικές ουσίες
- Δεν έχει δοκιμαστεί σε ζώα
- Χωρίς Γενετικά Τροποποιημένους Οργανισμούς
- Είναι αποτελεσματικό σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (στο νερό)
- Παρατείνει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων και μειώνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς. (Medigan, R. 2011).

Τα προϊόντα CitroX[®] χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, στην επεξεργασία τροφίμων, στη βιομηχανία αρτοποιίας και στη βιομηχανία κρασιού. Στην συνέχεια, παρουσιάζονται μερικές εφαρμογές του CitroX[®] στην βιομηχανία τροφίμων.

Σε μια πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος CitroX[®] στην φυσιολογική μικροχλωρίδα αλλά και σε εμβολιασμένους μικροοργανισμούς όπως ο *Bacillus cereus* και η *Salmonella enterica* σε σαλάτα τζατζίκι. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1ml/kg και 2 ml/kg ενώ τα δείγματα της σαλάτας τζατζίκι ήταν συσκευασμένα υπό κενό και οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ήταν οι 4°C και 10°C. Αρχικά, και οι δυο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν αποδεκτές όσον αφορά την γεύση. Γενικά, παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στον πληθυσμό του *Bacillus cereus* και της *Salmonella enteric* και στις δυο θερμοκρασίες που μελετήθηκαν και κυρίως από την 12^η μέρα της ανάλυσης μέχρι και την 70^η με μείωση του πληθυσμού των δυο παθογόνων κατά 2,5 logcfu/gr σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που εμβολιάστηκαν τα δείγματα που ήταν περίπου 6 log cfu/gr (Tsiraki, Savvaidis, 2016).

Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα του CitroX[®] για την αύξηση της διάρκειας ζωής ακατέργαστου κοτόπουλου σε συνδυασμό με την απορρόφηση του οξυγόνου. Η θερμοκρασία συντήρησης των δειγμάτων ήταν 4°C ενώ το μικροβιακό φορτίο που εξετάστηκε ήταν τα εξής: η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, τα γαλακτικά βακτήρια, τα *Enterobacteriaceae*, οι *Pseudomonas* και τα *Clostridium spp.* Παρατηρήθηκε ότι κατά την 6^η της συντήρησης υπήρξε μια σημαντική μείωση στον πληθυσμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας ενώ επιτεύχθηκε μια παράταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος κατά 4 ημέρες (Mexis et al., 2012).

1.9 Η ενθυλάκωση φυσικών ουσιών

Η ενθυλάκωση είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία. Στην τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιείται κυρίως για τη μεταφορά αρωματικών ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στα διατροφολογικά συστατικά, δηλαδή μικροσυστατικά των τροφίμων που έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Η ενθυλάκωση μπορεί να προστατεύσει τα διατροφολογικά συστατικά από αντιδράσεις οξειδωτικής και αποικοδόμησης. Επιπλέον, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της διαλυτότητάς τους στο νερό, καθιστώντας περισσότερο δυνατή τη χρησιμοποίησή τους των ενθυλακωμένων συστατικών για τον εμπλουτισμό τροφίμων ή για την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων. Παρά την ευρεία χρήση της τεχνικής της ενθυλάκωσης ως μεθόδου μεταφοράς και προστασίας συστατικών, οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται στην ενθυλάκωση μεμονωμένων συστατικών και όχι πολύπλοκων εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων πλουσίων σε συστατικά με υψηλή βιολογική αξία και δράση.

Ο όρος **συμπλόκο εγκλεισμού** (inclusion complex) αναφέρεται στη δημιουργία συμπλόκου με τη συμμετοχή δύο συστατικών. Το ένα από τα συστατικά καλείται υποδοχέας ή ξενιστής (host) και έχει ή μπορεί να σχηματίσει κοιλότητα, διάυλο ή σήραγγα, στην οποία εγκλείεται το υπόστρωμα ή ξενιζόμενο μόριο (guest), που είναι συνήθως το μικρότερο σε διαστάσεις συστατικό (Lehn, 1985). Ο ξενιστής και το ξενιζόμενο μόριο πρέπει να έχουν ή να δύνανται να αποκτήσουν γενικώς, σχέση ‘‘κλειδιού-κλειδαριάς’’, όσον αφορά στην αμοιβαία στερεοδιάταξη, ώστε να μπορέσει να σχηματιστεί το σύμπλοκο. Το προκύπτον σύμπλοκο έχει διαφορετικές ιδιότητες από αυτές των μορίων που το συνιστούν. Σύμπλοκα εγκλεισμού σχηματίζουν ανόργανοι υποδοχείς, όπως οι καολινίτες, οι ζεόλιθοι και ο γραφίτης, καθώς και οργανικοί, όπως οι κυκλοδεξτρίνες, τα κυκλοφάνια, τα κρυπτάνια, οι αιθέρες-στέμματα, κ.α. Όπως αναφέρθηκε, η σημαντικότερη ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με μία ποικιλία οργανικών και ανόργανων μορίων σε διάλυμα και σε στερεή κατάσταση. Στην κοιλότητα μίας κυκλοδεξτρίνης είναι δυνατόν να εγκλείεται ολόκληρο το μόριο ή μέρος αυτού, αναλόγως της υδροφοβικότητας και των διαστάσεών του, σε σχέση πάντα με αυτές της κυκλοδεξτρίνης. Οι κυκλοδεξτρίνες σε υδατικά διαλύματα, περιέχουν μόρια ύδατος στην κοιλότητά τους αλλά όταν προστεθούν υδρόφοβα οργανικά μόρια σχηματίζουν ισχυρά σύμπλοκα εγκλεισμού, στα οποία η κοιλότητα καταλαμβάνεται από το οργανικό μόριο. Η ενυδάτωση των κυκλοδεξτρινών αποτελεί σημαντικό παράγοντα όσον αφορά τη διαδικασία του εγκλεισμού. Ο μηχανισμός του εγκλεισμού λαμβάνει χώρα μόνο όταν η κυκλοδεξτρίνη έχει συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε νερό. Το νερό της εσωτερικής κοιλότητας είναι σημαντικό στην αλληλεπίδραση μεταξύ του εγκλεισμένου μορίου και της κυκλοδεξτρίνης

Όπως δείχνουν σύγχρονες μελέτες, στην πραγματικότητα ο μοριακός εγκλεισμός είναι αποτέλεσμα συνεισφοράς διαφόρων παραγόντων οι οποίοι εξαρτώνται τόσο από τη φύση της κυκλοδεξτρίνης και του ξενιζόμενου μορίου, όσο και από το διαλύτη στον οποίο πραγματοποιείται η συμπλοκοποίηση (αν πρόκειται για διάλυμα). Ωστόσο πρωταγωνιστικό ρόλο φαίνεται να έχουν οι παρακάτω παράγοντες (Manor and Saenger, 1974, Rekharsky and Inoue, 1998):

α) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

β) δεσμοί υδρογόνου.

γ) ενεργειακό κέρδος από την απομάκρυνση μορίων ύδατος από την κοιλότητα, το περιβάλλον της οποίας δεν ευνοεί το σχηματισμό πλήρους δικτύου δεσμών υδρογόνου.

δ) δυνάμεις διασποράς London.

ε) αλληλεπιδράσεις μεταφοράς φορτίου.

στ) στερεοχημική παρεμπόδιση.

ζ) αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου.

η) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

θ) αποδέσμευση της ενέργειας τάσεως του μακροκυκλίου στην περίπτωση της α-CD, η οποία ως συμπλοκοποιημένη έχει συμμετρικό σχήμα.

Οι συνηθέστερες στοιχειομετρίες των συμπλόκων που απαντώνται είναι: ξενιστής/ξενιζόμενο μόριο = 1:1, 2:1, 1:2 και 2:2. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα του συμπλόκου είναι η μεταβολή του αριθμού των μορίων ύδατος που είναι προσαρτημένα στην κυκλοδεξτρίνη και ο βαθμός εισχώρησης του ξενιζόμενου μορίου στην κοιλότητα. Επιπλέον, δύο ακόμα παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν σημαντικά στη σταθερότητα του συμπλόκου είναι η δημιουργία δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στο ξενιζόμενο μόριο και τον ξενιστή και οι αλλαγές στη διαμόρφωση της κυκλοδεξτρίνης και του ξενιζόμενου μορίου.

Σε ό,τι αφορά στις πλήρως μεθυλωμένες κυκλοδεξτρίνες, η κοιλότητά τους είναι παραμορφωμένη, λόγω απουσίας των σταθεροποιητικών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομάδων -OH. Στην περίπτωση αυτή, κατά την είσοδο του ξενιζόμενου μορίου, η γεωμετρία της κοιλότητας παραμορφώνεται, με σκοπό να επιτευχθεί μεγιστοποίηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο μορίων και ταυτόχρονη συμπληρωματικότητα στο σχήμα τους (Mentzafos *et al.*, 1999, Yannakopoulou, 1996).

Η ισορροπία σχηματισμού του συμπλόκου μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και συστατικού (G) περιγράφεται από την αντίδραση:



Η σταθερά σχηματισμού συμπλόκου περιγράφεται από την εξίσωση:

$$K_{nm} = [C_{nm}] / [G]^m [CD]^n \quad (1)$$

Η απελευθέρωση του εγκλεισμένου μορίου πραγματοποιείται όταν το σύμπλοκο τοποθετείται σε περίσσεια νερού, με αντιστροφή της θερμοδυναμικής ισορροπίας (Kant *et al.*, 2004). Η απελευθέρωση του μορίου επηρεάζεται από άλλα μόρια, τα οποία ενδέχεται να υπάρχουν. Το εγκλεισμένο μόριο μπορεί να δεσμευθεί σε άλλες ουσίες ως αποτέλεσμα του αυξανόμενου ρυθμού απελευθέρωσης.

Διάφορες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοσθούν για το σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ εγκλεισμένου συστατικού και κυκλοδεξτρίνης, μεταξύ των οποίων είναι ο σχηματισμός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα με ή χωρίς ρύθμιση του pH, η μέθοδος της συγκαταβύθισης και η απευθείας ανάμιξη στερεής σκόνης με την παρουσία μικρής ποσότητας νερού (kneading) (Hedges, 1998). Ο σχηματισμός ενός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα είναι μια απλή διαδικασία. Ο απαραίτητος εξοπλισμός περιορίζεται σε ένα ποτήρι σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Το υδατοδιαλυτό σύμπλοκο που προκύπτει σχηματίζεται μετά από ανάμιξη των συστατικών για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία που περιγράφεται παραπάνω. Ο καθαρισμός του σχηματιζόμενου συμπλόκου περιλαμβάνει διήθηση με φίλτρο συγκεκριμένης διαμέτρου. Εναλλακτικά ο σχηματισμός μπορεί να γίνει όταν το συστατικό διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε πολικό διαλύτη, και ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων (Polyakov *et al.*, 2004, Mele *et al.*, 1998). Ο τρόπος αυτός έχει το μειονέκτημα του πιθανού εγκλεισμού του οργανικού διαλύτη αντί του επιθυμητού συστατικού, στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Η τρίτη διαδικασία περιλαμβάνει ανάμιξη του συστατικού και της κυκλοδεξτρίνης σε μικρή ποσότητα νερού. Αυτή η μέθοδος μπορεί εύκολα να εφαρμοσθεί για εμπορική παραγωγή. Για την απομάκρυνση του νερού από το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί διήθηση, φυγοκέντριση, λυοφιλίωση ή ξηρός ψεκάσμος, όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω.

Οι παραπάνω διαδικασίες δεν περιλαμβάνουν ρύθμιση του pH. Εναλλακτικά μπορεί να γίνει σχηματισμός του συμπλόκου σε συγκεκριμένη τιμή pH με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η κατάσταση ιονισμού ορισμένων μορίων (Zornoza *et al.*, 1998) παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του συμπλόκου, πιθανόν λόγω του ότι η ιονισμένη μορφή του συστατικού είναι λιγότερο ικανή να αντικαταστήσει τα υδατοδιαλυτά μόρια που βρίσκονται στη κοιλότητα και να σχηματίσουν πιο σταθερά μόρια. Αυτός είναι και ο λόγος που σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα, με στόχο τη μετατροπή των μορίων στη μη ιονισμένη κατάσταση. Σαν παράδειγμα αναφέρεται ότι ο εγκλεισμός του κινναμωμικού οξέος σε κυκλοδεξτρίνες επιτυγχάνεται καλύτερα σε pH 4 (Rodis *et al.*, 2004).

Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες εφαρμόζεται σε φαρμακευτικά μόρια προκειμένου να αυξήσει τη διαλυτότητα μορίων με μικρή διαλυτότητα στο νερό. Επιπλέον, ο εγκλεισμός αυξάνει τη σταθερότητα των φαρμάκων και τη βιοδιαθεσιμότητα τους, ενώ μειώνει την τοξικότητά τους μεταβάλλει τη διαλυτότητά τους στο νερό, και με τον τρόπο αυτό μετατρέπονται σε μορφή με την οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό τροφίμων, στα οποία το κύριο συστατικό είναι το νερό. Ακόμη ο εγκλεισμός μορίων μέσα στη κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών μπορεί να αλλάξει της φυσικοχημικές ιδιότητες του εγκλεισμένου μορίου σε πολύ μεγάλο βαθμό (Clarot et al., 2000). Οι κυκλοδεξτρίνες εκτός από μεταφορείς διατροφολογικών μορίων, προσφέρουν ταυτόχρονα προστασία ευπαθών μορίων από την οξείδωση, προστασία από φωτοαποικοδόμηση και προστασία από αποικοδόμηση λόγω θέρμανσης.

Στο εμπόριο κυκλοφορούν διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες ως προς το μέγεθος του δακτυλίου και το βαθμό υποκατάστασης. Η επιλογή της πιο κατάλληλης κυκλοδεξτρίνης που θα χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό συγκεκριμένων διατροφολογικών μορίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως:

α) Το μέγεθος του μορίου.

β) Η διαλυτότητα του μορίου στο νερό.

γ) Το κόστος της κάθε κυκλοδεξτρίνης, σε σχέση με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα. δ) Το τρόφιμο όπου το εγκλεισμένο μόριο πρόκειται να ενσωματωθεί.

ε) Από την διαδικασία που θα χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό του συμπλόκου. στ) Τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο ή συγγενή μόρια.

ζ) Αν επιτρέπεται η χρήση τους σε συστήματα τροφίμων.

1.10. Εμπορική σημασία της ενθυλάκωσης-εφαρμογές

Η **μικροενθυλάκωση** (microencapsulation) αναφέρεται στη διαδικασία εγκλεισμού μιας ουσίας σε ένα υπόστρωμα που οδηγεί στο σχηματισμό ενός προϊόντος που χαρακτηρίζεται ως κάψουλα. Οι όροι **επικάλυψη (coating)** και **προστασία (protection)** χρησιμοποιούνται εναλλακτικά του όρου ενθυλάκωση. Και οι τρεις όροι περιγράφουν ένα υλικό, το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό ενός εξωτερικού περιβλήματος.

Στην τεχνολογία της μικροενθυλάκωσης χρησιμοποιούνται, επίσης, οι όροι πυρηνικό υλικό, ενεργή φάση, ή εσωτερική φάση (internal phase) για το συστατικό που ενθυλακώνεται, ενώ το υλικό που περιβάλλει το προς ενθυλάκωση συστατικό αναφέρεται ως βάση εγκλεισμού, μεταφορέας ή κάλυμμα (crust, vehicle) (Gibbs et al., 1999).

Στα τέλη του 1800 ο φαρμακοποιός Urjohn ανέφερε την παρακάτω διαδικασία επικάλυψης: Στερεά σωματίδια αναδεύονται σε ένα κυλινδρικό μέσο ενώ ψεκάζεται υδατικό διάλυμα ζάχαρης που αποτελεί το μέσο επικάλυψης. Η διαδικασία στη συνέχεια περιλαμβάνει την εξάτμιση του νερού μέχρι το στρώμα ζάχαρης που εναποτίθεται

να πάρει το επιθυμητό πάχος και σχήμα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε φαρμακευτικές ουσίες κυρίως για την επικάλυψη της δυσάρεστης γεύσης (Versic, 1988).

Με τη χρήση της τεχνολογίας της ενθυλάκωσης επιτυγχάνονται τα εξής (Betrolini, *et al.*, 2001, Schrooyen, *et al.*, 2001, Gouin, 2004):

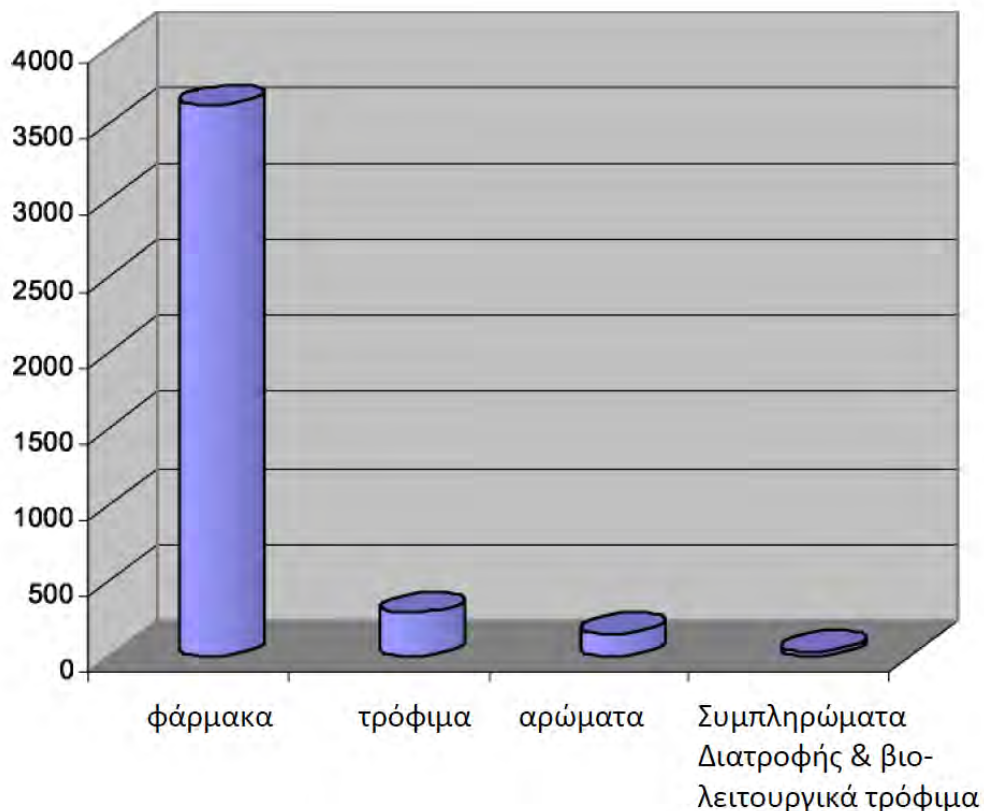
- α) Ο διαχωρισμός συστατικών
- β) Η μείωση της τοξικότητας ενός υλικού
- γ) Η αλλαγή των επιφανειακών ιδιοτήτων ενός υλικού
- δ) Η μείωση της ευφλεκτότητας των υγρών
- ε) Η αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης (χρόνου ζωής)
- στ) Η επικάλυψη της δυσάρεστης γεύσης συγκεκριμένων συστατικών
- ζ) Η μείωση της παραγωγής τοξικών προϊόντων λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων
- η) Η αύξηση της διαλυτότητας συστατικών σε συγκεκριμένο μέσο
- θ) Η μετατροπή σε στερεή σκόνη, ουσιών που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση, με αποτέλεσμα την εύκολη μεταφορά τους και προσθήκη σε μίγματα τροφίμων

Η προστασία δραστικών συστατικών από αντιδράσεις που καταλύονται από το φως καθώς και αποικοδομήσεις λόγω υψηλών θερμοκρασιών (Szente and Szejtli, 2004)

Σήμερα η ενθυλάκωση χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία για τη μεταφορά φαρμάκων (Zonora *et al.*, 1998, Arias-Blanco *et al.*, 1998, Mavromoustakos *et al.*, 1998, Ventura *et al.*, 1998, Zingone and Rubessa, 2001, Fatouros *et al.*, 2001, Manolikas and *et al.* 2003, Pinto *et al.*, 2004). Χαρακτηριστικά είναι τα αποτελέσματα της αναζήτησης με τις λέξεις κλειδιά “encapsulation and drugs”(www.scopus.com) όπου οι αριθμοί των βιβλιογραφικών πηγών παρουσιάζονται στο Σχήμα Α. 1. Βρέθηκαν 3623 αναφορές με τις παραπάνω λέξεις κλειδιά. Στην τεχνολογία τροφίμων η μέθοδος της ενθυλάκωσης είναι λιγότερο διαδεδομένη σε σχέση με τη χρήση της από την τεχνολογία φαρμάκων (αριθμός βιβλιογραφικών πηγών 291 ως αποτέλεσμα της αναζήτησης με τις λέξεις κλειδιά “encapsulation and food”). Χρησιμοποιείται κυρίως για τη μεταφορά αρωματικών συστατικών (αριθμός βιβλιογραφικών πηγών 151 ως αποτέλεσμα της αναζήτησης με τις λέξεις κλειδιά “encapsulation and flavour or flavor or aroma”), ενώ έχει αναφερθεί η χρήση της για την απομόνωση συστατικών, όπως στην απομόνωση χοληστερόλης από το αυγό (Williams III *et al.*, 1998). Η εφαρμογή του εγκλεισμού έχει γίνει αποδεκτή στην μεταφορά αρωματικών συστατικών και οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις είναι πτητικές και χημικώς ασταθείς παρουσία οξυγόνου, φωτός, νερού και θερμοκρασίας (Risch, 1995).

Ένας μικρός αριθμός βιβλιογραφικών πηγών βρέθηκε από το αποτέλεσμα της αναζήτησης για την εφαρμογή της ενθυλάκωσης σε συστατικά ή πρόσθετα των τροφίμων με βιολειτουργικές ιδιότητες (αριθμός βιβλιογραφικών πηγών 36 ως αποτέλεσμα της αναζήτησης με τις λέξεις κλειδιά “encapsulation and nutraceutical or functional food”) παρόλο που τα συστατικά αυτά αναφέρονται ως ευπαθή και υπάρχει ανάγκη προστασίας τους

Διάγραμμα Ι Αριθμός αναφορών από τα αποτελέσματα

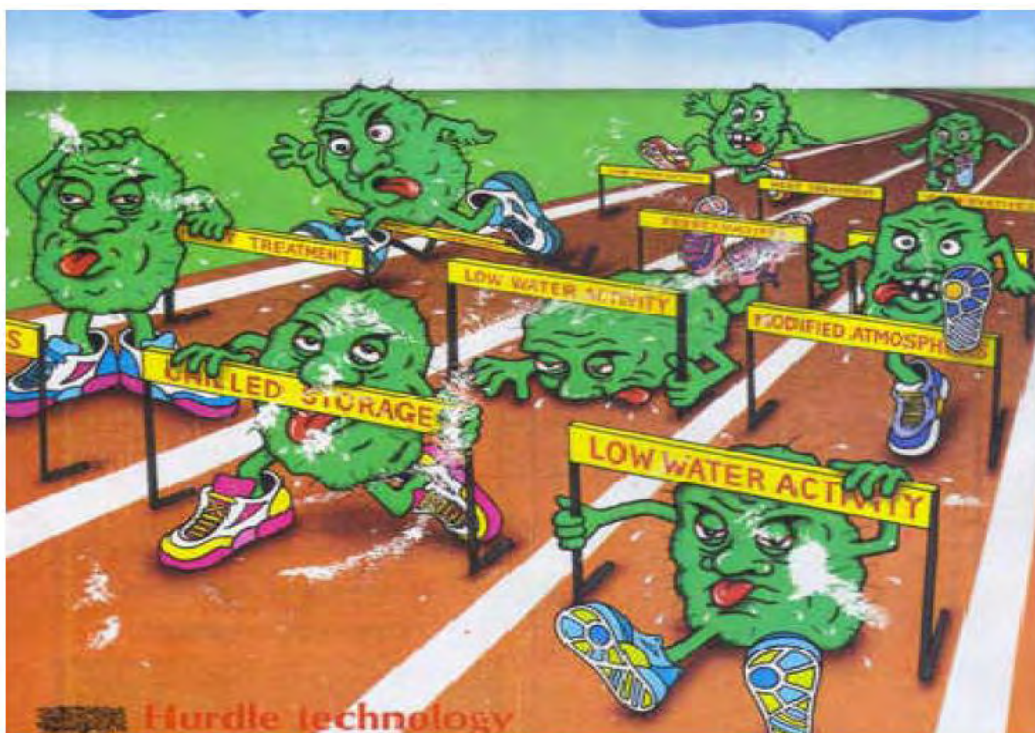


1.11.ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΜΠΟΔΙΩΝ (HURDLE TECHNOLOGY)

1.11.1 Θεωρία των εμποδίων - η βάση του συνεργισμού αντι-μικροβιακών παραγόντων

Η μικροβιολογική σταθερότητα και ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί ένα πρόβλημα το οποίο δεν είναι ακόμα υπό πλήρη έλεγχο, παρά το εύρος των διαθέσιμων μεθόδων συντήρησης (π.χ. κατάψυξη, ζεμάτισμα, παστερίωση και κονσερβοποίηση). Πράγματι, η σημερινή απαίτηση των καταναλωτών για πιο φυσικά και φρέσκα τρόφιμα καθιστά το πρόβλημα αυτό ακόμα πιο μεγάλο καθώς ωθεί τους παραγωγούς τροφίμων να χρησιμοποιούν πιο ήπιες τεχνικές συντήρησης (π.χ. ψύξη, αποθήκευση σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες και βιοσυντήρηση). Έτσι, υπάρχει μια μεγάλη ανάγκη για νέες ή βελτιωμένες ήπιες μεθόδους συντήρησης οι οποίες να επιτρέπουν την παραγωγή φρέσκων, αλλά σταθερών και ασφαλών τροφίμων. Η τεχνολογία εμποδίων σαν προσέγγιση καλύπτει αυτή ακριβώς την ανάγκη. Η τεχνολογία εμποδίων (hurdle technology), όπως παρουσιάστηκε από τον Leistner και συνεργάτες, υποστηρίζει τον

προσεκτικό συνδιασμό υφιστάμενων ή καινοτόμων μεθόδων συντήρησης με σκοπό τον καθορισμό μιας σειράς από παράγοντες συντήρησης (γνωστούς και ως εμπόδια; hurdles) τα οποία κανένας μικροοργανισμός δεν θα είναι σε θέση να υπερνικήσει (Εικόνα 1).



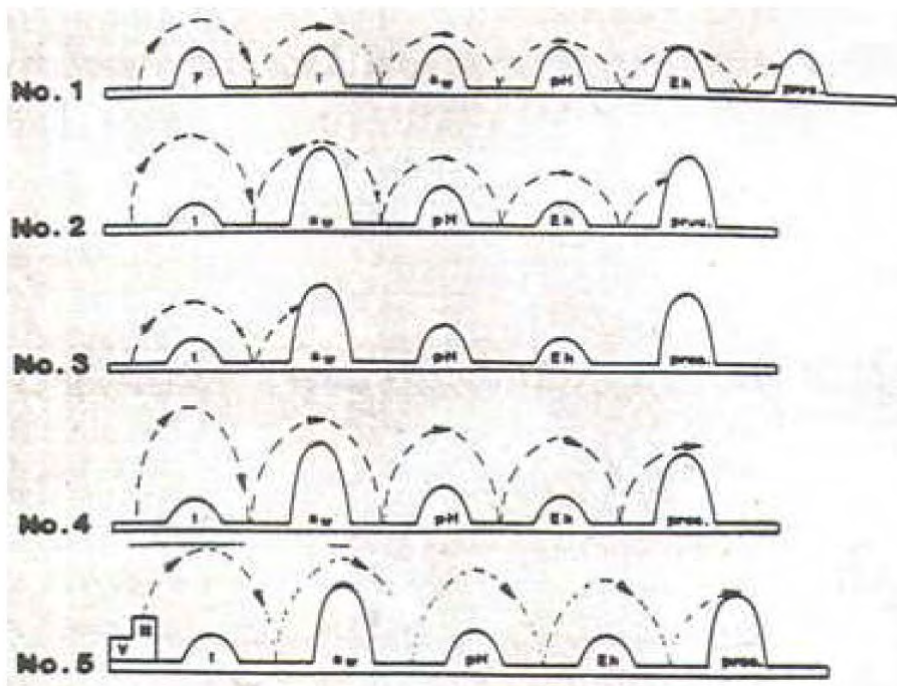
Εικόνα 1 Η Θεωρία των πολλαπλών εμποδίων για την συντήρηση τροφίμων

Πηγή : ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ(ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ – ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΥΧΑΣ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΠΑΝΑΓΟΥ)

Αυτά τα εμπόδια μπορεί να είναι ενδογενή (intrinsic; π.χ. pH, ενεργότητα νερού, το δυναμικό οξειδοαναγωγής και η δομή του τροφίμου), εξωγενή (extrinsic; π.χ. θερμοκρασία, συσκευασία και σχετική υγρασία) ή ο συνδιασμός τους (implicit). Καθένα από αυτά τα εμπόδια απαιτεί συγκεκριμένη προσπάθεια από το μικροοργανισμό προκειμένου να τα υπερνικήσει. Όσο μεγαλύτερο είναι το εμπόδιο, τόσο μεγαλύτερη θα πρέπει να είναι και η προσπάθεια (δηλαδή, τόσο μεγαλύτερος θα είναι ο αριθμός των οργανισμών που θα χρειαστεί να το ξεπεράσουν). Ορισμένα εμπόδια, όπως είναι η παστερίωση, μπορεί να έχουν υψηλή επίδραση σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών τύπων μικροοργανισμών, ενώ άλλα, όπως η αλατότητα, έχουν μικρότερη επίδραση ή η επίδραση είναι περιορισμένη στο εύρος των τύπων των μικροοργανισμών που επηρεάζουν. Το γεγονός ότι ο συνδυασμός παραγόντων συντήρησης επηρεάζει τη μικροβιολογική σταθερότητα και ασφάλεια των τροφίμων ήταν γνωστό εδώ και πολλούς αιώνες. Η προσέγγιση αυτή λίγο πολύ εφαρμόζονταν εμπειρικά σε πολλά παραδοσιακά τρόφιμα, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, χωρίς να είναι όμως γνωστός ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο προστάτευαν τα τρόφιμα. Εδώ και 30 περίπου χρόνια, η εφαρμογή της τεχνολογίας των εμποδίων είναι πιο διαδεδομένη καθώς ο τρόπος δράσης των κυριότερων παραγόντων συντήρησης στα τρόφιμα και οι αλληλεπιδράσεις τους έγιναν περισσότερο γνωστές. Η τεχνολογία των εμποδίων

χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη βιομηχανία κρέατος όπου η υιοθέτηση εμποδίων βρέθηκε να είναι πολύ αποτελεσματική στην παραγωγή σταθερών (shelf-stable) λουκάνικων. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε σε ένα μεγάλο εύρος τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων και λαχανικών, προϊόντων άρτου και γάλακτος, και ψαριών. Η τεχνολογία των εμποδίων αποτελεί μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την ήπια συντήρηση των τροφίμων, καθώς λόγω της συνδυαστικής (concerted) ή πολλές φορές συνεργιστικής επίδρασή τους, μπορούν να εφαρμοστούν σε χαμηλότερη ένταση από αυτή που θα χρειάζονταν εάν ένα μόνο εμπόδιο χρησιμοποιούνταν ως παράγοντα συντήρησης. Σήμερα, η τεχνολογία των εμποδίων χρησιμοποιείται επιτυχώς όχι μόνο για τη βελτίωση της μικροβιολογικής ασφάλειας και σταθερότητας, αλλά και για τη βελτίωση των οργανοληπτικών, διαθρεπτικών και οικονομικών ιδιοτήτων διαφόρων τροφίμων.

Ένα τρόφιμο είναι μικροβιολογικά ασφαλές και σταθερό εξαιτίας της παρουσίας πολλαπλών εμποδίων τα οποία είναι συγκεκριμένα για το τρόφιμο όσον αφορά τη φύση και την ένταση της επίδρασής τους. Όλα μαζί, τα εμπόδια αυτά, κρατούν τους αλλοιογόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς υπό έλεγχο, λόγω του ότι οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να υπερνικήσουν (υπερπηδήξουν) όλα τα εμπόδια τα οποία είναι παρόντα στο τρόφιμο. Παραδείγματα αυτών των πολλαπλών εμποδίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 2. Το παράδειγμα Νο.1 αντιπροσωπεύει ένα τρόφιμο το οποίο περιέχει έξι εμπόδια: υψηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (τιμή F), χαμηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (τιμή t), χαμηλή ενεργότητα νερού (aw), οξύτητα (pH), χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh) και συντηρητικά (pres.). Μερικοί από τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο τρόφιμο μπορούν να υπερνικήσουν ορισμένα από τα εμπόδια αλλά κανένας δεν μπορεί να ξεπεράσει όλα τα εμπόδια όταν αυτά χρησιμοποιούνται μαζί. Έτσι, το τρόφιμο είναι ασφαλές και σταθερό. Αυτό το παράδειγμα είναι θεωρητικό γιατί όλα τα εμπόδια απεικονίζονται σαν να έχουν την ίδια ένταση, κάτι το οποίο πρακτικά δεν μπορεί να συμβεί. Τα εμπόδια συνήθως έχουν διαφορετική ένταση, όπως φαίνεται και στο δεύτερο παράδειγμα (No 2), όπου η aw και τα συντηρητικά είναι τα κύρια εμπόδια ενώ η θερμοκρασία, το pH και το Eh είναι δευτερεύοντα. Εάν ένας πολύ μικρός αριθμός μικροοργανισμών είναι παρόν στην αρχή (No 3) λιγότερα σε αριθμό και ένταση εμπόδια μπορούν να επιφέρουν μικροβιολογική σταθερότητα. Από την άλλη πλευρά, εάν ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών είναι παρόν λόγω κακών συνθηκών υγιεινής, τότε, τα συνηθισμένα εμπόδια μπορεί να μην επαρκούν για να εμποδίσουν την αλλοίωση ή την τροφική δηλητηρίαση (No 4). Το παράδειγμα Νο 5 απεικονίζει ένα τρόφιμο το οποίο είναι πλούσιο σε βιταμίνες και θρεπτικά συστατικά και το οποίο μπορεί να επιτρέψει βραχυπρόθεσμα την αλματώδη ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Στα παραδείγματα Νο 1 και 5 απαιτούνται πρόσθετα ή μεγαλύτερης έντασης εμπόδια για να διασφαλιστεί η σταθερότητα του προϊόντος. Παρ' όλα αυτά, εάν η ένταση ενός εμποδίου είναι επιβλαβής για την ποιότητά του τότε αυτό θα πρέπει να ελαττωθεί.



Εικόνα 2 Πέντε παραδείγματα της δράσης των εμποδίων (hurdle effect) που χρησιμοποιούνται στη συντήρηση των τροφίμων. Τα σύμβολα έχουν την παρακάτω ερμηνεία: F, θερμότητα; t, ψύξη; Eh, δυναμικό οξειδοαναγωγής; aw, χαμηλή ενεργότητα νερού; pH, οξίνιση; pres., συντηρητικά; K-F, ανταγωνιστική χλωρίδα; V, βιταμίνες; N, θρεπτικά συστατικά.

Η διάρκεια ζωής, η ποιότητα και η ασφάλεια πολλών προϊόντων τροφίμων βασίζεται στην συνδιασμένη δράση πολλών παραγόντων (εμποδίων). Αυτά τα εμπόδια μπορούν να έχουν προσθετική ή συνεργιστική επίδραση. Εμπόδια στα τρόφιμα είναι ουσίες ή κατεργασίες οι οποίες παρεμποδίζουν τις διαδικασίες αλλοίωσης. Σε πολλές περιπτώσεις η παρεμπόδιση της αλλοιογόνου πορείας και η διατήρηση της ποιότητας είναι δράσεις αντίθετες. Επομένως για να διατηρήσουμε επιθυμητή ποιότητα στο τρόφιμο, το ύψος (ένταση) των εμποδίων πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν πιο χαμηλό, όπως για παράδειγμα συνδυάζοντας διαφορετικά εμπόδια. Δεν πρέπει να παραληφθεί, ότι η νομοθεσία που αφορά τα τρόφιμα διαφέρει από χώρα σε χώρα, ιδιαίτερα όσον αφορά την επιτρεπόμενη χρήση των προσθετικών στα τρόφιμα. Επομένως, δεν αρκεί να αποφασίσουμε τα σύσταση και την κατεργασία που θα δημιουργήσει ένα υγιεινό και θρεπτικό τρόφιμο, αλλά πρέπει να ελέγξουμε αν όλη η παραγωγική διαδικασία συμπεριλαμβανομένων των πρώτων υλών, του τύπου και της ποσότητας των προσθετικών υλών που θα χρησιμοποιηθούν κτλ. συμφωνούν με τη νομοθεσία στην συγκεκριμένη χώρα. Στη συνέχεια, γίνεται μία σύντομη περιγραφή των πιο σημαντικών εμποδίων, ιδιαίτερα αυτών που είναι σημαντικά για την ασφάλεια και σταθερότητα των τροφίμων. Στην περιγραφή αυτή έχει υιοθετηθεί η άποψη της καταγραφής των εμποδίων βάσει του διαχωρισμού τους σε φυσικά, φυσικοχημικά, μικροβιακής προέλευσης και διάφορα άλλα εμπόδια.

1.11.2. Οι φυσικές φαινόλες ως αντι - μικροβιακά

Οι φαινόλες αποτελούν αξιολογούμενη κατηγορία συντηρητικών και ιδιαίτερα οι φυτικές φαινόλες που ανήκουν στην ομάδα των φυσικών αντιμικροβιακών συστημάτων - φυτικής προέλευσης. Ο όρος «φαινολικά συστατικά» χημικώς αποδίδεται στις ουσίες που αποτελούνται από ένα ή δύο αρωματικούς δακτυλίους με ένα ή περισσότερα υδροξυποκατάστατα. Εκτός όμως από τις ουσίες με ένα, δύο, ή τρεις αρωματικούς δακτυλίους (π.χ. απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα) υπάρχουν πολυφαινολικές δομές, όπως τα φλαβονοειδή και αυτές που ανήκουν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες πολυμερών: οι λιγνίνες, οι μελανίνες και οι τανίνες. Ορισμένες δε φαινόλες αποτελούν μέλη άλλων χημικών ομάδων όπως των αμινοξέων (π.χ τυροσίνη) και των τερπενοειδών (π.χ. θυμόλη και γκοσιπόλη). Η χρήση της φαινόλης ως αντιμικροβιακό παράγοντα, γεγονός που χρονολογείται στην αρχή της ιστορίας της μικροβιολογίας, έχει σταδιακά αντικατασταθεί από τη χρήση φαινολικών παραγώγων, τα οποία είναι πιο αποτελεσματικά και λιγότερο τοξικά. Σήμερα είναι γνωστές μια σειρά από φαινολικές ουσίες οι οποίες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης στα τρόφιμα αλλά και στην παρεμπόδιση ή μείωση της οξειδωτικής αλλοίωσής τους. Οι φαινολικές ουσίες που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες κατατάσσονται σε επτά κατηγορίες:

- Φαινολικές ουσίες που είναι κοινώς αποδεκτές για χρήση στα τρόφιμα,
- Φαινολικές ουσίες που είναι κοινώς αποδεκτές για άλλες χρήσεις στα τρόφιμα, Φαινολικές ουσίες που απαντούν φυσικά στα τρόφιμα ή προστίθενται σ' αυτά κατά τη διάρκεια της παραγωγής
- Φαινολικά οξέα,
- Φλαβονοειδή,
- Ελευρωπαΐνη και Ταννίνες
- Ως μοναδικό εμπόδιο: Οι φαινόλες χρησιμοποιούνται σε συνδιασμό με άλλα εμπόδια, όπως συσκευασία.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1. Μικροβιολογικά υποστρώματα και βοηθητικά υλικά μικροβιολογικών μετρήσεων:

Υποστρώματα :

- Enterobacteriaceae: Violet Red Bile Glucose Agar, Oxoid
- Θειοαναγωγικά Clostridium: Perfringens Agar Base (TSC), Oxoid
- Ζύμες- Μύκητες: Sabourand Dextrose Agar, Acumedia
- Brochonthrix thermosphacta: STAA Agar Base, Himedia

Αραιωτικά υγρά: Maximum Recovery Diluent: Oxoid

Θρεπτικό υγρό : Tryptone Soya Broth: Oxoid

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Γυάλινα σωληνάκια,
- τρυβλία ,
- ανυδρόφιλο βαμβάκι,
- tips του 1ml, 5ml,
- δοχεία Simax των 100ml, 500ml,
- γυάλινες πιπέτες Pasteur,
- πιπέτες του 1ml και των 5ml,
- κρίκος επίστρωσης,
- σακούλες stomacher,
- ομογενοποιητής (stomacher),
- αναλυτικός ζυγός, ζυγός απλός,
- πεχάμετρο στερεών,
- αυτόκαυστο,
- θερμαντικές πλάκες,
- φούρνος μικροκυμάτων,
- θήκες για την ενθύκευση στα λουκάνικα,
- φυσικό έντερο,
- πλαστικοί περιέκτες για γιαούρτια,
- επωαστικοί κλίβανοι,
- vortex,
- καταμετρητής αποικιών,
- κυψελίδες,
- χρωματόμετρο.

2.1.2. Υλικά παραγωγής λουκάνικων τύπου χωριάτικων

- Θήκες για την ενθύκευση στα λουκάνικα,
- Φυσικό έντερο
- Έτοιμο μίγμα από κιμά για την Παρασκευή χωριάτικων λουκάνικων

2.1.3. Υλικά παραγωγής γιαουρτιού

- Παστεριωμένο γάλα
- Πλαστικοί περιέκτες των 200 g
- Πλαστικά πώματα για τους περιέκτες

2.1.4. Υγρό εκχύλισμα πολυφαινόλων ελιάς MEDOLIVA LIQUID®



Πολυφαινόλες που παράγονται από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά.

Το προϊόν μας, με την εμπορική επωνυμία **MEDOLIVA®**, παράγεται σύμφωνα με μία κατοχυρωμένη διαδικασία, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη **καθαρά φυτικά νερά** που προέρχονται από τους διαχωριστήρες προσεκτικά επιλεγμένων ελαιουργείων που παράγουν μόνο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο αποκλειστικά από **βιολογικές καλλιέργειες ελιάς στην Ελλάδα**.

Η κατοχυρωμένη με **δίπλωμα ευρεσιτεχνίας διαδικασία παραγωγής** δεν χρησιμοποιεί καθόλου οργανικούς διαλύτες ή άλλα επικίνδυνα υλικά αλλά μόνον υπέρ καθαρό πόσιμο νερό και εφαρμόζει μία φιλική προς το περιβάλλον λειτουργία, έχοντας υιοθετήσει την οδηγία της ΕΕ που αφορά στην **Αρχή της Ολικής Αξιοποίησης (Principle of Total Discharge)**.

Το προϊόν παράγεται σε υγρή μορφή η οποία είναι σταθερή και ασφαλής **χωρίς ανάγκη οποιασδήποτε προσθήκης συντηρητικού**.

Επιπλέον, μια μοναδική τεχνική ομογενοποίησης εφαρμόζεται κατά τη παρασκευή του προϊόντος MEDOLIVA® που επιτυγχάνει την μείωση του μεγέθους των διαλυτών στερεών σε «Νανο-μεγέθη», έτσι εγγυάται υψηλή αντιοξειδωτική δράση και βελτιωμένη λειτουργικότητα, βασικό χαρακτηριστικό των προϊόντων Νανοτεχνολογίας.

Το προϊόν έχει πολλές χρήσιμες εφαρμογές σε πολλούς τομείς, όπως τροφίμων, λειτουργικών τροφίμων (nutraceuticals), συμπληρωμάτων διατροφής, καλλυντικών, προϊόντων προσωπικής φροντίδας, κ.λπ..

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του προϊόντος συνοψίζονται παρακάτω:

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Υγρό φυσικό αντιοξειδωτικό, που παράγεται από την υδατώδη φάση του ελαιοκάρπου, με υψηλή περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη οι οποίες είναι γνωστές ως τα πιο αποτελεσματικά φυσικά αντιοξειδωτικά με πλήθος επιστημονικών αναφορών για την συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία που οφείλεται στη δράση τους ως επιβραδυντές ελεύθερων ριζών. Το προϊόν περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες καφεϊκού και κουμαρικού οξέος, κατεχίνες και ανθοκυάνες. Η περιεκτικότητα το προϊόντος MEDOLIVA® σε υδροξυτυροσόλη / τυροσόλη είναι 30 φορές περισσότερο από ότι στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Χρώμα: σκούρο μαύρο

Ιξώδες: Χαμηλό

Συνολικά στερεά: 10% w / w ελάχιστο ή 24 BRIX

Οσμή: Χαρακτηριστική του ελαιοκάρπου

Γεύση: Πικρή φυσικό χαρακτηριστικό της πολυφαινολικής του σύνθεσης

pH: 4,5

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες: 6.000 ppm min. επί υγρού ή 6% (60.000 ppm) επί ξηρού (μέθοδος Folin-Ciocalteu). Το προϊόν έχει αναλυθεί με HPLC και περιέχει τις ακόλουθες πολυφαινόλες:

- A) Υδροξυτυροσόλη
- B) Τυροσόλη
- Γ) Καφεϊκό οξύ
- Δ) ρ-κουμαρικό οξύ
- E) Ανθοκυάνες και κατεχίνες

2.1.5. Υγρό εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX® ProGarda™

Το CitroX® είναι ένα φυσικό σκεύασμα που προέρχεται από το εκχύλισμα εσπεριδοειδών (Hopper et al, 2011). Τα προϊόντα CitroX® είναι μη τοξικά, υποαλλεργικά, χρησιμοποιούνται ως φυσικά απολυμαντικά για να αντικαταστήσουν τα παραδοσιακά απολυμαντικά σε πολλά τμήματα της τροφικής αλυσίδας (López-Gálvez et al, 2009). Τα βασικά χαρακτηριστικά του CitroX® είναι ότι:

- Παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας μόνο φυσικά παραγόμενα, μη τοξικά, υποαλλεργικά και μη-διαβρωτικά συστατικά. Ακόμα είναι μη-μεταλλαξιογόνο, δεν έχει έντονους χρωματισμούς, είναι μη-καρκινογόνο και δεν είναι επικίνδυνο για τον άνθρωπο.
- Είναι πλήρως βιοδιασπώμενο, ασφαλές και φιλικό προς το περιβάλλον
- Είναι οργανικά συμβατό ενεργό αντιμικροβιακό συστατικό
- Εύκολο στο χειρισμό: μη-επιβλαβή για τον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον
- Δεν περιέχει πετροχημικά
- Δεν περιέχει αλλεργιογόνες ουσίες
- Δεν περιέχει συνθετικά αρώματα ή χρωστικές ουσίες
- Δεν έχει δοκιμαστεί σε ζώα
- Χωρίς Γενετικά Τροποποιημένους Οργανισμούς
- Είναι αποτελεσματικό σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (στο νερό)
- Παρατείνει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων και μειώνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς. (Medigan, R. 2011).

Τα προϊόντα CitroX® χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, στην επεξεργασία τροφίμων, στη βιομηχανία αρτοποιίας και στη βιομηχανία κρασιού. Στην συνέχεια, παρουσιάζονται μερικές εφαρμογές του CitroX® στην βιομηχανία τροφίμων.

2.2. Λυοφιλιωτής και μέθοδος λυοφιλίωσης

2.3. Όργανα- Εξοπλισμός

Για την λυοφιλίωση και την παραγωγή των σκονών χρησιμοποιήθηκε η Συσκευή λυοφιλίωσης (Freeze Dryer), CoolSaf (SCANVAC).



ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΚΕΥΗΣ (Freeze Dryer), CoolSaf (SCANVAC).

2.3.1. Μέθοδος της λυοφιλίωσης

Το πρώτο στάδιο της λυοφιλίωσης αφορά την κατάψυξη του υγρού δείγματος με συμβατικές μεθόδους. Το υγρό δείγμα καταψύχεται γρήγορα για την παραγωγή μικρών κρυστάλλων πάγου. Στα υγρά δείγματα, η αργή κατάψυξη χρησιμοποιείται για την δημιουργία χωροπλέγματος κρυστάλλων πάγου, το οποίο παρέχει κανάλια (πόρους) για την κίνηση των υδρατμών. Το επόμενο στάδιο αφορά την αφαίρεση του νερού (πάγου) κατά την διάρκεια της ξήρανσης, δηλαδή την ξήρανση του δείγματος. Αν η τάση ατμών του νερού στο τρόφιμο είναι κάτω από τα 4.58 Torr (610.5 Pa) και το νερό είναι παγωμένο, τότε στο δείγμα που θερμαίνεται ο πάγος μετατρέπεται κατευθείαν σε υδρατμό, δηλαδή έχουμε το φαινόμενο της εξάχνωσης του κατεψυγμένου νερού μέχρι η περιεχόμενη υγρασία να φτάσει το 2%-6% και να προκύψει σταθερή μη υγροσκοπική δομή. Το δεύτερο στάδιο επιτυγχάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος κοντά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, διατηρώντας ταυτόχρονα την πίεση χαμηλή και με τον τρόπο αυτό προκύπτει το τελικό προϊόν σε μορφή στερεού το οποίο μετά από κατάλληλη άλεση μετατρέπεται στην τελική σκόνη.

2.3.2 Μέθοδος παραγωγής (formulation) μικτών σκονών συνεργισμού από πολυφαινόλη ελιάς (MEDOLIVA®) και CitroX®

Για την παραγωγή των μικτών σκονών συνεργισμού MEDOLIVA® και CITROX® ακολουθήθηκε οι παρακάτω μεθοδολογία:

- 100 γρμ μαλτοδεξτρίνης τύπου DE18 (Dextrose Equivalent 18) αναμιγνύοταν με νερό , υγρό εκχύλισμα πολυφαινόλης MEDOLIVA® και με υγρό εκχύλισμα CITROX® με βάση τις παρακάτω συνταγές

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Πολυφαινόλη 12% στερεά	CITROX 60% στερεά	H ₂ O	Μαλτοδεξτρίνη 97% στερεά
20/16	20 ml 2,4 γρμ <u>Στερεά 20%</u>	16 ml 9,6 γρμ <u>Στερεά 80%</u>	64 ml	100 g
80/4	80 ml 9,6 γρμ <u>Στερεά 80%</u>	4 ml 2,4 γρμ <u>Στερεά 20%</u>	16 ml	100 g
50/10	50 ml 6 γρμ <u>Στερεά 50%</u>	10 ml 6 γρμ <u>Στερεά 50%</u>	40 ml	100 g
40/12	40 ml 4,8 γρμ <u>Στερεά 40%</u>	<u>12 ml</u> 7,2 γρμ <u>Στερεά 60%</u>	<u>48 ml</u>	100 g
60/8	60 ml 7,2 γρμ <u>Στερεά 60%</u>	8 ml 4,8 γρμ <u>Στερεά 40%</u>	32 ml	100 g

100/0	100 ml 12 γρμ <u>Στερεά 100%</u>	0 ml 0 γρμ	0 ml	100 g
0/100	0 ml 0 γρμ	100 ml 12 γρμ <u>Στερεά 100%</u>	0 ml	100 g

- Μετά την απλή ανάμιξη των υλικών κάθε συνταγής με απλό μίξερ ακολουθούσε υψηλή ομογενοποίηση με χρής ακίδας υπερήχων για τουλάχιστον 10 min
- Το τελικό ομογενοποιημένο μίγμα εισάγονταν στο λυοφιλιωτή και πραγματοποιούνταν λυοφιλίωση στους -110 °C
- Το λυοφιλιωμένο υλικό στην συνέχεια αλεθόταν με χρήση μύλου άλεσης και παραγόταν η τελική σκόνη

2.3.3. In vitro μελέτη της αντι-μικροβιακής δράσης σκονών πολυφαινόλων & CitroX® σε παθογόνα βακτήρια

Η in vitro μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των σκονών συνεργισμού της πολυφαινόλης ελιάς (MEDOLIVA®) και του CitroX® σε παθογόνα βακτήρια πραγματοποιήθηκε με χρήση των δύο γνωστών και αναγνωρισμένων επιστημονικά μεθόδων της:

- ✓ Ελάχιστης ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum inhibitory concentration MIC)
- ✓ Ελάχιστης βακτηριοκτόνος δράση (Minimum bacteriocidal concentration MBC)

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων MIC και MBC δίνεται αναλυτικά παρακάτω:

- Αρχικά, τα παθογόνα βακτήρια (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Cl.perfringens*, *S.aureus*, *E.coli*, *S.typhimurium* και *C.jejuni*) καλλιεργήθηκαν σε εκλεκτικά τρυβλία.
- Στη συνέχεια απομονώθηκαν μεμονωμένες αποικίες και εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό εξειδικευμένο υπόστρωμα Tryptic Soy Broth (TSB).
- Ακολούθως μόλις παρουσιάστηκε ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 0,1ml από το αναπτυγμένο υπόστρωμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους οποίους είχαν προστεθεί αντιμικροβιακές ουσίες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3% και 5%) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2 ημέρες.
- Μετά το τέλος της επώασης ο σωλήνας με την ελάχιστη συγκέντρωση που δεν παρουσίασε παραγωγή ιζήματος/ θολώματος παρείχε την τιμή της Ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC).

- Τέλος για να διαπιστωθεί η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση για την θανάτωση του κάθε παθογόνου πραγματοποιούνταν εμβολιασμοί με 0,1ml από τα σωληνάκια με συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη από την Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σε σωλίνες με TSB χωρίς την προσθήκη της αντιμικροβιακής ουσίας και ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 2 ημέρες και έλεγχος για εμφάνιση θολώματος ή ιζήματος.
- Το πρώτο σωληνάκι (μικρότερη συγκέντρωση) που δεν παρουσίαζε σημάδια θολώματος αντιστοιχούσε στην ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (Τιμή MBC)
- Παράλληλα, σε όλους τους σωλίνες της MIC έπειτα από την επώαση μετρώνταν την οπτική πυκνότητα με χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis στα 620nm για να διαπιστωθεί τυχόν μείωση ή την αύξηση του παθογόνου έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών σε σχέση πάντα με τον μάρτυρα ο οποίος δεν περιείχε καμία αντιμικροβιακή ουσία.

2.3.4. In vitro μελέτη της αντι-μικροβιακής δράσης σκονών πολυφαινόλων & Citrox® σε μύκητες-Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου (*Penicillium expansum*, *Penicillium nalgiovense*) μυκήτων έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία.

Για την in vitro μελέτη της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων των σκονών συνεργισμού της πολυφαινόλης ελιάς (MEDOLIVA®) και του Citrox® σε παθογόνους μύκητες πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου των βοθρίων.

- Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, αρχικά οι μύκητες *P.expansum* και *P.nalgiovense* αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Sabourand Dextrose Agar και τα μυκήλια τους μετά την ανάπτυξη τους εμβολιαζόταν σε σωλίνες με αραιωτικό υγρό MRD (Maximum Recovery Diluent) έτσι ώστε να δημιουργείται εναιώρημα των σπορίων τους.
- Στην συνέχεια, σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Sabourand Dextrose Agar πραγματοποιούνταν επιφανειακή επίστρωση με 0,1ml από την κάθε αντιμικροβιακή ουσία.
- Μόλις στέγνωσαν τα τρυβλία με αποστειρωμένη γυάλινη πιπέττα Pasteur ανοιγόταν στο κέντρο του τρυβλίου ένα βοθρίο και προσθέσαμε 0,25μl από το εναιώρημα των σπορίων των μυκήτων και τα επωαζόταν στους 25°C για 5 ημέρες.
- Τέλος, με την βοήθεια ειδικού παχύμετρου μετρούνταν με ακρίβεια η διάμετρος ανάπτυξης του μυκηλίου των μυκήτων περιμετρικά του βοθρίου.

2.4. Εφαρμογή των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε τρόφιμα

2.4.1. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθυλακωμένων σκονών πολυφαινόλης-Citrox® σε λουκάνικα

Παρασκευάστηκαν λουκάνικα με φυσικό έντερο στα οποία προστέθηκαν οι διάφορες φυσικές αντιμικροβιακές σκόνες (Πολυφαινόλη 100/0, Σκόνη πολυφαινόλη- citrox 40/12, Σκόνη πολυφαινόλη- citrox 20/16, Σκόνη citrox 66% και Σκόνη citrox 100%) σε συγκέντρωση ppm. Παράλληλα, για να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων

παρασκευάστηκαν και λουκάνικα στα οποία δεν προστέθηκε καμία αντιμικροβιακή ουσία (μάρτυρας) αλλά και με νιτρώδη σε συγκέντρωση προσθήκης 200ppm. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιούνταν μετά την Παρασκευή τους μικροβιολογικές αναλύσεις κάθε 15 ημέρες και καταμετρούνταν οι πληθυσμοί των παρακάτω μικροοργανισμών: *E.coli* (TBX Agar) , *Enterobacteriaceae* (VRBGA), *Brochothrix thermosphacta* (STAA και STAA supplement), *Cl.perfringens* (TSC Agar και προσθήκη Anaerocult A για ανερόβιες συνθήκες) και Ζύμες/Μύκητες (PDA). Ταυτόχρονα, στα δείγματα αυτά μετρούνταν η τιμή του pH με την χρήση πεχαμέτρου στερεών αλλά και το χρώμα με την χρήση χρωματόμετρου.

2.4.2. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθυλακωμένων δειγμάτων πολυφαινόλης-Citrox[®] σε γιαούρτια

Παρασκευάστηκαν γιαούρτια στα οποία προστέθηκαν οι διάφορες φυσικές αντιμικροβιακές σκόνες συβεργισμού πολυφαινόλης Citrox(Πολυφαινόλη 100/0, Σκόνη πολυφαινόλη- citrox 40/12, Σκόνη πολυφαινόλη- citrox 20/16, Σκόνη citrox 66% και Σκόνη citrox 100%) σε συγκεντρώσεις 1000ppm, 1500ppm και επίσης παρασκευάστηκαν γιαούρτια με προσθήκη συντηρητικού σορβικού καλίου του οποίου η συγκέντρωση ήταν 1000ppm και ένα γιαούρτι μάρτυρας το οποίο δεν είχε καμία προσθήκη αντι-μικροβιακής ουσία. Τα γιαούρτια επώαστηκαν στους 42°C για 6 ώρες. Μετά το τέλος της πήξης τα γιαούρτια εμβολιάστηκαν με χρήση αποστειρωμένου κρίκου στο κέντρο τους από το εναιώρημα των σποριών του μύκητα *Penicillium expansum* και τα τοποθετήθηκαν στους 4°C. Ακολούθως, στις 8d, 26d, 34d και 48d μετρήθηκε το μυκήλιο του μύκητα.

Παράλληλα σε ένα ανεξάρτητο πείραμα, παρασκευάστηκαν γιαούρτια με προσθήκη 5000ppm από τις φυσικές αντι-μικροβιακές ουσίες, γιαούρτια με το σορβικό κάλιο στα 1000ppm και ένας μάρτυρας χωρίς καμία προσθήκη. Τα γιαούρτια επώαστηκαν στους 42°C για 6 ώρες. Μετά το τέλος της πήξης τα γιαούρτια εμβολιάστηκαν με χρήση αποστειρωμένου κρίκου στο κέντρο τους από το εναιώρημα των σποριών του μύκητα *Penicillium expansum* και τα τοποθετήθηκαν στους 8°C. Ακολούθως, στις 12d, 21d και 35d μετρήθηκε το μυκήλιο του μύκητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1.1. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum inhibitory concentration MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος δράση (Minimum bacteriocidal concentration MBC)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων MIC δίνονται στον Πίνακα ΙΧ που ακολουθεί

Πίνακας ΙΧ : Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των ουσιών στα παρακάτω παθογόνα βακτήρια.

MIC							
	S. typhimurium	L. monocytogenes	B.cereus	E.coli	S.aureus	Cl.perfringens	C.jejuni
100/0	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
0/100	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
80/4	1%	0,50%	1%	1%	1%	0,50%	1%
50/10	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%
60/8	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,50%
40/12	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,50%
20/16	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%

Από τα καταγραφόμενα δεδομένα μετρήσεων του Πίνακα ΙΧ συμπεφέρονται τα παρακάτω:

- Στον μικροοργανισμό S. typhimurium η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση έπεται από την προσθήκη των φυσικών αντι-μικροβιακών ουσιών είναι το 1% για τις σκόνες 80/4, 50/10, 60/8, 40/12, 20/16 ενώ για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Στον μικροοργανισμό L.monocytogenes η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 είναι το 0,5%, ενώ για τις σκόνες 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι 0,1%. Τέλος , για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Για τον B.cereus η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 είναι το 1% ενώ για τις σκόνες 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 η ελάχιστη ανασταλτική

συγκέντρωση είναι το 0,5%. Τέλος, για τις σκόνες 100/0 και 0/100 η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.

- Για την E.coli η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για τις σκόνες 80/4, 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 είναι το 1%. Τέλος, για τις σκόνες 100/0 και 0/100 η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.

- Για τον S.aureus η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για τις σκόνες 80/4, 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 είναι το 1%. Τέλος, για τις σκόνες 100/0 και 0/100 η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.

- Για το Cl.perfringens η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 είναι το 0,5%, ενώ για τις σκόνες 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι 0,1%. Τέλος, για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.

- Για το C.jejuni η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 είναι 1%, για την σκόνη 50/10 είναι το 0,1%, για τις σκόνες 60/8 και 40/12 είναι το 0,5% ενώ για την σκόνη 20/16 είναι 0,1%. Τέλος, για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων MBC δίνονται στον Πίνακα X που ακολουθεί :

Πίνακας X :Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) των ουσιών στα παρακάτω παθογόνα βακτήρια

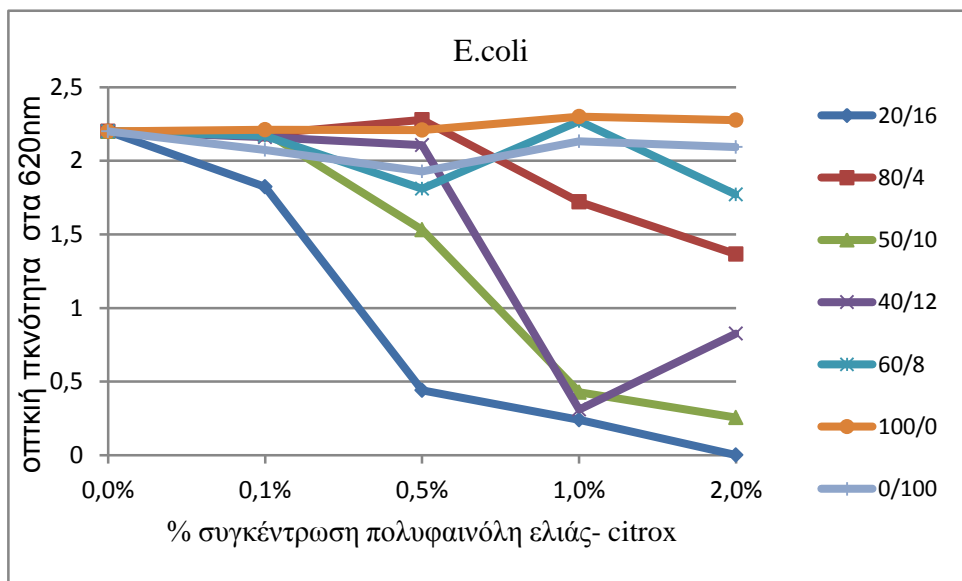
MBC							
	S. typhimurium	L. monocytogenes	B.cereus	E.coli	S.aureus	Cl.perfringens	C.jejuni
100/0	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
0/100	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
80/4	1%	0,50%	2%	1%	1%	1%	0,50%
50/10	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%
60/8	1%	0,10%	2%	1%	1%	1%	0,10%
40/12	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,50%	0,10%
20/16	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,50%	0,10%

Αναλύοντας τις μετρήσεις της MBC όπως παρατίθενται στον Πίνακα X εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα

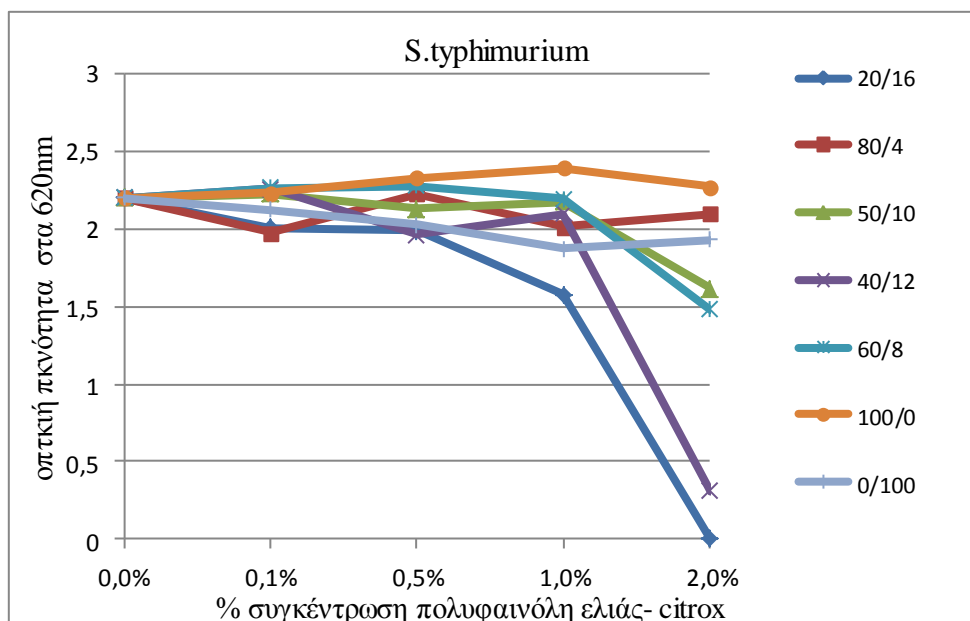
- Στον μικροοργανισμό *S. typhimurium* η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών είναι το 1% για τις σκόνες 80/4, 50/10, 60/8, 40/12, 20/16 ενώ για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Στον μικροοργανισμό *L.monocytogenes* η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 είναι το 0,5%, ενώ για τις σκόνες 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι 0,1%. Τέλος, για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Για τον *B.cereus* η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 και 60/8 είναι το 2% ενώ για τις σκόνες 50/10, 40/12 και 20/16 η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση είναι το 0,5%. Τέλος, για τις σκόνες 100/0 και 0/100 η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Για την *E.coli* η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση για τις σκόνες 80/4, 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 είναι το 1%. Τέλος, για τις σκόνες 100/0 και 0/100 η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Για τον *S.aureus* η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση για τις σκόνες 80/4, 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 είναι το 1%. Τέλος, για τις σκόνες 100/0 και 0/100 η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Για το *Cl.perfringens* η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 και 60/8 είναι το 1%, ενώ για τις σκόνες 50/10, 40/12 και 20/16 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι 0,5%. Τέλος, για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.
- Για το *C.jejuni* η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση για την σκόνη 80/4 είναι 0,5%, ενώ για τις σκόνες 50/10, 60/8, 40/12 και 20/16 είναι το 0,1%. Τέλος, για τις σκόνες 0/100 και 100/0 η ελάχιστη συγκέντρωση είναι πάνω από 5%.

3.2. Μετρήσεις Οπτικής πυκνότητας για τα διάφορα βακτήρια

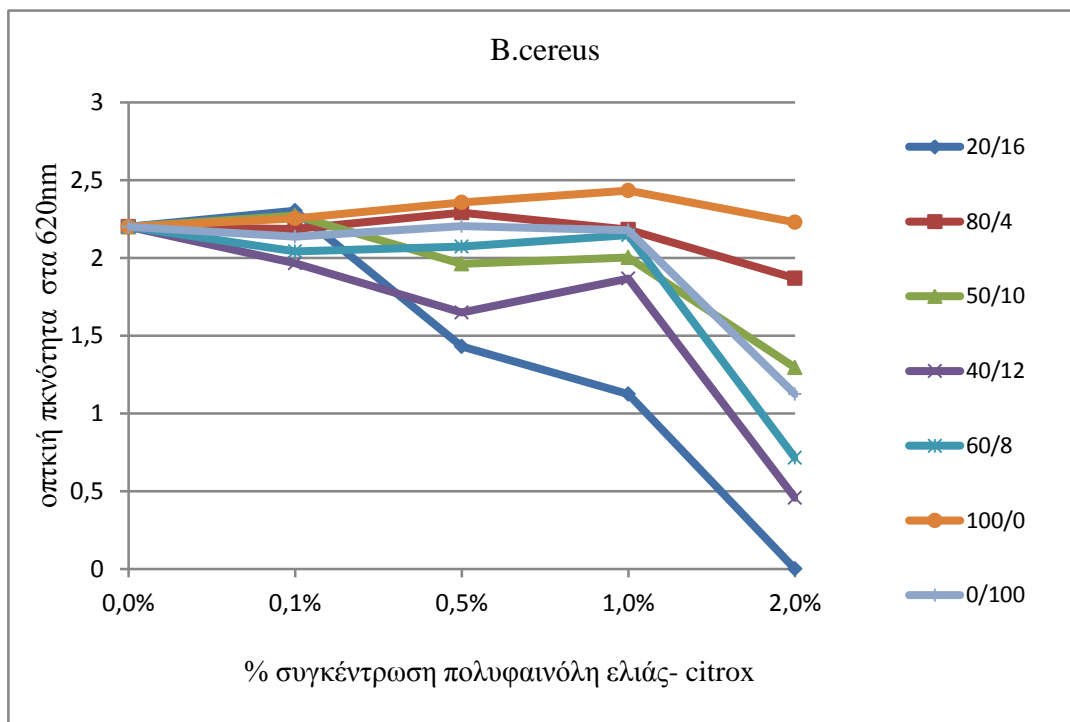
Στα διαγράμματα (I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII) που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 620 nm για τα βακτήρια σε σχέση με την συγκέντρωση προσθήκης των διαφόρων σκονών συνεργισμού MEDOLIVA® και CITROX®



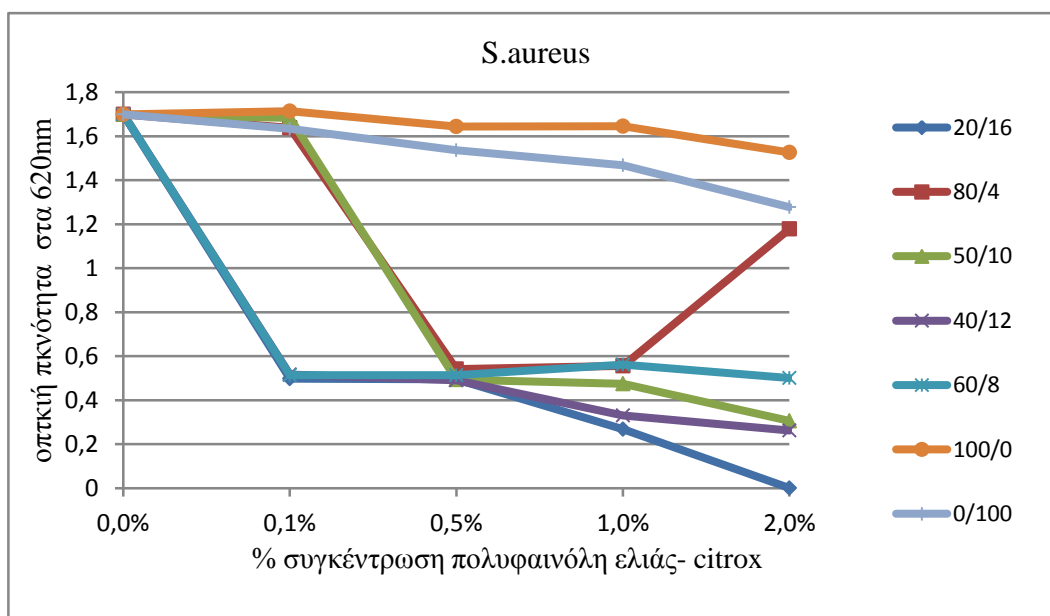
Διάγραμμα II : Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου E.coli έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και Citrox[®] σε διάφορες συγκεντρώσεις



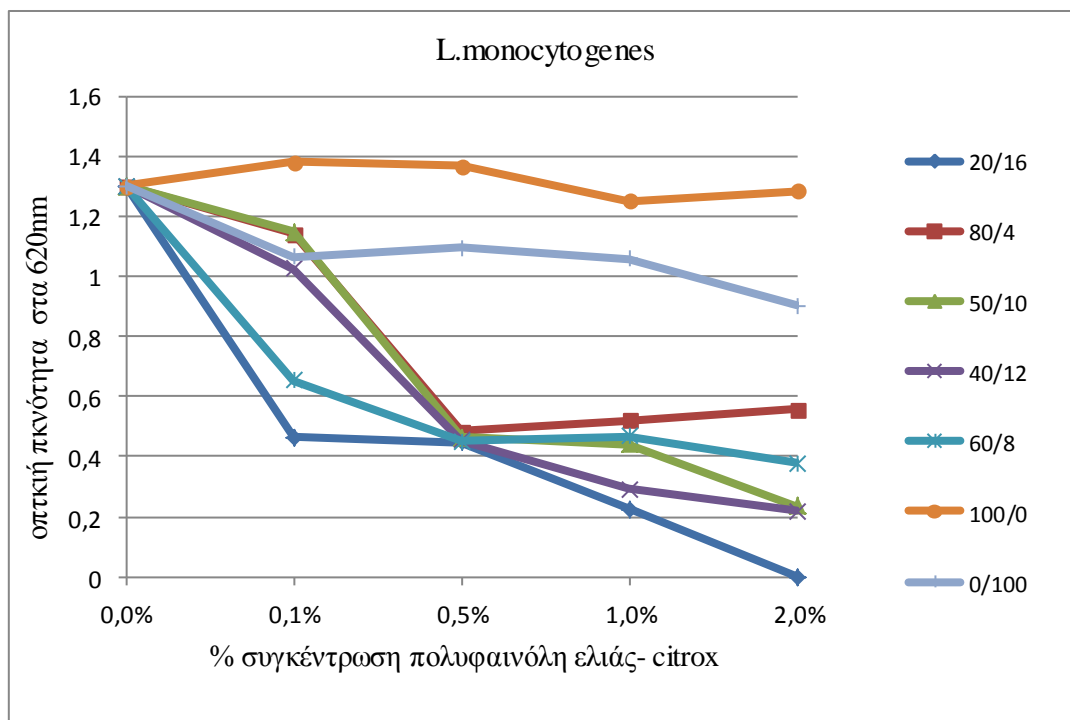
Διάγραμμα III: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου S.typhimurium έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και Citrox[®] σε διάφορες συγκεντρώσεις.



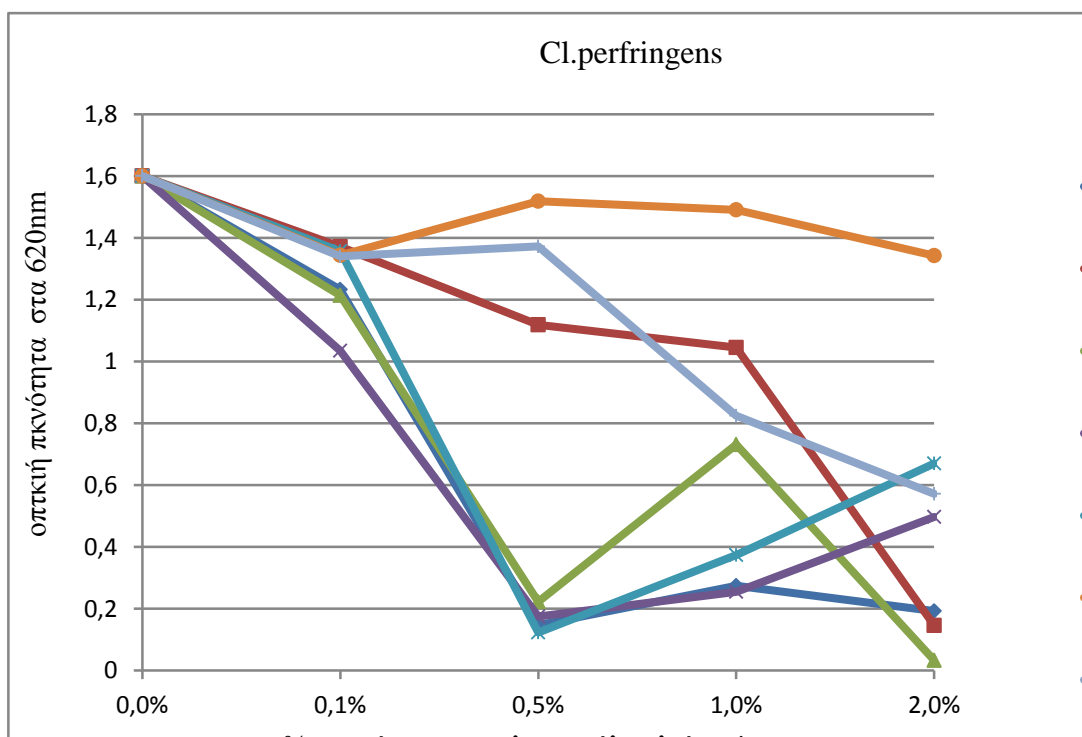
Διάγραμμα IV: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου *B.cereus* έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και Citrox[®] σε διάφορες συγκεντρώσεις.



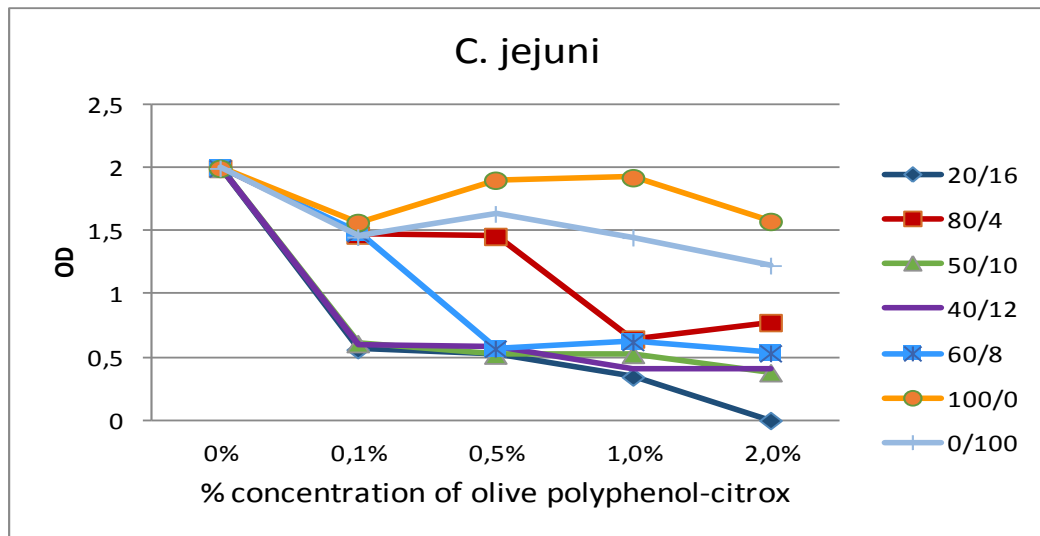
Διάγραμμα V : Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου *S.aureus* έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και Citrox[®] σε διάφορες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα VI: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου *L.monocytogenes* έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα VII: Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου *Cl.perfringens* έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα VIII : Απεικόνιση της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του βακτηρίου *C.jejuni* έπειτα από την προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών πολυφαινόλης ελιάς και CitroX® σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Από την ερμηνεία των στοιχείων που παρατίθενται για τους διάφορους μικροοργανισμούς/βακτήρια στα παραπάνω διαγράμματα διαπιστώνεται ότι σχετικά με την οπτική πυκνότητα:

- στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, η σκόνη που προκαλεί την μεγαλύτερη μείωση στην οπτική πυκνότητα είναι η 20/16 σε όλες τις συγκεντρώσεις.
- Αντίθετα, στον μικροοργανισμό *Staphylococcus aureus* παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη πτώση στην οπτική πυκνότητα είναι στην περίπτωση χρήσης σκόνης συνεργισμού τύπου 60/8 στο 0,1% ενώ και πάλι η σκόνη 20/16 από τη συγκέντρωση προσθήκης 0,5% προκάλεσε μείωση στην οπτική πυκνότητα.
- Για το *Clostridium perfringens* παρατηρείται ότι την μεγαλύτερη μείωση στην οπτική πυκνότητα προκαλείται από τις σκόνες 40/12 και 60/8 στο 0,5%.
- Τέλος στον μικροοργανισμό *Campylobacter jejuni* η μεγαλύτερη μείωση στην οπτική πυκνότητα σε σχέση με τον μάρτυρα παρατηρείται στην σκόνη 20/16 από το 0,5% μέχρι το 2%.

3.3. Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου (*Penicillium expansum*, *Penicillium nalgioense*) μυκήτων έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία (Μέθοδος βοθρίων για μύκητες)

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται η μετρήσεις του μεγέθους της διαμέτρου του δακτυλίου ανάπτυξης του μύκητα *P.nalgioense* για τις διάφορες συγκεντρώσεις προσθήκης των διαφόρων σκονών συνεργισμού πολυφαινόλης και CITROX®

Πίνακας XI : Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου του μύκητα *P.nalgioense*(cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία στο κέντρο του τρυβλίου.

<u>Penicillium nalgioense</u>						
Μάρτυρας: 0,9						
π/φ	0,10%	0,50%	1%	2%	3%	5%
20/16	-	-	-	-	-	-
80/4	0,9	-	-	-	-	-
100/0	0,875	0,95	0,9	0,675	0,8	0,825
0/100	1	-	-	-	-	-
50/10	-	-	-	-	-	-
60/8	0,425	-	-	-	-	-
40/12	-	-	-	-	-	-

Από τα στοιχεία του Πίνακα XI διαπιστώνεται ότι στην μέτρηση της διαμέτρου (σε cm) του μυκηλίου του μύκητα *Penicillium nalgioense* έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία στο κέντρο του τρυβλίου παρατηρείται ότι δεν υπήρξε καθόλου ανάπτυξη του μύκητα στις σκόνες τύπου 20/16, 50/10 και 40/12 σε όλες τις συγκεντρώσεις (0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3% και 5%) ενώ στις σκόνες 80/4, 0/100 και 60/8 υπήρξε ανάπτυξη μόνο στη συγκέντρωση 0,1% σε σχέση πάντα με τον μάρτυρα που ήταν 0,9cm. Τέλος, στην σκόνη 100/0 παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μύκητα σε όλες τις συγκεντρώσεις. Αυτό μας δείχνει ότι η συνενθυλάκωση της πολυφαινόλης ελιάς και του CitroX βοηθάει στην μείωση και καταστολή του μύκητα.

Αντίστοιχα, στον Πίνακα XII που ακολουθεί παρατίθενται η μετρήσεις του μεγέθους της διαμέτρου του δακτυλίου ανάπτυξης του μύκητα *P.expansum* για τις διάφορες συγκεντρώσεις προσθήκης των διαφόρων σκονών συνεργισμού πολυφαινόλης και CITROX®

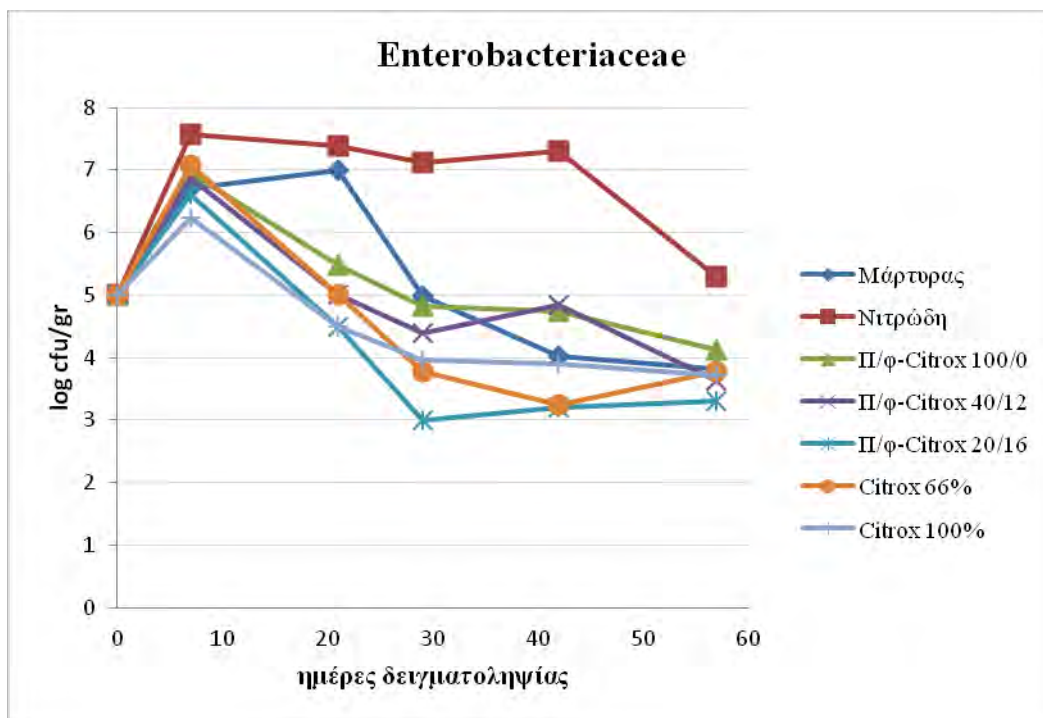
Πίνακας XII: Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου του μύκητα *P.expansum* (cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε βοθρία στο κέντρο του τρυβλίου.

<u>Penicillium expansum</u>						
Μάρτυρας: 1,275						
π/φ	0,10%	0,50%	1%	2%	3%	5%
20/16	0,8	-	-	-	-	-
80/4	1,075	0,95	0,675	-	-	-
100/0	1,35	1,3	1,325	1,325	1,3	1,55
0/100	1,425	0,775	-	-	-	-
50/10	1,1	0,1	-	-	-	-
60/8	1,025	0,2	0,2	-	-	-
40/12	1,075	-	-	-	-	-

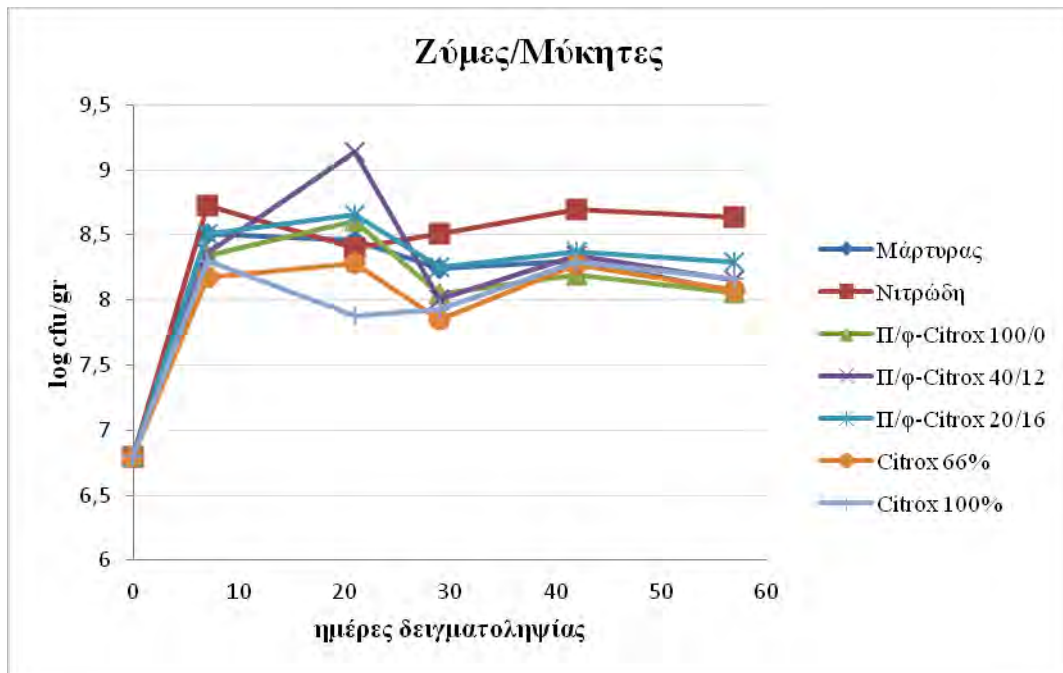
Όσον αφορά, τον μύκητα *Penicillium expansum*, παρατηρείται ότι μόνο στην σκόνη τύπου 20/16 και 40/12 έχουμε ανάπτυξη μόνο στο 0,1% (στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις έχουμε αναστολή) ενώ στις σκόνες 0/100 και 50/10 έχουμε ανάπτυξη στο 0,1% και 0,5%. Στις σκόνες 80/4 και 60/8 έχουμε ανάπτυξη μέχρι και το 1% ενώ στην σκόνη 100/0 έχουμε ανάπτυξη σε όλες τις συγκεντρώσεις.

3.4. *In-Vivo* Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθυλακωμένων σκονών συνεργισμού πολυφαινόλης-Citrox[®] σε λουκάνικα

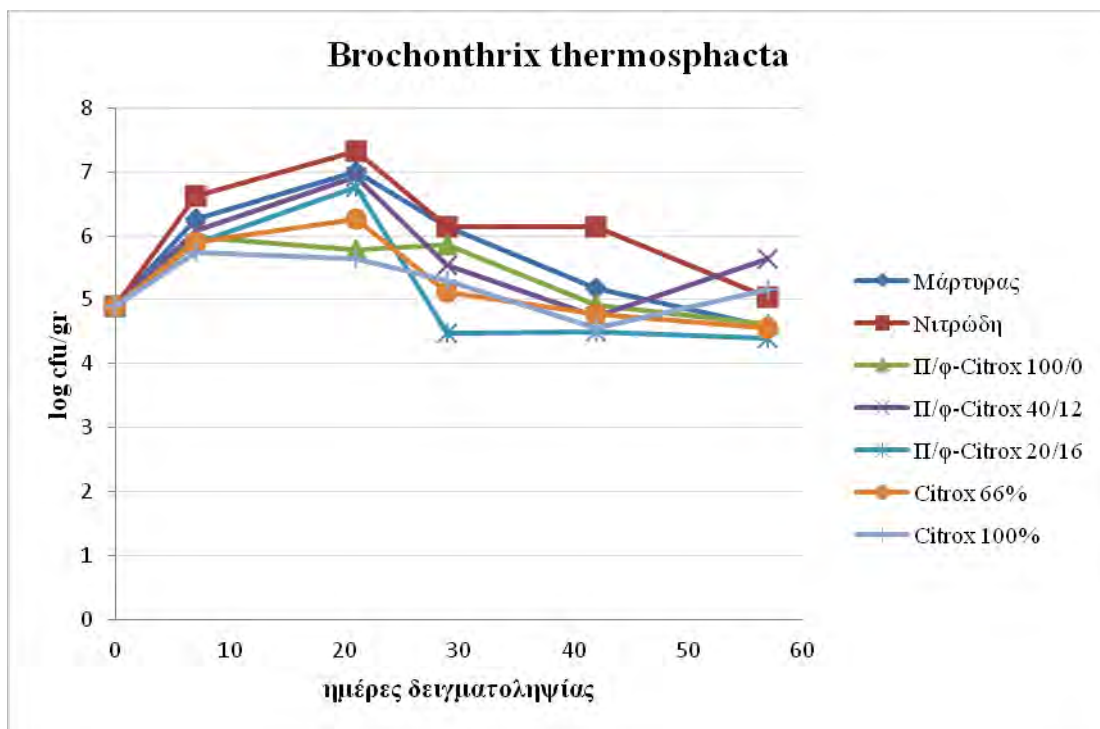
Για την *in vivo* δοκιμή σε τρόφιμα των σκονών συνεργισμού πολυφαινόλης /CITROX[®] δοκιμάστηκε αρχικά προσθήκη σε λουκάνικα τύπου χωριάτικα και μικροβιολογικός έλεγχος των διαφόρων προϊόντων προσθήκης με την πάροδο του χρόνου καθώς και έλεγχος μεταβολής των παραμέτρων χρώματος και pH. Παρακάτω παρατίθενται σε διαγράμματα τα σχετικά αποτελέσματα και στην συνέχεια εξάγονται τα σχετικά συμπεράσματα:



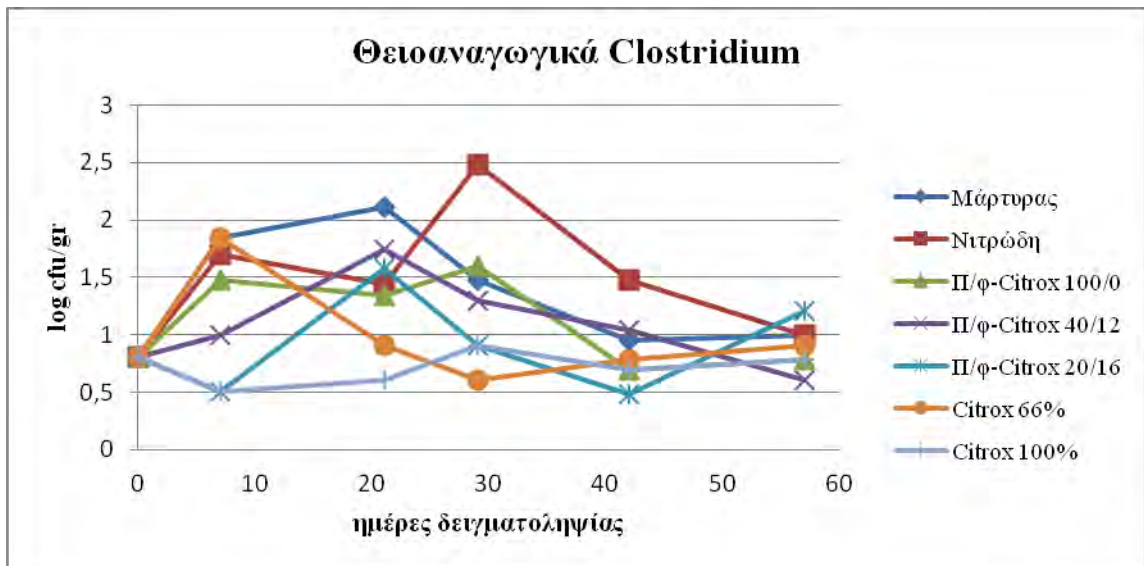
Διάγραμμα IX : Τα log cfu/gr του πληθυσμού των Enterobacteriaceae στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα



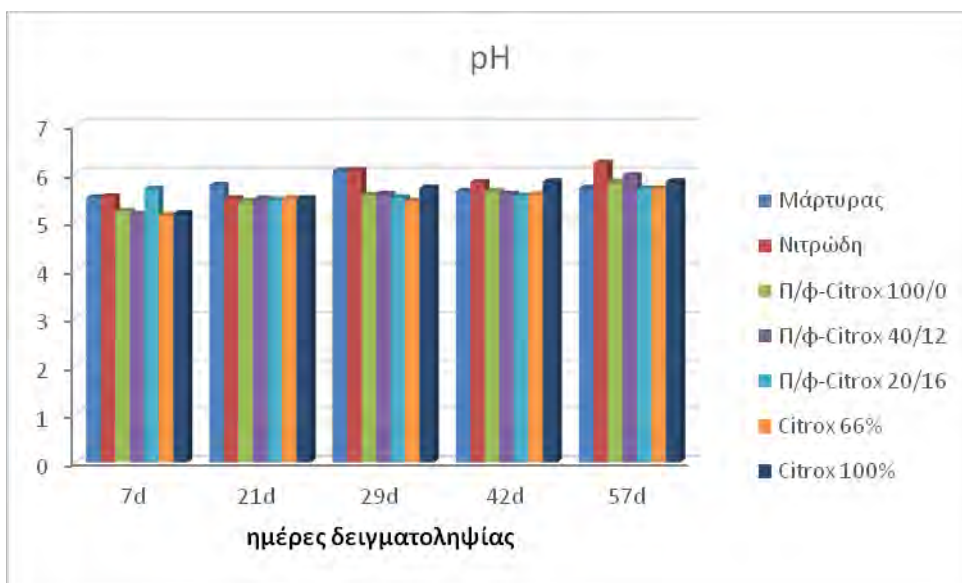
Διάγραμμα X : Τα log cfu /gr του πληθυσμού για ζύμες/Μύκητες στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα



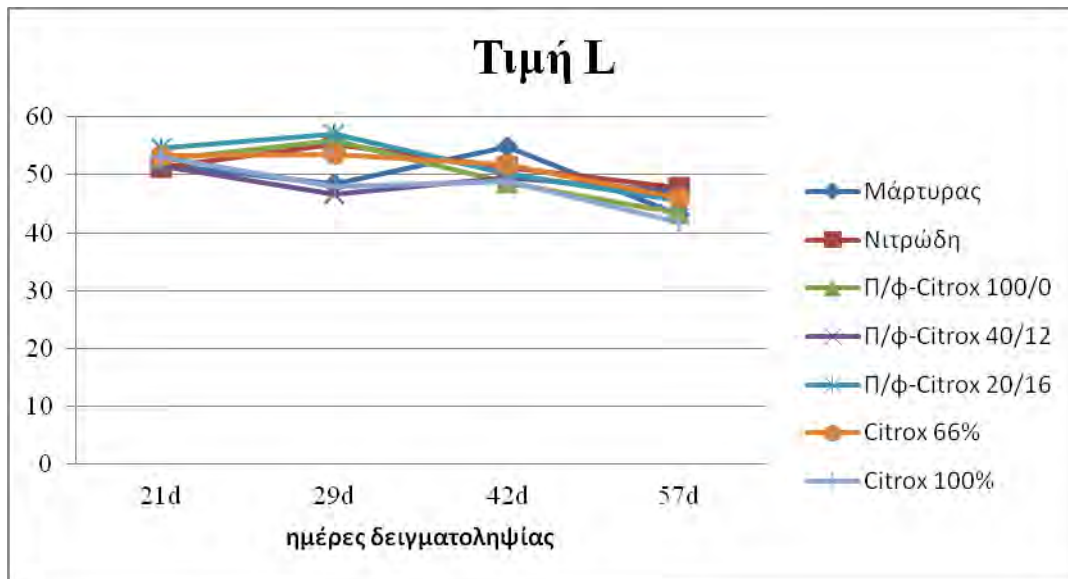
Διάγραμμα XI : Τα log cfu/gr του πληθυσμού *Brochontrix thermosphacta* στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα



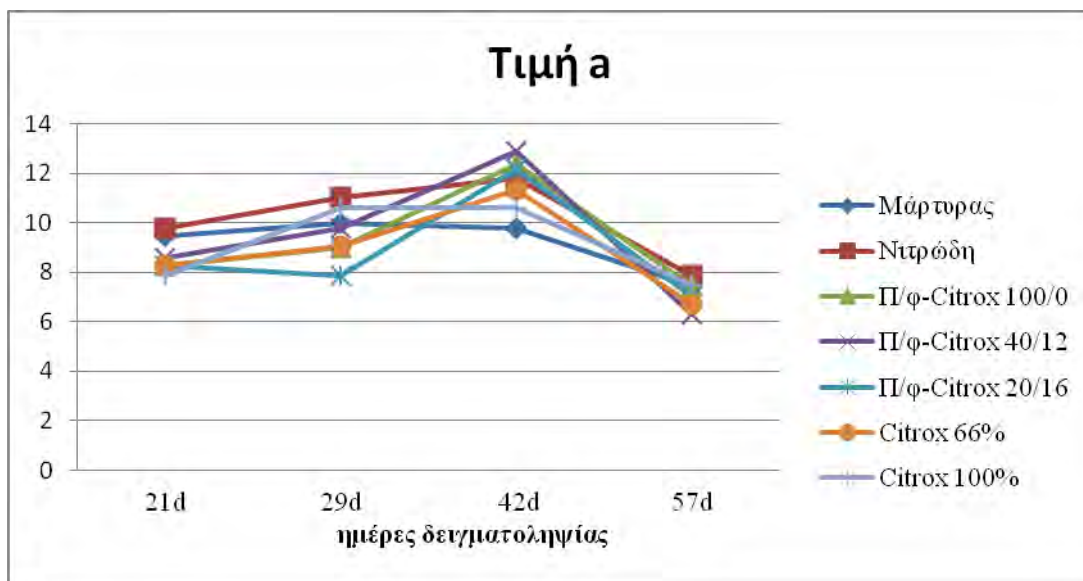
Διάγραμμα XII : Τα log cfu/gr Θειοαναγωγικά Clostridium στις διάφορες μέρες της δειγματοληψίας έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα



Διάγραμμα XIII: Μέτρηση pH των δειγμάτων που προέρχεται από την προσθήκη των αντι-μικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα στις διαφορετικές μέρες της δειγματοληψίας



Διάγραμμα XIV: Μέτρηση της τιμής L των δειγμάτων που προέρχεται από την προσθήκη των αντι-μικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα στις διαφορετικές μέρες της δειγματοληψίας



Διάγραμμα XV : Μέτρηση της τιμής a των δειγμάτων που προέρχεται από την προσθήκη των αντι-μικροβιακών ουσιών σε λουκάνικα στις διαφορετικές μέρες της δειγματοληψίας

Όσον αφορά τις μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα με τα λουκάνικα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον πληθυσμό των Enterobacteriaceae με την σκόνη 20/16 από τις 29d μέχρι και το τέλος των δειγματοληψιών η οποία είναι περίπου 3log σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίθετα, στις Ζύμες/ Μύκητες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάφορες σκόνες. Για τον μικροοργανισμό Brochonthrix thermosphacta παρατηρήθηκε μείωση στον πληθυσμό με την σκόνη 20/16 κατά 0,5log

σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος, για τα Θεριοαναγωγικά Clostridium παρατηρήθηκε μείωση στον πληθυσμό με όλες τις σκόνες και κυρίως με την 20/16 και CitroX 66%.

Για τις χημικές αναλύσεις και συγκεκριμένα για την μέτρηση του pH δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών σκονών.

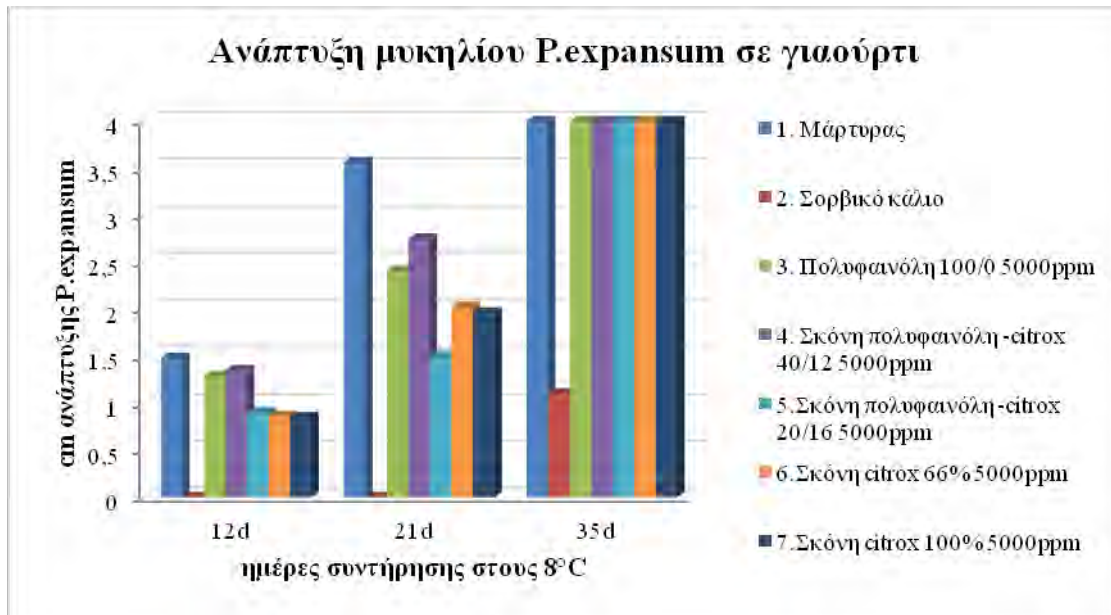
Για το χρώμα, στην παράμετρο L(η οποία εκφράζει το πόσο λαμπερό φαίνεται ένα δείγμα) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα, ενώ για την τιμή a (η οποία εκφράζει το πόσο κόκκινο είναι ένα δείγμα) παρατηρήθηκε ότι την μέγιστη τιμή την έχουμε στο δείγμα με την σκόνη 40/12 στις 42d σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά και με τα νιτρώδη και επίσης πολύ κοντά βρίσκεται και η τιμή a για το δείγμα 20/16 .

3.5. In-Vivo Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης συνενθλακωμένων σκονών συνεργισμού πολυφαινόλης - CitroX® σε γιαούρτια-Δοκιμές με τον μύκητα P.expansum

Πραγματοποιήθηκαν επίσης in vivo δοκιμές σε γιαούρτια με χρήση του μύκητα P.expansum σε δύο κλίμακες συγκεντρώσεων προσθήκης σκονών συνεργισμού 1000-1500 ppm και θερμοκρασία συντήρησης 4°C και 5000 ppm και θερμοκρασία συντήρησης 8°C και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται διαγραμματικά στα Διαγράμματα(XV,XVI,XVII) που ακολουθούν



Διάγραμμα XVI: Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου του μύκητα P.expansum (cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε γιαούρτια και συντήρησή τους στους 4°C



Διάγραμμα XVII : Μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου του μύκητα *P.expansum* (cm) έπειτα από την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών σε γιαούρτια και συντήρησή τους στους 8 °C

Από την μελέτη των στοιχείων των Διαγραμμάτων προκύπτουν τα εξής:

- Στα γιαούρτια τα οποία συντηρήθηκαν στους 4°C παρατηρείται ότι με την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών παρουσιάστηκε σημαντική μείωση στο μυκήλιο του μύκητα *P.expansum* από τις 26-32d τόσο στα 1000ppm όσο και στα 1500ppm σε όλες τις σκόνες και σε σχέση με τον μάρτυρα. Συγκεκριμένα, στις 26d παρατηρούμε ότι έχουμε μείωση στην σκόνη 40/12 στα 1000ppm (περίπου 3cm) ενώ στις 32d έχουμε μείωση και στην σκόνη με το 100% citrox στα 1500ppm.
- Για τα γιαούρτια τα οποία συντηρήθηκαν στους 8°C και είχαν 5000ppm από τις σκόνες δεν παρατηρούμε σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα. Μόνο στις 21d παρατηρούμε μείωση περίπου 1,5cm σε σχέση με τον μάρτυρα από την 20/16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε πειραματική παραγωγή ενθυλακωμένων σκονών δύο φυσικών αντιμικροβιακών προϊόντων και συγκεκριμένα πολυφαινόλων ελιάς και εκχυλίσματος εσπεριδοειδών. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα τα εμπορικά διαθέσιμα εκχυλίσματα υγρής πολυφαινόλης ελιάς με την ονομασία MEDOLIVA[®] και εσπεριδοειδών με την ονομασία CITROX[®].

Η μετατροπή των εκχυλισμάτων σε σκόνη έγινε με χρήση υψηλής ομογενοποίησης τους με προσθήκη μαλτοδεξτρίνης και στην συνέχεια με κρουγονική λυοφιλίωση και εκτός των απλών εκχυλισμάτων μετατράπηκαν σε σκόνη και μικτά εκχυλίσματα με μίξη σε διάφορες αναλογίες των δύο πρωτογενών εκχυλισμάτων ώστε να δοκιμαστεί ο πιθανός συνεργισμός των δύο φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών κατά παθογόνων και αλλοιογόνων βακτηρίων και μυκήτων που εμφανίζονται σε διάφορα τρόφιμα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές της *in vitro* αντι-μικροβιακής δράσης των σκονών που παρήχθησαν τόσο σε βακτήρια όσο και σε μύκητες.

Στην συνέχεια οι παραγόμενες σκόνες δοκιμάστηκαν *in vivo* σε δύο ευρείας παραγωγής και με ιδιαίτερα μικροβιολογικά προβλήματα τρόφιμα και συγκεκριμένα σε λουκάνικα χωριάτικα και γιαούρτι.

Στις δοκιμές *in-vitro* διαπιστώθηκε σημαντικός συνεργισμός των δύο φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών και συγκεκριμένα ενώ οι σκόνες με απλή πολυφαινόλη ελιάς και με απλό CITROX[®] παρουσίαζαν ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής και ελάχιστη συγκέντρωση θανάτωσης για τα διάφορα βακτήρια >5% οι αντίστοιχες σκόνες μίξης και συνεργισμού των δύο ουσιών παρουσίαζαν μέχρι και 5-50 φορές μικρότερες τιμές για τις εν λόγω κρίσιμες για την αντι-μικροβιακή δράση συγκεντρώσεις (τιμές από 1% έως και 0,1 %)

Επιπλέον σε όλους τους τύπους των βακτηρίων και σε όλες τις *in vitro* αντιμικροβιακές δοκιμές παρατηρήθηκε σημαντικό πλεονέκτημα από χρήση των σκονών συνεργισμού 20/16 (αρχική συνταγή ανάμιξης πριν την ξήρανση με λυοφιλίωση: 100 γρμ μαλτοδεξτρίνη, 20 γρμ υγρό εκχύλισμα πολυφαινόλης, 16 γρμ εκχυλίσματος CITROX[®] και 64 γρμ νερό) και 40/12 (αρχική συνταγή ανάμιξης πριν την ξήρανση με λυοφιλίωση: 100 γρμ μαλτοδεξτρίνη, 40 γρμ υγρό εκχύλισμα πολυφαινόλης, 12 γρμ εκχυλίσματος CITROX[®] και 48 γρμ νερό) σε σχέση με τις απλές σκόνες πολυφαινόλης και CITROX[®] και τις λοιπές σκόνες μίξης. Η εν λόγω παρατήρηση επιβεβαιώνει ότι υπάρχει η δυνατότητα να εκπονηθεί ένα πειραματικό πλάνο με τεχνική Box–Behnken και να βελτιστοποιηθεί ακόμα περισσότερο η αντιμικροβιακή δράση με στατιστική επιλογή αριστοποιημένης ανάμιξης των δύο φυσικών εκχυλισμάτων για το μέγιστο συνεργισμό τους και την επίτευξη μέγιστης αντι-μικροβιακής δράσης.

Εξάλλου οι *in vitro* δοκιμές με δύο μύκητες και συγκεκριμένα τους *Penicillium expansum* και *Penicillium nalgiovense* απέδειξαν ότι οι ίδιες σκόνες συνεργισμού τύπου 20/16 (αρχική συνταγή ανάμιξης πριν την ξήρανση με λυοφιλίωση: 100 γρμ μαλτοδεξτρίνη, 20 γρμ υγρό εκχύλισμα πολυφαινόλης, 16 γρμ εκχυλίσματος CITROX[®]

και 64 γρμ νερό) και τύπου 40/12 (αρχική συνταγή ανάμιξης πριν την ξήρανση με λυοφιλίωση: 100 γρμ μαλτοδεξτρίνη, 40 γρμ υγρό εκχύλισμα πολυφαινόλης, 12 γρμ εκχυλίσματος CITROX® και 48 γρμ νερό) παρουσίασαν την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση με βάση την ακύρωση της ανάπτυξης των μυκηλίων των δύο μυκήτων μετά από επιφανειακή προσθήκη συγκέντρωσης 0,5 % σε υπόστρωμα και εφαρμογή της μεθόδου βοθρίων.

Στην συνέχεια οι παραχθείσες σκόνες συνεργισμού δοκιμάστηκαν σε πραγματικά τρόφιμα και συγκεκριμένα τόσο σε λουκάνικα τύπου χωριάτικα όσο και σε γιαούρτι. Και πάλι διαπιστώθηκε σημαντική αντιμικροβιακή δράση και ειδικά της σκόνης τύπου 20/16 και αυτό αποτελεί μία πρόσθετη επιβεβαίωση της αξίας του συνεργισμού των φυσικών ουσιών για δημιουργία φυσικών συντηρητικών με ενισχυμένη δράση σε σχέση με τα πρωτογενή υλικά και δυνατότητα για περαιτέρω έρευνα και αριστοποίηση με χρήση στατιστικών μεθόδων βελτιστοποίησης με τεχνικές πειραματικού σχεδιασμού όπως η Box–Behnken σε συνδυασμό με μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας δεύτερης τάξεως.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

1. **Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, L.A., Mikros, E., Tsarbopoulos, A., Gikas, E.,**
2. **Aquious – PCI Membranes. 200a. Technical Paper, TP 105.6us.**
3. **Aquious – PCI Membranes. 2000a. Technical Paper, TP 138.5us.**
4. **Arts IC, Hplman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D.** “Catechin intake might explain the inverse between tea consumption and ischemic heart disease : the Zutphen Eldery Study.” *Am. J. Nutr.* 2001;74:227-3.
5. **Avihai Perl, Ofra Lotan, M. Abu- Abied, D. Holland** (1996) *Establishment of an Agrobacterium- mediated transformation system for grape (Vitis vinifera L.): The role of antioxidants during grape? Agro bacterium interactions Nature Biotechnology 14, 624- 628 doi: 10.1038/ nbt0596-624, Research Article.*
6. **Braithwaite A., Smith F.J., 1996.** *Chromatographic Methods. 5th edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 258-361.*
7. **Briante R., Febbraio F., and Nucci R.**(2003). “*Antioxidant Properties of Low Molecular Weight*”.
8. **Bringmann G, Messer K, Wohlarth M, Kraus J, Dumbuya K, Ruckert M:** *HLPC-CD on-line coupling in combination with HPLC-NMR and HPLC-MS-MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts. Anal Chem 1999, 71: 2678-2686.*
9. **Bronner WE, Beecher GR:** *Method for determining the content of catechines in tea infusions by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 1998, 805: 137-142.*
10. **Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bordiu A., Dupuy de Lome E. & Murillo J.M., 1996:** *Land Treatment Of Olive Oil Mill Wastewater. - Biodeterioration & Biodegradation 38: 215-225.*
11. **Chiou W.L., Riegelman S., 1971.** *Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. J. Pharm. Sci., 60, 1281-1302.*
12. **Curin Y, Andriantsitohaina R.** “*Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. Pharmacol. Rep. 2005;57:97-107*”
13. **Currell G., 2000.** *Analytical instrumentation performance characteristics and quality, J. Wiley & Sons. N. York, pp.125-139.*

14. **Dell' Agli M, Besciala A, Bosisio E.** 2004 “ *Vascular effects of wine polyphenols*”. *Cardiovascular Research*: 63:593-602
15. **Desai J., Alexander K., Riga A., 2006.** *Characterization of polymeric dispersions of dimenhydrinate in ethyl cellulose for controlled release. Int. J. Pharm., 308, 115-123.*
16. **Di Giovacchino, L., Basti, C., Constantini, N., Surricchio, G., Ferrante, M., Lombardi, D.,** *Effects of Spreading Olive Vegetable Water on Soil Cultivated with Maize and Grapevine, Olivae, 91, 37-43, 2002.*
17. **Fiestas Ros de Ursinos J.A., 1986:** *Vegetation water used as fertilizer. Proc. International Symposium on Olive by - Products Valorization. - FAO, UNDP, Sevilla, Spain, pp. 321-330.*
18. **Fiestas J.A., and Lopez Camino J. (1994)** *Evacuacion de la experiencia de las plantas prototipo de depuracion de alpechines en la cuenca del rio Gualdalquivir.*
19. **Fiestas J.A., Lopez Camino J. 1994, Knup G., Rucker G., Ramos-Coormenzana A., Garrido Hoyos S., Neugebauer M. , Ossenkop T. 1996, Juarez-Jimenez, M. Garcia-Pareja 1996.**
20. **Fuhrman B, Arivam M.** 2001 “*Flavonoids protect ALDL from oxidation and Attenuate atherosclerosis.* “ *Cur. Opin. Lipid.;* 12:41 -8
21. **Glajch J.L., Kirkland J.J., Squire K.M., Minor J.M., 1980.** *Optimization of solvent strength and selectivity for reversed phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. J. Chromatogr., 199, 7–79.*
22. **Goldberg A.H., Gibaldi M., Kanig J.L., 1965.** *Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures I-theoretical considerations and discussion of the literature. J. Pharm. Sci., 54, 1145-1148.*
23. **Goldberg A.H., Gibaldi M., Kanig J.L., 1966.** *Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures II-experimental evaluation of an eutectic mixture: urea-acetaminophen system. J. Pharm. Sci., 55, 482-487.*
24. **G. Guiochon / J. Chromatogr. A 965 (2002) 129–161.**
25. **Guyot M., Fawaz F., Bidet J., Bonini F., Lagueny A.M., 1995.** *Physicochemical characterization and dissolution of norfloxacin/cyclodextrin inclusion compounds and PEG solid dispersions. Int. J. Pharm., 123, 53-63.*
26. **Kanig J.L., 1964.** *Properties of fused mannitol in compressed tablets. J. Pharm. Sci., 53, 188-192.*
27. **Karata A., Yuksel N., Baykara T., 2005.** *Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. Il Farmaco, 60, 777-782.*

28. **Karavas E., Ktistis G., Xenakis A., Georgarakis E., 2006.** *Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone. Eur. J. Pharm. Biopharm., 63, 103-114.*
29. **Knup G., Rucker G., Ramos-Coormenzana A., Garrido Hoyos S., Neugebauer M. Juarez-Jimenez and M. Garcia-Pareja (1996).**
30. **Levy G., 1963.** *Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. Am. J. Pharm. Sci. Sup. Public Health, 135, 78-92.*
31. **Leuner C., Dressman J., 2000.** *Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. Eur. J. Pharm. Biopharm., 50, 47-60.*
32. **Li F.Q., Hu J.H., Denq J.X., Su H., Xu S., Liu J.Y., 2006.** *In vitro controlled release of sodium ferulate from Compritol 888 ATO-based matrix tablets. Int. J. Pharm., 324, 152-157.*
33. **Lloyd G.R, Craig D.Q.M., Smith A., 1999.** *A calorimetric investigation into the interaction between paracetamol and polyethylene glycol 4000 in physical mixes and solid dispersions. Eur. J. Pharm. Biopharm., 48, 59-65.*
34. **Manach C, Mazur A, Scalbert A. 2005** “ *Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. “ Current Opinion in Lipidology: 16:77-84.*
35. **Moffatt W.G., Pearsall G.W., Wulff J., 1964.** *Structure and properties of materials. Vol I. John Wiley & Sons, Inc., pp. 161-178, 224-239.*
36. **Nestel P. 2003** “ *Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions.” Cur.Opin. Lipid:14:3-8.*
37. **Ohara T., Kitamura S., Kitagawa T., Terada K., 2005.** *Dissolution mechanism of poorly watersoluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. Int. J. Pharm., 302, 95-102.*
38. **Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull EW, Spiegelhalder B, Bartsch H:** *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. Clin Chem 2000, 46:976-988.*
39. **Pokharkar V.B., Mandpe L.P., Padamwar M.N., Ambike A.A., Mahadik K.R., Paradkar A., 2006.** *Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. Powder Technol., 167, 20-25.*
40. **Pouton C.W., 2006.** *Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. Eur. J. Pharm. Sci., 29, 278-287.*
41. **Prabhu S., Ortega M., Chan M., 2005.** *Novel lipid-based formulations enhancing the in vitro dissolution and permeability characteristics of a poorly water-soluble model drug, Piroxicam. Int. J. Pharm., 301, 209-216.*

42. **Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean ME.** 2005 “ *Tea flavonoids and cardiovascular health.* “*Q. J. Med.*; 94: 277-82.
43. **Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., Aloui, F.,** 2000. *Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater bio treatment.* *Process Biochemistry* 35, 725-735.
44. **Sekiguchi K., Obi N.,** 1964. *Studies on absorption of eutectic mixture. II. Absorption of fused conglomerates of chloramphenicol and urea in rabbits.* *Chem. Pharm. Bull.*, 2, 134-144.
45. **Sekiguchi K., Obi N.,** 1961. *Studies on absorption of eutectic mixtures. I. A comparison of the behavior of eutectic mixtures of sulphathiazole and that of ordinary sulphathiazole in man.* *Chem. Pharm. Bull.*, 9, 866-872.
46. **Seo A., Holm P., Kristensen H.G., Schaefer T.,** 2003. *The preparation of agglomerates containing solid dispersions of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer.* *Int. J. Pharm.*, 259, 161-171.
47. **Serajuddin A.T.M.,** 1999. *Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs.* *J. Pharm. Sci.*, 88(10), 1058-1066.
48. **Scalbert, A. and Mellenthin, A.** 2001 “*Identification and Quantitation of flavonols in Rowanberry (Sorbus aucuparia L.) juice.* “ *Eur. Food Res. Technol.*: 213, pp. 12-17.
49. **Sierra, J., Marti, E., Montserrat, G., Cruanas, R., Garau, M.A.,** *Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal, The Science of the Total Environment*, 279, 207-214, 2001.
50. **Siouffi A.M., Phan-Tan-Luu R.,** 2000. *Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis.* *J. Chromatogr. A*, 892, 75-106.
51. **Simonelli A.P., Mehta S.C., Higuchi W.I.,** 1969. *Dissolution rates of high energy polyvinylpyrrolidone (PVP)-sulfathiazole coprecipitates.* *J. Pharm. Sci.*, 58, 538-549.
52. **Shahidi, F. and Naczki, M.,** *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press LLC, 2004.
53. **Snyder L.R., Carr P.W., Rutan S.C.,** 1993. *Solvatochromically based solvent-selectivity triangle.* *J. Chromatogr. A*, 656, 537-547.
54. **Stoclet JC, Chataigneu T, Ndiaya M.** 2004 “ *Vascular protection by dietary polyphenols.* “ *Europ. J. Of Pharmacology*; 500:299-313
55. **Taylor L.S., Zografis G.,** 1997. *Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions.* *Pharm. Res.*, 14, 1691-1698.

56. **Urbanetz N.A., Lippold B.C., 2005.** *Solid dispersions of nimodipine and polyethylene glycol 2000: dissolution properties and physico-chemical characterization.* *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59, 107–118.
57. **Won D.H., Kim M.S., Park J.S., Hwang S.J., 2005.** *Improved physicochemical characteristics of elodipine solid dispersion particles by supercritical anti-solvent precipitation process.* *Int. J. Pharm.*, 301, 199-208.
58. **Van Drooge D.J., Hinrichs W.L.J., Visser M.R., Frijlink H.W., 2006.** *Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques.* *Int. J. Pharm.*, 310, 220-229
59. **Vasconcelos T., Sarmiento B., Costa P., 2007.** *Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs.* *Drug Discovery Today*, 12, 1068-1075.
60. **Vermerris, W., Nickolson, R., Phenolic Compound Biochemistry, Springer 2006.**
61. **Visser T, Vredenbergregt MJ, Ten Hove GJ, De APJM, Somsen GW:** *Gradient elution liquid chromatography-infrared spectrometry at µg-l level using capillary column switching and addition of a make-up liquid. A preliminary study.* *Annal Chim Acta* 1997, 342: 151-158.
62. **Vilhelmsen T., Eliassen H., Schaefer T., 2005.** *Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions.* *Int. J. Pharm.*, 303, 132-142.
63. **Vita JA.** “Polyphenols and cardiovascular disease : effects on endothelial and platelet function.” *AM. J. Clin. Nutr.* 2005;81:292-7.
64. **Zern TL, Fernandez ML.** 2005 “Cardioprotective effect of dietary polyphenols.” *J. Nutr:* 135:2291-4

Ελληνόγλωσση

65. **Κουπάρης Μ.Α., Χατζιωαννου Θ.Π., 1997.** *Ενόργανη Ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, pp. 229-265; 403-426; 467-495.*
66. **Κουτελιδάκης Α.** *Φαινολικά συστατικά και πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων.*
67. **Κουντουρέλης Ι.Ε., 1997.** *Μαθήματα Φαρμακευτικής Ανάλυσης ΙΙ. Α.Π.Θ. Θεσ/νίκη, pp. 90-96.*
68. **Μήτσιος Ι.Κ., 1996:** *Αλατούχα και αλκαλιωμένα (με Νάτριο) εδάφη. Ποιοτική κατάταξη των νερών άρδευσης. - Εκδόσεις Zymel, Αθήνα , σελ. 79.*

69. **Νυχάς Ι, Πανάγου Ε.** : Σημειώσεις στη μικροβιολογία τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του ανθρώπου Εργαστήριο μικροβιολογίας & βιοτεχνολογίας τροφίμων σελ.58
70. **Πετρωτός Κ.,** 'Ανάπτυξη μεθόδου ολικής αξιοποίησης αποβλήτων ελαιολιπιδίου για παραγωγή βιο-δραστικών ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας και αγρο-υλικών'. Αρχιμήδης ΙΙΙ (Πρόγραμμα)
71. **Πετρωτός Κ.,** 2010, 'Ανάπτυξη μεθόδου αποχρωματισμού λιπαρών οξέων με βιομηχανική χρωματογραφία', Τεχνική Έκθεση (αρ. κουπονιού 15991593- 01000042)
72. **Πετρωτός Κ.,** 2011, «Παραγωγή Βιοδραστικού Παραδοσιακού Γιαουρτιού με Ενσωμάτωση Φυτικών Πολυφαινόλων» Τεχνική Έκθεση (αρ. κουπονιού: 69206003-01-000050 99

Ιστοσελίδες

73. Environmentalhealthcriteriaforphenol, www.inhem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm
74. Διατροφή σήμερα, 'Οι Πολυφαινόλες με απλά και κατανοητά λόγια', Στο : <http://www.diatrofisimera.gr/diatrofi/oi-polifainoles-me-apla-kai-katanoita-logia/>. (τελευταία πρόσβαση στις 19/03/2016)
75. ebooks.edu.gr 'Φαινόλες', Στο: <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-B132/471/3119,12545/>. (τελευταία πρόσβαση στις 19/03/2016)
76. ELQA «Επαναληψιμότητα», Στο: <https://elqa.teilar.gr/neaanakoinwseis/item/256-epanalipsimotita> ,(τελευταία πρόσβαση στις 30/06/2016)
77. Foodbites, 'Encapsulation, Ενθυλάκωση', Στο: <http://www.foodbites.eu/j15/el/foodpedia/626-encapsulation-->, (τελευταία πρόσβαση στις 01/06/2016)
78. Polyhealth, «Πολυφαινόλες», Στο: <http://www.polyhealth.gr/el/%CE%B2%CE%B9%CE%B2%CE%BB%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AF%CE%B1%CF%80%CF%81%CE%BF%CF%8A%CF%8C%CE%BD%CF%84%CF%89%CE%BD>, (τελευταία πρόσβαση στις 01/11/2015)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



Proceedings of 2nd I.C. FaBE 2015



Volume II



International Conference of
Food and Biosystems
Engineering

28-31 May 2015
Mykonos island

Study of the antibacterial and antifungal properties of olive polyphenols and citrox[®] encapsulated powders in vitro and in food samples

Fani Karkanta^{1,3}, Chrysanthi Mitsagga², Paraskevi Bouki²,
Sergios Touchikian², Konstantinos Petrotos^{3*}, Ioannis S. Boziaris⁴,
Ioannis Giavasis²

¹University of Thessaly, Dept. of Medicine, Lab of Hygiene and Epidemiology, 41222 Larisa

²TEI of Thessaly, Dept. of Food Technology, 43100 Karditsa, Greece

³TEI of Thessaly, Dept. of Biosystems Engineering, 41110 Larisa, Greece

⁴University of Thessaly, Dept. of Ichthyology and aquatic Environment, Volos, Greece

Abstract

*Olive polyphenols isolated from olive mill waste and citrox (mixture of plant extracts and organic acids) are natural, label-free antimicrobial substances derived from plants with promising properties and can be used as alternatives to food preservatives. Both have a distinctive, rather unpleasant taste which can be masked after appropriate encapsulation which may also affect their functionality as antimicrobials. In this study we compared encapsulated olive polyphenols and citrox preparations (either separately or simultaneously encapsulated in different ratios) used alone or in combinations, in order to test the inhibitory and bacteriocidal/fungicidal effects of both substances, as well to investigate potential synergistic effects between them in vitro and in food samples (formulated cheese substitutes and yogurt). We observed that although citrox had a higher antimicrobial activity compared to polyphenols when used alone, the combination of polyphenols with citrox had a much better activity, with a significant synergistic effect and was strongly inhibitory to different pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) and fungi (*Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Monilia fructigena*). The minimum inhibitory and minimum lethal concentrations for both single products and for different combination thereof are reported and the optimal conditions and concentrations for food applications are discussed. Also the potential for substituting synthetic preservatives with olive polyphenols and citrox, as well as the impact of their combined use on the self-life of the studied dairy products are described.*

*Corresponding author e-mail: petrotos@teilar

IN recent years, there has been a tendency for discovering and applying novel phytochemicals in food as a natural alternative to synthetic chemical preservatives (or additives in general), as a response to consumers' demand for healthier and more natural food products (Techathuvanan et al., 2014). Olive polyphenols are natural antioxidant and antimicrobial substances that derive either from Olive Mill Waste (OMW) or from olive leaves, comprising a mixture of water soluble polyphenolic substances, which can be utilized in food preservation and safety in order to improve safety and self life of food using natural phytochemicals, or to (partly) replace undesirable synthetic preservatives (Leontopoulos et al., 2015; Sudjana et al., 2009; Bisignano et al., 1999; Ramos-Cormenzana et al., 1996). Similarly, citrox, is a natural (proprietary) ingredient that can be used in food as a replacement for chemical preservatives, without carrying and an E-code which is necessary for all food additives. It contains flavonoids and organic acids from citrus extracts which have antimicrobial activity (Techathuvanan et al., 2014; Tsironi & Taoukis, 2012; Hooper et al., 2011). Both polyphenols and citrox have a dark color and bitter and astringent taste (especially citrox) which poses a disadvantage for food applications. This can be overcome by encapsulation of these compounds in an appropriate carrier such as maltodextrin. In this work, some of the antibacterial and antifungal properties of olive polyphenols derived from OMW (without use of organic solvents) and citrox in free or encapsulated form, used either alone or in combination are described in in vitro tests and in food applications.

I. MATERIALS AND METHODS

The process for isolating olive mill waste polyphenols involved briefly a microfiltration through ceramic membranes to separate polyphenols from the rest of the waste, a selective adsorption through microporous resins, desorption with pure water (without use of methanol/alcohols), condensation via reverse osmosis 4 times to produce a condensed liquid mixture of polyphenols (~ 20 Brix), microencapsulation in maltodextrin and freeze

drying. The polyphenol content in the encapsulated powder was ~ 3,8%, based on the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al. 1999) and the method for polyphenol isolation from olive mill waste is fully described by Petrotos et al., (2013). The encapsulated polyphenol was supplied by Polhealth S.A. (Greece). Citrox Progarda Ace (produced and supplied by Phyto, England) is a proprietary formulation with *Citrus aurantium amara* extract (bitter orange) and organic acids (citric acid, lactic acid, acetic acid) qualified for use in food without an 'E' code. It is a dark brown, bitter and acidic (pH 3) liquid ready for use in food.

The experimental design was as follows:

We tested different 2 formulations of citrox (in free liquid form and in encapsulated form) and one formulation of encapsulated olive polyphenols (using maltodextrin as a carrier) for their antibacterial activity against several food pathogens using, namely *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* by *in vitro* antimicrobial assays in synthetic media (Tryptone Soya Broth). More specifically we carried out the Minimum Inhibitory Concentration and the Minimum Bacteriocidal Concentration assay (MIC/MBC). Inhibition was estimated by the absence of sediment/turbidity in liquid cultures of bacterial pathogens in Tryptone soya broth supplemented with the tested antimicrobials at different concentrations. Bacteriocidal activity was estimated after recultivation of all the samples exhibiting inhibition into a fresh substrate free of antimicrobials.

Also, we produced co-encapsulated powder of both olive polyphenols and citrox ('2 in 1' powder, using liquid condensate of polyphenol and citrox, mixed with maltodextrin which was the encapsulation carrier) at different ratios, in order to formulate an optimized novel antimicrobial substance and conducted the following *in vitro* antimicrobial assays: the Minimum Inhibitory Concentration and the Minimum Bacteriocidal Concentration assay (MIC/MBC), the mycelium expansion assay (measurement of mycelium expansion zones in Petri dishes with solid substrates supplemented with the tested antimicrobial), and the measurement of micro-

bial population (log cfu/ml) after a 48h growth in synthetic medium supplemented with the tested antimicrobials.

In this case the composition and the encoding of the polyphenol/citrox encapsulated powders was as follows:

Sample	Polyphenol	CITROX	H ₂ O	Maltodextrin
20/16	20 ml	16 ml	64	100 g
80/4	80 ml	4 ml	16	100 g
50/10	50 ml	10 ml	40	100 g
40/12	40 ml	12 ml	48	100 g
60/8	60 ml	8 ml	32	100 g
100/0	100 ml	0 ml	0 ml	100 g
0/100	0 ml	300 ml	0 ml	300 g

We tested the antimicrobial activity against several pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*) as well two fungi (*Penicillium nalgiovense*, *Penicillium expansum*).

Lastly, we conducted tests of antimicrobial activity of the two natural antimicrobials in food such as cheese and yoghurt. In the first experiment with yoghurt the fungal population (log cfu/g) of *Penicillium italicum* was measured in inoculated and refrigerated yoghurt,

and we compared the antifungal activity of polyphenols encapsulated in pullulan and in maltodextrin. The sample encoding is shown below:

Control	no polyphenols
PPA1	polyphenols encapsulated in pullulan-1g/l
PPA2	polyphenols encapsulated in pullulan-2g/l
PPA3	polyphenols encapsulated in pullulan-3g/l
PMA1	polyphenols encapsulated in maltodextrin-1g/l
PMA2	polyphenols encapsulated in maltodextrin-2g/l
PMA3	polyphenols encapsulated in maltodextrin-3g/l

In the second experiment, the mycelium expansion (in mm) of *Alternaria alternata*, *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*, and *Aspergillus niger* was measured in inoculated and refrigerated semi-hard cheese.

II. RESULTS AND DISCUSSION

A) *In vitro* antimicrobial activity of polyphenols and citrox used separately-MIC/MBC assay. In this experiment, liquid condensate of citrox, as well as encapsulated citrox and encapsulated polyphenol was used. Citrox/maltodextrin ratio, and Polyphenol condensate/maltodextrin ratio was 50/50 in both powders. The results of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bacteriocidal Concentration are shown in Table 1.

Table 1. (a) Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bacteriocidal Concentration of liquid citrox condensate, encapsulated citrox and encapsulated polyphenol

Minimum Inhibitory Concentration			
	liquid citrox extract	citrox/maltodextrin 50/50	polyphenol condensate/maltodextrin 50/50
<i>S. typhimurium</i>	2%	2%	10%
<i>L. monocytogenes</i>	0,5%	2%	10%
<i>B. cereus</i>	2%	2%	10%
<i>E. coli</i>	2%	2%	10%
<i>S. aureus</i>	2%	2%	15%
<i>Cl. perfringens</i>	1%	2%	5%
<i>C. jejuni</i>	2%	1%	5%

Minimum Bacteriocidal Concentration			
	liquid citrox extract	citrox/maltodextrin 50/50	polyphenol condensate/maltodextrin 50/50
<i>S. typhimurium</i>	2%	2%	15%
<i>L. monocytogenes</i>	2%	2%	15%
<i>B. cereus</i>	2%	2%	15%
<i>E. coli</i>	5%	2%	15%
<i>S. aureus</i>	5%	2%	15%
<i>Cl. perfringens</i>	2%	2%	5%
<i>C. jejuni</i>	2%	2%	5%

As seen in the above Table, Citrox is more effective as antimicrobial compared to polyphenols, since it has lower MIC/MBC values, varying from 0,5% (the lowest MIC for *L. monocytogenes* using liquid citrox) to 2%, while encapsulated polyphenol required at least 5% and

for most pathogens 10% in order to exhibit inhibition. Notably, encapsulation of citrox decreased the MBC (improved antimicrobial activity) against *E. coli* and *S. aureus*.

B) *In vitro* antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox-MIC

/ MBC assay. The antimicrobial combinations of co-encapsulated olive polyphenol and citrox were added in TSB broth where the pathogenic bacteria were inoculated and grown for 2 days

at 37 °C, after which the MIC and MBC was counted. Table 2 depicts the results of MIC and MBC for these co-encapsulated powders.

Table 2. MIC and MBC values for the co-encapsulated powders (polyphenol/citrox ratio is given in the first column) added in Tryptone Soya Broth.

MIC							
sample	S. typhimurium	L. monocytogenes	B.cereus	E.coli	S.aureus	Cl.perfringens	C.jejuni
100/0	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
0/100	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
80/4	1%	0,50%	1%	1%	1%	0,50%	1%
50/10	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%
60/8	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,50%
40/12	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,50%
20/16	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%
MBC							
sample	S. typhimurium	L. monocytogenes	B.cereus	E.coli	S.aureus	Cl.perfringens	C.jejuni
100/0	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
0/100	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
80/4	1%	0,50%	2%	1%	1%	1%	0,50%
50/10	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%
60/8	1%	0,10%	2%	1%	1%	1%	0,10%
40/12	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,50%	0,10%
20/16	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,50%	0,10%

Interestingly, we observe in this experiment that although single polyphenol (100/0) or single citrox (0/100) formulation was not inhibitory up to 5% for all tested bacterial pathogens, the co-encapsulation of polyphenols and citrox had a great synergistic antimicrobial activity (MIC/MBC was reduced to as low as 0,1%). So, co-encapsulation of polyphenols and citrox is by far superior compared to the use of separately encapsulated powders. The highest bacteriocidal activity was observed in the formulations 50/10, 40/12 and 20/16, which contained a relatively high content of citrox, which was previously shown to be more effective as a antimicrobial compared to olive

polyphenols.

C) *In vitro* antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox-mycelium expansion values (mm). The antimicrobials were added in Sabourad Dextrose agar (SDA), at the centre of which two different fungal spores were tip inoculated (*Penicillium expansum* and *P. nalgiovense*). A blank sample without addition of antimicrobials was also inoculated with each fungi. The mycelium expansion (in mm) was measured after 7 days of incubation at 30 °C and the results are shown in Table 3.

Table 3. Mycelium expansion (in mm) on SDA after 7 days of incubation

Penicillium nalgiovense							Penicillium expansum						
Blank: 0,9mm expansion							Blank: 1,275mm expansion						
sample	0,10%	0,50%	1%	2%	3%	5%	sample	0,10%	0,50%	1%	2%	3%	5%
20/16	-	-	-	-	-	-	20/16	0,8	-	-	-	-	-
80/4	0,9	-	-	-	-	-	80/4	1,075	0,95	0,68	-	-	-
100/0	0,875	0,95	0,9	0,875	0,8	0,825	100/0	1,35	1,3	1,33	1,325	1,3	1,25
0/100	1	-	-	-	-	-	0/100	1,425	0,775	-	-	-	-
50/10	-	-	-	-	-	-	50/10	1,1	0,1	-	-	-	-
60/8	0,425	-	-	-	-	-	60/8	1,025	0,2	0,2	-	-	-
40/12	-	-	-	-	-	-	40/12	1,075	-	-	-	-	-

Similarly to the results obtained for the bacterial pathogens, the results on these two spoilage fungi indicate that citrox alone was more antifungal than polyphenol alone, but

again the co-encapsulation of the two natural antimicrobials had a synergistic effect with improved antifungal activity even at only 0,1% concentration. The best antifungal activity was

observed for 20/16, 40/12 and 50/10 formulations, which is probably due to comparatively higher content of citrox in these formulations.

D) *In vitro* antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox- Measurement of Optical Density. The antimicrobials were added in TSB broth where the pathogenic bacteria were inoculated and grown for 2 days at 37 °C, after which the optical density of the cells was counted at 620nm. Results are shown in Figure 1. It can be deduced from the above graphs that when olive polyphenol was used alone (100/0) there was practically no antimicrobial activity up to 2%, while when citrox was used alone (0/100) there was only a limited inhibition (maximum 10% reduction

of O.D. value at 2% concentration). On the contrary, the combination (co-encapsulation) of polyphenols with citrox showed a significant antimicrobial activity and synergistic effects, due to which up to a 100% reduction of O.D. value was observed at 2% concentration. It is also noted that the 20/16 ratio seems to be most preferable for antimicrobial activity, since it was effective in reducing significantly the O.D. of food pathogens even at only 0,1% concentration. This sample contained almost equal amounts of olive polyphenol condensate and liquid citrox and most importantly, the highest ratio of citrox amongst the tested formulations, which was probably the reason for its superior antimicrobial activity.

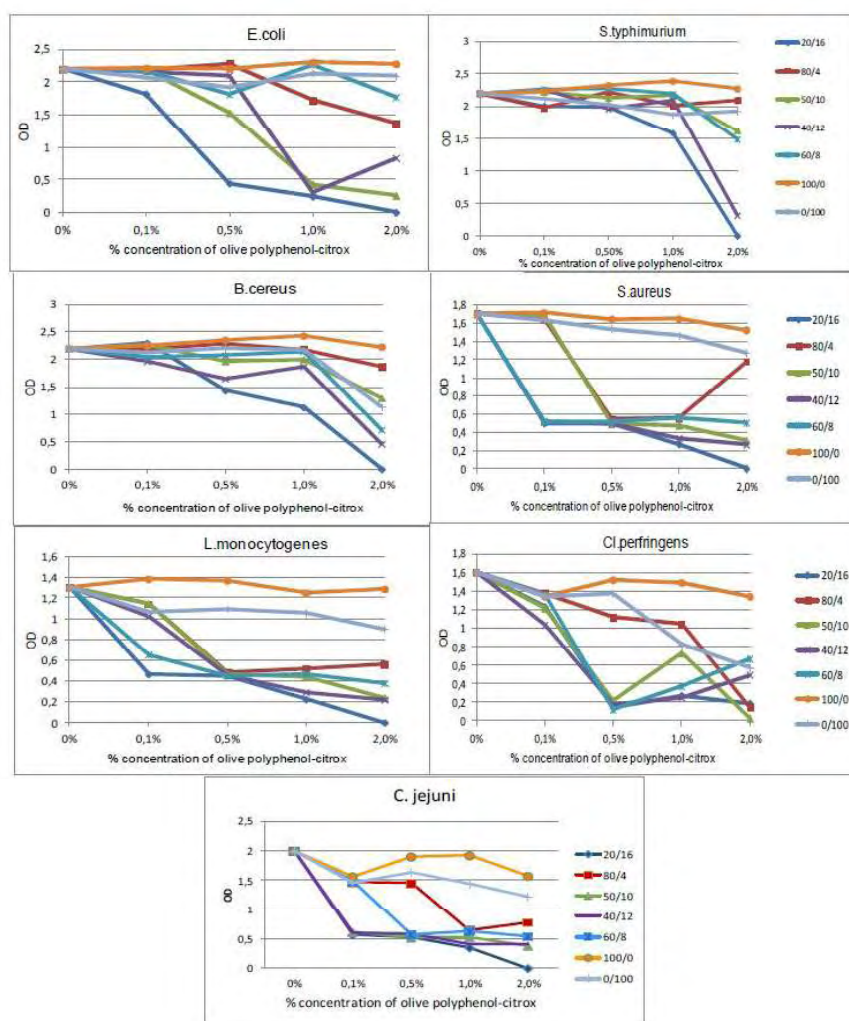


Fig.1. Optical Density (at 620nm) of liquid cultures of bacterial pathogens supplemented with polyphenol/citrox formulations.

E) Antifungal activity of encapsulated olive polyphenols in yogurt after inoculation with *Penicillium italicum*. The results of antifungal activity were measured as a reduction of the population (log cfu/g) of *P. italicum* in yoghurt samples containing encapsulated polyphenols. The yogurts were inoculated by inserting a spore suspension into the mass of the yoghurt.

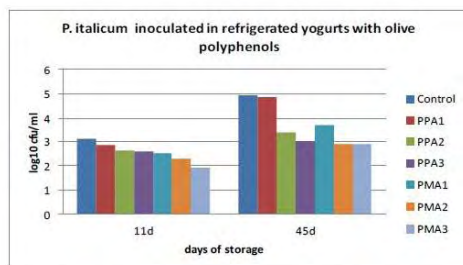


Fig. 2. Population of *P. italicum* after inoculation in yogurt containing olive polyphenols, encapsulated in pullulan (PPA) or in maltodextrin (PMA), at different concentrations (0.1, 0.2, 0.3 g/l).

It appears that the encapsulation of polyphenols in maltodextrin was preferable to the encapsulation in pullulan. At 3g/l concentration both powders resulted in a 2log reduction compared to the control after 45 days of refrigerated incubation.

F) Antifungal activity of encapsulated olive polyphenols and citrox in semi-hard cheese after inoculation with different fungi and incubation at 30 °C (challenge tests). In this experiment, semi-hard type of cheese containing citrox alone or in combination with encapsulated olive polyphenols, along with a

negative control (without antimicrobials) and a positive control (containing potassium sorbate) was inoculated (after production) with different fungi and stored aerobically in sterile stomacher bags under refrigeration. The population of the fungi was measured at 1, 15 and 45 days of storage.

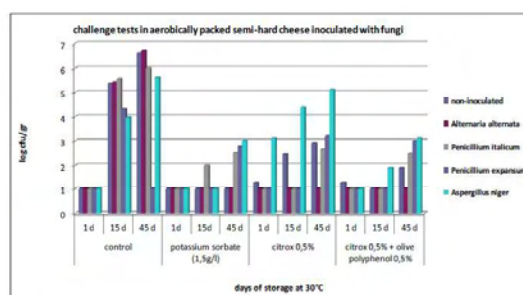


Fig. 3. Population of fungi inoculated in semi-hard cheese containing natural antimicrobials (citrox or citrox with olive polyphenols) and synthetic preservatives (sorbates) compared to a control without any antimicrobials. Samples were vacuum packed after inoculation

It seems, based on the above graph, that although citrox was efficient in reducing the fungal population compared to the negative control, it was not as effective as the use of potassium sorbate. Nevertheless, the combination of polyphenols (encapsulated in maltodextrin) with citrox (at 0,5% each) had a synergistic antifungal effect, which was practically equivalent to that of the synthetic additive (potassium sorbate) used at 1,5%. Thus, extended shelf-life compared to the negative control can be obtained by using these natural antimicrobials.

III. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out as part of the MSc Thesis of Mrs Fani Karkanta and for the completion of this work the contributions of Polyhealth S.A. (Greek producer and supplier of olive polyphenols) and Polypan S.A. (Greek supplier of Citrox) are thankfully acknowledged.

REFERENCES

- [1] Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R.L., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971-974.
- [2] Hooper, S.J., Lewis, M.A.O., Wilson, M.J., & Williams, D.W. (2011). Antimicrobial activity of Citrox bioflavonoid preparations against oral microorganisms. *British dental journal*, 210(1), E22-E22.

- [3] Leontopoulos, S.V., Giavasis, I., Petrotos, K., Kokkora, M., & Makridis, C. (2015). Effect of Different Formulations of Polyphenolic Compounds Obtained from OMWW on the Growth of Several Fungal Plant and Food Borne Pathogens. Studies in vitro and in vivo. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 4, 327-337.
- [4] Petrotos, K.B., Gkoutosidis, P.E., Kokkora, M.I., Giankidou, K.G., & Tsagkarelis, A.G. (2013). A study on the kinetics of olive mill wastewater (OMWW) polyphenols adsorption on the commercial XAD4 macroporous resin. *Desalination and Water Treatment*, 51(10-12), 2021-2029.
- [5] Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jimenez, B., & Garcia-Pareja, M.P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3), 283-290.
- [6] Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, (299C), 152-178.
- [7] Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V. & Hammer, K.A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 461-463.
- [8] Techathuvanan, C., Reyes, F., David, J.R., & Davidson, P.M. (2014). Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, 77(2), 269-275.
- [9] Tsironi, T.N., & Taoukis, P.S. (2012). Shelf-life extension of gilthead seabream fillets by osmotic treatment and antimicrobial agents. *Journal of applied microbiology*, 112(2), 316-328.

Study of the antibacterial and antifungal properties of olive polyphenols and citrox® encapsulated powders in vitro and in food samples

Fani Karkanta^{1,3}, Chrysanthi Mitsagga², Paraskevi Bouki², Sergios Touchikian², Konstantinos Petrotos³, Ioannis S. Boziaris⁴ and Ioannis Giavasis^{2*}

¹ University of Thessaly, Dept. of Medicine, Lab of Hygiene and Epidemiology, Papakyriazi 22, 41222 Larisa,

² Technological Educational Institute of Thessaly, Dept. of Food Technology, End of N. Temponera Street, 43100 Karditsa, Greece

³ Technological Educational Institute of Thessaly, Dept. of Biosystems Engineering, Ring Road of Larisa-Trikala, 41110 Larisa, Greece

⁴ University of Thessaly, Dept. of Ichthyology and Aquatic Environment, Fytokou Street, Nea Ionia, Volos, Greece

* igiavasis@teilar.gr

Olive mill waste (OMW) polyphenols

- **Mixture of polyphenolic substances, derived from olive mill waste (the water soluble by-product of olive oil production after physical pressing of the olive fruit)**
- **OMW can be toxic to plants and aquatic organisms and has a very high COD and BOD levels (environmental pollutant)**
- **However OMW has valuable components: it is very rich in phenols such as hydroxytyrosol and tyrosol, with a very high antioxidant potential.**
- **These polyphenols can be used as natural antioxidants and antimicrobials in food, cosmetics and pharmaceuticals**
- **The process for isolating olive mill waste polyphenols involves:**
- **Microfiltration through ceramic membranes** to separate polyphenols from the rest of the waste
- **Selective adsorption** through microporous resins,
- **Desorption** with pure water (no use of methanol/alcohols, totally green process!)
- **Condensation via reverse osmosis** \implies 4 times condensed liquid of polyphenols ($\sim 20^\circ$ Brix)
- **Microencapsulation**, e.g. in maltodextrin and **freeze drying** \implies encapsulated polyphenol powder

Olive mill waste (OMW) polyphenols

- **Microfiltration / reverse osmosis unit**



- **Freeze drying (lab scale)**



- **(pilot scale)**



Olive mill waste (OMW) polyphenols

- **Final Product: (from left to right)**

Liquid polyphenol condensate, polyphenol powder, encapsulated polyphenol powder



Note 1 : the nanoencapsulated powder does no longer have a dark brown color and a bitter taste as the liquid condensate

Note 2 : the polyphenol content in the encapsulated powder is ~3,8% (Folin-Ciocalteu method)

CITROX – A label free antimicrobial



Citrox Progarda Ace (by Phyto, England):

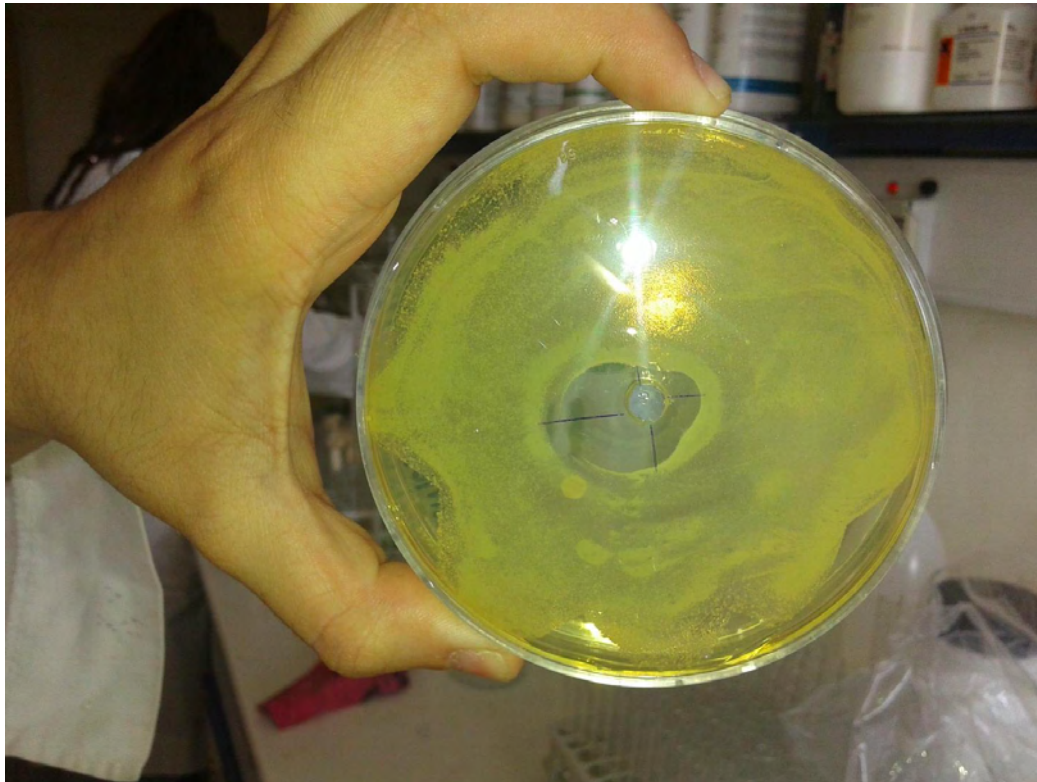
- It is a proprietary formulation with **Citrus aurantium amara** extract (bitter orange) and organic acids (citric acid, lactic acid, acetic acid) qualified for use in food without an “E” code.
- It is a dark brown, bitter and acidic (pH 3) liquid ready for use in food.
- **Disadvantage** (same as in the case of olive polyphenol condensate): it gives a bitter and astringent taste and may darken the color of foods
- **Solution:** nanoencapsulation in maltodextrin

Experimental design

- **A. We tested different powder formulations of encapsulated olive polyphenols or citrox alone or in combination with polyphenols using *in vitro* antimicrobial assays**
- **B. We produced co-encapsulated powder of both polyphenols and citrox (2 in 1) at different ratios, in order to formulate an optimized novel antimicrobial substance and conducted *in vitro* antimicrobial assays**
- **We tested the antimicrobial activity against several pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*) as well several fungi**
- **In vitro tests included:**
 - **Minimum Inhibitory and Minimum Bacteriocidal (lethal) concentration**
 - **Well diffusion assay (inhibition zones)**
 - **Reduction of cell population in liquid substrates**
- **C. We also conducted tests of antimicrobial activity *in food* such as cheese and yogurt**

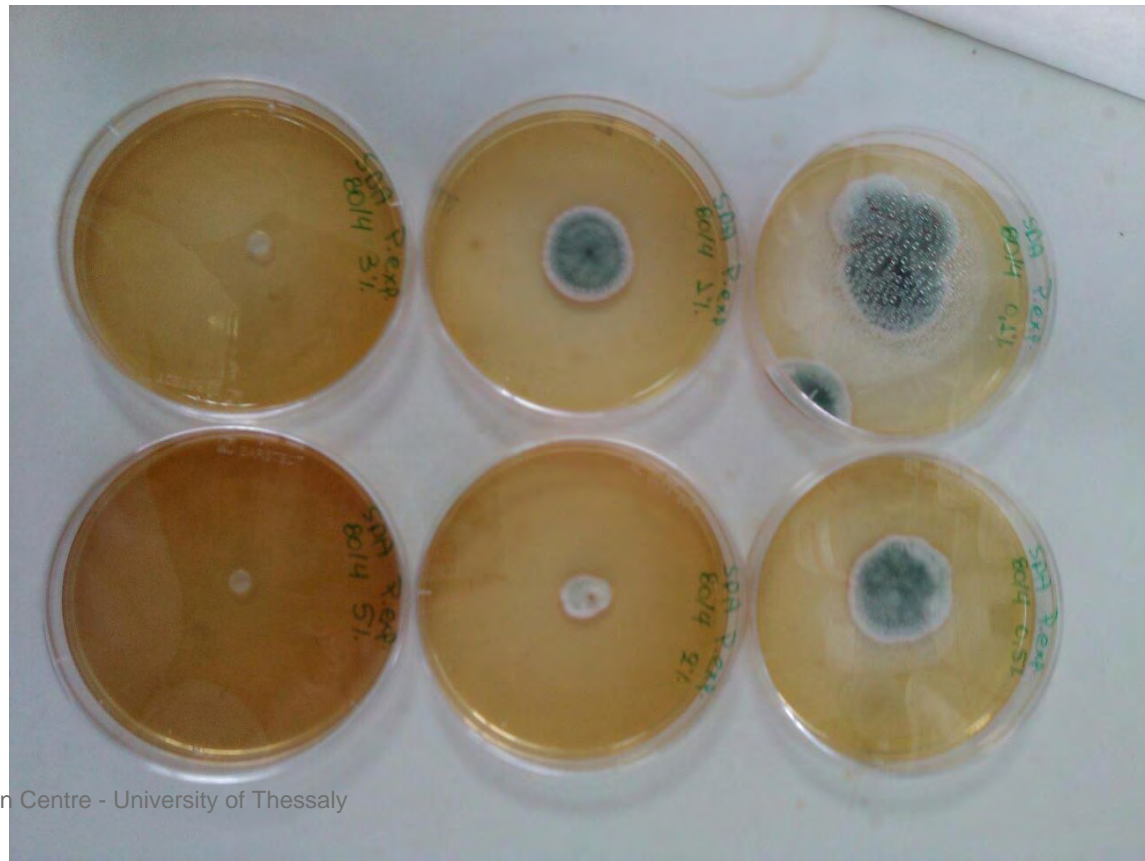
In vitro antimicrobial activity of polyphenols and citrox - Bacterial Inhibition zones

- Pathogens were plated on selective agar medium in the centre of which the antimicrobial substance was added
- After incubation the mm of the inhibition zone was counted



In vitro antimicrobial activity of polyphenols and citrox - Inhibition of mycelium expansion

- The antimicrobial substances (polyphenols/citrox) was spread on the surface of Sabourad Dextrose agar (0,1 ml per plate)
- The fungi were inoculated in wells at the center of the plate and the inhibition was measured as mm of mold expansion (short expansion means higher inhibition)



In vitro antimicrobial activity of polyphenols and citrox

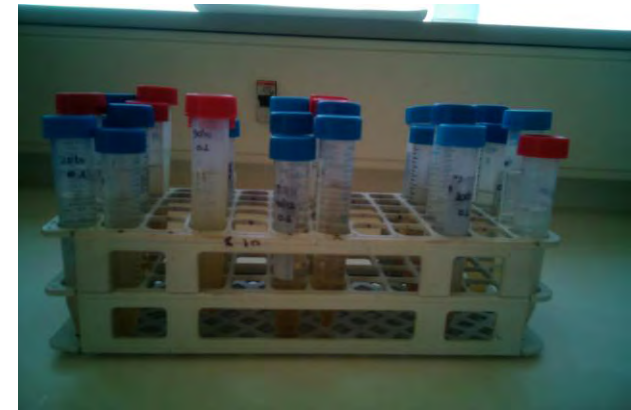
Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC)

Pathogens were inoculated into liquid substrates in test tubes containing the antimicrobial substance at different concentrations and incubated for 2 days at 37°C.

- After incubation the minimum concentration where no growth was observed was the MIC.
- Cultures from all test tubes that exhibited inhibited were subcultured in fresh substrate without any antimicrobial and the minimum concentration where no growth was observed was the MBC

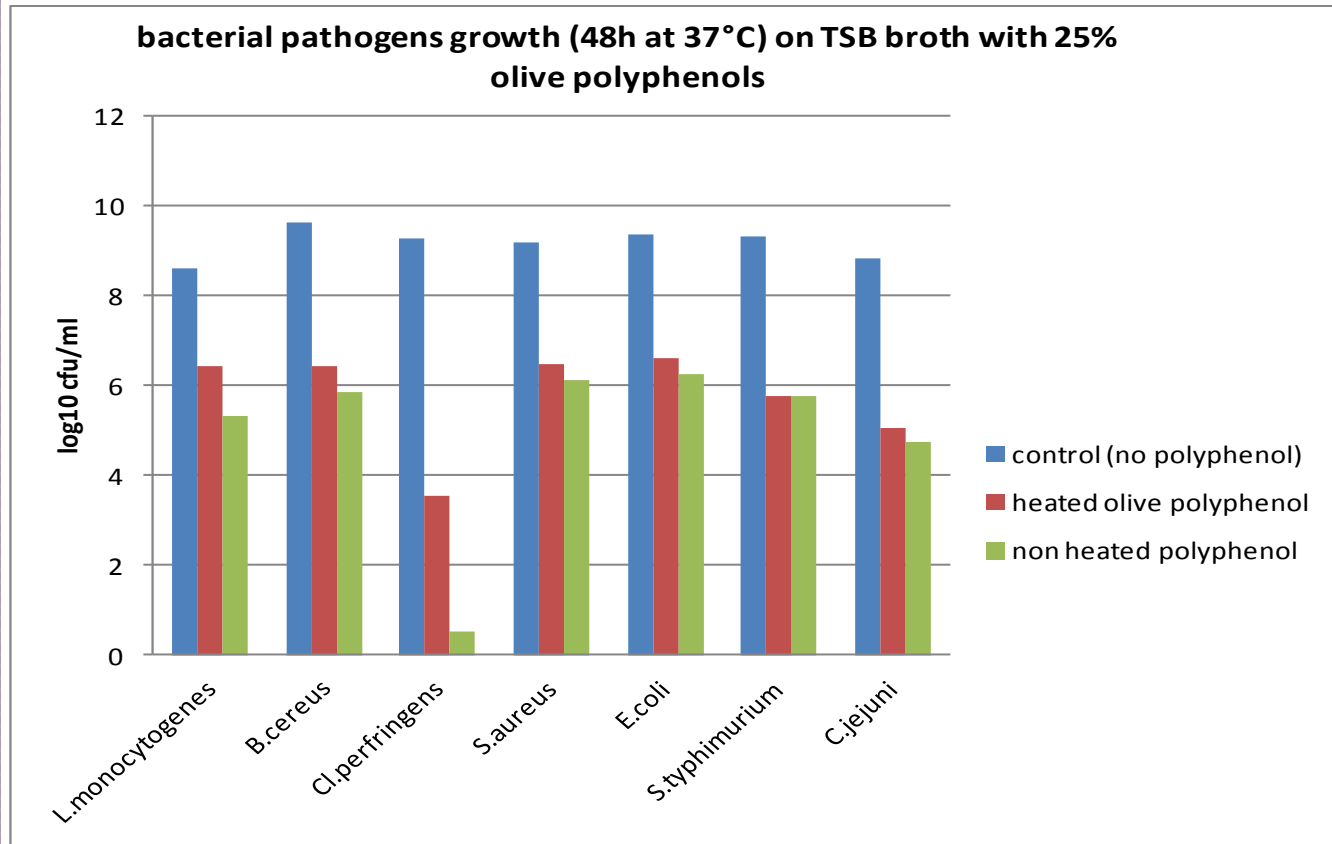
Reduction of microbial population and measurement of Optical Density

- Pathogens were grown on liquid substrates for 2 days with and without antimicrobials and the population at the end of the incubation was counted in selective agar media.
- Also, the optical density at 620nm was measured as an indication of cell density (high O.D. means high microbial growth)



In vitro antimicrobial activity of polyphenols – effect of heating of the condensate prior to encapsulation

Growth medium (optimal for bacterial growth): Tryptone Soya broth



Note 1: There is a reduction of 2-5log of bacterial pathogens after phenol addition at 25%

Note 2: Heating of the condensate may slightly reduce the antimicrobial activity of the polyphenol powder

In vitro antimicrobial activity of polyphenols and citrox used separately-MIC/MBC assay

- citrox/maltodextrin ratio 50/50
- Polyphenol condensate/maltodextrin ratio 50/50
- Growth medium (optimal for bacterial growth): Tryptone Soya broth

Minimum Inhibitory Concentration			
	liquid citrox extract	citrox/maltodextrin 50/50)	polyphenol condensate/maltodextrin 50/50
S. typhimurium	2%	2%	10%
L. monocytogenes	0,5%	2%	10%
B.cereus	2%	2%	10%
E.coli	2%	2%	10%
S.aureus	2%	2%	15%
Cl.perfringens	1%	2%	5%
C.jejuni	2%	1%	5%

Minimum Bacteriocidal Concentration			
	liquid citrox extract	citrox/maltodextrin 50/50)	polyphenol condensate/maltodextrin 50/50
S. typhimurium	2%	2%	15%
L. monocytogenes	2%	2%	15%
B.cereus	2%	2%	15%
E.coli	5%	2%	15%
S.aureus	5%	2%	15%
Cl.perfringens	2%	2%	5%
C.jejuni	2%	2%	5%

Note 1 : Citrox is more effective as antimicrobial compared to polyphenols (it has lower MIC/MBC values)

Note 2 ; encapsulation of citrox decreased the MBC (improved antimicrobial activity) against E.coli and S. aureus

In vitro tests with co-encapsulated olive polyphenol/citrox samples

Sample coding was based on the liquid polyphenol/citrox ratio before co-encapsulation:

Sample code	Polyphenol	CITROX	H₂O	maltodextrin
20/16	20 ml	16 ml	64 ml	100 g
80/4	80 ml	4 ml	16 ml	100 g
50/10	50 ml	10 ml	40 ml	100 g
40/12	40 ml	12 ml	48 ml	100 g
60/8	60 ml	8 ml	32 ml	100 g
100/0	100 ml	0 ml	0 ml	100 g
0/100	0 ml	300 ml	0 ml	300 g

In vitro antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox – MIC / MBC values

Sample coding represents polyphenol/citrox ration

The antimicrobials were added in TSB broth where the pathogenic bacteria were inoculated and grown for 2 days at 37°C, after which the MIC and MBC was counted

MIC							
sample	S. typhimurium	L. monocytogenes	B.cereus	E.coli	S.aureus	Cl.perfringens	C.jejuni
100/0	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
0/100	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
80/4	1%	0,50%	1%	1%	1%	0,50%	1%
50/10	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%
60/8	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,50%
40/12	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,50%
20/16	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%

MBC							
sample	S. typhimurium	L. monocytogenes	B.cereus	E.coli	S.aureus	Cl.perfringens	C.jejuni
100/0	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
0/100	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
80/4	1%	0,50%	2%	1%	1%	1%	0,50%
50/10	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,10%	0,10%
60/8	1%	0,10%	2%	1%	1%	1%	0,10%
40/12	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,50%	0,10%
20/16	1%	0,10%	0,50%	1%	1%	0,50%	0,10%

Note : Although single polyphenol or single citrox formulation was not inhibitory up to 5%, the co-encapsulation of polyphenols and citrox had a great synergistic antimicrobial activity (MIC/MBC as low as 0,1%). So, co-encapsulation of polyphenols and citrox is by far superior compared to the use of separately encapsulated powders

In vitro antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox – mycelium expansion values (mm)

Sample coding represents polyphenol/citrox ration

The antimicrobials were added in Sabourad Dextrose agar at the centre of which two different fungal spores were tip inoculated (*Penicillium expansum* and *P. nalgioense*).

The mycelium expansion (in mm) was measured after 7days incubation

Penicillium nalgioense

Blank: 0,9mm expansion

sample	0,10%	0,50%	1%	2%	3%	5%
20/16	-	-	-	-	-	-
80/4	0,9	-	-	-	-	-
100/0	0,875	0,95	0,9	0,875	0,8	0,825
0/100	1	-	-	-	-	-
50/10	-	-	-	-	-	-
60/8	0,425	-	-	-	-	-
40/12	-	-	-	-	-	-

Penicillium expansum

Blank: 1,275mm expansion

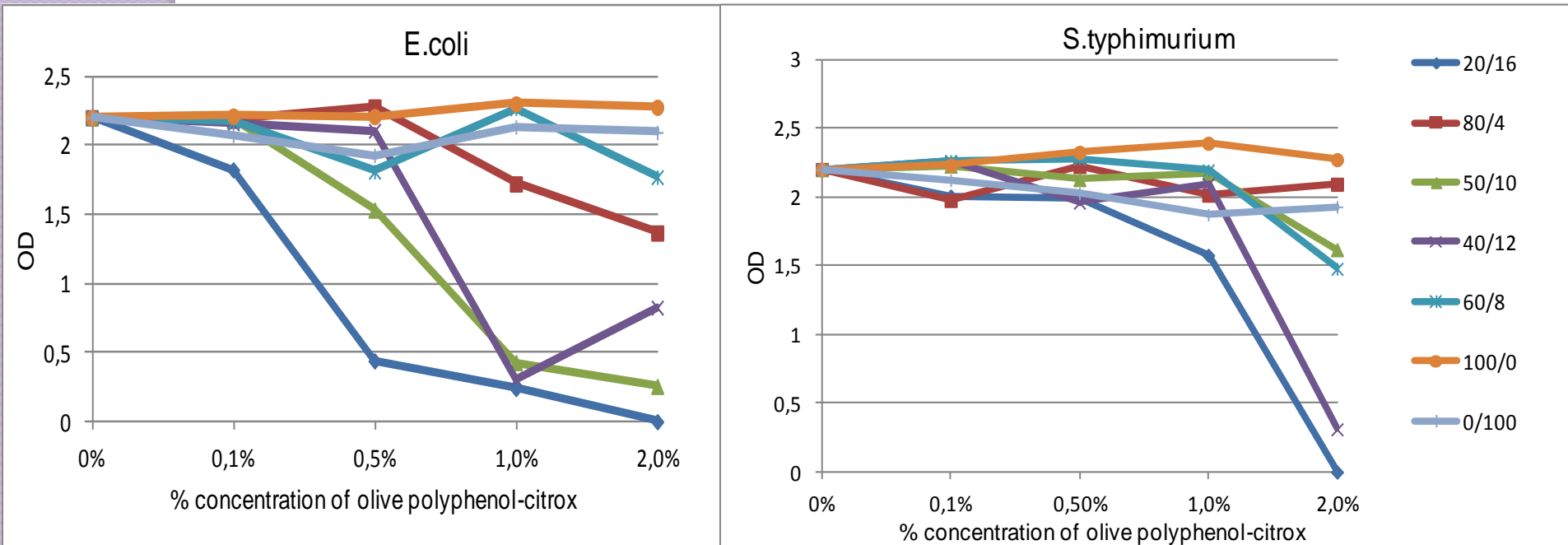
sample	0,10%	0,50%	1%	2%	3%	5%
20/16	0,8	-	-	-	-	-
80/4	1,075	0,95	0,68	-	-	-
100/0	1,35	1,3	1,33	1,325	1,3	1,25
0/100	1,425	0,775	-	-	-	-
50/10	1,1	0,1	-	-	-	-
60/8	1,025	0,2	0,2	-	-	-
40/12	1,075	-	-	-	-	-

Note : Citrox alone was more antifungal than polyphenol alone, but again the co-encapsulation of the two had a synergistic effect with improved antifungal activity even at 0,1% concentration. The best antifungal activity was observed for 20/16, 50/10, and 40/12 formulations

In vitro antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox – Measurement of Optical Density

Sample coding represents polyphenol/citrox ration

The antimicrobials were added in TSB broth where the pathogenic bacteria were inoculated and grown for 2 days at 37°C, after which the optical density of the cells was counted



Note 1: when olive polyphenol was used alone (100/0) there was practically no antimicrobial activity up to 2%, while when citrox was used alone (0/100) there was a limited inhibition. On the contrary, the combination of polyphenols with citrox showed a significant antimicrobial activity and synergistic effects.

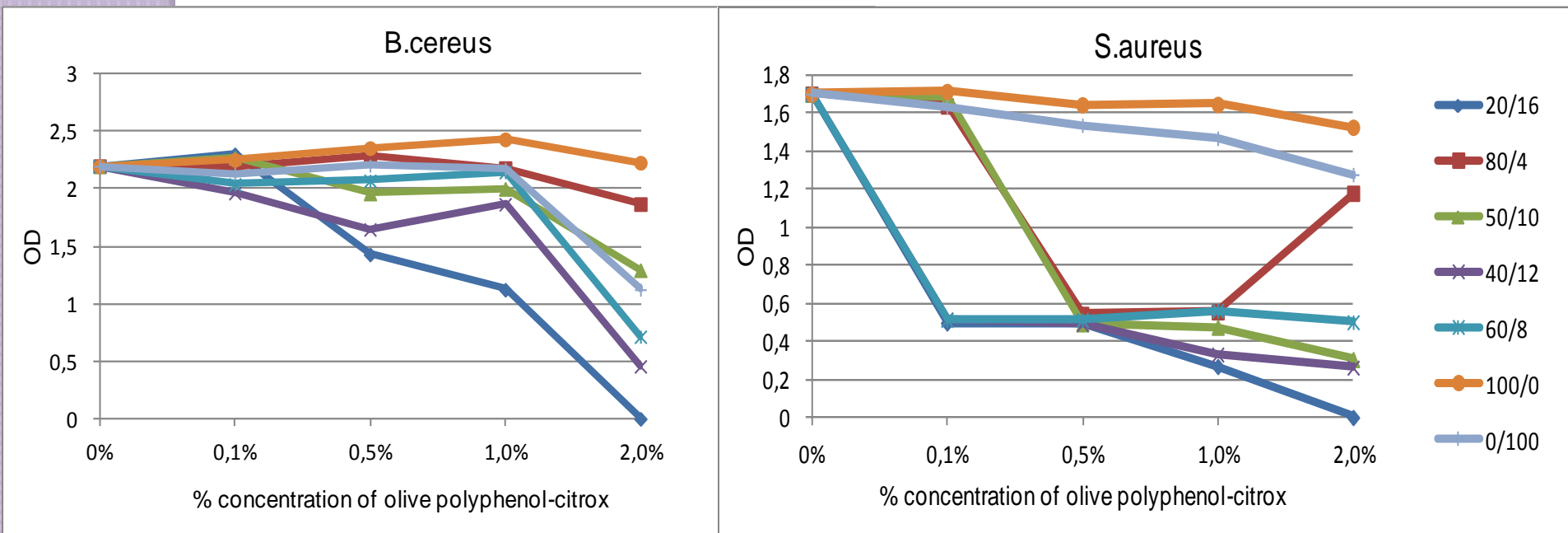
Note 2: the 20/16 ratio seems to be preferable for antimicrobial activity (almost equal amounts of olive polyphenol condensate and liquid citrox), possibly because it contains relatively

higher content of citrox

In vitro antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox – Measurement of Optical Density

Sample coding represents polyphenol/citrox ration

The antimicrobials were added in TSB broth where the pathogenic bacteria were inoculated and grown for 2 days at 37°C, after which the optical density of the cells was counted

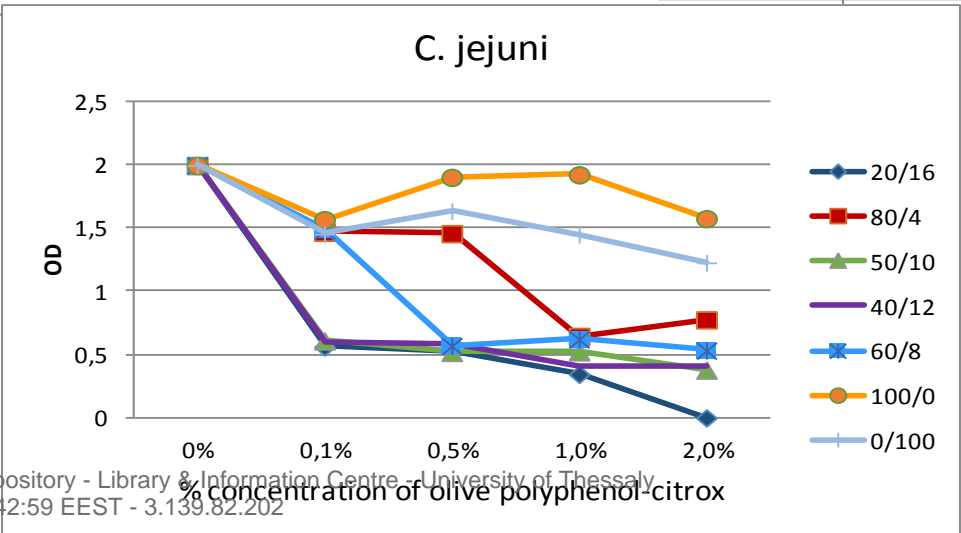
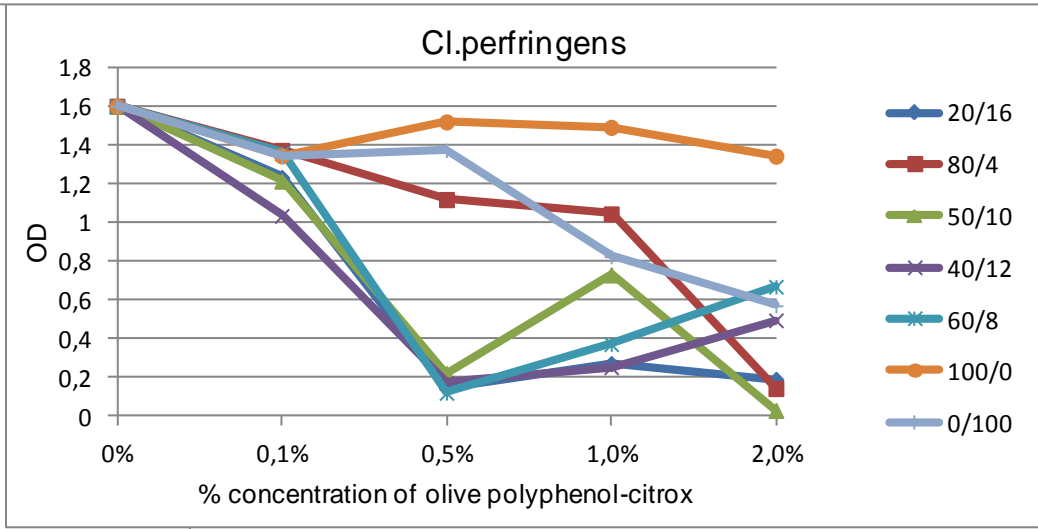
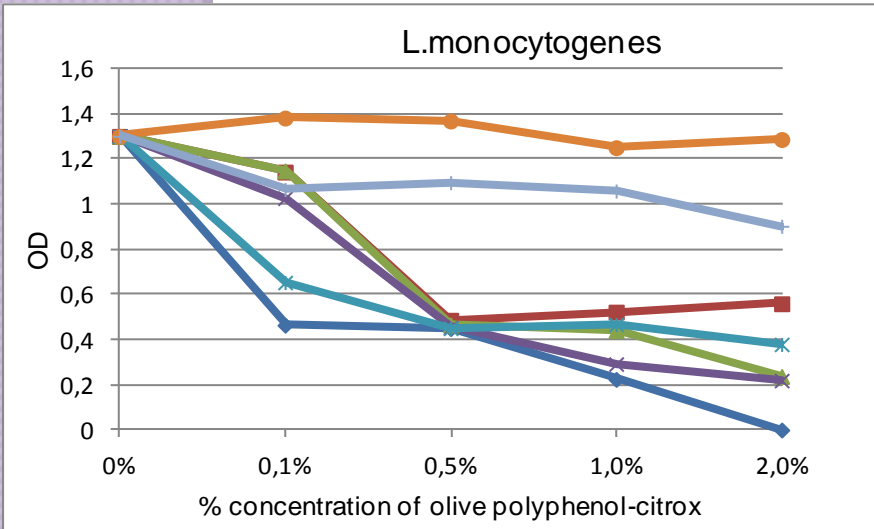


- **Note: similar results as previously discussed**

In vitro antimicrobial activity of co-encapsulated olive polyphenols and citrox – Measurement of Optical Density

Sample coding represents polyphenol/citrox ration

The antimicrobials were added in TSB broth where the pathogenic bacteria were inoculated and grown for 2 days at 37°C, after which the optical density of the cells was counted

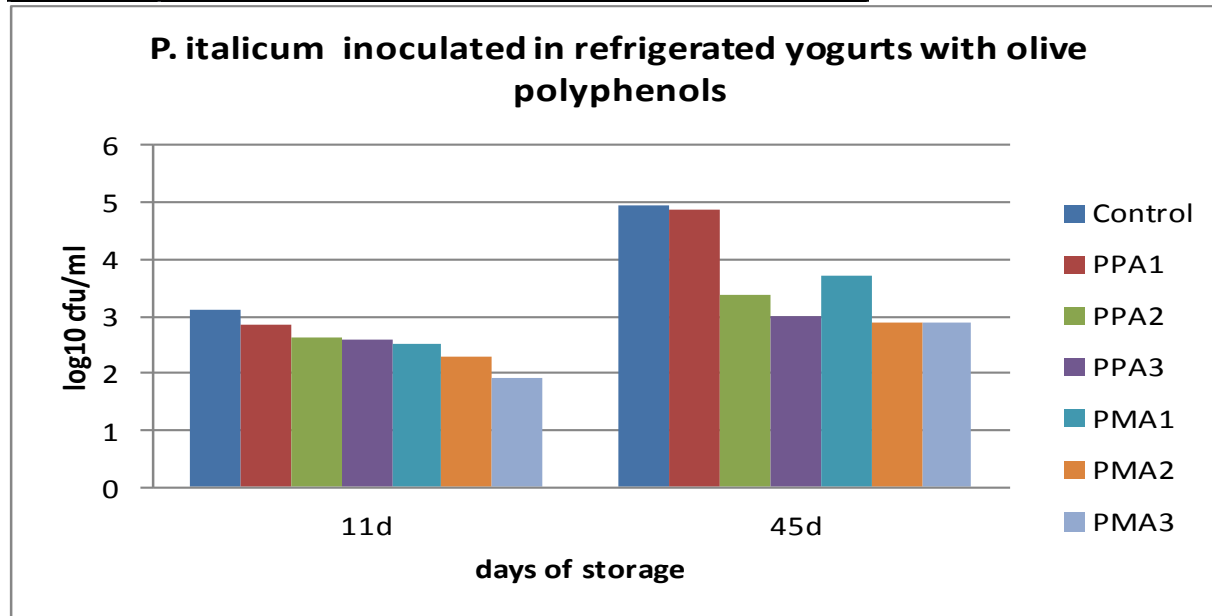


Note: similar results as previously discussed

Antifungal activity of encapsulated olive polyphenols in yogurt after inoculation with *Penicillium italicum*

Sample coding :

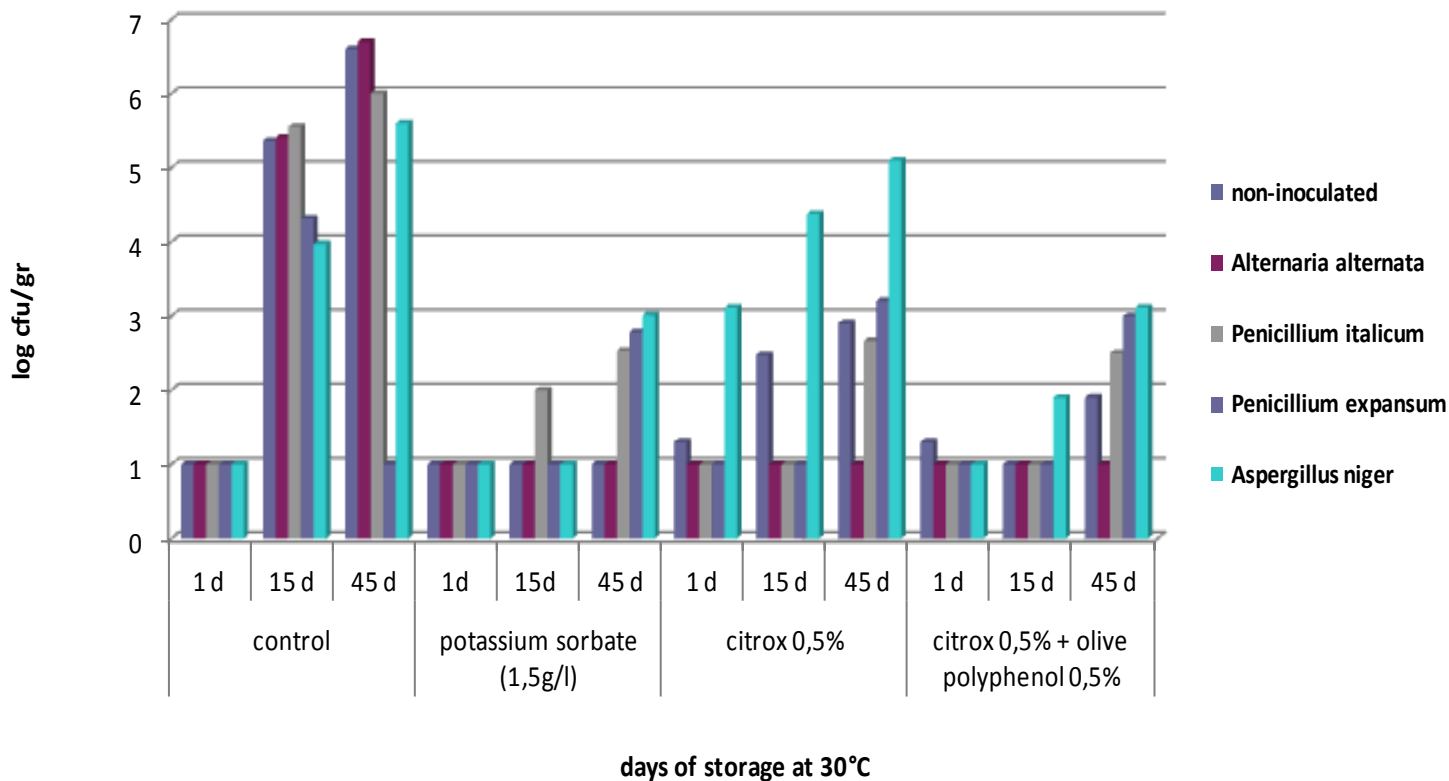
Control	no polyphenols
PPA1	polyphenols encapsulated in pullulan-1g/l
PPA2	polyphenols encapsulated in pullulan-2g/l
PPA3	polyphenols encapsulated in pullulan-3g/l
PMA1	polyphenols encapsulated in maltodextrin-1g/l
PMA2	polyphenols encapsulated in maltodextrin-2g/l
PMA3	polyphenols encapsulated in maltodextrin-3g/l



The encapsulation of polyphenols in maltodextrin was preferable to the encapsulation in pullulan. At 3g/l concentration both powders resulted in a 2log reduction compared to the control after 45 days of refrigerated incubation

Antifungal activity of encapsulated olive polyphenols and citrox in semi-hard cheese after inoculation with different fungi and incubation at 30°C (challenge tests)

challenge tests in vacuum packed semi-hard cheese inoculated with fungi



The combination of polyphenols (encapsulated in maltodextrin) with citrox (at 0,5% each) had a synergistic antifungal effect, which was equivalent to that of synthetic additive (potassium sorbate) used at 1,5%. Thus, extended shelf-life compared to control can be obtained by using these natural antimicrobials

Conclusions

- **Olive mill polyphenols derived from olive mill waste have antibacterial and antifungal activity**
- **Citrox has even higher antimicrobial activity than olive polyphenols**
- **The combination of the two antimicrobials exhibits significant synergistic activity, especially when they are co-encapsulated into one powder**
- **Non-heated polyphenol condensate may improve the antimicrobial activity of polyphenols**
- **The combination of olive polyphenols and citrox can replace synthetic preservatives in food leading to healthier and clean-label foods**



Thanks for your attention

Blingee