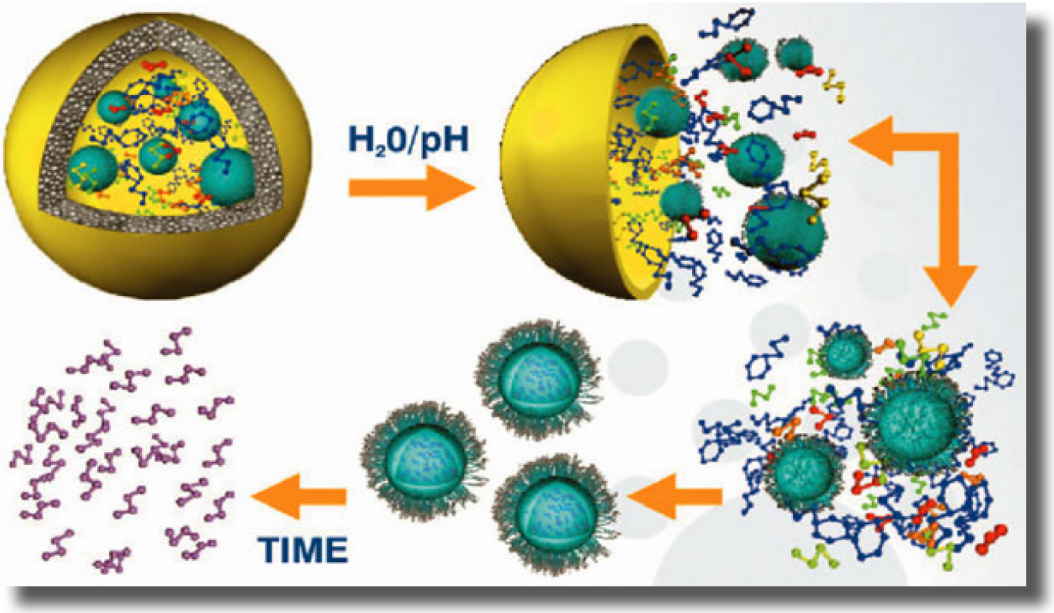
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

"Βιοενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*: Μελέτη φυσικοχημικών παραμέτρων και εφαρμογή σε τρόφιμα"



Διδακτορική Διατριβή

Παραμέρα Ευσταθία

M.Sc. Χημικός

Αθήνα 2011



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Καραθάνος Βάϊος, Καθηγητής

Μέλη:

Ανδρικόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής

Μαρούλης Ζαχαρίας, Καθηγητής

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καραθάνος Βάϊος, Καθηγητής

Ανδρικόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής

Μαρούλης Ζαχαρίας, Καθηγητής

Μπιλιαδέρης Κωσταντίνος, Καθηγητής

Κωμαΐτης Μιχαήλ, Καθηγητής

Παπαδάκης Σπυρίδων, Καθηγητής

Χίου Αντωνία, Επίκουρη Καθηγήτρια

Αφιερωμένη στην οικογένεια μου,

που είναι δίπλα μου σε κάθε στιγμή της ζωής μου:

στους γονείς μου Ιωάννη & Παναγιώτα,

στην αδερφή μου Σπυριδούλα

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2006-2010 στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, με χορήγηση υποτροφίας από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στον τομέα της «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων». Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στο ΙΚΥ, για την πολύτιμη οικονομική στήριξη που μου παρείχε για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Από καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Βάϊο Καραθάνο, για την συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε καθώς και για την εμπιστοσύνη και συμπαράσταση που μου έδειξε, καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου κ. Νικόλαο Ανδρικόπουλο, μέλος της Τριμελούς μου Επιτροπής, για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή του.

Τις θερμότερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στον Καθηγητή κ. Ζαχαρία Μαρούλη, μέλος της Τριμελούς μου Επιτροπής, για την βοήθεια και τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ τα μέλη της Επταμελούς μου Επιτροπής για τις χρήσιμες υποδείξεις και τα ουσιαστικά σχόλια τους.

Η συμβολή του Δρ. Σπύρου Κοντελέ, Επιστημονικού Συνεργάτη της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του ΤΕΙ Αθήνας, στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, ήταν καθοριστική. Γι' αυτό θα ήθελα να του εκφράσω από καρδιάς τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου για την πραγματικά πολύτιμη στήριξη που μου προσέφερε, την έμπρακτη βοήθεια του, τις συμβουλές του και την υπομονετική διάθεση που επέδειξε. Τον ευχαριστώ επίσης, για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω μέρος του πειραματικού μέρους στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας (Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, ΤΕΙ Αθήνας) και για τον ίδιο λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου κ. Δημήτριο Τυμπή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αντωνία Χίου, την Λέκτορα κ. Ανδριάνα Καλλιώρα καθώς και την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα, μέλη του δυναμικού του εργαστηρίου Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων, για τις πολύτιμες συμβουλές και την προθυμία τους να βοηθήσουν σε κάθε πρόβλημα.

Ακόμα θα ήθελα εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Παπαδάκη (Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Αθήνας) για την βοήθεια του και την διεξαγωγή πειραμάτων ξήρανσης με ψεκασμό, στην κ. Δρ. Αρχοντούλα Χατζηλαζάρου (Τμήμα Οινολογίας & Τεχνολογίας Ποτών, ΤΕΙ Αθήνας) για την διεξαγωγή πειραμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης, καθώς και στους Καθηγητές κ. Ηλία Νεραντζή (Τμήμα Οινολογίας & Τεχνολογίας Ποτών, ΤΕΙ Αθήνας) και κ. Δημήτριο Κάβουρα (Τμήμα Φωτογραφίας & Οπτικοακουστικών Τεχνών, ΤΕΙ Αθήνας) για την βοήθεια στην Μικροσκόπηση Φθορισμού.

Ευχαριστώ πολύ για την στήριξη και το ενδιαφέρον, τους φίλους και συνεργάτες Γκιοξάρη Αριστέα, Δρ. Ιωάννη Μουρτζίνο, Καρβέλα Ευαγγελία, Δρ. Κουντούρη Αγγελική και Παπαϊωάννου Ελένη.

Τέλος, θα ήθελα και οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υπομονή και την ανεκτίμητη συμπαράσταση τους κατά την εκπόνηση και συγγραφή του απαιτητικού αυτού έργου.

Ευσταθία Παραμέρα

Ιανουάριος 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη 1

Abstract 5

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η τεχνική της ενθυλάκωσης

1.1. Γενικά για την ενθυλάκωση 11

1.2. Μέθοδοι ενθυλάκωσης 12

1.3. Μέσα ενθυλάκωσης 14

1.3.1. Οι κυκλοδεξτρίνες ως μέσα ενθυλάκωσης 15

1.3.2. Τα λιποσώματα ως μέσα ενθυλάκωσης 20

2. Το κύτταρο του Saccharomyces cerevisiae ως μέσο ενθυλάκωσης

2.1. Εισαγωγή 27

2.2. Μελέτες σχετικές με την εφαρμογή των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσο ενθυλάκωσης 29

2.3. Το κύτταρο του *S. cerevisiae*

2.3.1. Ανατομία του κυττάρου 33

2.3.2. Ο κυτταρικός φάκελος του *S. cerevisiae* 35

2.3.3. Το κυτταρόπλασμα και ο κυτοσκελετός του *S. cerevisiae* 41

2.3.4. Ο πυρήνας του *S. cerevisiae* 44

2.3.5. Ο μηχανισμός πρόσληψης θρεπτικών συστατικών από τα κύτταρα του *S. cerevisiae* 44

2.4. Στρες στον *S. cerevisiae* 48

2.4.1. Θερμικό Στρες 49

2.4.2. Στρες λόγω μεταβολών στην ενεργότητα νερού-Αφυδάτωση-Πλασμόλυση 51

2.4.3. Στρες λόγω υψηλής πίεσης 56

2.4.4. Στρες λόγω ακτινοβόλησης 56

2.4.5. Μηχανικό και ηλεκτρικό στρες 56

2.4.6. Στρες λόγω αιθανόλης 57

2.4.7. Οξειδωτικό στρες 60

3. Η απελευθέρωση και η σταθερότητα ενθυλακωμένων μορίων

3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την συγκράτηση ενός ενθυλακωμένου μορίου στο μέσο ενθυλάκωσης 63

3.2. Απελευθέρωση του ενθυλακωμένου συστατικού από το μέσο ενθυλάκωσης 65

3.3. Η απελευθέρωση ενθυλακωμένου συστατικού σε γαστρικό υγρό 66

3.4. Σταθερότητα των ενθυλακωμένων συστατικών στις συνθήκες του περιβάλλοντος 69

3.4.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα της κάψουλας 71

3.4.2. Επίδραση της υγρασίας στη σταθερότητα της κάψουλας 72

3.4.3. Επίδραση του οξυγόνου στη σταθερότητα της κάψουλας 73

3.4.4. Επίδραση άλλων συστατικών στη σταθερότητα της κάψουλας 73

3.4.5. Επιταχυνόμενη δοκιμή του χρόνου ζωής ενός προϊόντος στο ράφι 74

4. Η κουρκουμίνη

4.1. Εισαγωγή 75

4.2. Χημικές ιδιότητες κουρκουμίνης 78

4.3. Αντιοξειδωτικές-Αντικαρκινικές ιδιότητες κουρκουμίνης: συσχέτιση δομής- δραστικότητας 81

4.4. Μελέτες που αφορούν τις θεραπευτικές ιδιότητες της κουρκουμίνης και την βιοδιαθεσιμότητά της 83

4.5. Μειονεκτήματα της κουρκουμίνης 85

4.6. Ανάλογα της κουρκουμίνης 88

4.7. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης 90

5. Ταυτοποίηση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης σε κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae

5.1. Έμμεσες τεχνικές για την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης 97

5.1.1. Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) 97

5.1.2. Η Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR) 103

5.2. Άμεσες μέθοδοι για την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης 104

5.2.1. Οπτική μικροσκοπία 105

5.2.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία 108

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 111

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 119

Α' ενότητα: Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae

6.Α.1. Παραλαβή των κυττάρων του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* 122

6.Α.2. Πλασμόλυση των κυττάρων του *S. cerevisiae* με χλωριούχο νάτριο 123

6.Α.3. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο των μη-πλασμολυμένων και των πλασμολυμένων κυττάρων 124

6.Α.4. Μέθοδος Neubauer: προσδιορισμός της βιωσιμότητας και του πληθυσμού των κυττάρων 125

6.Α.5. Μέθοδος PDA για τον προσδιορισμό της ζωτικότητας των κυττάρων 126

6.Α.6. Μελέτη των κυττάρων του *S. cerevisiae* (μη-πλασμολυμένων και πλασμολυμένων) με DSC και FT-IR 127

6.Α.7. Παράμετροι που επηρεάζουν την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα του *S. cerevisiae* 128

6.Α.7.Α Πλασμολυμένα, μη-πλασμολυμένα και ζωντανά κύτταρα 128

6.Α.7.Β	Θερμοκρασία, αιθανόλη, λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα	130
6.Α.8.	Απεγκλωβισμός και προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae*	133
6.Α.9.	Ποσοτικός προσδιορισμός της κουρκουμίνης με HPLC	134
6.Α.10.	Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae*	135
6.Α.10.1.	Μικροσκόπιο Ηλεκτρονικής Σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy, SEM*)	137
6.Α.10.2.	Μικροσκόπιο Φθορισμού (*Fluorescence Microscopy*)	137
6.Α.10.3.	Μελέτη των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης στα κύτταρα με DSC	138
6.Α.10.4.	Μελέτη των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης στα κύτταρα με FT-IR	139

Β' ενότητα: Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη & τροποποιημένο άμυλο

6.Β.1.	Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη	142
6.Β.2.	Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε τροποποιημένο άμυλο με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό (*spray drying*)	144
6.Β.3.	Προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στην β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο	145
6.Β.4.	Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης με DSC	147
6.Β.5.	Μελέτη της διαλυτότητας της κουρκουμίνης παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης	147

Γ' ενότητα: Φυσικοχημικές ιδιότητες ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

6.Γ.1.	Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης παρουσία κυττάρων του *S. cerevisiae*	152
6.Γ.2.	Προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε σύστημα οκτανόλης/νερό	154
6.Γ.3.	*In vitro* μελέτη της διαλυτοποίησης (*dissolution profile*) της κουρκουμίνης σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό	155
6.Γ.4.	Χρωστική ικανότητα κουρκουμίνης (*colour staining*)	157

6.Γ.5. Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας της κουρκουμίνης βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH) 158

Δ' ενότητα: Επίδραση της ενθυλάκωσης στην σταθερότητα της κουρκουμίνης

6.Δ.1. Φωτοχημική σταθερότητα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 164

6.Δ.2. Επίδραση της σχετικής υγρασίας στην οξειδωτική σταθερότητα της κουρκουμίνης 167

6.Δ.3. Επίδραση της θέρμανσης στη σταθερότητα της κουρκουμίνης 168

6.Δ.4. Υδρολυτική σταθερότητα της κουρκουμίνης: επίδραση του pH και της υψηλής θερμοκρασίας 170

Ε' ενότητα: Εφαρμογή της ενθυλακωμένης στα κύτταρα κουρκουμίνης σε τρόφιμο

6.Ε.1. Μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας ηλιέλαιου παρουσία κουρκουμίνης με Rancimat 175

6.Ε.2. Παρασκευή κριτσινιών με κουρκουμίνη 177

6.Ε.3. Προσδιορισμός περιεκτικότητας κουρκουμίνης και αντιοξειδωτικής δραστικότητας των κριτσινιών με DPPH 178

6.Ε.4 Μελέτη των κριτσινιών σε αδρανείς και οξειδωτικές συνθήκες με DSC 179

6.Ε.5. Μελέτη της απελευθέρωσης (*dissolution profile*) της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό 179

6.Ε.6. Προσδιορισμός της υγρασίας των κριτσινιών 179

6.Ε.7. Σταθερότητα της περιεχόμενης κουρκουμίνης κατά την αποθήκευση 180

6.Ε.8. Επίδραση της κουρκουμίνης στην οξειδωτική σταθερότητα των κριτσινιών με Rancimat 181

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae

7.1.	Εισαγωγή	185
7.2.	Επίδραση της λυοφιλίωσης και της πλασμόλυσης στην ζωτικότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae*	186
7.3.	DSC και FT-IR των πλασμολυμένων κυττάρων	188
7.4.	Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* και παράμετροι που την επηρεάζουν	195
7.4.1.	Πλασμολυμένα, μη-πλασμολυμένα και ζωντανά κύτταρα	195
7.4.2.	Λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα, θερμοκρασία, αιθανόλη	197
7.5.	Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae*	204
7.5.1.	Μικροσκοπικές τεχνικές: Μικροσκόπιο φθορισμού και Μικροσκόπιο Ηλεκτρονικής Σάρωσης	204
7.5.2.	Μελέτη των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης με DSC και FT-IR	209
7.6.	Συμπεράσματα	217

8. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο

8.1.	Εισαγωγή	219
8.2.	Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-CD και MS	221
8.3.	Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης με DSC	224
8.4.	Μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης με DSC	227
8.5.	Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης παρουσία β-CD	228
8.6.	Συμπεράσματα	231

9. Φυσικοχημικές ιδιότητες ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

9.1. Εισαγωγή 233

9.2. Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης παρουσία κυττάρων του *S. cerevisiae* 234

9.3. Προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής (Kc) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε σύστημα οκτανόλης/νερό 240

9.4. *In vitro* προφίλ της διαλυτοποίησης-απελευθέρωσης (*dissolution profile*) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό 245

9.5. Χρωστική ικανότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 253

9.6. Αντιοξειδωτική δραστικότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 256

9.7. Συμπεράσματα 262

10. Επίδραση της ενθυλάκωσης στην σταθερότητα της κουρκουμίνης

10.1. Εισαγωγή 265

10.2. Φωτοχημική σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 267

10.3. Επίδραση της σχετικής υγρασίας στην οξειδωτική σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 272

10.4. Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου θέρμανσης στη σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 278

10.5. Επίδραση του pH και της υψηλής θερμοκρασίας στην υδρολυτική σταθερότητα και απελευθέρωση (*dissolution*) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 286

10.6. Συμπεράσματα 292

11. Εφαρμογή της ενθυλακωμένης στα κύτταρα S. cerevisiae κουρκουμίνης

11.1. Εισαγωγή 293

11.2. Οξειδωτική σταθερότητα ηλιελαίου παρουσία ενθυλακωμένης κουρκουμίνης 296

11.3. Παρασκευή κριτσινιών με κουρκουμίνη 298

11.3.1. Οργανοληπτικός έλεγχος 298
11.3.2. Περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη και αντιοξειδωτική δραστικότητα των κριτσινιών 299
11.3.3. Μελέτη των κριτσινιών σε αδρανείς και οξειδωτικές συνθήκες με DSC 301
11.3.4. Προφίλ απελευθέρωσης (*dissolution profile*) της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό 302
11.3.5. Προσδιορισμός της υγρασίας των κριτσινιών 303
11.3.6. Σταθερότητα της κουρκουμίνης κατά την αποθήκευση των κριτσινιών 304
11.3.7. Οξειδωτική σταθερότητα των κριτσινιών 309
11.4. Συμπεράσματα 310

12. Διατροφική αξιολόγηση της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της 313

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 317

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 325

Ζ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 361

Περίληψη

Η τεχνική της *μικροενθυλάκωσης (μικροεγκλεισμός, microencapsulation*) αποτελεί έναν από τους τρόπους, σε κάποιες περιπτώσεις και ο μοναδικός, για τον εμπλουτισμό των τροφίμων με διατροφοδραστικά συστατικά ή για την καλύτερη αξιοποίηση των λειτουργικών ιδιοτήτων τους. Στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε η δυνατότητα των κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae*, του γνωστού ζυμομύκητα της αρτοποιίας και της ζυθοποιίας, να χρησιμοποιηθεί ως μέσου ενθυλάκωσης ενός διατροφοδραστικού συστατικού. Η χρησιμοποίηση των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσο ενθυλάκωσης, αν και έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, ωστόσο μόλις πέντε επιστημονικές αναφορές υπάρχουν μέχρι σήμερα, παρέχοντας ελάχιστες πληροφορίες για τις βέλτιστες συνθήκες, για τον τρόπο επιβεβαίωσης και την απόδοση της ενθυλάκωσης ή για τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των σχηματιζόμενων μικροκαψουλών. Ως διατροφοδραστικό συστατικό επιλέχθηκε η κίτρινη πολυφαινόλη κουρκουμίνη, βασικό συστατικό του φυτού *Curcuma longa*, η οποία πέρα από την χρωστική της ικανότητα μελετάται για την φαρμακευτική της δράση έναντι πληθώρας ασθενειών: νευρολογικών, καρδιαγγειακών, δερματικών, καρκίνου και HIV. Οι λόγοι που επιβάλλουν την ενθυλάκωσή της είναι η σχεδόν ανύπαρκτη υδατοδιαλυτότητά της, η ευαισθησία της σε αλκαλικό περιβάλλον, καθώς και η φωτοχημική και θερμική αστάθειά της.

Στη χρησιμοποίηση των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσου ενθυλάκωσης, βρέθηκε ότι καθοριστικό ρόλο παίζει αφενός το ίδιο το κύτταρο και αφετέρου οι συνθήκες κάτω από τις οποίες τα κύτταρα και η ουσία αλληλεπιδρούν. Μελέτες με μικροσκόπηση Φθορισμού και Ηλεκτρονικής Σάρωσης, με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) και με Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR) έδειξαν την επιτυχή ενθυλάκωση της κουρκουμίνης και τον τρόπο κατανομής της στα κύτταρα. Η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης εκφράστηκε ποσοτικά με την % κ.β. περιεκτικότητα των μικροκαψουλών σε κουρκουμίνη (*% Encapsulation Yield, %EY*) και με την απόδοση της ενθυλάκωσης (*% Encapsulation Efficiency, %EE*). Και οι δυο παράμετροι εξαρτώνται από τις συνθήκες ενθυλάκωσης: (α) τη χρησιμοποίηση πλασμολυμένων ή μη κυττάρων, (β) το διάλυμα ενθυλάκωσης (υδατικό ή 50% v/v αλκοολικό), (γ) τη θερμοκρασία ενθυλάκωσης και (δ) το λόγο μάζας κουρκουμίνης:κυττάρων. Με μια απλή ανάμιξη των κυττάρων με την κουρκουμίνη σε υδατικό διάλυμα είναι εφικτή η παρασκευή μικροκαψουλών με % κ.β. περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη έως 35%. Ζωντανά κύτταρα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, ενώ η χρησιμοποίηση πλασμολυμένων κυττάρων δεν

ενίσχυσε επιπλέον το ποσοστό ενθυλάκωσης. Οι μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα αντί για 50% v/v αλκοολικό χαρακτηρίζονται από υψηλότερες *%EE* και *%EY* κατά τουλάχιστον 2 φορές. Θερμοκρασίες πάνω από 35^{o}C επίσης ενισχύουν την ενθυλάκωση, ενώ ο λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα αποτελεί κρίσιμη παράμετρο. Συγκεκριμένα, όταν η ενθυλάκωση αποσκοπεί στην παρασκευή μικροκαψουλών με περισσότερη κουρκουμίνη (υψηλή *%EY*) πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίσσεια κουρκουμίνης. Αντιθέτως, όταν σκοπός είναι η μέγιστη αξιοποίηση των διαθέσιμων μορίων της κουρκουμίνης (υψηλή *%EE*) θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίσσεια κυττάρων. Στην διαδικασία της ενθυλάκωσης, η οποία περιλαμβάνει παθητική διάχυση της κουρκουμίνης κατά μήκος του κυτταρικού φακέλου, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν οι υδροξυλομάδες της κουρκουμίνης, οι οποίες προσελκύονται από τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Έτσι, το μεγαλύτερο μέρος της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης, βρίσκεται ενσωματωμένο στην πλασματική μεμβράνη συμμετέχοντας σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ωστόσο υπάρχουν και μόρια κουρκουμίνης συνδεδεμένα μέσω δεσμών υδρογόνου και σταυροειδών δεσμών με συστατικά του δικτύου του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες, γλυκάνες).

Η κουρκουμίνη ενθυλακώθηκε επίσης σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) και τροποποιημένο άμυλο (MS) με διάφορες μεθόδους. Η ενθυλάκωσή της σε αυτά ενίσχυσε την υδατοδιαλυτότητά της σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα κύτταρα, αλλά σε μικρότερο βαθμό την ισχυρή αντιοξειδωτική της δραστικότητα. Όλα τα μέσα ενθυλάκωσης ελάττωσαν την προσκολλητική ικανότητα και την ένταση του κίτρινου χρώματος της κουρκουμίνης. Προσομοιάζοντας τις συνθήκες πέψης χρησιμοποιώντας συνθετικό γαστρικό (SGF) και παγκρεατικό υγρό (SPF) βρέθηκε ότι η αποσάρθρωση και η διαλυτοποίηση (*dissolution*) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε β-CD και MS γίνεται γρήγορα, ενώ αντίθετα στις μικροκάψουλες κυττάρων υπάρχει αργή και παρατεταμένη απελευθέρωση/διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης. Επιπλέον, τα κύτταρα προστάτεψαν την κουρκουμίνη από την αλκαλική αποικοδόμηση στο SPF περισσότερο από τα άλλα μέσα. Η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη, και λιγότερο στην β-CD και το MS, προστατεύτηκε αποτελεσματικά από τις καταστροφικές συνέπειες του φωτός, από την αλκαλική υδρόλυση καθώς και από την οξειδωτική αποικοδόμηση σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας πάνω από 75%. Στην ισόθερμη θέρμανση έως τους 150^{o}C για 120 min, κάτω από αδρανείς ή οξειδωτικές συνθήκες, όλες οι ενθυλακωμένες μορφές παρείχαν παρόμοια προστασία ενάντια στην θερμική αποικοδόμηση, ενώ στους 200^{o}C την μεγαλύτερη προστασία παρείχαν τα κύτταρα. Φαίνεται ότι το δίκτυο του κυτταρικού

τοιχώματος, το οποίο περιβάλλει την πλασματική μεμβράνη στα κύτταρα, παρέχει επιπλέον προστασία στην κουρκουμίνη. Αυτό επιβεβαιώθηκε και μετά τον εμπλουτισμό προϊόντος αρτοποιίας με κουρκουμίνη, όπου όταν χρησιμοποιήθηκε ενθυλακωμένη σε κύτταρα κουρκουμίνη αντί για μη-ενθυλακωμένη, το τελικό προϊόν χαρακτηρίστηκε από μεγαλύτερη περιεκτικότητα και καλύτερη σταθερότητα της κουρκουμίνης κατά την αποθήκευση, καθώς και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα. Συνεπώς, η χρησιμοποίηση ενθυλακωμένης σε κύτταρα *S. cerevisiae* κουρκουμίνης, αντί για μη-ενθυλακωμένη, μπορεί να περιορίσει κάποια μειονεκτήματά της και να διευρύνει την εφαρμογή της στα τρόφιμα, με σκοπό είτε την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες ή την αντικατάσταση κάποιων συνθετικών αντιοξειδωτικών, ενισχύοντας την διατροφική τους αξία. Σε αυτή την κατεύθυνση, τα κύτταρα του *S. cerevisiae*, τα οποία αποτελούν ένα φυσικό, ασφαλές (*food grade*), οικονομικό και σε μεγάλη αφθονία προϊόν, φαίνεται να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτελεσματική ενθυλάκωση, υδρόφιλων και υδρόφοβων, διατροφοδραστικών συστατικών.

Abstract

Microencapsulation is a method where bioactive substances are covered by or incorporated in a material (wall material, coating, matrix, encapsulant or carrier). Bioactive substances can often be added in foods only after encapsulation and by this manner it is possible to achieve better exploitation of their functional properties. In the present thesis, the feasibility of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as encapsulation agent was evaluated. The concept of encapsulation in yeast cells has been the topic of several patents, however only five scientific approaches have been made up to present, thus the available information regarding the optimum encapsulation conditions, the confirmation and yield of encapsulation, as well as the properties of the microcapsules prepared, is restricted. The natural yellow polyphenol curcumin, found in the plant *Curcuma longa*, was chosen to be encapsulated in yeast cells. Curcumin is widely used as a food colorant and also as a potential protective agent against chronic diseases including cancer, HIV-infection, neurological, cardio-vascular and skin diseases. The encapsulation of curcumin is imposed by its low water solubility and susceptibility to alkaline conditions, thermal treatment and light.

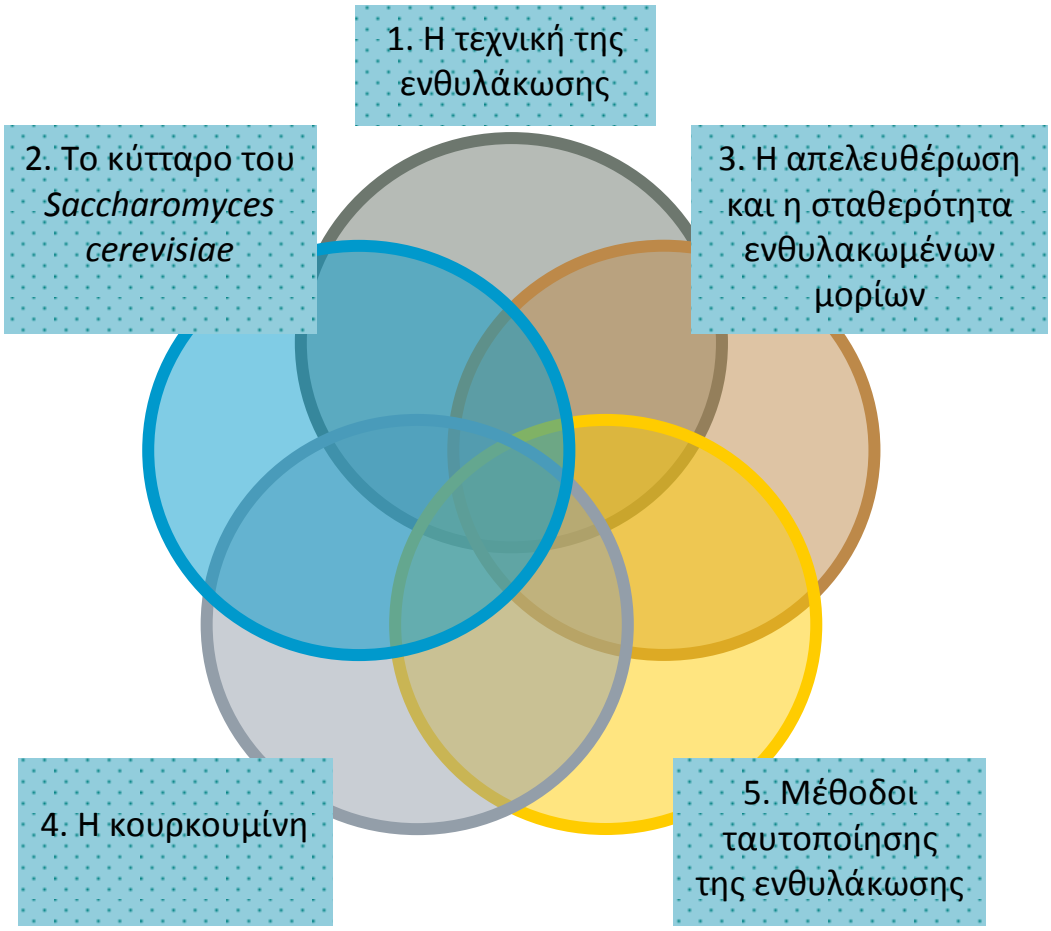
In the yeast encapsulation process the main parameters involved are the cell itself, the encapsulated compound and the conditions under which the cells and the compound interact. Fluorescence and Scanning Electron Microscopy, Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) confirmed the successful encapsulation and the distribution of curcumin molecules in yeast cells. The effectiveness of encapsulation was quantitatively expressed by the % w/w curcumin content of microcapsules *(% Encapsulation Yield, %EY*) and by *Encapsulation Efficiency (%EE*). Both parameters were highly dependent on the encapsulation conditions: (a) use of plasmolysed or non-plasmolysed cells, (b) the encapsulation solution (water or 50% v/v ethanol), (c) encapsulation temperature and (d) curcumin:yeast cells mass ratio. Yeast microcapsules that contained up to 35% w/w curcumin were prepared by simple mixing of the substance with the yeast cells in water. Live, non-freeze dried yeast cells can also be used, whereas plasmolysis of yeast cells was rather redundant. Preparation of microcapsules in water instead of 50% v/v ethanol increased the *%EY* and *%EE* values by at least 2-fold. Temperatures above 35^{o}C enhanced the encapsulation of curcumin molecules whilst the mass ratio curcumin:cells was, also, critical. In particular, when the aim of encapsulation is the production of yeast cells loaded with as much % w/w curcumin as possible

(high *%EY*), excess amount of curcumin should be used, whilst, when the aim is to utilize as much of the available curcumin molecules curcumin as possible (high *%EE*), excess amount of yeast cells and thus available 'encapsulation vehicles' will preferably be used. Regarding the encapsulation process, which involved passive diffusion across the cell envelope, it was assisted by the hydroxyl groups of curcumin which are attractive to the polar headgroups of the membrane. Hence, microencapsulated curcumin was mainly integrated into the cell membrane participating in hydrophobic interactions, but it was also hydrogen-bonded and cross-linked with external cell wall network components (mannoproteins, glucans).

Curcumin, was also encapsulated in β-cyclodextrin (β-CD) and modified starch (MS) by various methods. These encapsulation forms enhanced the solubility of curcumin to a higher degree compared to yeast microcapsules, contrary to the antioxidant activity which was enhanced significantly by yeast encapsulation. All encapsulation forms decreased the colour staining properties of curcumin, along with its yellowness. The release (*dissolution*) profile of encapsulated curcumin in simulated gastric (SGF) and pancreatic fluid (SPF) was also obtained. Disintegration and dissolution of curcumin from β-CD and MS microcapsules was fast in SGF while in yeast microcapsules a slow and prolonged release/dissolution appeared along with lower degradation rate in SPF. Contrary to β-CD and MS, yeast cells significantly protected curcumin from the detrimental effects of light, against alkaline degradation, as well as against the oxidative degradation at Relative Humidity above 75%. Following isothermal heat treatment up to 150^{o}C for 120 min, under either oxidative or inert conditions, all the encapsulants provided similar protection against heat decomposition, whilst at 200^{o}C the yeast cells exhibited the highest heat resistance. It seems that the network of the cell wall that surrounds the plasma membrane in the yeast cells provides additional resistance to curcumin. This was also confirmed after the addition of curcumin in a bakery product, where it was found that when encapsulated in yeast cells curcumin, instead of non-encapsulated, was used, the final product was characterized by higher content and storage stability of curcumin, along with higher antioxidant activity. Therefore, encapsulation of curcumin in cells of *S. cerevisiae,* can restrict some of its disadvantages and promote its application in the food industry for either the production of functional foods with antioxidant properties, or for the replacement of synthetic antioxidants, thus enhancing the nutritional value of foods. Towards this direction, the cells of *S. cerevisiae*, which comprise a natural, safe (food grade), cheap and abundant food material,

can be used for the effective encapsulation of both hydrophilic and hydrophobic bioactive substances.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

Η τεχνική της ενθυλάκωσης

1.1. Γενικά για την ενθυλάκωση

Η μικροενθυλάκωση (μικροεγκλεισμός, microencapsulation) αποτελεί μια τεχνική με μεγάλη εφαρμογή στις βιομηχανίες φαρμάκων και τελευταία και στη βιομηχανία των τροφίμων. Πρόκειται για μια μέθοδο όπου μία ουσία ή ένα μίγμα ουσιών (που ονομάζεται core material) περιβάλλεται από ένα άλλο υλικό, το οποίο αποτελεί το μέσο εγκλεισμού (shell ή wall material ή carrier ή coating ή encapsulant) ή ενσωματώνεται σε μια ομοιογενή ή ετερογενή μήτρα (matrix), καταλήγοντας στο σχηματισμό μικρών καψουλών. Τα συστατικά που μπορούν να εγκλειστούν και ενδιαφέρουν τον τομέα των τροφίμων είναι αρωματικά συστατικά, γλυκαντικά, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, βιταμίνες, ένζυμα, μικροοργανισμοί, αιθέρια έλαια, αμινοξέα, χρωστικές, ιχνοστοιχεία κλπ, και με την τεχνική αυτή μπορούν να προστατευτούν απέναντι στην εξάτμιση, την οξείδωση, την απορρόφηση υγρασίας ή τη θέρμανση (φυσικοχημικές διαδικασίες που μπορεί να συμβούν κατά την αποθήκευση ή την επεξεργασία ενός τροφίμου) (Gibbs et al., 1999; Zeller and Saleeb, 1999).

Ο πίνακας 1 (βλ. παράρτημα) συνοψίζει κάποιες εφαρμογές της μικροενθυλάκωσης που ήδη εφαρμόζονται στην βιομηχανία τροφίμων. Ενθυλακωμένο αλάτι χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της απώλειας χρώματος, της τάγγισης και της απορρόφησης νερού σε ζύμη αρτοποιίας. Εγκλεισμένες μορφές ιχθυελαίων χρησιμοποιούνται σε προϊόντα αρτοποιίας και στις σκόνες γάλακτος. Στις σκυλοτροφές γίνεται εγκλεισμός βιταμινών, ιχνοστοιχείων, υποκατάστατων κρέατος, αρωμάτων. Στα γλυκά, τα οποία είναι ευαίσθητα στην υγρασία και την θερμοκρασία, ο εγκλεισμός μειώνει την υγροσκοπικότητα κάποιων συστατικών, ή βελτιώνει τις ρεολογικές τους ιδιότητες. Το κιτρικό οξύ ενθυλακωμένο προστίθεται στο τσάι για να παρεμποδιστεί η αντίδραση του με τις ταννίνες, κάτι που προκαλεί τον αποχρωματισμό του, ενώ στα

δημητριακά πρωινού εγκλείονται αρωματικά συστατικά. Στα κρέατα ως ενισχυτικά χρησιμοποιούνται εγκλεισμένα μέσα οξίνισης, όπως γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ, γλυκογονο-δέλτα- λακτόνη. Η γλυκογονο- δέλτα- λακτόνη εγκλείεται σε λίπος και βρίσκει εφαρμογή σε προϊόντα αρτοποιίας ως συντηρητικό αφού δρα ως τροποποιητής του pH. Στις τσίχλες, τα αρωματικά συστατικά και τα μέσα οξίνισης ενθυλακώνονται σε κόμμεα ή άλλα μη υδατοδιαλυτά συστατικά για να επιτευχθεί αργή απελευθέρωση και για να αποφευχθούν αντιδράσεις με τα χρώματα και τα σάκχαρα. Γλυκαντικά, όπως η ασπαρτάμη εγκλείονται σε κηρούς για να προσδώσουν σταθερότητα και αργή απελευθέρωση (Pszczola, 1998).

1.2. Μέθοδοι ενθυλάκωσης

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ενθυλάκωσης, οι οποίες γενικά περιλαμβάνουν την παρασκευή γαλακτώματος του συστατικού και του μέσου μικροενθυλάκωσης ακολουθούμενη από ταχεία ξήρανση. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από την τελική χρήση του προϊόντος, από τις ιδιότητες του συστατικού που θα εγκλειστεί, από το κόστος παραγωγής, από το βαθμό σταθερότητας που απαιτείται κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία του καθώς και από τις απαιτούμενες ιδιότητες απελευθέρωσης. Ανάλογα με την τεχνική εγκλεισμού, τα εγκλεισμένα προϊόντα θα έχουν διαφορετικά σχήματα (φιλμ, σφαίρες, ακανόνιστα σωματίδια) και διαφορετική δομή (πορώδη ή συμπαγή, άμορφη, κρυσταλλική ή υαλώδη) που θα επηρεάζουν την διάχυση των ενθυλακωμένων συστατικών και συνεπώς την σταθερότητα του τροφίμου κατά την αποθήκευση (Madene et al., 2006; Gibbs et al., 1999; Zeller and Saleeb, 1999).

Οι πιο γνωστές μέθοδοι ενθυλάκωσης που περιγράφονται στην βιβλιογραφία διακρίνονται σε χημικές και μηχανικές και είναι οι ακόλουθες:

Α) Χημικές Μέθοδοι

- *co-crystallization (συνκρυστάλλωση)*: εφαρμόζεται σε χυμούς, αιθέρια έλαια, μαύρη ζάχαρη.
- *coacervation*: είναι ακριβή μέθοδος. Χρησιμοποιούνται κολλοειδή διαλύματα: ένα, όπως η ζελατίνη ή περισσότερα πχ ζελατίνη και κόμμι ακακίας. Υδρόφιλα μέσα, όπως η ζελατίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθούν για εγκλεισμό υδρόφοβων ουσιών.
- σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (*inclusion complex*): π.χ. με κυκλοδεξτρίνες

- *adsorption (προσρόφηση)*: το συστατικό προσροφάται στην επιφάνεια του υποστρώματος. Τα υποστρώματα πρέπει να διαθέτουν στην επιφάνεια τους μικρούς πόρους ικανούς να προσροφήσουν πτητικά συστατικά: π.χ. η σακχαρόζη ή το άμυλο καλαμποκιού.

Β*) Μηχανικές μέθοδοι*

- *spray drying (ξήρανση με ψεκασμό)*: Μειονεκτήματα της είναι ότι μπορεί να χαθούν μερικές χαμηλού Σ.Ζ ουσίες ή ότι το συστατικό βρίσκεται στην επιφάνεια της κάψουλας οπότε και οξειδώνεται. Το συστατικό αναμιγνύεται με την κάψουλα συνήθως σε αναλογία 1:4. Ιδανικά μέσα εγκλεισμού είναι όσα έχουν μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, μικρό ιξώδες και γαλακτωματοποιητικές ικανότητες (τροποποιημένο άμυλο, μαλτοδεξτρίνη, κόμμεα κ.α.).
- *lyophilization or freeze-drying (λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη)*: χρησιμοποιείται για θερμοευαίσθητες ουσίες και κοστίζει 50 φορές περισσότερο απ' ότι η ξήρανση με ψεκασμό.
- *spray cooling ή spray chilling (ψύξη με ψεκασμό)*: είναι η πιο φτηνή μέθοδος. Διαφέρει από τις υπόλοιπες, αφού δεν περιλαμβάνει πραγματική ενθυλάκωση: ένας σημαντικός αριθμός μορίων συγκρατούνται στην επιφάνεια του μέσου και η απελευθέρωση ξεκινά όταν το ενθυλακωμένο συστατικό έρχεται σε επαφή με το τρόφιμο. Χρησιμοποιείται συνήθως για ενθυλάκωση θειικού σιδήρου, βιταμινών, μεταλλικών ιόντων ή οργανικών οξέων.
- *spinning disk* (περιστρεφόμενος δίσκος): σχηματίζεται αιώρημα του προς ενθυλάκωση συστατικού και του μέσου ενθυλάκωσης το οποίο περνάει από περιστρεφόμενο δίσκο σε συνθήκες που οδηγούν στον σχηματισμό ενός φιλμ.
- *fluidized bed (ρευστοποιημένη κλίνη*): δημιουργείται μια ομοιόμορφη στοιβάδα γύρω από στερεά σωματίδια. Ως μέσα εγκλεισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, αιθανολικά διαλύματα συνθετικών πολυμερών και γαλακτωματοποιητές.
- *Extrusion (εξώθηση ή εκβολή):* Χρησιμοποιούνται υδατάνθρακες που βρίσκονται στην υαλώδη κατάσταση. Το βασικό πλεονέκτημα της είναι η επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των αρωματικών συστατικών, επειδή περιορίζεται η διάχυση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και επειδή απομακρύνεται το συστατικό που δεν έχει ενθυλακωθεί (Szente and Szejtli, 2004; Madene et al., 2006; Gibbs et al., 1999; Zeller and Saleeb, 1999).

Όλες οι μέθοδοι ενθυλάκωσης, εκτός των συμπλόκων εγκλεισμού, καταλήγουν σε σωματίδια με διάμετρο 3-800 μm (Reineccius, 2002).

1.3. Μέσα ενθυλάκωσης

Τα μέσα εγκλεισμού ποικίλλουν και περιλαμβάνουν κυρίως υδατάνθρακες (άμυλο, κυκλοδεξτρίνες, μαλτοδεξτρίνη), κόμμεα, πρωτεΐνες ή λιπίδια (λιποσώματα) και συνθετικά πολυμερή. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν ένα ή περισσότερα διαφορετικά είδη υλικών. Η επιλογή του μέσου ενθυλάκωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: τις απαιτήσεις του τελικού προϊόντος, τη φύση του ενθυλακωμένου συστατικού, την τεχνική εγκλεισμού, το κόστος, πιθανή έγκριση από τον FDA. Το μέσο εγκλεισμού που θα επιλεχθεί δεν πρέπει να αντιδρά με το εγκλεισμένο συστατικό, θα πρέπει να βρίσκεται σε πρακτική μορφή π.χ. να έχει χαμηλό ιξώδες σε υψηλές συγκεντρώσεις, να έχει καλές γαλακτωματοποιητικές-σταθεροποιητικές ικανότητες και να απελευθερώνει την ενθυλακωμένη ουσία σε επιθυμητό χρόνο και τόπο (Madene et al., 2006; Gibbs et al., 1999; Zeller and Saleeb, 1999). Τα συνηθέστερα μέσα ενθυλάκωσης είναι τα ακόλουθα:

- ***ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ***

Χρησιμοποιούνται κυρίως πρωτεΐνες γάλακτος και πρωτεΐνες σόγιας. Έχουν αμφιφιλικές ιδιότητες, μεγάλο ΜΒ, ευκινησία στην μοριακή τους αλυσίδα και εξαιρετικές λειτουργικές ιδιότητες όπως διαλυτότητα, ιξώδες και γαλακτωματοποιητικές ικανότητες. Χρησιμοποιούνται επίσης οι πολυπεπτόνες και τα παράγωγα ζελατίνης, τα οποία σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα αλλά έχουν μικτή διαλυτότητα στο ψυχρό νερό, αντιδρούν με καρβονύλια και έχουν υψηλό κόστος.

- ***ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ***

Χρησιμοποιείται άμυλο (τροποποιημένο ή μη), μαλτοδεξτρίνες, κόμμεα, κυκλοδεξτρίνες. Οι μαλτοδεξτρίνες και κυκλοδεξτρίνες έχουν χαμηλό ιξώδες, καλή διαλυτότητα και ενθυλακώνουν κυρίως αρωματικά συστατικά. Το άμυλο προέρχεται από πατάτες, καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι και χρησιμοποιείται κυρίως για πτητικά συστατικά με τα οποία σχηματίζει πολύ σταθερά γαλακτώματα: το πτητικό συστατικό περικυκλώνεται από την έλικα της αμυλόζης με υδρόφοβο δεσμό είτε σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα -ΟΗ του αμύλου. Η μαλτοδεξτρίνη προέρχεται από μερική υδρόλυση του καλαμποκάλευρου με οξέα ή ένζυμα και παρέχεται σε διάφορα ισοδύναμα δεξτρόζης (DE). Διατίθεται σε διάφορα ΜΒ αλλά δεν διαθέτει γαλακτωματοποιητικές ικανότητες και έχει χαμηλή συγκράτηση των πτητικών συστατικών. Τα κόμμεα είναι άγευστα. Το αραβικό κόμμι έχει χαμηλό ιξώδες, γαλακτωματοποιητικές ικανότητες και καλή συγκράτηση, αλλά επειδή είναι ακριβό, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την μαλτοδεξτρίνη. Αλγινικά και υδροκολλοειδή παραλαμβάνονται από τα φύκια και με ιόντα

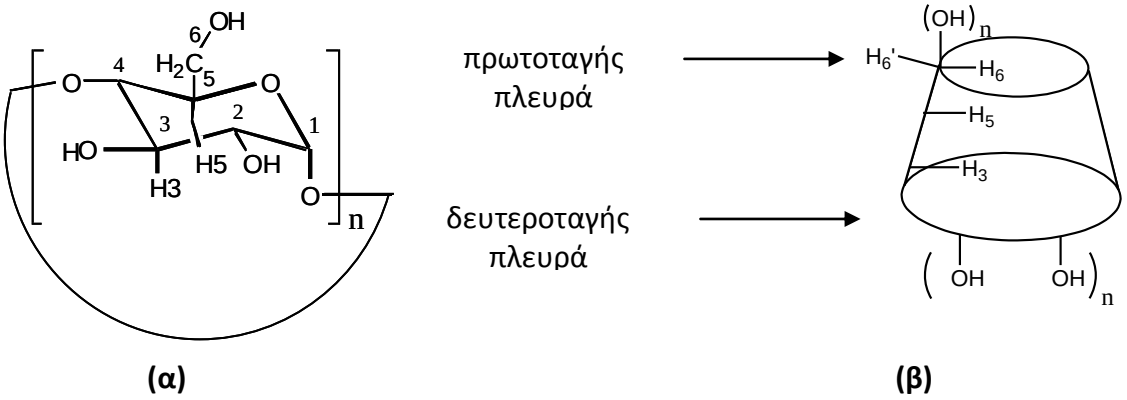
ασβεστίου σχηματίζουν σταθερές πηκτές. Χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό αιθέριων ελαίων σε διάφορες θερμοκρασίες.

Στον πίνακα 2 του παραρτήματος συνοψίζονται κάποιες μελέτες που αφορούν την ενθυλάκωση διατροφοδραστικών συστατικών κυρίως σε υδατάνθρακες**.**

1.3.1. Οι Κυκλοδεξτρίνες ως μέσα ενθυλάκωσης

Πρόκειται για κυκλικά μόρια που σχηματίζονται από ενζυμική κατεργασία του αμύλου και χρησιμοποιούνται σε τσίχλες, σούπες, πουτίγκες, καφέ, τσάι, γλυκά, τυριά, σνακ, κράκερ και δημητριακά πρωινού. Υπάρχουν 3 τύποι: α, β και γ κυκλοδεξτρίνες. Η β και γ- κυκλοδεξτρίνη έχουν αναγνωριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe), ενώ η α- εξετάζεται ακόμα. Οι FAO, WHO έχουν ορίσει για την β- κυκλοδεξτρίνη ως ανεκτή ημερήσια πρόσληψη τα 5 mg /kg βάρους σώματος. Οι α και β κυκλοδεξτρίνη, αντίθετα με την γ, δεν υδρολύονται από το σάλιο και τις παγκρεατικές αμυλάσες, και αφομοιώνονται από την εντερική μικροχλωρίδα. Στο γαστρεντερικό σύστημα δεν απορροφώνται λόγω του μεγάλου ΜΒ τους, αλλά κάποια λιπόφιλα παράγωγα τους, όπως οι μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες, απορροφώνται εν μέρει αλλά είναι τοξικές. Η β-κυκλοδεξτρίνη αποτελεί το πιο συνηθισμένο μέσω εγκλεισμού εξαιτίας της υψηλής ικανότητας να σχηματίζει σύμπλοκα και λόγω χαμηλού κόστους.

Οι α, β, γ κυκλοδεξτρίνες αποτελούνται αντίστοιχα από 6,7,8 μονάδες δ-1,4-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένες με α δεσμούς. Η εξωτερική τους επιφάνεια είναι υδρόφιλη και η εσωτερική τους κοιλότητα υδρόφοβη. Το σχήμα τους, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.1 είναι κωνικό με δυο υδρόφιλες βάσεις: Όλα τα πρωτοταγή –ΟΗ των C6 είναι προσανατολισμένα στην πλευρά με την μικρότερη διάμετρο, ενώ όλα τα δευτεροταγή –ΟΗ των C2, C3 στην πλευρά του κώνου με την μεγαλύτερη διάμετρο. Η κεντρική κοιλότητα αποτελείται από τους άνθρακες, τα Η3, Η5 και τα αιθερικά οξυγόνα των μονάδων γλυκόζης, που τις δίνουν τον λιπόφιλο χαρακτήρα. Η πολικότητα της κοιλότητας έχει υπολογιστεί ως παρόμοια με αυτή ενός υδατικού διαλύματος αιθανόλης. Οι διαστάσεις των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρινών εμφανίζονται στον Πίνακα 1.1. (Yuliani et al., 2005).



Σχήμα 1.1. (α) *Δομική μονάδα α-D-γλυκοπυρανόζης των κυκλοδεξτρινών (α-CD n=6, βCD: n=7 γCD: n=8).* ***(β)*** *Σχηματική αναπαράσταση κυκλοδεξτρίνης υπό μορφή κόλουρου κώνου (Dodziuk, 2006).*

Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού (inclusion complexes) με ποικιλία μορίων εγκλείοντας ολόκληρο ή μέρος του μορίου στην κοιλότητα τους, ανάλογα με το μέγεθος της κοιλότητας τους. Μόνο σχετικά μη πολικά μόρια, κατάλληλου μεγέθους μπορούν να εισχωρήσουν στην κοιλότητα τους. Ωστόσο για να σχηματιστεί σύμπλοκο εγκλεισμού τις περισσότερες φορές αρκεί μόνο κάποιο μη πολικό μέρος του μορίου να εγκλωβιστεί στην κοιλότητα. Οι κινητήριες δυνάμεις για το σχηματισμό συμπλόκου περιλαμβάνουν απελευθέρωση μορίων νερού μεγάλης ενθαλπίας από την κοιλότητα, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου. Το μέγεθος, η χημική δομή και η πολικότητα του εγκλεισμένου μορίου, επηρεάζουν κυρίως τον σχηματισμό του συμπλόκου.

Πίνακας 1.1*. Διαστάσεις της α-, β-, γ- κυκλοδεξτρίνης.*

Τύπος κυκλοδεξτρίνης	***Εσωτ.διάμετρος (Å)***	***Εξωτ. Διάμετρος (Å)***	***Μήκος (Å)***
α-κυκλοδεξτρίνη	5.7	13.7	7.8
β-κυκλοδεξτρίνη	7.8	15.3	7.8
γ-κυκλοδεξτρίνη	9.5	16.9	7.8

Για τη βελτίωση των φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των κυκλοδεξτρινών έχουν παρασκευαστεί παράγωγά τους. Η υδατοδιαλυτότητα των παραγώγων είναι συνήθως

μεγαλύτερη από της κυκλοδεξτρίνης από την οποία προέρχονται. Από το 1997 έχει αναφερθεί η σύνθεση περισσοτέρων από 1500 παραγώγων κυκλοδεξτρινών. Τα πιο γνωστά είναι η υδρόξυπρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD), τυχαίας μεθυλίωσης α- και β-κυκλοδεξτρίνη, μαλτόζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, ακετυλιωμένη κυκλοδεξτρίνη, σουλφοβουτυλο-αιθέρ-β-κυκλοδεξτρίνη (SE-b-CD) (Connors, 1997). Στο Πίνακα 1.2 παρουσιάζεται η διαλυτότητα στο νερό και το κόστος των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων παραγώγων κυκλοδεξτρινών.

Διάφορες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοσθούν για το σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ δραστικού συστατικού και κυκλοδεξτρίνης:

1) Σε υδατικό διάλυμα με ή χωρίς ρύθμιση του pH. Η κατάσταση ιονισμού ορισμένων μορίων παίζει σημαντικό ρόλο, γιατί η ιονισμένη μορφή είναι λιγότερο ικανή να αντικαταστήσει τα υδατοδιαλυτά μόρια της κοιλότητας (Zornoza, 1998). Στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα τα μόρια μπορεί να βρεθούν στην μη ιονισμένη κατάσταση. Για παράδειγμα, ο εγκλεισμός του κιναμμικού οξέος σε κυκλοδεξτρίνες επιτυγχάνεται καλύτερα σε pH 4 (Rodis et al., 2004).

2) *Μέθοδος της συγκαταβύθισης (co-precipitation)*: το διατροφοδραστικό συστατικό διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε πολικό διαλύτη, και ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων.

3) *Απευθείας ανάμιξη στερεής σκόνης (Kneading)*: αυτή η μέθοδος μπορεί εύκολα εφαρμοστεί για εμπορική παραγωγή. Για την απομάκρυνση του νερού από το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί διήθηση, φυγοκέντρηση, λυοφιλίωση ή ξηρός ψεκασμός (Hedges, 1998).

Πίνακας 1.2. *Υδατοδιαλυτότητα και κόστος διαφόρων παραγώγων κυκλοδεξτρινών* (*Magnusdottir et al., 2002*).

Κυκλοδεξτρίνες	*Υποκατάσταση*	*MW*	*Υδατοδιαλυτότητα (mg/ml)*	*Κόστος (USD/Kg)*
α-κυκλοδεξτρίνη		972	145	45
β-κυκλοδεξτρίνη		1135	18.5	5
υδρόξυπρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη	0.65	1400	>600	300
Τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη	1.8	1312	>500	350
γ-κυκλοδεξτρίνη		1297	232	80

Για την ταυτοποίηση των συμπλόκων με τις κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι: η θερμική ανάλυση (Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης), η διάθλαση με ακτίνες Χ και ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR).

- ***Προσδιορισμός της σταθερά ισορροπίας (K_c) των συμπλόκων εγκλεισμού***

Όταν ένα συστατικό εγκλείεται σε κυκλοδεξτρίνη επιτυγχάνεται μια ισορροπία μεταξύ των ελεύθερων και των συμπλοκοποιημένων μορίων (Bibby et al., 2000; Clarot et al., 2000). Η σταθερά ισορροπίας εξαρτάται από τη φύση του μορίου και την κυκλοδεξτρίνη και από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η σύσταση του τροφίμου (Reineccius, 2002).

$$mG + nCD \underset{}{\overset{Kmn}{\leftrightarrow}} C\,nm$$

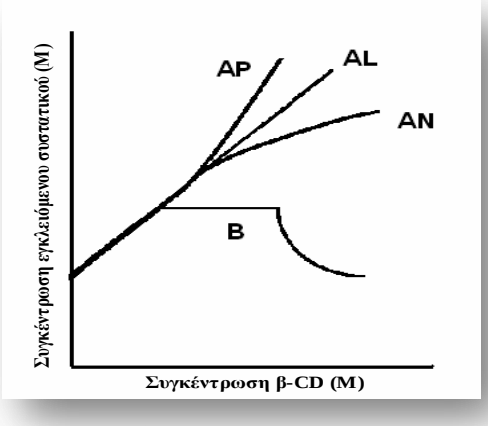
Η σταθερά σχηματισμού συμπλόκου περιγράφεται από την εξίσωση:

$$K_{nm} = [C_{nm}] / [G]^m[CD]^n$$

όπου m, n είναι ο αριθμός μορίων της ουσίας και της κυκλοδεξτρίνης, που σχηματίζουν σύμπλοκο. Στις περισσότερες περιπτώσεις ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης σχηματίζει σύμπλοκο με ένα μόριο ουσίας και η σταθερά σύνδεσης είναι $K_{1:1.}$

- ***Μελέτη διαλυτότητας***

Είναι πολύ σημαντική όταν οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για να τροποποιήσουν την υδατοδιαλυτότητα ενός μη διαλυτού ή ελάχιστα διαλυτού μορίου: περιγράφει εάν η αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα του μορίου αλλά δεν επαληθεύει το σχηματισμό συμπλόκου. Οι Higuchi & Connors (1967) ταξινόμησαν τα σύμπλοκα με τις κυκλοδεξτρίνες με βάση το προφίλ διαλυτότητας που εμφανίζει το εγκλειόμενο συστατικό σε συνάρτηση με την συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης (σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2. *Διαγράμματα μελέτης διαλυτότητας (Higuchi & Connors, 1967).*

Ο τύπος Α εμφανίζεται όταν η διαλυτότητα του συστατικού αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης. Όταν το σύμπλοκο είναι πρώτης τάξης σε σχέση με την κυκλοδεξτρίνη και πρώτης ή μεγαλύτερης τάξης σε σχέση με το υπόστρωμα τότε το προφίλ διαλυτότητας χαρακτηρίζεται A_L. Αν το σύμπλοκο είναι πρώτης τάξης σε σχέση με το υπόστρωμα αλλά δεύτερης ή τρίτης τάξης σε σχέση με τη κυκλοδεξτρίνη τότε το προφίλ διαλυτότητας χαρακτηρίζεται A_P. Το A_N προφίλ μπορεί δύσκολα να ερμηνευθεί. Το προφίλ διαλυτότητας τύπου Β υποδηλώνει σχηματισμό συμπλόκου με περιορισμένη διαλυτότητα.

Με τη μελέτη της διαλυτότητας υπολογίζεται η διαλυτότητα της ουσίας σε αυξημένες συγκεντρώσεις κυκλοδεξτρίνης και από την κλίση της ευθείας που προκύπτει μπορεί να υπολογιστεί η διαλυτότητα του συστατικού, απουσία κυκλοδεξτρίνης, S_0:

$$K_C = \text{κλίση} / S_0\,(1 - \text{κλίση})$$

Από την γραφική παράσταση του $\ln K_c$ συναρτήσει του 1/T μπορεί να υπολογιστεί η μεταβολή της ενθαλπίας και η μεταβολή της εντροπίας (Tommasini et al., 2004) του σχηματισμού του συμπλόκου με βάση την εξίσωση του Van't Hoff :

$$\ln K_C = -\frac{\Delta H^{\neq}}{RT} + \frac{\Delta S^{\neq}}{R}$$

όπου $\Delta H^{\neq}$ η μεταβολή της ενθαλπίας, $\Delta S^{\neq}$ η μεταβολή της εντροπίας, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (R=8,314 J/mol K) και T η απόλυτη θερμοκρασία (K).

Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs λόγω των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν κατά το σχηματισμό του συμπλόκου μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση :

$$\Delta G_{25} = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Συνήθως ΔΗ <0 δηλαδή ο σχηματισμός συμπλόκου είναι εξώθερμη αντίδραση, λόγω των δυνάμεων VDW μεταξύ ουσίας-κυκλοδεξτρίνης, των δεσμών Η μεταξύ ουσίας- ΟΗ κυκλοδεξτρίνης ή λόγω μεταβολών στο βαθμό συσσωμάτωσης των μορίων του νερού που βρίσκονται γύρω από τα μόρια που συμμετέχουν στη συμπλοκοποίηση. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συνδέονται με μικρή θετική ΔΗ και μια υψηλή θετική ΔS, αλλά δεν εμπλέκονται στο σχηματισμό συμπλοκών. Η κύρια κινητήρια δύναμη στο σχηματισμό συμπλόκων είναι η απελευθέρωση των μορίων νερού μεγάλης ενθαλπίας από το εσωτερικό της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Η ΔS μπορεί να είναι θετική ή αρνητική (Loftsson et al., ; Connors 1997; Clarot et al., 2000).

1.3.2. Τα Λιποσώματα ως Μέσα Ενθυλάκωσης

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση φαρμάκων, πρωτεϊνών, νουκλεοτιδίων ακόμα και πλασμιδίων. Στην φαρμακευτική βοηθούν στη θεραπεία πολλών ασθενειών, καθώς μπορούν να στοχεύουν σε συγκεκριμένα όργανα του σώματος, μειώνοντας τις παρενέργειες των φαρμάκων. Συγκεκριμένα στην επιφάνεια των λιποσωμάτων μπορούν να συνδεθούν ειδικά μόρια (αντισώματα, πρωτεΐνες, πεπτίδια) για να ενισχύσουν τον σχηματισμό δεσμού ανάμεσα στο ενθυλακωμένο σε λιποσώματα φάρμακο και σε ένα κύτταρο στόχο, όπως ένα καρκινικό κύτταρο.

Βασικό πλεονέκτημα των λιποσωμάτων είναι ότι αποτελούνται από φυσικά συστατικά, και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στα τρόφιμα. Οι λεκιθίνες γενικώς αναγνωρίζονται ως GRAS, αλλά υψηλές συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων όταν χρησιμοποιούνται τοπικά για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να προκαλέσουν ενοχλήσεις στο δέρμα. Τα λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί στα τρόφιμα: στην παρασκευή τυριών ενθυλακώνεται λυσοζύμη ή το αντιβιοτικό νισίνη για να παρεμποδιστεί η αλλοίωση τους από βακτήρια του βουτυρικού οξέος. Στις μαργαρίνες και την μαγιονέζα παρεμποδίζουν την οξείδωση των ακόρεστων λιπιδίων (Zeller and Saleeb, 1999). Λιποσώματα από λεκιθίνη εμπλουτισμένα με στεατικό οξύ και α- τοκοφερόλη προστατεύουν την α-αμυλάση από την πεψίνη. Το ασκορβικό οξύ ενθυλακώνεται σε λιποσώματα και αυξάνεται η αντιοξειδωτική του ικανότητα (Taylor et al., 2005). Ωστόσο στην βιομηχανία τροφίμων η χρήση τους είναι περιορισμένη, διότι αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των τροφίμων, το κόστος της βιομηχανικής παρασκευής τους είναι μεγάλο και η σταθερότητά τους στις συνθήκες του περιβάλλοντος περιορισμένη (πολύ εύκολα οξειδώνονται ή υδρολύονται, γι' αυτό ή αποθηκεύονται σε αδρανείς συνθήκες αζώτου ή αργού ή τους προστίθενται αντιοξειδωτικά) (Taylor et al., 2005; Baianu et al., ; Edwards and Baeummer, 2006; Gibbs 1999).

- ***Σύσταση λιποσωμάτων***

Τα λιποσώματα αποτελούνται από 1 ή περισσότερες στοιβάδες λιπιδίων (σε αντίθεση με τα γαλακτώματα που αποτελούνται μόνο από μια στοιβάδα), κυρίως φωσφολιπιδίων, αλλά και άλλα λιπίδια μπορεί να ενσωματωθούν. Τα φωσφολιπίδια είναι σφιγγολιπίδια ή φωσφοδιγλυκερίδια. Το πιο συνηθισμένο φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατίδυλο-χολίνη που

απομονώνεται χωρίς κόστος από την σόγια ή τον κρόκο του αυγού. Το υδρόφιλο τμήμα των λιπιδίων (η πολική κεφαλή) κατευθύνεται προς την υδατική φάση και οι υδρόφοβες ομάδες συσσωματώνονται μεταξύ τους. Διάταξη των λιπιδίων σε σφαιρική μορφή οδηγεί στον σχηματισμό πολύ σταθερής κάψουλας επειδή δεν υπάρχει αλληλεπίδραση των λιπιδίων με το νερό.

- ***Ενθυλάκωση μορίων στα λιποσώματα***

Τα λιποσώματα μπορούν να ενθυλακώσουν τόσο υδρόφιλα μόρια στην εσωτερική υδρόφιλη κοιλότητα τους, όσο και λιπόφιλα μόρια στην μεμβρανική διπλοστοιβάδα τους. Τα σάκχαρα και τα μεγάλα πολικά μόρια δε μπορούν να περάσουν μέσα από την λιποσωμική διπλοστοιβάδα, εν τούτοις μικρά λιπόφιλα μόρια μπορούν.

Η ενθυλάκωση ενός μορίου στα λιποσώματα γίνεται με τους εξής τρόπους:

- με εγκλεισμό στην εσωτερική τους κοιλότητα (υδρόφιλες ουσίες)
- με κατανομή μέσα στις λιπιδικές υδρογονανθρακικές ουρές των διπλοστοιβάδων (λιπόφιλες ουσίες)
- με ομοιοπολικούς δεσμούς και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων

Πολύ σημαντικό ρόλο στην ενθυλάκωση ενός μορίου στα λιποσώματα παίζει η φάση στην οποία βρίσκεται η φωσφολιπιδική μεμβράνη, η οποία επηρεάζεται από την σύσταση της και την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η φωσφολιπιδική μεμβράνη μπορεί να βρίσκεται είτε στην **φάση πηκτής** (*gel phase*) στην οποία οι δυνάμεις VDW μεταξύ των άκυλο-ομάδων των φωσφολιπιδίων είναι ισχυρές οπότε και η ρευστότητα της περιορισμένη, είτε σε μια πιο ρευστή **υγροκρυσταλλική φάση** (liquid crystalline). Η θερμοκρασία στην οποία η μεμβράνη μεταβαίνει από την φάση πηκτής στην πιο ρευστή υγροκρυσταλλική κατάσταση (λόγω ελάττωσης των δυνάμεων VDW μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων) ονομάζεται ***θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης, Tm (phase transition temperature)***. Όσο πιο μεγάλη είναι η T_m τόσο λιγότερο ρευστό είναι το λιποειδές σε συνηθισμένες συνθήκες. Συνήθως μεγάλες υδρογονανθρακικές αλυσίδες αυξάνουν την T_m, ενώ οι ακόρεστοι δεσμοί και οι διακλαδώσεις την μειώνουν. Επίσης, ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολικών κεφαλών μπορεί να αυξήσουν την T_m. Στα λιποσώματα, κατά την παρασκευή τους συνήθως προστίθεται

χοληστερόλη, η οποία αυξάνει την ακαμψία (rigidity) της μεμβράνης: επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τόσο των πολικών κεφαλών όσο και των υδρογονανθρακικών αλυσίδων και μειώνει την T_m και την ενθαλπία μετάπτωσης.

Όσον αφορά την απελευθέρωση των ενθυλακωμένων συστατικών τα *υδατοδιαλυτά* συστατικά απελευθερώνονται από τα λιποσώματα με διάχυση: το υδατοδιαλυτό συστατικό στο κέντρο του λιποσώματος αρχικά έρχεται σε ισορροπία με το περιβάλλον μέσο, αλλά όταν το περιβάλλον μέσο ενυδατωθεί, π.χ. με το σάλιο, η ουσία διαχέεται προς τα έξω με ρυθμό που εξαρτάται από την σύσταση του λιποσώματος και τις φυσικές της ιδιότητες. Τα *λιποδιαλυτά ή τα μη πτητικά συστατικά* απελευθερώνονται μόνο όταν το λιπόσωμα σπάει π.χ. κατά την ενζυματική αποικοδόμηση ή την υδρόλυση της λεκιθίνης.

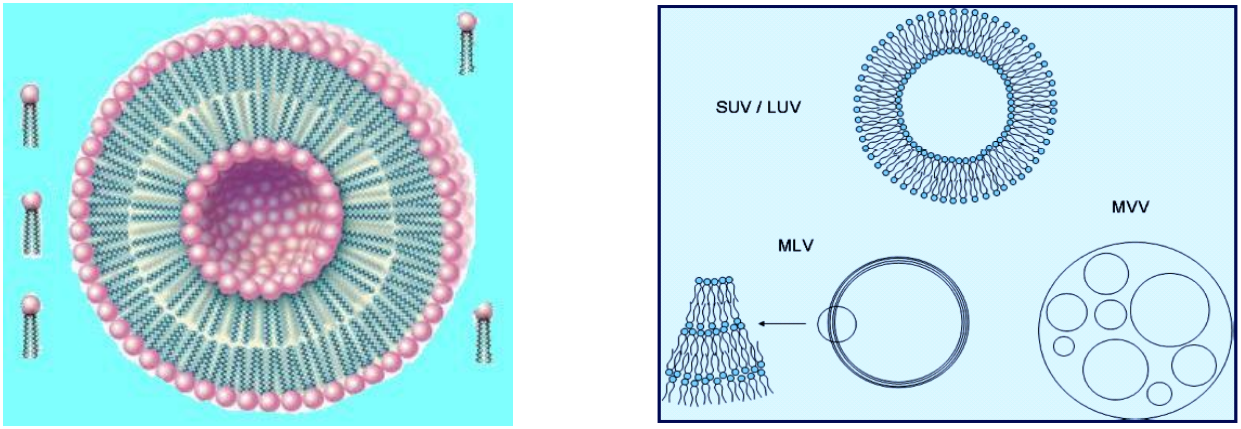
- ***Σταθερότητα των λιποσωμάτων***

Η σταθερότητα των λιποσωμάτων στο περιβάλλον επηρεάζεται από την ρευστότητα της μεμβράνης, το επιφανειακό δυναμικό, το βαθμό ενυδάτωσης, το μέγεθος τους και τη μέθοδο παρασκευής τους. Το Z-potential δείχνει σε υδατικό μέσο το επιφανειακό δυναμικό των λιποσωμάτων, το οποίο σχετίζεται με τη σταθερότητά τους στον χρόνο. Κατά την προετοιμασία ή την αποθήκευση τους μπορεί να συμβούν χημικές και φυσικές αλλαγές. Χημικές αλλαγές που μπορεί να συμβούν είναι: 1) οξείδωση των άκυλο-αλυσίδων μέσω του μηχανισμού ελευθέρων ριζών, ιδιαίτερα όσων έχουν διπλούς δεσμούς. 2) υδρόλυση τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Φυσικές αλλαγές μπορεί να συμβούν λόγω της μείωσης του ηλεκτρικού δυναμικού στην επιφάνεια τους. Το επιφανειακό δυναμικό των λιποσωμάτων επηρεάζει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των λιπιδίων με άλλα φορτισμένα συστατικά και εμποδίζει φαινόμενα συσσωμάτωσης και συγχώνευσης των λιπιδικών διπλοστοιβάδων. Για παράδειγμα οι φορτισμένες λιπιδικές μεμβράνες μπορούν να εμποδίσουν το πέρασμα ομοίως φορτισμένων μορίων στο εσωτερικό τους προστατεύοντας τις εγκλεισμένες ουσίες.

Τα λιποσώματα συνήθως αποθηκεύονται στην λυοφιλιωμένη κατάσταση, όπου αυξάνεται η σταθερότητα τους για 2 λόγους: 1) Η αφαίρεση του νερού εμποδίζει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων και 2) η χημική αποικοδόμηση επιβραδύνεται, λόγω της στερεής κατάστασης τους. Στην λυοφιλιωμένη κατάσταση τα λιποσώματα βρίσκονται στην άμορφη δομή και η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Tg) σχετίζεται με την σταθερότητά τους.

- ***Τεχνικές Παρασκευής των λιποσωμάτων***

Η σύσταση των φωσφολιπιδίων και η μέθοδος παρασκευής τους καθορίζει αν τα λιποσώματα αποτελούνται από 1 ή περισσότερες στοιβάδες, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.3. Τα λιποσώματα που περιέχουν μια μονοστοιβάδα είναι τα Μικρά (<30nm) ή τα Μεγάλα (30-500nm) Μονοστοιβαδιακά Λιποσώματα (Small & Large Unilamellar Vesicles, **SUVS & LUVS**). Τα λιποσώματα που περιέχουν περισσότερες από μια διπλοστοιβάδες ονομάζονται Πολυστοιβαδιακά (Multilamellar Vesicles, **MLVS**), αν όλες οι στοιβάδες είναι ομόκεντρες και Multivesicular vesicles (**MVVS**) στα οποία ένας αριθμός σφαιριδίων μπορεί να εγκλειστεί στο εσωτερικό ενός άλλου σφαιριδίου. Τα LUVS είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα λιποσώματα και εγκλείουν μεγαλύτερους όγκους από ότι τα SUVS.



Σχήμα 1.3*. Κατηγορίες λιποσωμάτων.*

Σε αντίθεση με τα μικκύλια, τα λιποσώματα δεν σχηματίζονται αυθόρμητα σε υδατικά διαλύματα και δεν αποτελούν θερμοδυναμικώς σταθερά συστήματα: ο σχηματισμός τους απαιτεί ενέργεια. Τα MLVS σχηματίζονται αμέσως όταν τα πολικά λιπίδια διασπείρονται σε υδατικό διάλυμα υπό ήπια ανάδευση. Τα LUVS, SUVS προέρχονται από την διάσπαση των MLVS και των MVVS και απαιτείται μεγάλη ενέργεια.

Οι πιο συχνές τεχνικές βασίζονται στην παροχή *μηχανικής ενέργειας*, π.χ. υπερήχηση, υψηλής πίεσης ομογενοποίηση, εξώθηση, ομογενοποίηση με μεμβράνες. Οι *μη- μηχανικές μέθοδοι* περιλαμβάνουν ανάστροφης φάσης εξάτμιση (reverse-phase evaporation), απομάκρυνση απορρυπαντικών από μικκύλια απορρυπαντικών/λιπιδίων και λυοφιλίωση (αφυδάτωση) ακολουθούμενη από επανυδάτωση.

- *Μηχανικές μέθοδοι*

- *υπέρηχοι*: παράγονται ηχητικά κύματα με συχνότητες μεταξύ 16 και μερικών εκατοντάδων KHz που έχουν ως αποτέλεσμα την αυθόρμητη δημιουργία μικρών κοιλοτήτων (cavitation). Ο σχηματισμός και η καταστροφή των κοιλοτήτων αυξάνει την θερμοκρασία μέσα στην κοιλότητα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακίδα ή λουτρό υπερήχων. Η ακίδα παρέχει μεγαλύτερη ενέργεια και παράγει μικρότερα σωματίδια, αλλά η κατανομή της ενέργειας και συνεπώς τα σχηματισθέντα λιποσώματα δεν είναι ομοιογενή. Ακόμα μπορεί λόγω της υψηλής ενέργειας να συμβεί υπερθέρμανση και μετανάστευση των ιόντων του μετάλλου. Με το λουτρό υπερήχων σχηματίζονται λιποσώματα με ομοιόμορφο μέγεθος, ελαττώνεται η πιθανότητα μόλυνσης των πολικών λιπιδίων και παρέχει καλύτερο έλεγχο της θερμοκρασίας. Οι υπέρηχοι είναι αποτελεσματικοί στην παραγωγή SUVS, αλλά μπορεί να προκαλέσει αφρισμό που οδηγεί σε απώλεια λιπιδίων. Επιπλέον τα λιποσώματα που παράγονται είναι σχεδόν ασταθή, γι' αυτό και συνιστάται να αποθηκεύονται για τουλάχιστον 24 ώρες, ώστε να αποκτήσουν πιο σταθερή δομή (annealing).
- *εξώθηση και ομογενοποίηση μεμβρανών*: τα μεγάλα λιποσώματα περνάνε μέσα από μεμβράνη ή φίλτρο με ομοιόμορφο μέγεθος πόρων.

- *Μη μηχανικές μέθοδοι*

- *reverse-phase evaporation*: τα πολικά λιπίδια διασπείρονται σε οργανικό διαλύτη με χαμηλό ΣΖ, π.χ. διαιθυλαιθέρα, ισοπρόπυλαιθέρα, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη. Προστίθεται υδατικό διάλυμα της ουσίας στη φάση και το μίγμα ομογενοποιείται (με vortex ή υπερήχους) οπότε σχηματίζεται γαλάκτωμα. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Χχρησιμοποιείται για την παρασκευή LUVs. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η ομοιομορφία των σωματιδίων που σχηματίζονται και η μεγάλη ικανότητα εγκλεισμού. Από την άλλη η έκθεση των συστατικών σε οργανικούς διαλύτες και οι υπέρηχοι μπορεί να καταλήξουν σε αποσύνθεση των πρωτεϊνών.
- *Microfluidization*: Ο εγκλεισμός με αυτή επιτυγχάνεται με την δυναμική αλληλεπίδραση 2 διαλυμάτων νερού-λιπιδίων με μεγάλη ορμή για να υπερνικηθεί ο ενεργειακός φραγμός. Οι πολύ μεγάλες ταχύτητες που αναπτύσσονται επιτρέπουν τον σχηματισμό μικρών λιποσωμάτων με μεγάλη ικανότητα εγκλεισμού (Taylor et al., 2005; Edwards and Baeummer, 2006; Gibbs, 1999).

- ***Κυκλοδεξτρίνες και Λιποσώματα: διπλή ενθυλάκωση συστατικών***

Τα λιποσώματα έχουν περιορισμένη ικανότητα συγκράτησης λιποδιαλυτών συστατικών στις διπλοστοιβάδες τους. Από την άλλη οι κυκλοδεξτρίνες αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα μη-υδατοδιαλυτών μορίων, αλλά δεν έχουν την δυνατότητα να στοχεύουν φάρμακα σε βιολογικούς στόχους. Για να υπερνικηθούν τα μειονεκτήματα του καθενός μέσου ξεχωριστά, γεννήθηκε η ιδέα της διπλής ενθυλάκωσης ουσιών: εάν ένα μη-υδατοδιαλυτό μόριο ενθυλακωθεί σε κυκλοδεξτρίνη, θα προκύψει υδατοδιαλυτό σύμπλοκο το οποίο στην συνέχεια θα μπορέσει να εγκλειστεί στην εσωτερική υδρόφιλη κοιλότητα των λιποσωμάτων (και όχι στην λιπιδική διπλοστοιβάδα που θα εγκλειόταν αν δεν υπήρχε η κυκλοδεξτρίνη). Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται το ποσοστό του φαρμάκου που μπορεί να εγκλειστεί και μπορεί να επιτευχθεί και στόχευση του συμπλόκου σε συγκεκριμένους στόχους. Ωστόσο τα λιποσώματα που εγκλείουν σύμπλοκα ουσίας- κυκλοδεξτρίνης είναι λιγότερα σταθερά (όσον αφορά την μεμβρανική συνοχή) σε σχέση με τα λιποσώματα που εγκλείουν σκέτη την ουσία. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων και των μορίων κυκλοδεξτρίνης μπορεί να καταλήξουν σε επαναδιοργάνωση της λιπιδικής μεμβράνης προκαλώντας γρήγορη απελευθέρωση του εγκλεισμένου μορίου. Επιπλέον, τα λιπίδια μπορεί να εισέλθουν στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης σχηματίζοντας σύμπλοκα εγκλεισμού, αντικαθιστώντας το φάρμακο, το οποίο αναγκαστικά θα απελευθερωθεί.

Οι μελέτες που σχετίζονται με την εφαρμογή των λιποσωμάτων στα τρόφιμα είναι πρόσφατες. Οι Gordon et al., 1998 ενθυλάκωσαν την κερκετίνη και την μυρικετίνη και μελετήθηκε η αντιοξειδωτική τους δραστικότητα. Σε λιποσώματα έχουν επίσης ενθυλακωθεί φυτοπλαγκτόν (Buttino et al. 2006), εκχυλίσματα θυμαριού (Gortzi et al 2006), φλαβονοειδή (Erleijman et al.,2004), διάφορα αντιοξειδωτικά (BHA, BHT, TBHQ), καφεϊκό οξύ, (Nenadis et al., 2003), κερκετίνη (Gabrieelska et al., 2006), κατεχίνες και φλαβονοειδή (Gutierrez et al., 2003; Fang et al., 2006), αντιοξειδωτικά του ελαιολάδου (Paiva- Martins et al., 2003) καθώς και χρωστικές (Baptista et al., 2003), αντιμικροβιακά (νισίνη, Benech et al., 2002), χολικά άλατα και παγκρεατική λιπάση (Kokkona et al., 2000). Οι Fatouros et al., 2005 ασχολούνται με την μελέτη και την παρασκευή αρσονολιπιδίων. Έχει μελετηθεί επίσης η εφαρμογή και η αποτελεσματικότητα του συνδυασμένου εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών-λιποσωμάτων (Fatouros et al., 2001; Loukas et al., 1998; McCormack et al., 1998; Maestrelli et al., 2005; Maestrelli et al., 2006; Salem et al., 2003; Piel et al., 2006; Tavares et al., 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

Το κύτταρο του Saccharomyces cerevisiae ως μέσο ενθυλάκωσης

Saccharomyces Cerevisiae:

"Ένας μύκητας που ζυμώνει τη ζάχαρη στα δημητριακά (Saccharo-mucus cerevisiae) για να παράγει αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα"

2.1. Εισαγωγή

Η σημασία των ζυμομυκήτων για τον άνθρωπο επεκτείνεται, ως γνωστό, σε πολλούς τομείς: στην παραγωγή αλκοολούχων ευφραντικών και στην αρτοποιία, στην παραγωγή βιοαιθανόλης ως εναλλακτική πηγή ενέργειας, στην βιολογική έρευνα (χρησιμοποιούνται ως μοντέλα ευκαρυωτικών κυττάρων) αλλά και στην υγεία. Σήμερα, γενετικά τροποποιημένοι ζυμομύκητες αξιοποιούνται στην παραγωγή βιοφαρμακευτικών παραγώγων για την πρόληψη και την θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών. Επίσης τα ζωντανά κύτταρα κάποιων ζυμομυκήτων της ζυθοποιίας/ αρτοποιίας έχει βρεθεί ότι βοηθούν στην θεραπεία κάποιων ασθενειών, όπως η κολίτιδα και το IBS (Irritable Bowel Syndrome) (Walker 1997). Πρόσφατες μελέτες αναφέρονται στη χρησιμοποίηση νεκρών κυττάρων του *S. cerevisiae* για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου (μαστού, στόματος, εντέρου) (Ghoneum et al., 2008; 2005; Ghoneum and Collapudi, 2004; Herberman, 2002). Μελετάται επίσης η δράση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και ειδικότερα των β-D-γλυκανών ως αντιοξειδωτικά και αντιμεταλλαξιογόνα, ιδιότητες που καθιστούν πιθανή την αντικαρκινική τους δράση (Kogan et al., 2008). Άλλωστε οι β-1,3- και β-1,6–D–γλυκάνες έχουν θετική δράση στο ανοσοποιητικό σύστημα, με αντιβακτηριδιακές, επουλωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, αλλά η αντιοξειδωτική τους

δραστικότητα είναι μικρότερη σε σχέση με άλλα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. πρωτεΐνες) (Silke et al.,2008).

Στο εμπόριο κυκλοφορούν πολλά σκευάσματα με κύτταρα του *S. cerevisiae* τα οποία αποτελούν πηγή διαφόρων αμινοξέων, βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων και συνιστάται η ημερήσια πρόσληψη τους έως και 16 γρ. ημερησίως. Τα κύτταρα του *S.cerevisiae* παρέχουν μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών (περιέχουν αλανίνη, αργινίνη, γλυκίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, γλυκίνη, προλίνη, βαλίνη, τυροσίνη, σερίνη, θρυπτοφάνη σε ποσότητα 15-63mg/γρ. κυττάρων) και βιταμίνες κυρίως του συμπλέγματος Β (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη, Β6, Β12, φολικό οξύ, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ) και μια ποικιλία μετάλλων και ιχνοστοιχείων (ασβέστιο, σίδηρος, φώσφορος, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, χαλκός, μαγγάνιο, χρώμιο, θείο, κάλιο).

Ωστόσο, το ενδιαφέρον για τα κύτταρα των ζυμομυκήτων έχει επεκταθεί και σε άλλους τομείς της βιομηχανίας των τροφίμων. Μόλις το 1970 κύτταρα του *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν από την ομάδα του Joseph Shank, για λογαριασμό της εταιρία Swift and Co, για την ενθυλάκωση μιας σειράς ενεργών συστατικών,. Η εργασία αυτή και μετέπειτα του Nahida Pannell στην AD_2 Ltd (Birgingham) επικεντρώθηκε στην βιομηχανική χρήση των κυττάρων ζυμομυκήτων, για την παραγωγή χαρτιού καρμπόν και για την ενθυλάκωση αρωματικών συστατικών. Αυτή η τεχνολογία της ελεγχόμενης απελευθέρωσης αρωματικών συστατικών έχει εξελιχθεί και σήμερα εφαρμόζεται ήδη στην αγορά μέσω της συνεργασίας δυο εταιριών: της Mincap plc (Merseyside, UK) και της Firmenich SA, μιας ελβετικής εταιρίας αρωματικών συστατικών. Η μικροενθυλάκωση πτητικών αρωματικών συστατικών στην διπλού-τοιχώματος κάψουλα των κυττάρων επιτρέπει στα συστατικά να παραμένουν αναλλοίωτα κατά το μαγείρεμα, αλλά να απελευθερώνονται στο στόμα. Η τεχνική αυτή βρίσκει μεγάλη εφαρμογή ιδιαίτερα σε αρωματικά συστατικά που χρησιμοποιούνται σε σούπες, σάλτσες και τηγανητά.

Ο αρχικός σκοπός αυτού του συστήματος ήταν να μετατραπεί, για πρακτικούς λόγους, μια πτητική, υγρή ουσία σε σκόνη. Όταν βρέθηκε ότι οι κάψουλες των κυττάρων της ζύμης απελευθέρωναν την ενθυλακωμένη ουσία όταν έρχονταν σε επαφή με την χλωρίδα του στόματος πιο αποτελεσματικά σε σχέση με το σάλιο από μόνο του, γεννήθηκε η ιδέα της στοχευμένης διανομής δραστικών ουσιών (targeted drug delivery). Όταν ανακτήθηκαν από την επιφάνεια της γλώσσας τα κύτταρα βρέθηκαν ανέπαφα, μετά την αποτελεσματική

απελευθέρωση του αρωματικού συστατικού. Επίσης λόγω των διαστάσεων τους, τα κύτταρα των ζυμομυκήτων συγκρατούν για περισσότερο χρόνο τα αρωματικά συστατικά σε σχέση με τις κοινές σκόνες που προκύπτουν από ξήρανση με ψεκασμό (π.χ. με τροποποιημένο άμυλο).

2.2. Μελέτες σχετικές με την εφαρμογή των κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae* ως μέσο ενθυλάκωσης

Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων τα οποία έχουν ενδιαφέρον ως μέσο ενθυλάκωσης συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα κάποιων άλλων μέσων με το χαμηλό κόστος, είναι τα κύτταρα του ζυμομύκητα της ζυθοποιίας/αρτοποιίας *Saccharomyces cerevisiae (*Blanquet, 2001, 2005). Η ευκαρυωτική δομή του κυττάρου του προσφέρει κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπόλοιπα μέσα ενθυλάκωσης (Nelson, 2002). Ο Zlotnik et al., 1984 βρήκε ότι το κυτταρικό τοίχωμα του αποτελείται από β-(1->3)-γλυκάνη, μια στοιβάδα μαννοπρωτεΐνης και μικρό ποσοστό χιτίνης είναι διαπερατό σε μικρά πολικά και άπολα μόρια με μοναδικούς περιοριστικούς παράγοντες το μοριακό βάρος και την πολικότητα του μορίου. Το δίκτυο της β-γλυκάνης παίζει τον ρόλο του σκελετού και διατηρεί την ακαμψία ενώ η εξωτερική πρωτεϊνική στοιβάδα καθορίζει το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος (Normand et al., 2005). Ο Scherrer et al., 1974, ανέφερε ότι μόρια με ΜΒ μικρότερο από 620 Da, διαπερνούν εύκολα το κυτταρικό τοίχωμα, αλλά μετέπειτα μελέτες αναφέρουν τη διάχυση μορίων διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος με ΜΒ έως 200000 ή ακόμα 400000. Μια πιθανή εξήγηση είναι η παρουσία λίγων μεγάλων οπών στο τοίχωμα με το μέσο μέγεθος πόρων να είναι μικρό (Nobel and Barnett, 1991). Ωστόσο το βασικό εμπόδιο για την εισαγωγή ενός μορίου εντός του κυττάρου είναι η κυτταρική μεμβράνη και όχι το κυτταρικό τοίχωμα. Επιπλέον, τα κύτταρα που είναι αφυδατωμένα είναι αδιαπέραστα σε βιοδραστικές ουσίες, σε αντίθεση με τα νωπά. Σε περιβάλλον με ενεργότητα νερού μικρότερη από 0,7 δεν συμβαίνει καμία ανταλλαγή με το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Σε υψηλή ενεργότητα νερού η εξωτερική στοιβάδα του τοιχώματος που αποτελείται από μαννοπρωτεΐνες (οι οποίες διαθέτουν δότες δεσμών υδρογόνου τα οποία προσελκύουν και σταθεροποιούν μόρια νερού) διογκώνεται διατηρώντας τη συμπαγή δομή β-φύλλου και εμφανίζονται κενά-πόροι στην νωπή δομή, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η διάχυση μικρών μορίων (Normand et al., 2005; Dardelle et al., 2007).

Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων μορίων. Η πρώτη επιστημονική αναφορά (Bishop et al., 1998) αφορά στην ενθυλάκωση αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού και δυόσμου σε κύτταρα του *S. cerevisiae*, και την μελέτη κάποιων παραμέτρων που επηρεάζουν το ποσοστό της ενθυλάκωσης: οι λειτουργικές ομάδες και το μέγεθος της ενθυλακωμένης ουσίας, η θερμοκρασία κατά την παρασκευή της κάψουλας, η ζωτικότητα των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν. Η φωτοευαίσθητη ρεσβερατρόλη ενθυλακώθηκε σε κύτταρα του *S. cerevisiae* και η ενθυλάκωση βελτίωσε την υδατοδιαλυτότητα, την αντιοξειδωτική δραστικότητα και την σταθερότητά της (στην θέρμανση, το φως, την υγρασία) (Shi et al., 2008). Ομοίως, το υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό χλωρογενικό οξύ βελτίωσε τη σταθερότητά του μετά την ενθυλάκωση σε κύτταρα του *S. cerevisiae* και η απελευθέρωση του ήταν πιο έντονη σε γαστρικό υγρό, ακολουθούμενη από ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7.4) και νερό (Shi et al., 2007). Το ενθυλακωμένο στα κύτταρα λεμονένιο χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για την μελέτη του μηχανισμού απελευθέρωσης συναρτήσει την θερμοκρασίας και της ενεργότητας νερού (Normand et al., 2005). Σε μια άλλη μελέτη της ίδιας επιστημονικής ομάδας κατασκευάστηκε για την κάψουλα του λεμονένιου η ισόθερμη ρόφησης νερού για διάφορες τιμές σχετικής υγρασίας και μελετήθηκε η απελευθέρωση του σε υδατικό και λιπαρό μέσο. Παρασκευάστηκαν επίσης λαζάνια στα οποία προστέθηκε γεύση σκόρδου ή βοδινού είτε ως συμβατική σκόνη του εμπορίου ή ενθυλακωμένη σε κύτταρα *S. cerevisiae* και συγκρίθηκαν οργανοληπτικά: οι κάψουλες με τα κύτταρα συγκράτησαν καλύτερα τα αρωματικά συστατικά, επιτυγχάνοντας και μεγαλύτερης διάρκειας απελευθέρωση στο στόμα (Dardelle et al., 2007).

Για την ενθυλάκωση των παραπάνω μορίων χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι από μια σειρά πατεντών, στις οποίες αρωματικά συστατικά ενθυλακώνονται σε κύτταρα του S. *cerevisiae* και οι οποίες συνοψίζονται στον πίνακα 4 του παραρτήματος. Στις πατέντες αυτές αρχικά γίνεται μια διάκριση στα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ανάλογα με το ποσοστό λιπιδίων που περιέχουν. Έτσι, σε κάποιες πατέντες για την ενθυλάκωση λιποδιαλυτών συστατικών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα με υψηλό ποσοστό λιπιδίων (>40%w/w). Ο Dunlop Ltd. (1982) πατένταρε μια μέθοδο για την ενθυλάκωση υδρόφιλων συστατικών, προσθέτοντας μια 'lipid extending' ουσία (π.χ. ξυλένιο ή τριακετίνη) να δράσει ως μεταφορέας της ουσίας. Αυτή η ουσία μπορεί γενικά να προστεθεί σε κύτταρα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, για την ενθυλάκωση υδρόφοβων συστατικών, αλλά η προς ενθυλάκωση ουσία πρέπει να είναι διαλυτή ή να διασπείρεται σε αυτή, οπότε και οι δύο συγκρατούνται παθητικά εντός του

κυττάρου. Ο James, 1982 χρησιμοποίησε μια 'lipid- extending ' ουσία για να αυξηθεί η λιπιδιακή περιεκτικότητα του κυττάρου. Παραδείγματα ουσιών είναι κάποιες κατώτερες αλκοόλες, εστέρες, αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Για την ενθυλάκωση διάλυμα του συστατικού προστίθεται είτε ταυτόχρονα κατά την κατεργασία του δείγματος με την 'lipid extending' ουσία είτε μετά την προσθήκη της τελευταίας.

Στην πατέντα AD2 Ltd 1987 αναφέρεται ότι η μικροενθυλάκωση μπορεί να επιτευχθεί και με κύτταρα κανονικού λιπιδικού περιεχομένου (<5% w/w), χωρίς την χρήση της 'lipid extending'ουσίας, ακόμα και χωρίς την προκατεργασία της πλασμόλυσης. Ο Inoue, 1991 ενθυλάκωσε υδρόφοβα συστατικά σε κύτταρα ζυμομυκήτων τα οποία είχαν πλασμολυθεί με οργανικό διαλύτη για να εξάγουν το ενδοκυτταρικό τους υλικό (πρωτεΐνες, αμινοξέα, νουκλεΐνικά οξέα, σάκχαρα κλπ), προκειμένου να ενθυλακωθεί μεγαλύτερο ποσοστό του υδρόφοβου συστατικού και με γρηγορότερο ρυθμό. Στην ίδια πατέντα αναφέρονται τα βασικά βήματα που περιλαμβάνει η διαδικασία της ενθυλάκωσης:

1) Εξαγωγή των ενδοκυτταρικών συστατικών από τα κύτταρα (πλασμόλυση). Αυτή μπορεί να επιτευχθεί με κατεργασία του αιωρήματος των κυττάρων σε κατάλληλη θερμοκρασία και pH, για συγκεκριμένο χρόνο, ή με την προσθήκη ενός 'elution promoting agent' ή ενός ενζύμου. Συνήθως χρησιμοποιείται θερμοκρασία 30-100^{o}C: στους 30-60^{o}C η κατεργασία διαρκεί τουλάχιστον 1 ώρα, προτιμότερο 5 ώρες. Η παρατεταμένη θέρμανση μπορεί να αποδιοργανώσει το κυτταρικό τοίχωμα. Ο 'elution promoting agent' μπορεί να είναι πολικός οργανικός διαλύτης, όπως οι κατώτερες αλκοόλες, ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη, ή ανόργανα άλατα, σάκχαρα, παπαΐνη, τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα, αντιμικροβιακοί παράγοντες κλπ. Προτιμάται η αλκοόλη και η ακετόνη. Τα ενδοκυτταρικά συστατικά που εξάγονται είναι κυρίως υδατοδιαλυτά συστατικά (ένζυμα, πρωτεΐνες, αμινοξέα, σάκχαρα, νουκλεΐνικά οξέα), αλλά μπορεί να είναι και λιπιδικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Στην συγκεκριμένη μελέτη οι ζυμομύκητες είχαν μικρό περιεχόμενο σε λιπίδια (<10% w/w) και ήρθαν σε επαφή με πολικό οργανικό διαλύτη (κατώτερες αλκοόλες, οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη). Ο διαλύτης έδρασε ως 'elution promoting agent', προκαλώντας πλασμόλυση, εξάγοντας τα ενδοκυτταρικά συστατικά, χωρίς ο ίδιος να εισέρχεται εντός του κυττάρου. Εάν τα κύτταρα είχαν μεγάλη περιεκτικότητα σε λιπίδια τότε οι ίδιοι διαλύτες, θα εισέρχονταν στο εσωτερικό του κυττάρου, δρώντας ως 'lipid extending agent'.

2) Ενθυλάκωση. Παρασκευάζεται αιώρημα των κυττάρων, με διασπορά τους στο νερό. Τα κύτταρα μπορεί να είναι ζωντανά, νεκρά ή αφυδατωμένα. Γενικά, η πορεία του εγκλεισμού

επιτυγχάνεται με ανάμιξη του αιωρήματος των κυττάρων με το δραστικό συστατικό, οπότε σχηματίζεται ένα υδατικό γαλάκτωμα. Η ενθυλάκωση πραγματοποιείται στους 20-70^{o}C για τουλάχιστον μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση. Το συστατικό διαχέεται κατά μήκος του κυτταρικού τοιχώματος και συγκρατείται παθητικά εντός του κυττάρου. Εάν το συστατικό βρίσκεται σε στερεή μορφή μπορεί να διαλυθεί σε έναν οργανικό διαλύτη, κατά προτίμηση σε έναν που δεν συγκρατείται παθητικά εντός του κυττάρου και συνεπώς δεν αναμιγνύεται με τα λιπίδια του κυττάρου, όπως οι κατώτερες αλκοόλες, δηλαδή η αλκοόλη, η μεθανόλη και η ισοπροπανόλη.

3) Ξήρανση στο αέρα, ξήρανση με ψεκασμό ή λυοφιλίωση.

Ο Pannell 1984; 1987; 1994 ανέπτυξε μια μέθοδο για την ενθυλάκωση αιθέριων ελαίων σε κύτταρα του *S. cerevisiae* με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια (<40% w/w) χωρίς την πλασμόλυση τους ή την προσθήκη 'lipid extending' ή επιφανειοδραστικής ουσίας και χωρίς προ-γαλακτωματοποίηση του προς εγκλεισμού συστατικού. Η σχηματιζόμενη κάψουλα μπορεί να καταστεί πιο μαλακή με την προσθήκη ενός πρωτεολυτικού ενζύμου ή αλκάλεος ή πιο σκληρή με την προσθήκη υδατικού διαλύματος αλδεΰδης. Ο Nelson (2006) ενθυλάκωσε αιθέρια έλαια σε ξεπλυμένα με αιθανόλη κύτταρα του *S. cerevisiae,* χρησιμοποιώντας αναλογία βάρους κυττάρων: έλαια μεγαλύτερη από 1:1. Απέδειξε ότι αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων που είναι διαθέσιμα για ενθυλάκωση, παρά αυξάνοντας την ποσότητα της ουσίας αυξάνεται η απόδοση της ενθυλάκωσης. Εάν η προς ενθυλάκωση ουσία βρίσκεται στην στερεή κατάσταση τότε συνιστάται να διαλυθεί ή να διασπαρθεί σε έναν μεταφορέα (carrier). Κατάλληλοι μεταφορείς είναι οι πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς αλκοόλες, οι γλυκόλες, οι εστέρες, οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τα καρβοξυλικά οξέα. Οι Round and Nelson (2006) περιγράφουν την χρησιμοποίηση κυττάρων τα οποία έχουν αυτολυθεί και των οποίων το κυτταρικό τοίχωμα παραμένει ανέπαφο ενώ η μεμβράνη τους έχει καταστραφεί. Τα κύτταρα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση λιπόφιλων φυτοδραστικών συστατικών, προκειμένου να ελαττωθεί η τοξικότητα τους, να αυξηθεί η εκλεκτικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα τους (Nelson, Duckham, 2005). Τέλος, σε μια πατέντα (Lubitz; Werner, 2005) αναπτύσσεται μια μέθοδος για την προετοιμασία 'bacterial ghosts' από Gram- αρνητικά βακτήρια στα οποία μπορούν να ενθυλακωθούν διάφορα δραστικά συστατικά (γενετικό υλικό, φάρμακα).

Στον πίνακα 4 του παραρτήματος περιγράφονται κυρίως οι μέθοδοι ενθυλάκωσης και τονίζεται η απαίτηση υδατικού αιωρήματος της ζύμης (αναλογία βάρους κύτταρα: νερό 1:2) και η αναλογία βάρους κύτταρα:ουσία>1. Πληροφορίες σχετικά με την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης, το ποσοστό ενθυλάκωσης και την σταθερότητά της κάψουλας παρέχονται από τις περιορισμένες επιστημονικές μελέτες, όπως συνοψίζονται στον πίνακα 3 του παραρτήματος.

2.3. Το κύτταρο του *Saccharomyces cerevisiae*

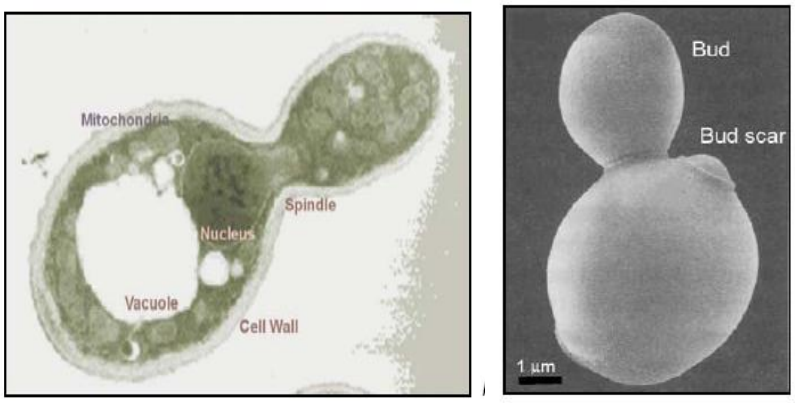
2.3.1. Ανατομία του κυττάρου

***Πίνακας 2.1**. Μακρομοριακά συστατικά των κυττάρων των ζυμομυκήτων.*

Μακροσυστατικό	
Πρωτεΐνες	• Οι δομικές πρωτεΐνες είναι η ακτίνη και η τουβουλίνη του κυτοσκελετού, οι ιστόνες και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες • Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες υπάρχουν στις 60S και 40S ριβονουκλεοπρωτεϊνικές υπομονάδες • Οι ορμονικές πρωτεΐνες είναι οι φερρομόνες
Γλυκοπρωτεΐνες	• Οι μαννοπρωτεΐνες αποτελούν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος • Γλυκοπρωτεϊνικά ένζυμα: ιμβερτάση
Πολυσακχαρίτες	• Γλυκάνες, μαννάνες και χιτίνη είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος • Αποθηκευτικοί πολυσακχαρίτες είναι το γλυκογόνο και η τρεχαλόζη
Πολυφωσφορικά άλατα	• Αποθηκεύονται κυρίως στο κενοτόπιο
Λιπίδια	• Ελεύθερες στερόλες στις μεμβράνες • Αποθηκευτικά λιπίδια είναι οι εστέρες στερολών και τα τριγλυκερίδια • Λειτουργικά λιπίδια: παράγωγα φωσφογλυκερόλης (στην μεταγωγή σημάτων) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό)
Νουκλεϊνικά Οξέα	• Δεόξυ-ριβονουκλεινικό οξύ: περίπου το 80% είναι γενετικό DNA του πυρήνα, 10-20% μιτοχονδριακό DNA και 1-5% χρωμοσωμικό • Ριβονουκλεϊνικό οξύ: το 80% είναι στην ριβονουκλεοπρωτεΐνη (rRNA), το 5% είναι το mRNA στο κυτταρόπλασμα, το ΕΔ και τα μιτοχόνδρια. Κάποιο dsRNA βρίσκεται στα πλασμίδια του *S. Cerevisiae* και κάποιο μικρό πυρηνικό RNA (snRNA) βρίσκεται στον πυρήνα

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι μονοκύτταρος, ευκαρυωτικός μικροοργανισμός. Αναπτύσσεται σε pH 4-5 και σε ενεργότητα νερού μεγαλύτερη από 0.88. Το κύτταρο του είναι ελλειψοειδές με διάμετρο 5-10μm και μικρή διάμετρο 1-7 μm. Ο όγκος του κυττάρου είναι 29-55μm^3 και το βάρος τους 8-10* 10^9/γρ. Το μέγεθος του αυξάνεται με την ηλικία. Στον πίνακα 2.1 συνοψίζονται τα βασικά μακροστοιχεία από τα οποία αποτελείται το κύτταρο του.

Ο πολλαπλασιασμός στον *S. cerevisiae* γίνεται με εκβλάστηση (budding): όταν τα μητρικά κύτταρα φτάσουν σε ένα κρίσιμο μέγεθος σχηματίζονται τα εκβλαστήματα και δημιουργείται μια 'turgor pressure' οπότε το κυτταρόπλασμα εξέρχεται και περιβάλλεται από νέο υλικό κυτταρικού τοιχώματος. Η χιτίνη σχηματίζει έναν δακτύλιο στο σημείο επαφής μεταξύ του μητρικού κυττάρου και του εκβλαστήματος. Όταν τα εκβλαστήματα τελικά αποχωρίζονται, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.1, τα μητρικά κύτταρα μένουν με μια 'bud scar', ενώ τα θυγατρικά με μια κυρτή 'birth scar', που έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε χιτίνη.



Σχήμα 2.1. *Εκβλάστηση (budding) στον S. cerevisiae*

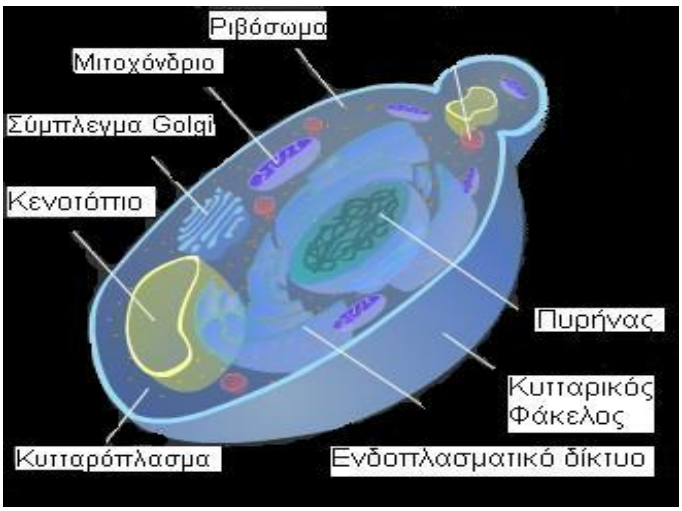
Βασικά μέρη του κυττάρου, όπως διακρίνονται στο σχήμα 2.2 είναι: ο κυτταρικός φάκελος (που περιλαμβάνει την πλασματική μεμβράνη, το περίπλασμα και το κυτταρικό τοίχωμα), ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια, το σύμπλεγμα Golgi, τα εκκριτικά σωματίδια (secretory vesicles), το ενδοπλασματικό δίκτυο, το κενοτόπιο και οι μικροσωληνίσκοι (microbodies). Το κυτταρόπλασμα περιέχει επίσης ριβοσώματα και πλασμίδια (Walker, 1997).

2.3.2. Ο Κυτταρικός Φάκελος (cell envelope) του S. cerevisiae

Ο κυτταρικός φάκελος περιβάλλει το κυτταρόπλασμα και από μέσα προς τα έξω περιλαμβάνει: 1) την πλασματική μεμβράνη, 2) το περίπλασμα και 3) το κυτταρικό τοίχωμα. Στον *S. cerevisiae* καταλαμβάνει το 15% του κυτταρικού όγκου και βασικός του ρόλος είναι ο έλεγχος της διαπερατότητας.

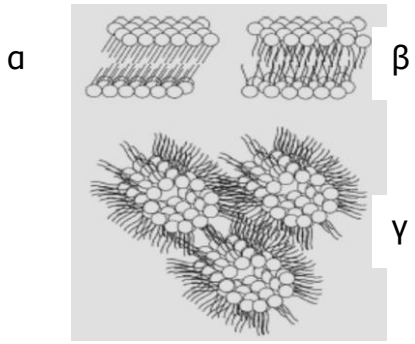
- ***Η πλασματική μεμβράνη (plasma membrane)***

Η βασική λειτουργία της μεμβράνης είναι η εκλεκτική διαπερατότητα στην οποία συμμετέχουν και εξειδικευμένες πρωτεΐνες. Το πάχος της είναι περίπου 7.5 nm με διάφορες εσοχές (invaginations) να κατευθύνονται προς το κυτταρόπλασμα. Αποτελείται από μια λιπιδιακή διπλοστοιβάδα με ενσωματωμένες σφαιρικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες που περιλαμβάνει η πλασματική μεμβράνη είναι αυτές που εμπλέκονται στην μεταφορά ουσιών (ATPάσες, περμεάσες, κανάλια), στην βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (συνθάσες γλυκάνης και χιτίνης) και οι διαμεμβρανικές για την μεταγωγή σημάτων. Ο σημαντικότερος ρόλος τους είναι η θρέψη και η αποβολή των επικίνδυνων μορίων. Τα λιπίδια αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια, (κυρίως φωσφατίδυλοχολίνη και φωσφατίδυλοαιθανολαμίνη με μικρά ποσά φωσφατίδυλοινοσιτόλης, φωσφατίδυλοσερίνης και φωσφατίδυλογλυκερόλης) και στερόλες (κυρίως εργοστερόλη και ζυμοστερόλη με μικρά ποσά φεκοστερόλης και λανοστερόλης). Τα κύρια λιπαρά οξέα στις ακυλοαλυσίδες του *S. cerevisiae* είναι το ελαϊκό οξύ (18:1) και το παλμιτελαϊκό οξύ (16:1), μαζί με ελάχιστα ποσοστά παλμιτικού (16:0) και στεατικού οξέος (18:0). Τα διάφορα είδη ζυμών ποικίλλουν ως προς την λιπιδική σύσταση της μεμβράνης τους, η οποία επηρεάζεται και από τις συνθήκες ανάπτυξης τους. Για παράδειγμα τα στελέχη ζυθοποιίας του *S. cerevisiae* περιέχουν 10 φορές περισσότερη φωσφατίδυλοχολίνη από τα αρτοποιίας. Η λιπιδική σύσταση της μεμβράνης του *S. cerevisiae* συνοψίζεται στον πίνακα 5 του παραρτήματος.



Σχήμα 2.2. *Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών οργάνων στο κύτταρο του S. cerevisiae.*

Σε υδατικά διαλύματα τα αμφιφιλικά φωσφολιπίδια αυτοδιοργανώνονται σε διπλοστοιβάδες, λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ακυλοαλυσίδων, οι οποίες τις προστατεύουν από την επαφή με το υδατικό μέσο. Οι διπλοστοιβάδες διατάσσονται σε κλειστές δομές με τις υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων να εκτείνονται στην εσωτερική και την εξωτερική πλευρά, γι' αυτό η μεμβράνη περιγράφεται σαν ένα ρευστό μωσαϊκό κι ο όρος *ρευστότητα μεμβράνης'* αναφέρεται στις δυναμικές ιδιότητες των λιπιδίων εντός της διπλοστοιβάδας. Τα δομικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης μπορούν να τροποποιηθούν είτε αλλάζοντας τις συνθήκες του περιβάλλοντος, ή την σύσταση των μεμβρανών είτε με την προσθήκη μορίων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της. Σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού (ωσμωτικής πίεσης) η μεμβράνη βρίσκεται στην ***'υγροκρυσταλλική φάση'*** *(liquid crystalline phase)*. Όταν τροποποιηθεί η ενεργότητα νερού του περιβάλλοντος, είτε η θερμοκρασία, είτε η σύσταση της, η μεμβράνη μπορεί να μεταβεί από την υγροκρυσταλλική φάση στην ***φάση πηκτής*** *(gel phase)* στην οποία η ρευστότητα – διαπερατότητα της είναι περιορισμένη, γιατί οι υδρόφοβες δυνάμεις Van Der Waals μεταξύ των άκυλοομάδων των φωσφολιπιδίων είναι αυξημένες. Η θερμοκρασία που συμβαίνει αυτή η αλλαγή της φάσης της μεμβράνης είναι γνωστή ως '***Θερμοκρασία Μετάπτωσης Φάσης***, (Tm, *phase transition temperature*) των φωσφολιπιδίων. Οι πρωτεΐνες είναι λειτουργικές όταν η μεμβράνη βρίσκεται στην υγροκρυσταλλική φάση. Σε συνθήκες ξήρανσης, θέρμανσης, ή παρουσίας φορτισμένων διαλυτών μπορεί να συμβεί μετάβαση από την διπλοστοιβαδιακή διαμόρφωση σε μια μη-διπλοστοιβαδιακή διαμόρφωση (H_{11}) (σχήμα 2.3) (Beney and Gervais 2001). Στις μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων, όπως είναι τα κύτταρα των ζυμομυκήτων, δεν υπάρχει οξεία μετάπτωση φάσης, αλλά ευρεία.



Σχήμα 2.3. *Οργάνωση των φωσφολιπιδίων. α) διπλοστοιβάδα λιπιδίων στην φάση πηκτής, β) διπλοστοιβάδα λιπιδίων στην υγροκρυσταλλική φάση, γ) εξαγονική (μη- διπλοστοιβαδιακή) φάση.*

Το πακετάρισμα των άκυλο-αλυσίδων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη ρευστότητα της μεμβράνης: η ρευστότητα ελαττώνεται καθώς αυξάνει το μήκος των άκυλο- αλυσίδων και καθώς μειώνεται ο βαθμός ακορεστότητας. Συνθήκες όπως αυξημένη υδροστατική πίεση, πτώση της θερμοκρασίας, ή η παρουσία στερολών (οι οποίες προσδίδουν την ακαμψία) ελαττώνουν επίσης τη ρευστότητα της μεμβράνης. Επιπλέον η ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης διαφέρει μεταξύ αερόβιων και αναερόβιων κυττάρων: Τα αερόβια κύτταρα περιέχουν περισσότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα (4.2 φορές περισσότερα), 2.3 φορές περισσότερη ολική στερόλη και μεγαλύτερο ποσοστό μη εστεροποιημένης στερόλης (με μεγαλύτερο ποσοστό εργοστερόλης) διότι για την σύνθεση τους απαιτείται οξυγόνο, γι' αυτό και υπήρχε η άποψη ότι τα αερόβια κύτταρα έχουν μεγαλύτερη διαπερατότητα από τα αναερόβια. Ωστόσο βρέθηκε ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε αναερόβιες συνθήκες ήταν 4.5 φορές πιο ρευστά από τα αερόβια κύτταρα. Άρα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα δεν είναι η κύρια αιτία της αυξημένης διαπερατότητας. Πιθανότατα παίζουν κάποιο ρόλο, αλλά είναι οι στερόλες που παίζουν το βασικό ρόλο στην ρευστότητα της μεμβράνης. Οι στερόλες και κυρίως η εργοστερόλη, συνεισφέρουν επίσης στην ικανότητα των κυττάρων να παραμένουν ζωντανά παρουσία αιθανόλης ή στο πάγωμα-ξεπάγωμα. Παράλληλα με τις στερόλες η σύσταση της πολικής κεφαλής των PL επηρεάζει την ρευστότητα της μεμβράνης (Jones et al., 1987; Snoek and Steensma, 2007).

Πέρα από την ρευστότητα άλλες λειτουργίες της μεμβράνης σχετίζονται με την ενδοκύττωση και την εξωκύττωση. Στην εξωκύττωση δευτερεύοντα σωματίδια του ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi μαζί με την πλασματική μεμβράνη κατανέμουν

πρωτεΐνες, ενώ στην ενδοκύττωση εισέρχονται συγκεκριμένα μόρια με την βοήθεια των ενδοσωμάτων. Επιπλέον η πλασματική μεμβράνη συμβάλει στην λειτουργικότητα των ζυμομυκήτων στην βιομηχανία. Π.χ. η ικανότητα των ζυμών αρτοποιίας να παράγουν αιθανόλη συνδέεται με την φύση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και στερολών στις πλασματικές μεμβράνες και επειδή το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την σύνθεση τους οι ζύμες ζυθοποιίας απαιτούν, πριν την ζύμωση οξυγόνο, διαφορετικά είναι ευαίσθητες στην αιθανόλη (Walker 1997; Rest et al., 1995; Snoek and Steensma, 2007). Τέλος, η μεμβράνη δρα ως αισθητήριο όργανο, το μοναδικό σε πολλές περιπτώσεις, στο περιβαλλοντικό στρες. Η μετάδοση του σήματος βασίζεται στην άμεση επίδραση των λιπιδίων στην λειτουργία των πρωτεϊνών, αλλά οι μηχανισμοί δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι: μπορεί να τροποποιηθεί η σύσταση των λιπιδίων ή να συντεθούν πρωτεΐνες (Beney and Gervais 2001).

- ***Το περίπλασμα (periplasm)***

Είναι μια λεπτή (35-45 Å) περιοχή ανάμεσα στο κυτταρικό τοίχωμα και την πλασματική μεμβράνη. Περιέχει κυρίως πρωτεΐνες (μαννοπρωτεΐνες) και τα γλυκοπρωτεϊνικά ένζυμα ιμβερτάση και όξινη φωσφατάση, καθώς και μελιβιάση και τρεχαλάση.

- ***Το κυτταρικό τοίχωμα (cell wall) του S. cerevisiae***

Έχει πάχος 100-200 nm και αποτελεί το 15-25% της ξηρής μάζας του κυττάρου. Καθορίζει το σχήμα του κυττάρου και την ακεραιότητα του κατά την ανάπτυξη και την διαίρεση. Αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, οι οποίοι διακρίνονται σε 3 ομάδες:

1) πολυμερή της μαννόζης (μαννάνες) σε ποσοστό 40% της μάζας επί ξηρού του κυτταρικού τοιχώματος.
2) πολυμερή της γλυκόζης (β-γλυκάνες), περίπου 60% της μάζας επί ξηρού του τοιχώματος.
3) πολυμερή της N- ακετυλογλυκοζαμίνης, που ονομάζεται χιτίνη, σε ποσοστό 2% της μάζας επί ξηρού του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι β-γλυκάνες χωρίζονται σε 2 ομάδες ανάλογα με τον τρόπο που συνδέονται οι μονάδες γλυκόζης: ι) μακριάς αλυσίδας (περίπου 1500) β-1,3 μονάδες γλυκόζης, που αντιπροσωπεύουν το 85% της ολικής β-γλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος, και ιι) μικρής αλυσίδας (περίπου 150) β-1,6 μονάδες γλυκόζης, που αντιπροσωπεύουν μόλις το 15% της β-γλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Το κυτταρικό τοίχωμα περιλαμβάνει επίσης πρωτεΐνες, λιπίδια και ανόργανα φωσφορικά και γενικά η χημική σύσταση του εξαρτάται από το στέλεχος, την ηλικία

και τις συνθήκες ανάπτυξης του ζυμομύκητα συμπεριλαμβανομένου και του μέσου ανάπτυξης (Aguilar- Uscanga and Francois, 2003; Walker, 1997; Lipke et al., 1998; Cabib et al., 2001; Klis et al., 2002).

Εξωτερικά στο τοίχωμα υπάρχουν οι μαννοπρωτεΐνες, σημαντικές για το πορώδες του τοιχώματος, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή με δισουλφιδικούς δεσμούς και με το εσωτερικό ινώδες δίκτυο των γλυκανών με ομοιοπολικούς δεσμούς (Zlotnik et al 1984; Vranska et al., 1977; Horisberger and Vonlanthen 1977). Οι Scherrer et al 1974 προσδιόρισαν το μέγεθος των πόρων του τοιχώματος κυττάρων στάσιμης φάσης ίσο με 0.89 nm, το οποίο αποκλείει την είσοδο μορίων με μέγεθος μεγαλύτερο από 760 Da, εκτός και αν τα κύτταρα βρίσκονται στην φάση λογαριθμικής ανάπτυξης (De Nobel et al., 1989; MacKay et al., 1988; Makarow 1985; Penttill et al., 1988; Wood et al., 1985) οπότε και επιτρέπεται η είσοδος αρκετά μεγαλύτερων μορίων με ακτίνα 5.8 nm το οποίο αντιστοιχεί σε σφαιρικές πρωτεΐνες με μοριακή μάζα 400000 (De Nobel et al., 1989; De Nobel et al., 1990). Οι μαννοπρωτεΐνες στο κυτταρικό τοίχωμα του *S. cerevisie* μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες:

1) SDS-διαλυτές μαννοπρωτεΐνες, που αποτελούν το ~80% της πρωτεΐνης του κυτταρικού τοιχώματος.

2) SDS- αδιάλυτες ή γλυκανοσο –διαλυτές (glucanase-soluble) μαννοπρωτεΐνες (Valentin et al 1984).

Το 90% της μαννόζης του κυτταρικού τοιχώματος είναι N-συνδεδεμένη (Zueco et al., 1986; Ballou and Raschke 1974) και οι SDS- διαλυτές μαννοπρωτεΐνες είναι O-γλυκοζυλιωμένες μαννοπρωτεΐνες (Sanz et al., 1989; Pastor et al., 1984) και φέρουν μόνο O-συνδεδεμένες μαννοσιλικές πλευρικές αλυσίδες, γι' αυτό και περιλαμβάνουν μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της μαννόζης του κυτταρικού τοιχώματος. Αντίθετα, οι glucanase-διαλυτές μαννοπρωτεΐνες είναι N-γλυκοζυλιωμένες και περιέχουν τόσο N- όσο και O- συνδεδεμένες (Pastor et al., 1984; Frevert and Ballou 1985) πλευρικές αλυσίδες μαννόζης, και είναι υπεύθυνες για την πλειονότητα των υπολειμμάτων μαννόζης του κυτταρικού τοιχώματος. Οι glucanase-διαλυτές μαννοπρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά με τις γλυκάνες (Pastor et al., 1984; Shibata et al., 1983). Το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος εξαρτάται από τη φάση ανάπτυξης των κυττάρων και το βαθμό μαννοσυλίωσης (mannosylation) των μαννοπρωτεϊνών. Επίσης, οι glucanase- διαλυτές μαννοπρωτεΐνες και όχι οι SDS- διαλυτές μαννοπρωτεΐνες είναι αυτές που

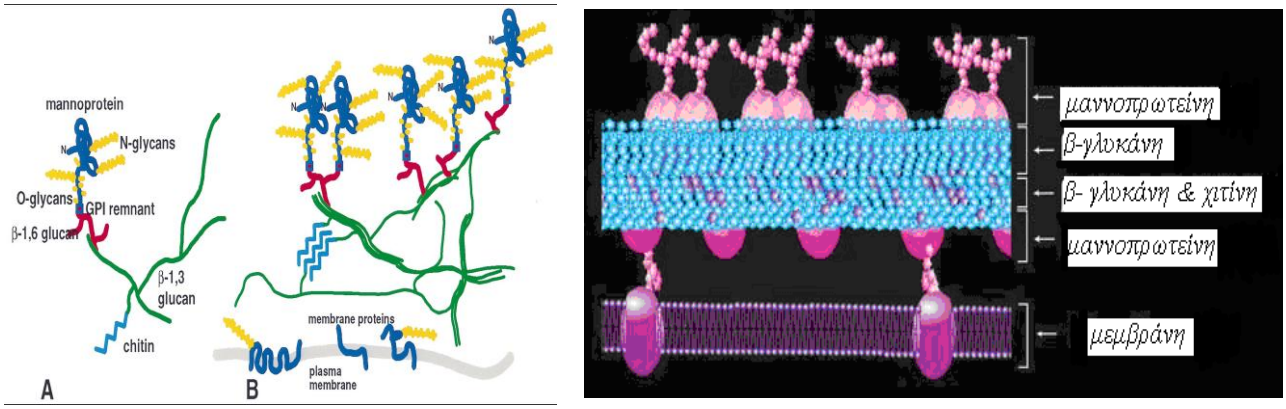
καθορίζουν το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος, διότι οι N- συνδεδεμένες πλευρικές αλυσίδες μαννόζης ελαττώνουν το πορώδες. Έτσι, το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος είναι μέγιστο στην εκθετική φάση και μειώνεται αισθητά στις μετέπειτα φάσεις ανάπτυξης, αφού στην στάσιμη φάση αυξάνεται το ποσοστό των glucanase-διαλυτών μαννοπρωτεϊνών. Επιπλέον οι δισουλφιδικές γέφυρες (γέφυρες S-S) που βρίσκονται κυρίως στις glucanase-διαλυτές πρωτεΐνες του τοιχώματος ελαττώνουν το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να αυξηθεί αν εφαρμοστούν τα ακόλουθα:

1) ανάπτυξη κυττάρων μέχρι την λογαριθμική φάση ανάπτυξης αντί για την στάσιμη φάση.
2) μειωμένη μαννοσυλίωση των πρωτεϊνών του τοιχώματος
3) οι φερρομόνες προκαλούν τον σχηματισμό πρωτεϊνών με μικρότερες πλευρικές αλυσίδες μαννάνης
4) καλλιέργεια των κυττάρων σε μικρότερο δυναμικό οξυγόνου για να μειωθεί ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταρικό τοίχωμα (De Nobel et al., 1990; Nobel et al., 1991; Lipke et al., 1998; Cabib et al., 2001; klis et al., 2002)

Ενώ το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος καθορίζεται από την εξωτερική στοιβάδα μαννοπρωτεϊνών (Zlotnik et al., 1984; De Nobel et al., 1989) η ακαμψία του καθορίζεται μόνο από τους σταυροειδείς δεσμούς μεταξύ των β-1,3 γλυκανών, των μαννοπρωτεϊνών και της χιτίνης (Wessels and Sietsma 1981; Cabib et al., 1982). Η β-1,6-γλυκάνη παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή την οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος με το να συνδέει τις μαννοπρωτεΐνες της εξωτερικής πλευράς του κυτταρικού τοιχώματος με το ινώδες δίκτυο των β-1,3, γλυκανών (βλ. σχήμα 2.4): η β-1,6 γλυκάνη κατέχει κεντρική θέση, η χιτίνη και η β-1,3 γλυκάνη συνδέονται απευθείας με αυτή με γλυκοζιτικούς δεσμούς και οι μαννοπρωτεΐνες με ομοιοπολικούς δεσμούς. Στον *S. cerevisiae* η χιτίνη έχει διάφορες λειτουργίες: ως υποδοχέας φονικών τοξινών, στην διατήρηση της ωσμωτικής και μορφολογικής συνοχής (Aguilar- Uscanga and Francois, 2003; Walker 1997; Lipke et al., 1998; Cabib et al., 2001). Οι βασικές λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και η σημασία του για την βιοτεχνολογία και την ιατρική συνοψίζεται στον πίνακα 6 του παραρτήματος.

Η ανθεκτικότητα του τοιχώματος προέρχεται από τις γλυκάνες που σχηματίζουν ένα μικροϊνώδες δίκτυο. Όταν το pH του μέσου ανάπτυξης αυξάνεται από 4,0 σε 6,0 στο κυτταρικό

τοίχωμα του *S. cerevisiae* αυξάνεται το ποσοστό της β-1,6- γλυκάνης έως και 40%. Αύξηση της θερμοκρασίας του μέσου ανάπτυξης από 22 σε 37^{o}C προκάλεσε αύξηση στο περιεχόμενο της χιτίνης και στο ποσοστό της β-1,6 γλυκάνης (Aguilar- Uscanga and Francois, 2003).



Σχήμα 2.4*. Η σύσταση και η δομή του κυτταρικού τοιχώματος του S. Cerevisiae: Αποτελείται από δυο στοιβάδες. Η εσωτερική παρέχει την ανθεκτικότητα στο τοίχωμα και αποτελείται από β-1,3 και β-1,6 γλυκάνες που συμπλέκονται με χιτίνη. Η εξωτερική στοιβάδα αποτελείται από μαννοπρωτείνες και καθορίζει τις περισσότερες από τις επιφανειακές ιδιότητες του κυττάρου, όπως το πορώδες. Η πλειοψηφία των μαννοπρωτεϊνών συνδέονται ομοιοπολικά με την εσωτερική στοιβάδα γλυκανών.*

2.3.3. Το Κυτταρόπλασμα και ο Κυτοσκελετός (cytoplasm and cytoskeleton)

Το κυτταρόπλασμα των ζυμών είναι ένα όξινο υγρό που περιέχει μικρού και μεσαίου ΜΒ ουσίες, διαλυμένες πρωτεΐνες και άλλα διαλυτά μακρομόρια. Υπάρχουν επίσης μικροσώματα (microbodies) και μακρομόρια όπως ριβοσώματα, πρωτεασώματα και λιπίδια. Το δίκτυο που παρέχει την δομική οργάνωση στο κυτταρόπλασμα περιλαμβάνει μικροσωληνίσκους (microtubules) και μικροΐνες (microfilaments). Τα ένζυμα που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα είναι γλυκολυτικά ένζυμα, το σύμπλεγμα της συνθετάσης των λιπαρών οξέων και τα ένζυμα της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στον *S. cerevisiae* το κυτταροπλασματικό pH των λογαριθμικής φάσης κυττάρων υπολογίστηκε στο 5.25.

Ριβοσώματα: Στα ριβοσώματα γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών, οι οποίες μεταφέρονται σε όλα τα μέρη του κυττάρου με το σύστημα των καναλιών δικτύου.

Μιτοχόνδρια: Είναι τα κέντρα παραγωγής ενέργειας στο κύτταρο, και διαθέτουν τα ένζυμα για την διάσπαση της γλυκόζης, απ' όπου απελευθερώνεται ενέργεια. Αποτελούνται από τα εξής: *1)* μια εξωτερική μεμβράνη που περιέχει τα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων, *2)* μια μήτρα που περιέχει τα ένζυμα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων και του κύκλου του κιτρικού οξέος μαζί με το μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης (συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων) και του μιτοχονδριακού DNA, *3)* μια εσωτερική μεμβράνη που περιέχει τα κυτοχρώματα της αναπνευστικής αλυσίδας, NADH και H^+- ATPάση.
Σε αερόβιες συνθήκες τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στην σύνθεση του ATP κατά την αναπνοή. Σε αναερόβιες συνθήκες είναι αναγωγικά μέσα στην αναπνευστική αλυσίδα και επιπλέον συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της εργοστερόλης, των λιπαρών οξέων, βοηθούν στην προσαρμογή των κυττάρων στο στρες από την αιθανόλη ή το οξυγόνο.

Ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ): αποτελείται από σωλήνες και κυστίδια που επικοινωνούν μεταξύ τους. Πάνω στην επιφάνεια του φέρει τα ριβοσώματα. Από το ενδοπλασματικό δίκτυο οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi, απ' όπου κατευθύνονται στον προορισμό τους.

Σύμπλεγμα Γκόλτζι: είναι επιμήκη κυστίδια τα οποία συμμετέχουν στον σχηματισμό μεμβρανών. Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται από το σύμπλεγμα Golgi κατευθύνονται μέσω των εκκριτικών σωματιδίων στο κενοτόπιο, το εκβλάστημα, την πλασματική μεμβράνη, το περίπλασμα κλπ.

Λιπιδικά τμήματα (ή σφαιροσώματα)*:* λειτουργούν ως αποθηκευτικές πηγές λιπιδίων για την βιοσύνθεση της μεμβράνης των κυττάρων. Περιέχουν κυρίως εστέρες στερολών και μικρά ποσά φωσφολιπιδίων, πρωτεϊνών και ακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Μικροσώματα (microbodies): περιλαμβάνονται κυρίως τα **υπεροξειδιοσώματα** (*peroxisomes*) και **γλυοξυσώματα** (*glyoxysomes*) που είναι κυστίδια σφαιρικά με απλή μεμβράνη. Η παρουσία τους εξαρτάται από τον διαθέσιμο άνθρακα και το άζωτο. Τα **υπεροξειδιοσώματα**

εκτελούν μεταβολικές λειτουργίες: Εκτός από την καταλάση περιέχουν πολλές οξειδάσες που προκαλούν την διάσπαση μερικών τροφικών μορίων. Τα **γλυοξυσώματα** εκτός από την καταλάση περιέχουν ένζυμα του γλυοξυλικού κύκλου και του μεταβολισμού των αμινών. Υπάρχει και η πιθανότητα τα γλυοξυσώματα και τα υπεροξυσώματα να μην είναι στην πραγματικότητα διαφορετικά οργανίδια, γι' αυτό και χρησιμοποιείται και ο όρος γλυοξυ-υπεροξυσώματα για να περιγράψει αυτά τα μικροσωματίδια.

Τα **πρωτεασώματα** είναι μεγάλα ενζυμικά συμπλέγματα πρωτεάσης που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα και το πυρηνόπλασμα και ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την μεταγωγή σημάτων, την αναπαραγωγή και τις αποκρίσεις στο στρες.

Ο ***κυτοσκελετός*** των κυττάρων των ζυμών περιλαμβάνει **μικροσωληνίσκους** (microtubules) και **μικροίνες (microfilaments)**, τα οποία εκτελούν μηχανικό ρόλο στο κύτταρο και εμπλέκονται στην μίτωση και την μείωση και την κινητικότητα των οργανιδίων. Οι μικροσωληνίσκοι παίζουν ρόλο στην διατήρηση του σχήματος του κυττάρου.

Εκκριτικό Σύστημα (Secretory System) και Κενοτόπιο

Η κίνηση των πρωτεϊνών μέσα και έξω από το κύτταρο γίνεται μέσω ενός συστήματος σωματιδίων στο οποίο συμμετέχουν το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύμπλεγμα Golgi και η πλασματική μεμβράνη (εκκριτικό σύστημα). Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για το κενοτόπιο μεταφέρονται επίσης με εκκριτικά οργανίδια και η ακτίνη είναι υπεύθυνη για την κατεύθυνση της έκκρισης. Κάποιες φυσικώς εκκρινόμενες πρωτεΐνες από τις ζύμες είναι οι φερρομόνες, κάποιες φονικές τοξίνες, η ιμβερτάση και η όξινη φωσφατάση (δεν εκκρίνονται, αλλά παραμένουν εξωκυτταρικά στο περιπλασματικό χώρο), η εξωγλυκανάση (εμπλέκεται στην επέκταση του τοιχώματος κατά την ανάπτυξη) και υδρολάσες (πρωτεάσες, πηκτινάσες, λιπάσες, αμυλάσες κλπ).

Το **κενοτόπιο** εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών. Αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό του συστήματος, το οποίο περιλαμβάνει το ΕΔ, το σύμπλεγμα Golgi και τα εκκριτικά σωματίδια, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ο όρος κενοτοπικό διαμέρισμα (**vacuolar compartement**). Τα κύτταρα της στάσιμης φάσης περιέχουν ένα ή δυο μεγάλα κενοτόπια. Τα κενοτόπια προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό προϋπαρχόντων δομών παρά από *de novo* σύνθεση. Τα κενοτόπια περιβάλλονται από μια μεμβράνη που έχει διαφορετική σύσταση σε φωσφολιπίδια, ακόρεστα λιπαρά οξέα και στερόλη σε σχέση με την πλασματική και είναι πιο ελαστική. Το κενοτόπιο είναι υπεύθυνο για την ενδοκυτταρική πρωτεόλυση στις ζύμες, αλλά

εμπλέκεται και στην αποθήκευση βασικών αμινοξέων, πολυφωσφορικών και κάποιων μεταλλικών κατιόντων καθώς και την ωσμωρύθμιση και την ομοιόσταση ιόντων και το pH.

2.3.4. Ο Πυρήνας του S. cerevisiae (nucleus)

Είναι ένα κυλινδρικό οργανίδιο διαμέτρου 1.5 μm που βρίσκεται στο κέντρο του κυττάρου. Το πυρηνόπλασμα διαχωρίζεται από το κυτταρόπλασμα με μια διπλή μεμβράνη που περιέχει πόρους διαμέτρου 50-100 nm. Στον *S. cerevisiae* η πυρηνική μεμβράνη έχει παρόμοια χημική σύσταση με το ενδοπλασματικό δίκτυο. Εντός του πυρήνα βρίσκεται μια δρεπανοειδούς – σχήματος περιοχή που αποτελεί τον πυρηνίσκο (nucleolus) και περιέχει RNA. Ο πυρήνας φέρει τις γενετικές πληροφορίες για την ανάπτυξη του κυττάρου, κωδικοποιημένες ως DNA. Τα μόρια του DNA συγκροτούν νηματοειδής σχηματισμούς, τα χρωμονημάτια, τα οποία οργανώνονται σε δομές που ονομάζονται χρωμοσώματα.

2.3.5. ***Ο Μηχανισμός Πρόσληψης Θρεπτικών Συστατικών από τα κύτταρα του S. Cerevisiae***

Στοιχειακή ανάλυση 100 γρ. ζυμών αρτοποιίας έδωσε την ακόλουθη εμπειρική φόρμουλα:
$C_{47} H_{6.3} O_{33} N_8 P_{1.2} Salt_{4.5}$

Οι ζύμες έχουν την ανάγκη μακροθρεπτικών συστατικών (~ 10^{-3} M) C, H, O, N, P, K, Mg και S ή μικροθρεπτικών (~10^{-6}M) όσον αφορά τα ιχνοστοιχεία. Οι διατροφικές απαιτήσεις των ζυμομυκήτων αναφέρονται στον πίνακα 9 του παραρτήματος. Εκτός από τα παραπάνω θρεπτικά συστατικά στους ζυμομύκητες έχουν καταλυτικό ρόλο και κάποιοι παράγοντες ανάπτυξης (*growth factors*) χωρίς να αποτελούν πηγή ενέργειας: βιταμίνες (αποτελούν συστατικά των συνενζύμων), πουρίνες και πυριμιδίνες, νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, στερόλες κ.α. Οι απαραίτητες βιταμίνες για τις ζύμες είναι η βιοτίνη (συμπαράγοντας στις αντιδράσεις που καταλύονται από την καρβοξυλάση), το παντοθενικό οξύ (εμπλέκεται στις αντιδράσεις ακετυλίωσης), το νικοτινικό οξύ (εμπλέκεται στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις) και η θειαμίνη (εμπλέκεται στις αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης).

Στην πρόσληψη των παραπάνω θρεπτικών συστατικών 2 μέρη του κυττάρου παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο: το κυτταρικό τοίχωμα και η πλασματική μεμβράνη. Αν και το κυτταρικό

τοίχωμα δεν παρουσιάζει την εκλεκτικότητα στον ίδιο βαθμό με την πλασματική μεμβράνη, δεν αποτελεί ελεύθερη πορώδης δομή. Γενικά θεωρείται πορώδες για μόρια με μοριακή μάζα έως 300 Da ή ακόμα και 400 Da, αλλά κατακρατά μόρια μεγαλύτερα από 700 Da. Το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος του *S. cerevisiae* ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Η κυτταρική μεμβράνη, αντιθέτως, είναι αυτή που παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα και ελέγχει τα θρεπτικά συστατικά που θα εισέλθουν και του μεταβολίτες που θα φύγουν από το κύτταρο.

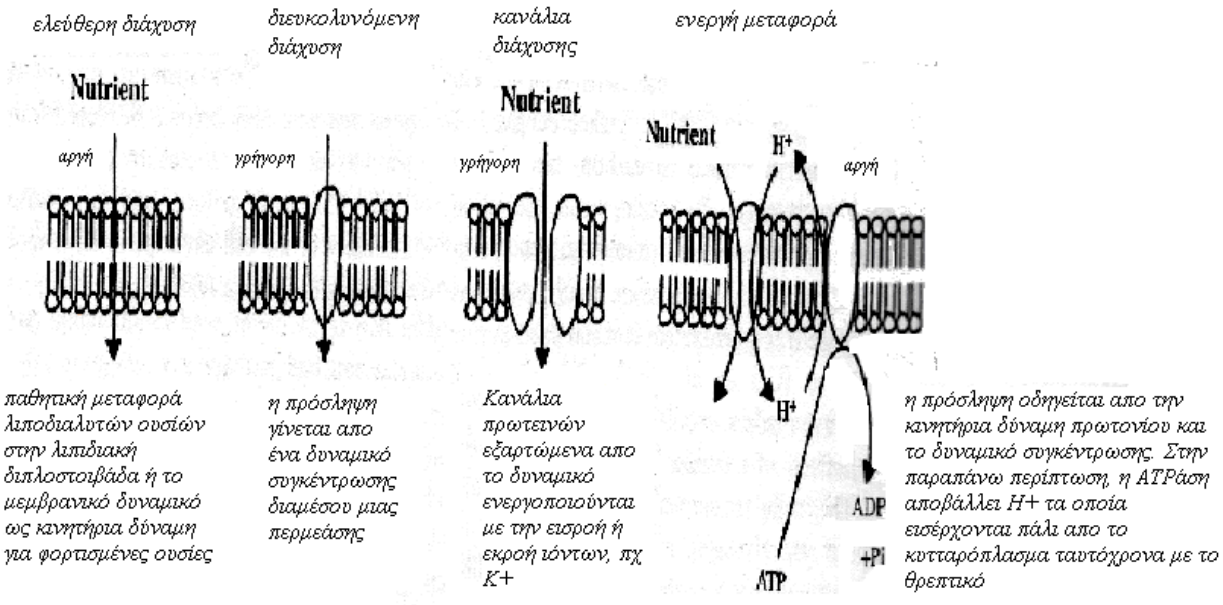
Η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και η αποβολή των μεταβολιτών κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τέσσερις βασικούς μηχανισμούς, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.5.

I.Ελεύθερη διάχυση (free diffusion)
II. Διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion)
III.Κανάλια διάχυσης – πόροι (diffusion channels (pores)
IV.Ενεργή μεταφορά (active transport)

Παθητική διάχυση

I.. Απλή Διάχυση , (free diffusion) (παθητική διάχυση)

Είναι ο πιο απλός, αλλά και ο πιο αργός τρόπος μεταφοράς κατά τον οποίο οι ουσίες μετακινούνται από μια υψηλή εξωκυτταρική συγκέντρωση σε μια χαμηλότερη ενδοκυτταρική. Ο τρόπος αυτός μεταφοράς περιλαμβάνει κυρίως την παθητική μεταφορά λιποδιαλυτών ουσιών διαμέσου της μεμβράνης ή την είσοδο μη φορτισμένων οργανικών οξέων (π.χ. βενζοϊκό, σορβικό), μικρής αλυσίδας αλκανίων ή μεγάλης αλυσίδας λιπαρών οξέων ή την έξοδο της αιθανόλης και αερίων από το κύτταρο. Οι φορτισμένες ουσίες θα εισαχθούν μόνο αν αναπτυχθεί μια κατάλληλη διαφορά δυναμικού ως κινητήρια δύναμη κατά μήκος της μεμβράνης.



Σχήμα 2.5. *Μηχανισμοί πρόσληψης θρεπτικών συστατικών ή αποβολής μεταβολιτών στα κύτταρα των ζυμομυκήτων (Walker, 1997).*

II. Διευκολυνόμενη Διάχυση (facilitated diffusion) (παθητική Διάχυση)

Είναι πιο γρήγορη από την απλή διάχυση αφού οι ουσίες μεταφέρονται διαμέσου ενός ενζύμου. Το ένζυμο αναφέρεται ως περμεάση ή carrier ή facilitator, είναι ενσωματωμένο στην μεμβράνη και παρουσιάζει στερεο-εκλεκτικότητα για τη μεταφερόμενη ουσία. Όπως και στην ελεύθερη διάχυση η μεταφορά της ουσίας συνεχίζεται έως ότου η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ισοσταθμίσει την εξωκυτταρική. Με αυτό τον τρόπο μεταφέρονται κυρίως σάκχαρα.

III. Κανάλια Διάχυσης, Πόροι (diffusion channels)

Βοηθούν συγκεκριμένα ιόντα να μετακινηθούν κατά μήκος μιας διαφοράς συγκέντρωσης. Αυτά τα πρωτεϊνικά κανάλια κανονικά είναι κλειστά στο αρνητικό μεμβρανικό δυναμικό των κυττάρων και ανοίγουν όταν μεμβρανικό δυναμικό γίνεται θετικό. Το κανάλι του K^+ της πλασματικής μεμβράνης είναι το κυρίαρχο ιοντικό κανάλι στις ζύμες. Κάτω από συνθήκες ωσμωτικού στρες, ο *S. cerevisiae* επιτρέπει την είσοδο γλυκερόλης διαμέσου ενός μεμβρανικού καναλιού, την FPS1 πρωτεΐνη.

IV. Ενεργή μεταφορά (active transport)

Πρόκειται για μεταφορά ενάντια στη βαθμίδωση συγκέντρωσης και συχνά, ενάντια στο ηλεκτρικό δυναμικό. Σε αυτή την περίπτωση απαιτείται ενέργεια και η βασική κινητήρια

δύναμη ενάντια σε ένα δυναμικό συγκέντρωσης είναι το δυναμικό που δημιουργείται από την H^+- ATP άση της πλασματικής μεμβράνης. Η τελευταία ελέγχει το ενδοκυτταρικό pH απομακρύνοντας τα πρωτόνια χρησιμοποιώντας την ελεύθερη ενέργεια της υδρόλυσης του ATP και αποτελεί βασικό ένζυμο στην ανάπτυξη και τη θρέψη των ζυμών. Η κινητήρια δύναμη των πρωτονίων καθιστά ικανά τα θρεπτικά συστατικά είτε να εισέλθουν καθώς εισέρχονται τα πρωτόνια, ή εναντίον στα εξερχόμενα πρωτόνια (Walker, 1997).

Με βάση τα παραπάνω, η πρόσληψη βασικών θρεπτικών συστατικών πραγματοποιείται ως εξής :

- **Νερό:** Κινητήρια δύναμη είναι η διαφορά ωσμωτικού δυναμικού κυττάρων και περιβάλλοντος, η οποία δημιουργείται από τη συσσώρευση K^+, αμινοξέων, οργανικών οξέων, φωσφορικών, Mg^{2+} και $Να^+$.
- **Σάκχαρα:** μεταφέρονται με απλή ή διευκολυνόμενη διάχυση (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη), ενώ οι δισακχαρίτες εισέρχονται με μηχανισμούς ενεργούς μεταφοράς.
- **Αλκοόλες:** Μικρά μόρια, όπως η μεθανόλη και η αιθανόλη μεταφέρονται με ελεύθερη παθητική διάχυση. Η γλυκερόλη στον *S. Cerevisiae* μεταφέρεται είτε με ελεύθερη διάχυση είτε με διευκολούμενη μέσω μιας πρωτεΐνης (Fps1).
- **Υδρογονάνθρακες :** με παθητική διάχυση
- **Οργανικά οξέα:** με απλή διάχυση.
- **Αζωτούχα συστατικά:** Ο *S. cerevisiae* δεν μπορεί να αφομοιώσει νιτρικά ή νιτρώδη ενώ τα αμμωνιακά και τα αμινοξέα τα μεταφέρει με ενεργή μεταφορά. Έτσι το διαμεμβρανικό δυναμικό του pH παρέχει την ενέργεια και η εισροή πρωτονίων εξισορροπείται με την αποβολή ιόντων K^+. Τα δι- και τριπεπτίδια τα προσλαμβάνει με διευκολούμενη διάχυση. Οτιδήποτε μεγαλύτερο από τριπεπτίδιο είναι απίθανο να μεταφερθεί ανέπαφο.
- **Ανιόντα:** Η μεταφορά του ορθοφωσφορικού είναι ενεργή και εξαρτάται από το ενδο- και το εξω-κυτταρικό pH και από τις συγκεντρώσεις Mg^{2+}, K^+, φωσφορικών στο μέσο ανάπτυξης. Η πρόσληψη θειικών είναι επίσης ενεργή διαδικασία μέσω ενός μεταφορέα που ενεργοποιείται με κινητήρια δύναμη πρωτονίου. Η μεταφορά των θειωδών στον *S. cerevisiae* γίνεται με απλή διάχυση.
- **Κατιόντα:** Η H+-ATPase της κυτταρικής μεμβράνης ελέγχει το pH του κυττάρου, την μεταφορά των θρεπτικών, συμπεριλαμβανομένων των ιόντων και την ολική ανάπτυξη

του κυττάρου. Το K^+ αποτελεί το κυρίαρχο κατιόν στο κυτταρόπλασμα (περίπου 150mM) και υπάρχουν διάφορα συστήματα για τη μεταφορά του: ενεργή μεταφορά μέσω περμεασών, με πρωτόνια μέσω της H+ ATPάσης και παθητική μεταφορά μέσω καναλιών ιόντων K^+. Η εκροή του από τα κύτταρα μπορεί να προκληθεί από διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες: από κατιοντικές χρωστικές, βαρέα μέταλλα, απορρυπαντικά, πολυμυκίνη Β και φονικές τοξίνες. Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων δεν συσσωρεύουν ιόντα Na^+ κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, αλλά αντίθετα διώχνουν Na^+ με την βοήθεια μιας P-τύπου ATPάσης της μεμβράνης. Για την πρόσληψη δισθενών κατιόντων η βασική κινητήρια δύναμη είναι το διαμεμβρανικό δυναμικό και οι εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις της γλυκόζης, των φωσφορικών και του καλίου επηρεάζουν σημαντικά την πρόσληψη δισθενών κατιόντων: η πρόσληψη ιόντων Mg^{2+} οδηγείται από τα διαμεμβρανικά δυναμικά του πρωτονίου και του καλίου. Μια γενική μεταφορά δισθενών κατιόντων περιγράφηκε 30 χρόνια πριν για τον *S. cerevisiae* με την ακόλουθη σειρά συγγένειας (affinity):

$$Mg^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Ni^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+}$$

Η πρόσληψη Zn^{2+} απαιτεί ενέργεια και οδηγείται από τα δυναμικά πρωτονίου και καλίου. Η ομοιόσταση των ιόντων χαλκού στα κύτταρα ελέγχεται με διάφορους τρόπους πρόσληψης, εκροής και σχηματισμού χηλικών ενώσεων. Όσον αφορά την πρόσληψη σιδήρου (αλλά όχι στον *S. cerevisiae*) κάποιοι ζυμομύκητες μπορεί να εκκρίνουν εξειδικευμένες χηλικές ενώσεις σιδήρου που ονομάζονται σιδεροφόρα (siderophores). Τέλος στον *S. cerevisiae* μπορεί να προσκολληθούν βαρέα μέταλλα: κάδμιο, καίσιο, νικέλιο, υδράργυρος, χρυσός, κοβάλτιο, στρόντιο και ουράνιο, τα οποία τα απομονώνουν ενδοκυτταρικά, συμβάλλοντας έτσι στην απομάκρυνση τους, από μολυσματικές περιοχές της βιομηχανίας (Walker 1997).

2.4. Στρες στον S. cerevisiae

Τα κύτταρα ενός μικροοργανισμού μπορεί να βρεθούν σε δυσμενείς για την ανάπτυξη τους συνθήκες, οι οποίες περιγράφονται ως καταστάσεις ‘στρες’. Ανάλογα με την αιτία που τα προκαλούν διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

1) Φυσικό στρες: θερμοκρασία, ωσμωτικό στρες (ενεργότητας νερού), αφυδάτωση, υψηλές υδροστατικές πιέσεις, δυνάμεις βαρύτητας, ακτινοβόληση, υπερήχηση.
2) Χημικό στρες: αιθανόλη, απουσία θρεπτικών συστατικών, οξειδωτικό στρες, στρες μεταλλικών ιόντων, αλλαγή στο pH και χημικές μεταλλάξεις.

3) Βιολογικό στρες: γήρανση κυττάρων, γενοτυπικές αλλαγές, ανταγωνισμός από άλλους Μ/Ο.

Τα κύτταρα δεν μένουν αδρανή στις περιβαλλοντικές αλλαγές και προσπαθούν να επιβιώσουν προσαρμόζοντας τις κυτταρικές τους δραστηριότητες. Οι πιο σημαντικές αποκρίσεις τους στο στρες είναι: η σύνθεση πρωτεϊνών (Hsps) (Ang et al., 1991; Sanchez et al., 1992; Lindquist & Kim, 1996; Lee & Goldberg, 1998), τρεχαλόζης (Attfield, 1987; Hottiger et al., 1987; Neves & Franc¸ois, 1992; Singer & Lindquist, 1998) και γλυκερόλης (Blomberg & Adler,1992; Albertyn et al., 1994; Omori et al., 1996; Hohmann,2002), η τροποποίηση της σύστασης της μεμβράνης (Mishra & Prasad, 1989; Piper, 1993), η τροποποίηση των ιονανταλλακτικών διαδικασιών (Petrov & Okorokov, 1990), και η παραγωγή γλουταθειόνης (Jamieson, 1995; Stephen & Jamieson, 1996) και ενζύμων υπεροξειδίων της δισμουτάσης (Costa et al., 1993; Davidson et al., 1996).

2.4.1. Θερμικό Στρες

Ο πίνακας 2.2 συνοψίζει τις επιπτώσεις του θερμικού στρες στο κύτταρα των ζυμομυκήτων.

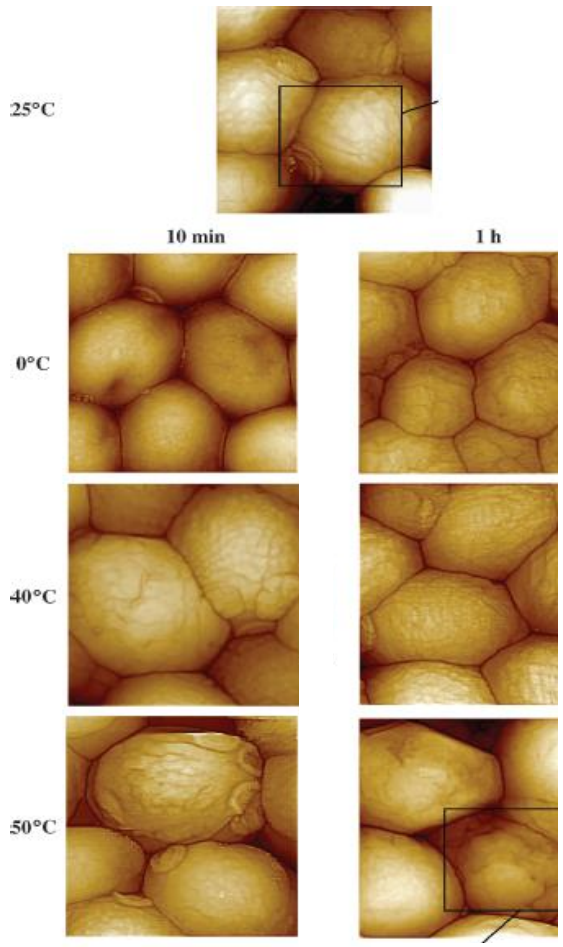
Στις υψηλές θερμοκρασίες διασπώνται οι δεσμοί Η και εξασθενούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις προκαλώντας μετουσίωση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων. Ανεκτικότητα των ζυμομυκήτων στις υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να συμβεί όταν πριν το θερμό σοκ έχει προηγηθεί κατεργασία τους σε μια ήπια θερμοκρασία. Την ανεκτικότητα την επηρεάζουν και άλλοι παράγοντες, όπως χημικές ουσίες, η οσμωτική πίεση, το χαμηλό pH, το θρεπτικό υπόβαθρο και η φάση ανάπτυξης. Το θερμικό στρες οδηγεί στην έναρξη της σύνθεσης μιας σειράς πρωτεϊνών, τις λεγόμενες '*heat shock proteins (Hsps)*'. Αυτές εμποδίζουν την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και βοηθούν στην αποικοδόμηση των κατεστραμμένων από το στρες πρωτεϊνών. Εκτός από την δημιουργία των Hsps, τα κύτταρα αποκρίνονται επίσης με την συσσώρευση προστατευτικών συστατικών, όπως η τρεχαλόζη, η γλυκερόλη, ένζυμα, όπως η καταλάση και η μιτοχονδριακή υπεροξυ-δισμουτάση και πολυαμίνες (σπερμίνη, σπερμιδίνη). Η τρεχαλόζη σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες, αντικαθιστώντας το νερό και σχηματίζοντας ένα υδατικό μικκύλιο γύρω από τις πρωτεΐνες του *S. cerevisiae*.

Πίνακας 2.2. *Επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας στα κύτταρα των ζυμομυκήτων.*

Φυσιολογική λειτουργία	
Βιωσιμότητα	Υπάρχει αξιοσημείωτη κυτταρική θνησιμότητα. Σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες ο ρυθμός του θερμικού θανάτου είναι εκθετικός.
Μορφολογία	Άτυπη εκβλάστηση, μη κανονική ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος και αυξημένο κυτταρικό μέγεθος.
Διαίρεση και ανάπτυξη	Η ανάπτυξη των μη-θερμοανθεκτικών ζυμών εμποδίζεται σε θερμοκρασίες > 40^{o}C. Ενεργός διαιρούμενες ζύμες στην S φάση είναι πιο θερμοευαίσθητες.
Δομή- λειτουργία πλασματικής μεμβράνης	Αυξημένη ρευστότητα και μειωμένη διαπερατότητα σε βασικά θρεπτικά. Η εργοστερόλη αυξάνει την θερμοανθεκτικότητα. Υπάρχει μείωση στα ακόρεστα λιπαρά οξέα της μεμβράνης. Διέγερση της ενεργότητας της ATPase και της RAS-adenylate cyclase
Συνοχή κυτοσκελετού	Προβλήματα στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων.
Μιτοχονδριακή δομή/ λειτουργία	Ελάττωση στην αναπνευστική ενεργότητα - Παρεκκλίνουσα μορφολογία
Μεταβολισμός	Αναστολή της αναπνοής και της ζύμωσης Άμεση αύξηση της κυτταρικής τρεχαλόζης
Σύνθεση πρωτεϊνών	Καταστολή της σύνθεσης πολλών πρωτεϊνών , αλλά και σύνθεση θερμού- σοκ πρωτεϊνών

Στις χαμηλές θερμοκρασίες η επιβίωση των κυττάρων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η λυοφιλίωση καταστρέφει τα κύτταρα κατά την κατάψυξη- απόψυξη. Προστασία στα κύτταρα από το ψυχρό σοκ προσφέρει η τρεχαλόζη.

Στο σχήμα 2.6 φαίνονται κύτταρα του *S. cerevisiae* που ελήφθησαν με Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy), μετά από έκθεση τους στους 0, 40 και 50^{o}C για 10 min και 1h. Στους 25^{o}C επιβίωσαν 100%. Στους 0 και τους 40^{o}C για 1 ώρα η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν 99% και 96%, αντίστοιχα. Στους 50^{o}C η βιωσιμότητα ήταν 93% τα πρώτα 20 min, αλλά μετά από 1 ώρα έπεσε στο 56% (Adya et al., 2006).



Σχήμα 2.6. *Εικόνα του S. cerevisiae που εκτίθεται στους 0, 40 και 50°C για 10 min και 1 h. Κύτταρα που παρέμειναν στους 25°C χρησιμοποιήθηκαν ως control. Στους 0°C τα κύτταρα συρρικνώθηκαν, στους 40°C για 10 min δεν άλλαξε η μορφολογία τους, αλλά στα 30 min-1h συρρικνώθηκαν χωρίς να μεταβάλλεται ο όγκος τους. Στους 50°C για 30 min τα κύτταρα συρρικνώθηκαν δραματικά και το σχήμα τους έγινε ακανόνιστο. Το μέγεθος κάθε εικόνας είναι 10 μm×10 μm και η κλίμακα 0-4 μm (Adya et al., 2006).*

2.4.2. Στρες λόγω μεταβολών στην ενεργότητα νερού (water stress)–Αφυδάτωση-Πλασμόλυση

Όταν τα κύτταρα των ζυμομυκήτων βρεθούν σε περιβάλλον με χαμηλή ενεργότητα νερού (υψηλή συγκέντρωση άλατος, ζάχαρης) τότε υφίσταται το λεγόμενο υπερωσμωτικό σοκ, ενώ σε περιβάλλον με υψηλή ενεργότητα νερού το υποωσμωτικό σοκ όπου αυξάνεται ο όγκος τους και ελαττώνονται τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του K^+ ή της γλυκερόλης (Walker 1997). Στο στρες λόγω ενεργότητας και άλλοι παράγοντες πέρα από την σύσταση του μέσου μπορεί να έχουν συνεργιστική δράση (π.χ. ακραίες τιμές του pH, της θερμοκρασίας ή της πίεσης, στέρηση

θρεπτικών, κυρίως Mg^{2+}), και να αποδυναμώνουν περαιτέρω δεσμούς υδρογόνου δομικής σημασίας (Van Uden, 1989, Jones at al., 1989, Omi et al., 1989). Η πλασμόλυση σχετίζεται με το υπερωσμωτικό στρες, όπου συρρικνώνεται το πρωτόπλασμα λόγω απώλειας νερού και κάποιων υδατοδιαλυτών συστατικών του πρωτοπλάσματος. Μετά την πλασμόλυση τα κύτταρα μπορεί να επιβιώσουν. Σε περίπτωση που δεν επιβιώσουν η κυτταρική μεμβράνη χάνει την εκλεκτικότητα της για τον έλεγχο της διαπερατότητας μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος και μπορεί να υπάρχει ρήξη της μεμβράνης (Korber et al., 1996).

Η συρρίκνωση των κυττάρων του *S. cerevisiae* δεν καταλήγει πάντα σε πλασμόλυση επειδή η πλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα παραμένουν σε στενή επαφή και συρρικνώνονται μαζί. Η αυξημένη ώσμωση στο μέσο ανάπτυξης, όμως, θα προκαλέσει :

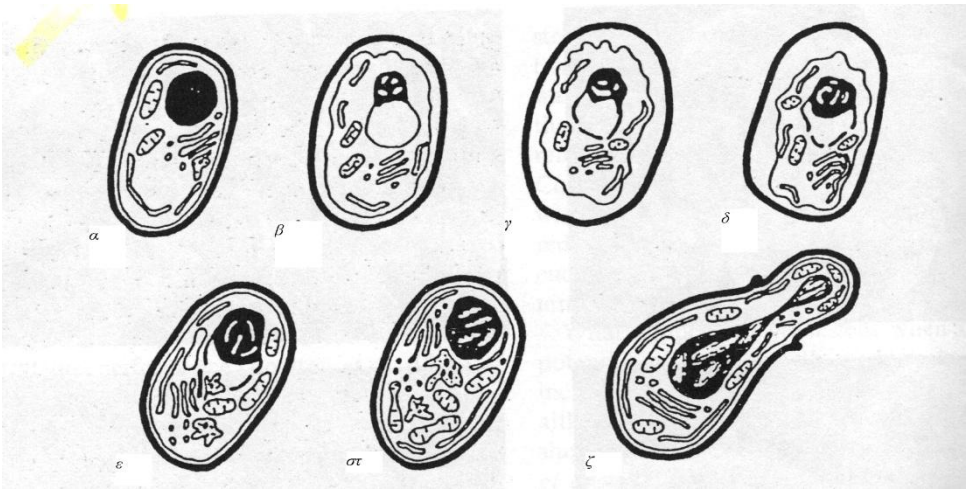
- συρρίκνωση του κυττάρου: κάποια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος θα μετακινηθούν στο περίπλασμα, προκαλώντας αλλαγή στην οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος (Hohnman 1997).
- προσωρινή διακοπή της ανάπτυξης: όταν κύτταρα του *S. Cerevisiae* της λογαριθμικής φάσης μεταφέρθηκαν σε υπερωσμωτικό μέσο 0,7-1M KCl, 1M mannitol και /ή 1M γλυκερόλης αναστάλθηκε η ανάπτυξη τους για περίπου 2 ώρες και μετά επανήλθε στους αρχικούς ρυθμούς (Slaninova et al., 2000).
- αποσύνθεση της κυτοσκελετικής ακτίνης και των μικροσωληνίσκων.
- συσσώρευση των διαλυτών, πχ της γλυκερόλης ως συνέπεια της ενεργοποίησης των γονιδίων της λεγόμενης High Osmolarity Glycerol Pathway (HOG pathway) (Hohnman 1997; Walker, 1997). Στον *S. cerevisiae* βρέθηκαν τα '*stress response elements (STREs)*', τα οποία ενεργοποιούνται σε διάφορες συνθήκες στρες, μαζί και στο ωσμωτικό σοκ. Το HOG περιλαμβάνει πολλές κινάσες πρωτεϊνών και η λειτουργία του περιορίζεται στο στρες υψηλής ωσμωτικότητας.
- ελάττωση της ζωτικότητας των κυττάρων, η οποία εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό και από την θερμοκρασία. Σε μια επιστημονική ομάδα μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (6-35^{o}C) και της ωσμωτικής πίεσης (1.38-133.1 MPα). Σε πίεση 13.4MPα η ζωτικότητα ήταν 63% στους 12^{o}C, ενώ έφτανε το 90-100% στις άλλες θερμοκρασίες. Στα 133.1MPα, στους 5 ή 8^{o}C η ζωτικότητα ήταν 36%, ενώ σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες ήταν 15-20% χαμηλότερη. Στους 25 και 30^{o}C έφτανε το 40% (Lachoche et al., 2001).

- αλλαγή στην διαπερατότητα του πλασματικής μεμβράνης: Η διαπερατότητα της μεμβράνης σχετίζεται άμεσα με την ρευστότητα της, και συνεπώς με την θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης (Tm) των λιπιδίων της διπλοστοιβάδας. Η θερμοκρασία αυτή ποικίλλει ανάλογα με την ωσμωτική πίεση του μέσου και τη σύσταση της μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η Tm αυξάνεται καθώς αυξάνεται η ωσμωτική πίεση (διότι οι κεφαλές των φωσφολιπιδίων έρχονται πιο κοντά) και εξαρτάται και από τη σύσταση της μεμβράνης (μήκος αλυσίδων λιπιδίων, ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων, επίπεδο στερολών) (Lachoche et al., 2001; Coury et al., 1999; Simonin et al., 2007; Laroche and Gervais 2003). Οι ζυμομύκητες μπορεί να τροποποιήσουν τη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης τους προκειμένου να αυξήσουν τη βιωσιμότητα τους στο ωσμωτικό στρες (Lande et al., 1995; Sharma et al., 1996; Swan and Watson, 1997).

Η απώλεια νερού από το κύτταρο μπορεί να οδηγήσει και σε αφυδάτωση του: Η αφυδάτωση θα επηρεάσει και τη φάση στην οποία βρίσκονται τα λιπίδια της μεμβράνης. Σε φυσιολογικές συνθήκες η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα βρίσκεται στη ρευστή υγροκρυσταλλική φάση. Όταν τα κύτταρα αφυδατώνονται οι κεφαλές των φωσφολιπιδίων έρχονται πιο κοντά, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των άκυλοομάδων, οδηγώντας στην μετάπτωση των λιπιδίων από την υγροκρυσταλλική φάση στη φάση πηκτής. Κατά την επανυδάτωση η μεμβράνη επιστρέφει στην υγροκρυσταλλική φάση. Όταν οι μεμβράνες αφυδατώνονται η μετάπτωση φάσης συμβαίνει σε υψηλότερες θερμοκρασίες, απ΄ ότι στις ενυδατωμένες μεμβράνες. Στον *S. cerevisiae* η μετάπτωση συμβαίνει στους 10^{o}C σε ενυδατωμένο μέσο και σε μεγαλύτερη από τους 30^{o}C σε αφυδατωμένα κύτταρα (Lachoche et al., 2001). Οι βιολογικές μεμβράνες που περιέχουν ετερόλογο μίγμα λιπιδίων, μπορεί να έχουν περιοχές όπου η φάση πηκτής και η υγροκρυσταλλική φάση συνυπάρχουν, δημιουργώντας ατέλειες στο πάκτωμα των διπλοστοιβάδων, όπου μπορεί να συμβεί και διαρροή του κυτταροπλάσματος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου. Για να παρεμποδιστεί αυτή η διαρροή η επανυδάτωση πρέπει να συμβεί παρουσία σακχάρων τρεχαλόζης ή σακχαρόζης ή αμινοξέων, τα οποία συνδέονται άμεσα με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων με δεσμούς υδρογόνου καθώς το νερό φεύγει (Simonin et al., 2007; Laroche and Gervais 2003).

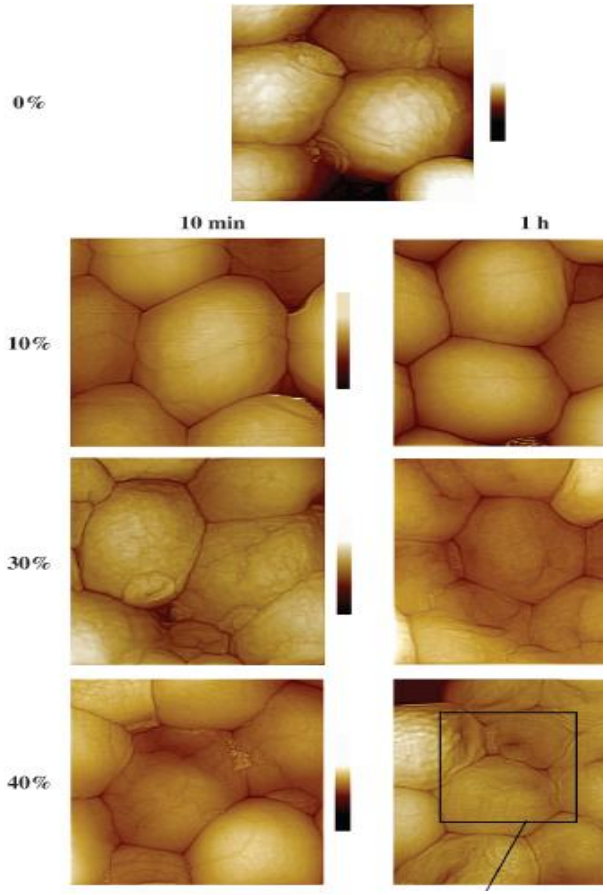
Όπως αναφέρθηκε, οι ζυμομύκητες μπορεί να αποκρίνονται στο ωσμωτικό στρες συνθέτοντας ‘συμβατούς διαλύτες’ (**compatible solutes**), οι οποίοι αντικαθιστούν το κυτταρικό νερό, και

διατηρούν χαμηλά την ενεργότητα νερού όταν εξωτερικά είναι υψηλή. Συγκεκριμένα, σταθεροποιούν τις μεμβρανικές και τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες του κυττάρου, και διατηρούν την υγροκρυσταλλική φάση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων κατά την αφυδάτωση. Οι πιο αποτελεσματικοί είναι οι πολυόλες, και ειδικότερα η γλυκερόλη. Αν τόσο η τρεχαλόζη όσο και η γλυκερόλη προστατεύουν την μεμβράνη κατά το στρες της ενεργότητας νερού, η τρεχαλόζη έχει πιο αποτελεσματικό ρόλο από τους άλλους συμβατούς διαλύτες στην αφυδάτωση, όπου αντικαθιστά το νερό αλλά και κατά την ενυδάτωση, στην οποία είναι πιθανόν οι δεσμοί λιπιδίου-λιπιδίου να εξασθενήσουν και η διπλοστοιβάδα να έρθει σε ρήξη. Η γλυκερίνη (και άλλες χαμηλού ΜΒ πολυόλες) αλληλεπιδρούν με τις ξηρές μεμβράνες των λιπιδίων με διαφορετικό τρόπο απ' ότι η τρεχαλόζη (Carpenter et al 1988, Crowe et al 1984, Colaco et al 1992). Η τρεχαλόζη επίσης συσσωρεύεται στα κύτταρα των ζυμομυκήτων και κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ (Attfield et al., 1994, Lewis et al., 1995, Leslie et al., 1994, Hottiger at al., 1987). Στον *S. cerevisiae* η συσσώρευση της γλυκερόλης λόγω στρες από αλάτι συμβαίνει μετά από αρκετές ώρες προσαρμογής κατά την οποία το περιεχόμενο επίσης των K^+, Na^+ και της τρεχαλόζης αυξάνονται (Sun et al., 2007). Η κυτταροπλασματική συγκέντρωση της γλυκερόλης στον *S. cerevisiae* ελέγχεται με ένα κανάλι στην πλασματική μεμβράνη, το οποίο ανοίγει και κλείνει ανάλογα με την απουσία και παρουσία, αντίστοιχα, του υπερωσμωτικού στρες. Στο υποτονικό σοκ τα κύτταρα του *S. cerevisiae* αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του Ca^{2+}, μέσω καναλιών (Walker 1997).



Σχήμα 2.7. *Σχηματική αναπαράσταση του κυττάρου του S. cerevisiae κατά την αφυδάτωση και την επανυδάτωση του. α) αρχικό κύτταρο, β-δ) σχηματισμός εσοχών (invaginations) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και διαχωρισμός ενός τμήματος του πυρήνα που περιέχει χρωμόσωμα κατά την β) αφυδάτωση, γ) πλασμόλυση, δ) συμπύκνωση χρωματίνης. ε-στ) επανυδάτωση των κυττάρων ζ) διαίρεση του ενυδατωμένου κυττάρου (Walker, 1997).*

Στο σχήμα 2.8 φαίνονται κύτταρα του *S. cerevisiae* που υπέστησαν ωσμωτικό στρες με διαφορετικά διαλύματα σορβιτόλης (10%, 20%, 30% and 40% w/v) για χρόνο έως 1 ώρα. Έκθεση σε 20% σορβιτόλη για 1 ώρα ελάττωσε τη ζωτικότητα των κυττάρων στο 86%, σε 30% σορβιτόλη στο 77% και στο 40% σορβιτόλη έφτασε το 69%. Οι σχετικά υψηλές τιμές βιωσιμότητας αποδίδονται στην σύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης (Adya et al., 2006).



Σχήμα 2.8. *Κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae (NCYC 1681) που εκτίθενται σε 10%, 30% και 40% σορβιτόλη για 10 min και για 1h. Οι ζύμες στις οποίες δεν προστέθηκε σορβιτόλη χρησιμοποιήθηκαν ως control. Σημαντικές αλλαγές προκαλούνται σε συγκεντρώσεις σορβιτόλης 30 ή 40%. Η συρρίκνωση του κυττάρου μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη ελαστικότητα του κυτταρικού τοιχώματος που οδηγεί στην απώλεια κυτοπλασματικού νερού. Το μέγεθος κάθε εικόνας είναι 10 μm × 10 μm και η κλίμακα 0-4 μm (Adya et al., 2006).*

2.4.3. Στρες λόγω Υψηλής Πίεσης

Στην βιομηχανία ζυθοποιίας οι ζυμομύκητες μπορεί να δεχθούν πίεση π.χ. στα δοχεία ζύμωσης, ή από το CO_2 που παράγουν κατά την ζύμωση. Πιέσεις CO_2 μεγαλύτερες από 50KPa (~0.5 atm) αναστέλλουν κάποια ένζυμα του *S. cerevisiae (*Walker 1997*).* Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* αντέχουν σε πιέσεις μέχρι 150 MPa. Εφαρμογή πίεσης 30 MPα στους 25^{o}C προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης αλλά όχι θανάτωση των κυττάρων του *S. cerevisiae,* διότι παράγονται συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες ενεργοποιούν τα γονίδια που ελέγχουν την δομή της μεμβράνης (Iwahashi et al., 2005).

2.4.4. *Στρες λόγω Ακτινοβόλησης*

Η υπεριώδης και η ακτινοβολία γ καταστρέφουν το DNA του κυττάρου. Οι ακτίνες Χ ομοίως καταστρέφουν το DNA και αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο. Η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί έμμεσες επιδράσεις στις οποίες μεσολαβούν δραστικές μορφές οξυγόνου που καταστρέφουν το DNA. Έχει βρεθεί ότι η γ-ακτινοβόληση ενισχύει την παραγωγή της αλκοόλης περίπου 25% στον *S. cerevisiae*, ενώ το διάχυτο φως της ημέρας αναστέλλει την εκβλάστηση του *(*Walker 1997*).*

2.4.5. Μηχανικό και Ηλεκτρικό στρες

Λόγω των πυκνών κυτταρικών τοιχωμάτων, οι ζυμομύκητες είναι πολύ ανθεκτικοί στο μηχανικό στρες. Οι υπερηχητικές συχνότητες που συνήθως είναι ικανές να σπάσουν τα βακτηριακά κύτταρα και να μετουσιώσουν τα ένζυμα τους, δεν επιδρούν στους ζυμομύκητες. Τα χαμηλής έντασης υπερηχητικά κύματα, ωστόσο, μπορεί να βοηθήσουν την μεταφορά μεταβολιτών εντός ή εκτός του κυτταρικού φακέλου. Η φυγόκεντρος δύναμη δε θεωρείται ότι προκαλεί κάποιο στρες στα κύτταρα, ωστόσο μπορεί να προκαλέσει μεταβολικές αναταράξεις. Η υπερφυγοκέντρηση μπορεί να ελαττώσει τη βιωσιμότητα. Τα ηλεκτρικά κύματα επηρεάζουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Η ηλεκτροευαισθησία των ζυμομυκήτων εξαρτάται από το μήκος, την συχνότητα και την διάρκεια των ηλεκτρικών παλμών.

2.4.6. *Στρες λόγω Αιθανόλης*

Αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης είναι ανασταλτικές και θανατηφόρες για τους ζυμομύκητες, όπως φαίνεται και στον πίνακα 2.3. Η κύρια επίδραση της αιθανόλης είναι να αυξάνει την διαπερατότητα και συνεπώς την ρευστότητα της μεμβράνης (Pang et al., 1979; Curran and Seeman 1979; Bangham and Mason 1980). Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων αντισταθμίζουν αυτή τη μεταβολή με δυο τρόπους: είτε συνθέτοντας κάποιους 'συμβατικούς διαλύτες' (βλ.§ 2.4.2) είτε τροποποιώντας τη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης για να ελαττώσουν την αύξηση στη ρευστότητα που προκαλεί η αιθανόλη (Jones and Greenfield, 1987; Littleton, 1979; Chin and Goldstein, 1977).

Πίνακας 2.3. *Επίδραση της αιθανόλης στα κύτταρα των ζυμομυκήτων.*

Φυσιολογική λειτουργία	***Επίδραση της αιθανόλης***
Βιωσιμότητα και ανάπτυξη	Γενική αναστολή της ανάπτυξης, της διαίρεσης και της βιωσιμότητας Ελάττωση του κυτταρικού όγκου Μορφολογικές μετατροπές Ενίσχυση του θερμικού θανάτου
Μεταβολισμός και βιοσύνθεση μακρομορίων	Μετουσίωση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και γλυκολυτικών ενζύμων Χαμηλότερος ρυθμός της συσσώρευσης του RNA και των πρωτεϊνών Σύνθεση των πρωτεϊνών του θερμικού στρες Αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου Έναρξη σύνθεσης του κυτοχρώματος P450
Μεμβρανική δομή και λειτουργία	Τροποποίηση σύστασης λιπαρών οξέων και στερολών Λιπόλυση κυτταρικών φωσφολιπιδίων Αυξημένη ιονική διαπερατότητα Αναστολή της πρόσληψης θρεπτικών Αναστολή της H-ATPάσης και απώλεια της κινητήριας δύναμης πρωτονίου

Νεότερες μελέτες (Hallsworth 1998) αναφέρουν ότι η αιθανόλη προκαλεί στρες επειδή ελαττώνει την ενεργότητα νερού (Hodgman et al., 1944; Perry et al., 1963; Jones et al., 1986, Guerzoni et al., 1994): συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με ενυδατωμένα κυτταρικά συστατικά διαταράσσοντας την δομή της μεμβράνης και τα ένζυμα, τα οποία επηρεάζονται

αρνητικά από την μειωμένη διαθεσιμότητα νερού και την διαταραχή των δεσμών υδρογόνου (Nelson et al., 1928; Brown et al., 1990; Israelachvili et al., 1996; Griffin et al., 1977). Επίσης, αλληλεπιδρά με το διαμεμβρανικό νερό και διαταράσσει τους υδρόφοβους VDW δεσμούς λιπιδίου-λιπιδίου (Slater et al, 1993), ελαττώνοντας την θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης των λιπιδιακών διπλοστοιβάδων οπότε αυξάνεται η ρευστότητα της (Jain et al., 1977). Μερικές φορές προκαλεί και κυτταρική λύση (Kollar et al., 1993; Breddam et al., 1991). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η αιθανόλη εμποδίζει την ανάπτυξη του κυττάρου, ελαττώνοντας το ενδοκυτταρικό pH (Van Uden et al., 1985; Salgueiro et al., 1988; Cartwright et al., 1987). Μια μελέτη των Millar et al. έδειξε ότι η αιθανόλη μετουσιώνει τα γλυκολυτικά ένζυμα. Στα υδρόφιλα ένζυμα σε 10- 15% w/v αιθανόλη, που ισοδυναμεί με ενεργότητα 0,953-0,925 (συνθήκες όπου αναστέλλεται η ανάπτυξη και/ ή μεταβολική ενεργότητα) παρατηρείται 50% ελάττωση της ενζυμικής δραστικότητας (Scopes et al .,1989). Όσον αφορά τα υδρόφοβα συστατικά της ζύμης η αιθανόλη μπορεί να έχει και σε αυτά αρνητικές επιπτώσεις αλλά η κύρια αιτία της αναστολής της ανάπτυξης αποδίδεται στην αλληλεπίδραση της με τα υδρόφιλα συστατικά του κυττάρου, (για συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες από 5%w/v) (Carlsen et al., 1991). Κάποιες φορές η τοξικότητα της αιθανόλης έχει αποδοθεί στην επίδραση που ασκεί ο προκάτοχος της, η ακεταλδεύδη, η οποία είναι πιο θανατηφόρα για τον μεταβολισμό της ζύμης (Stanley et al., 1993).

Γενικά, υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης επιδρούν αρνητικά στις πρωτεΐνες, τις διπλοστοιβάδες των φωσφολιπιδίων και τα υπόλοιπα ενυδατωμένα κυτταρικά συστατικά περιορίζοντας την ανάπτυξη και την μεταβολική δραστηριότητα (Stewart et al., 1988, Van Uden et al., 1989, Rose et al., 1993), αλλά ακόμα και μικρές συγκεντρώσεις αιθανόλης (5 -10% w/v) προκαλούν σημαντική ελάττωση στην ενεργότητα νερού. Ακόμα και όταν το διαθέσιμο νερό του υγρού μέσου είναι 90% (w/w) μεγάλες συγκεντρώσεις χαμηλού ΜΒ ουσιών μπορεί να παρεμποδίσουν την κυτταρική ανάπτυξη (Ferro Fontan et al., 1981). Η ιδανική ενεργότητα για την ανάπτυξη του *S. cerevisiae*, είναι 0,975-0,999, ενώ η ενεργότητα που αποτελεί το όριο ανάπτυξης για τα περισσότερα στελέχη του *S. cerevisiae* είναι 0.92, η οποία αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αιθανόλης 15.9% w/v. Μόνο σε ειδικές περιπτώσεις μπορεί ορισμένα στελέχη του *S. cerevisiae* να αναπτυχθούν σε συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 15% w/v (Jones et al., 1986).

Όπως αναφέρθηκε τα κύτταρα των ζυμομυκήτων αποκρίνονται στην αιθανόλη είτε τροποποιώντας την σύσταση της μεμβράνης τους, όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 είτε συνθέτοντας κάποιους διαλύτες συμβατούς με την λειτουργία της μεμβράνης, την ενζυμική δραστικότητα και τον μεταβολισμό, τους '**συμβατούς διαλύτες'** (Brown et al., 1972). Τα κύτταρα ζύμης συσσωρεύουν πολυόλες όπως γλυκερίνη, αμινοξέα (π.χ. προλίνη) και/ή τον δισακχαρίτη τρεχαλόζη (Brown et al., 1990, Jennings et al., 1990). Ο *S. cerevisiae* από τις πολυόλες συσσωρεύει μόνο γλυκερόλη (Brown et al., 1990, Carpenter et al., 1988). Η μαννιτόλη είναι αναποτελεσματική λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας ή/και το υψηλό MB (Chirife et al., 1984). Αντίθετα, η τρεχαλόζη έχει προστατευτική επίδραση στις διπλοστοιβάδες, τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και τα υδρόφιλα ένζυμα (Carpenter et al., 1988, Crowe et al., 1984, Colaco et al., 1992, Crowe et al., 1984, Crowe et al., 1988). Η τρεχαλόζη είναι πιο αποτελεσματική στην αφυδάτωση (Carpenter et al., 1988, Crowe et al., 1984, Colaco et al., 1992, Crowe et al., 1984). Στον *S. cerevisiae* η γλυκερόλη παράγεται ως απόκριση σε υψηλές εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις αλατιού και ζάχαρης (Brown et al., 1972), αλλά κατά τη διάρκεια συσσώρευσης της αιθανόλης (Bandas et al., 1985; Schuchmanet et al., 1988; Johanson et al., 1984), ενώ αυτή που παράγεται ως απόκριση στο ωσμωτικό στρες δεν έχει προστατευτικό ρόλο (Thomas et al., 1994) αλλά ο ρόλος της είναι σημαντικός για την προσαρμογή των κυττάρων σε χαμηλές τιμές ενεργότητας (Albertyn et al., 1994). Σε αντίθεση με την τρεχαλόζη, η γλυκερόλη μπορεί να διαχέεται μέσω των λιπιδικών διπλοστοιβάδων και δεν απαιτείται μεταφορέας για να παρασχεθεί προστασία και στις δύο πλευρές της κυτταρικής μεμβράνης. Η ακινητοποίηση (immobilization) των κυττάρων ζύμης σε αδρανή υλικά ή υδρόφιλα πολυμερή έχει συσχετισθεί με υψηλές συγκεντρώσεις τρεχαλόζης και με αυξημένη ανοχή στην αιθανόλη (Dror et al., 1988). Στην ανοχή των κυττάρων στην αιθανόλη, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν και τα ιόντα Mg^{2+} τα οποία διατηρούν υψηλή τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Walker, 1997; Jones & Greenfield, 1987).

Σε μια μελέτη των Thomas et al., (1978) βρέθηκε ότι κύτταρα που αναπτύχθηκαν αναερόβια σε ρυθμιστικό διάλυμα αιθανόλης με pH 4.5 ήταν πιο ανθεκτικά στην αιθανόλη όταν οι πλασματικές τους μεμβράνες εμπλουτίστηκαν με λινολεϊκά παρά με ελαϊκά κατάλοιπα ανεξάρτητα από την φύση της στερόλης. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αυξάνουν την ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης, και συνεπώς και την ανθεκτικότητα της στην αιθανόλη. Γι' αυτό και ο *S. cerevisiae* του οποίου η πλασματική μεμβράνη περιέχει πολύ-

ακόρεστα λιπαρά έχει μεγάλη ικανότητα να διαχειρίζεται τα εισερχόμενα μόρια αιθανόλης (Thomas et al., 1978).

Πίνακας 2.4. *Απόκριση των ζυμομυκήτων στο στρες της αιθανόλης μέσω τροποποίησης της σύστασης της μεμβράνης τους.*

- Ελάττωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων της μεμβράνης (πχ παλμιτικό)
- Αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων της μεμβράνης (πχ ελαϊκό)
- Επιτάχυνση της βιοσύνθεσης του σκουαλενίου και της εργοστερόλης
- Αύξηση των φωσφολιπιδίων (πχ αυξημένη βιοσύνθεση φωσφατιδυλοινοσιτόλης)
- Αυξημένη ενεργότητα της μιτοχονδριακής υπεροξυ-δισμουτάσης
- Αυξημένα στα επίπεδα της κυτταρικής τρεχαλόζης
- Βιοσύνθεση των πρωτεϊνών του στρες
- Αυξημένη σύνθεση του κυτοχρώματος P450 και αυξημένος μεταβολισμός αιθανόλης

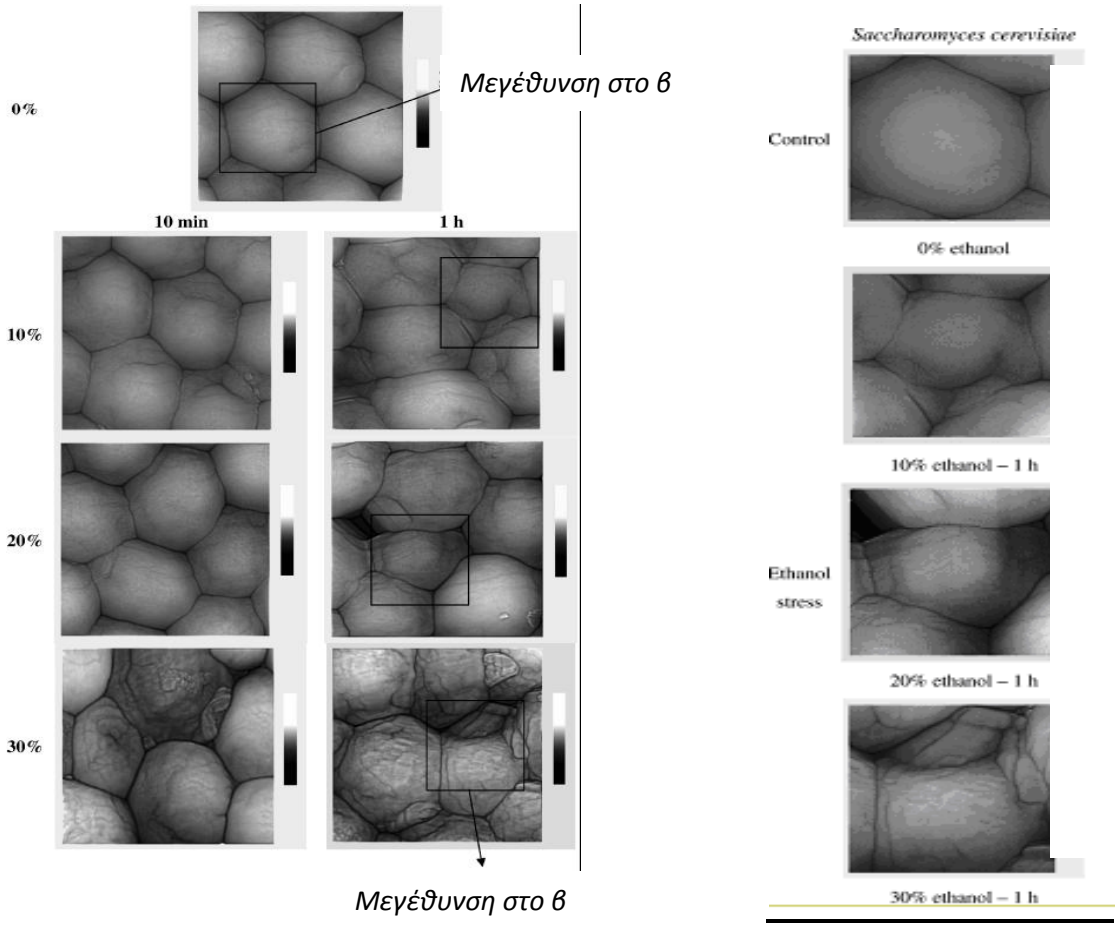
Στο σχήμα 2.9 φαίνονται κύτταρα του *S. Cerevisiae* μετά από έκθεση τους σε διαλύματα αιθανόλης συγκέντρωσης 10%, 20% και 30% για 10 min έως 1 ώρα. Επίπεδα αιθανόλης μεγαλύτερα από 4-6% v/v μπορεί να ελαττώσουν την βιωσιμότητα των κυττάρων, την μεταβολική δραστικότητα και σε ακραίες καταστάσεις να προκαλέσουν θάνατο. Παραμονή των κυττάρων για 30 min σε 10% αιθανόλη ελάττωσε λίγο την βιωσιμότητα στο 96% και μετά από 1 ώρα στο 91%. Σε 20% v/v αιθανόλη η βιωσιμότητα στα πρώτα 30min ήταν υψηλή (95%), αλλά μετά από 1 ώρα ελαττώθηκε στο 80%. Σε 30% v/v αιθανόλη για 10 min η βιωσιμότητα ήταν 9% και μετά από 1 ώρα 0%. Επιπλέον, συγκεντρώσεις αιθανόλης >10% v/v δεν ελαττώνουν μόνο την βιωσιμότητα των κυττάρων, αλλά αυξάνουν και την ρευστότητα της μεμβράνης, οδηγώντας σε κατάρρευση της δομής της (Canetta et al., 2006).

2.4.7. *Οξειδωτικό στρες*

Πρόκειται για το στρες που υφίστανται τα κύτταρα, κυρίως κατά την αερόβια ανάπτυξη, το οποίο οφείλεται στις ενεργές μορφές οξυγόνου, όπως τα ιόντα υπεροξειδίου ($O^{\cdot-}_2$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τη ρίζα υδροξυλίου. Αυτές οι μορφές οξυγόνου καταστρέφουν τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Τα κύτταρα παράγουν διάφορα αντιοξειδωτικά και

ένζυμα για να προστατευτούν από το οξειδωτικό στρες. Η γλουταθειόνη είναι ένα θειολικό συστατικό που παίζει ρόλο- κλειδί στην προστασία τους αφού δεσμεύει τις ρίζες οξυγόνου. Αλλά αντιοξειδωτικά είναι οι μεταλλοθειονίνες και μια σειρά ενζύμων: υπεροξυσωμιακές και κυτοπλασματικές καταλάσες, μιτοχονδριακές και κυτοπλασματικές υπερόξυ-δισμουτάσες και υπεροξειδάσες (Walker, 1997).

Ο πίνακας 8 του παραρτήματος συνοψίζει τις βασικές αποκρίσεις των ζυμομυκήτων στο στρες.



Σχήμα 2.9. *Κύτταρα του S. cerevisiae μετά από έκθεση τους σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 10%, 20% και 30% v/v α) για 10 min έως 1h και β) για 1 h. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μη εκτεθειμένα σε αιθανόλη. Δραματική αλλαγή τόσο στο σχήμα όσο και την μορφολογία των κυττάρων παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα παρέμειναν για 1 ώρα σε 30% αιθανόλη. Το μέγεθος κάθε εικόνας είναι α) 10 μm x 10 μm και η κλίμακα είναι 0-3.5 μm και β) 5 μm x 5 μm και η κλίμακα είναι 0-3 μm (Canetta et al., 2006).*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

Η απελευθέρωση & η σταθερότητα ενθυλακωμένων μορίων

3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την συγκράτηση ενός ενθυλακωμένου συστατικού στο μέσο ενθυλάκωσης

Το ποσοστό της συγκράτησης και κατά συνέπεια το ποσοστό προστασίας ενός διατρόφο-δραστικού συστατικού στο μέσο ενθυλάκωσης εξαρτάται από φυσικοχημικούς παράγοντες που αφορούν τόσο το ίδιο το συστατικό όσο και τον τρόπο αλληλεπίδρασης του με το μέσο εγκλεισμού (Goubet et al., 1998).

Α) Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ενθυλακωμένης ουσίας που επηρεάζουν την συγκράτησή της στο μέσο ενθυλάκωσης

- ΜΒ και στερεοχημική διάταξη:

Όσο πιο μεγάλο είναι το ΜΒ του συστατικού τόσο καλύτερη η συγκράτηση του, διότι ελαττώνεται ο ρυθμός διάχυσής του. Πολύ σημαντικό είναι και το σχήμα του προς εγκλεισμό συστατικού, διότι μπορεί καθορίζει την επιφάνεια επαφής με το μέσο ενθυλάκωσης και την ισχύ του δεσμού με αυτή.

- Οι λειτουργικές ομάδες

Στους υδατάνθρακες οι ενώσεις που συγκρατούνται καλύτερα είναι οι αλκοόλες. Ακολουθούν οι κετόνες, οι οποίες έχουν παρόμοια συγκράτηση με τους εστέρες και τελευταία τα οξέα τα οποία έχουν πολύ μικρή συγκράτηση, ανεξαρτήτως του μέσου εγκλεισμού. Η συγκράτηση των αλδεϋδών γενικά είναι μικρή. Εάν ένα μόριο έχει περισσότερες από μια λειτουργικές ομάδες, πρέπει να ληφθεί υπόψη και η πολικότητα του.

- Πολικότητα

Η πολικότητα του προς ενθυλάκωση συστατικού πρέπει να ληφθεί υπόψη για την επιτυχία της ενθυλάκωσης και τη σταθερότητά της σχηματιζόμενης κάψουλας.

- Σχετική πτητικότητα

Αφορά αρωματικά συστατικά: όσο πιο μεγάλη είναι η πτητικότητά τους τόσο μικρότερη είναι η συγκράτησή τους στο μέσο ενθυλάκωσης.

Β) Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μέσου ενθυλάκωσης που επηρεάζουν τη συγκράτηση της ενθυλακωμένης ουσίας

- MB

Στις μαλτοδεξτρίνες όσο μικρότερο είναι το ισοδύναμο δεξτρόζης και όσο μεγαλύτερο το μέσο MB, τόσα περισσότερα πτητικά εγκλείονται. Γενικά μεγάλο MB του μέσου ενθυλάκωσης ελαττώνει τη διάχυση του συστατικού στη μήτρα.

- Διαμόρφωση

Αφορά κυρίως τις μαλτοδεξτρίνες και τις β-κυκλοδεξτρίνες, όπου στη χαμηλή συγκράτηση εμπλέκονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις VDW. Άλλες δυνάμεις, όπως δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αλλαγές στην ενέργεια διαμόρφωσης, μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην ικανότητα συγκράτησης αυτών των μέσων εγκλεισμού.

- Λειτουργικές ομάδες

Επηρεάζουν το ιξώδες (viscosity): το μεγάλο ιξώδες προκαλεί μεγαλύτερη συγκράτηση του ενθυλακωμένου συστατικού. Επίσης, οι λειτουργικές ομάδες του μέσου ενθυλάκωσης θα καθορίσουν τις γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες του και την ικανότητά του να εγκλείει πτητικά συστατικά (Goubet et al., 1998).

- Η φυσική κατάσταση του μέσου ενθυλάκωσης

- *άμορφη φάση* (*amorphous state*)*:* οι υδατάνθρακες μπορεί να βρίσκονται στην άμορφη ή την κρυσταλλική κατάσταση. Όταν η μήτρα έχει αφυδατωθεί γρήγορα και υπάρχει χαμηλή ενεργότητα νερού (π.χ. μετά από λυοφιλίωση) τότε βρίσκονται στην υαλώδη φάση (glassy state). Εδώ υπάρχει πολύ μικρή κινητικότητα των μορίων, οπότε και συμβαίνει απελευθέρωση μέσω των πόρων της μήτρας. Το ποσοστό του πτητικού που απελευθερώνεται εξαρτάται από την σύσταση της μήτρας, το μέγεθος των πόρων και την πυκνότητα γύρω από τα εγκλεισμένα μόρια. Όταν το περιεχόμενο νερό αυξάνει, το μέσο ενθυλάκωσης μεταβαίνει από την στερεή glassy στην ελαστική κατάσταση (*liquid- like*

rubbery state), στην οποία οι δεσμοί υδρογόνου εξασθενούν και η μοριακή κινητικότητα αυξάνεται, όπου μπορούν να συμβούν και περιστροφικές κινήσεις των μορίων της μήτρας. Η θερμοκρασία που συμβαίνει αυτή η μετάπτωση από την glassy state στην rubbery ονομάζεται **θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g**, (glass transition temperature), είναι ενδεικτική του βαθμού μοριακής κινητικότητας ενός άμορφου υλικού και εξαρτάται από την σύσταση του. Η T_g στους άμορφους υδατάνθρακες ελαττώνεται καθώς αυξάνει η ενεργότητα νερού (Goubet et al., 1998; Ubbink and Kruger, 2006) και μπορεί να συμβεί κατάρρευση (collapse), εάν το ιξώδες μειωθεί πολύ. Εάν συμβεί αυτό χάνεται το πορώδες και μειώνεται η διάχυση διαμέσου της μήτρας. Ορισμένες φορές η κατάρρευση μπορεί να οδηγήσει σε επανένθυλάκωση του αρωματικού συστατικού.

- *κρυσταλλική φάση (crystalline state):* η μετατροπή από την υαλώδη στην κρυσταλλική φάση προκαλεί απώλεια των πτητικών συστατικών. Η κρυστάλλωση απαιτεί θερμοκρασία μεγαλύτερη της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης. Συμβαίνει όταν το ιξώδες είναι χαμηλό και τα πολυμερή έχουν αρκετή κινητικότητα για να συνδεθούν και να σχηματίσουν κρυσταλλικούς δεσμούς. Στην κρυσταλλική φάση αυξάνεται η απελευθέρωση των ενθυλακωμένων συστατικών.

Συμπερασματικά, η άμορφη φάση είναι η πιο αποτελεσματική για την συγκράτηση πτητικών συστατικών, η collapse φάση οδηγεί σε απώλειες συστατικών, και η κρυσταλλική φάση προκαλεί την απελευθέρωση των εγκλεισμένων συστατικών (Goubet et al., 1998).

3.2. Απελευθέρωση του ενθυλακωμένου συστατικού από το μέσο ενθυλάκωσης

Η απελευθέρωση ενός ενθυλακωμένου συστατικού από το μέσο ενθυλάκωσης μπορεί να γίνει με τους ακόλουθους τρόπους (Madene et al., 2006; Gibbs et al., 1999):

- διάχυση: είναι ο βασικός μηχανισμός στην ελεγχόμενη απελευθέρωση. Βασικά βήματα είναι: η διάχυση του ενεργού συστατικού στην επιφάνεια του μέσου ενθυλάκωσης, η κατανομή του συστατικού μεταξύ μέσου εγκλεισμού- περιβάλλοντος τροφίμου και η μεταφορά του εκτός του μέσου εγκλεισμού.
- πίεση: το συστατικό απελευθερώνεται λόγω εφαρμογής πίεσης στα τοιχώματα της μικροκάψουλας ή λόγω ωσμωτικής πίεσης στο εσωτερικό της μικροκάψουλας.
- διόγκωση: λόγω απορρόφησης υγρού το μέσο εγκλεισμού διογκώνεται και το συστατικό διαχέεται προς τα έξω. Ο βαθμός διόγκωσης επηρεάζεται από την παρουσία διαλυτών, όπως γλυκερίνη ή προπυλενική γλυκερόλη.

- διάλυση σε διαλύτη: π.χ. η προσθήκη νερού σε ξηρά αφεψήματα.
- τήξη: τήκεται το τοίχωμα της κάψουλας και απελευθερώνεται το ενεργό συστατικό.
- αλλαγή της τιμής του pH: το συστατικό απελευθερώνεται σε συγκεκριμένη τιμή pH. Ιδιαίτερη εφαρμογή βρίσκει στην κοσμετολογία, όπου επιλέγονται κατάλληλα μέσα ώστε η απελευθέρωση να γίνεται στο pH του δέρματος.

Ο όρος '**ελεγχόμενη απελευθέρωση'** αναφέρεται στο ότι 1 ή περισσότερα ενεργά συστατικά γίνονται διαθέσιμα σε επιθυμητό τόπο και χρόνο και με συγκεκριμένο ρυθμό με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι απώλειες που θα μπορούσαν να συμβούν κατά το μαγείρεμα ή την επεξεργασία ή κατά την αντίδραση των συστατικών μεταξύ τους (Madene et al., 2006 ;Gibbs et al., 1999).

3.3. Η απελευθέρωση ενθυλακωμένου συστατικού σε γαστρικό υγρό

Η πέψη των τροφών στο στομάχι είναι απαραίτητη για να μελετηθεί η βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο γαστρεντερικό σύστημα και για να επιτευχθεί ελεγχόμενη απελευθέρωση. Το στομάχι επιτελεί 3 βασικές λειτουργίες: την αποθήκευση, την ανάμιξη και το άδειασμα της τροφής και αποτελείται από 4 βασικά τμήματα: 1) fundus, 2) body, 3) antrum, 4) pylorus. Τα πρώτα τμήματα του (το body & fundus) είναι υπεύθυνα για την εκκένωση των υγρών, ενώ το antrum είναι υπεύθυνο για την άλεση και την εκκένωση της στερεάς τροφής. Το μέγεθος των σωματιδίων του τροφίμου που εκκενώνονται είναι λιγότερο από 1 έως 2 mm. Το γαστρικό υγρό περιέχει γαστρικό οξύ, χολικά άλατα και τα ένζυμα της πέψης (Kong and Singh 2008).

Η πέψη μπορεί να θεωρηθεί ως μια διαδικασία 2 βημάτων: διάσπαση και διάλυση. Η διάσπαση υποδηλώνει πόσο γρήγορα ένα τμήμα τροφής διασπάται σε μικρά κομματάκια έτσι ώστε ένα οποιοδήποτε ενθυλακωμένο θρεπτικό συστατικό να απελευθερωθεί, ενώ η διάλυση δείχνει πόσο γρήγορα τα θρεπτικά συστατικά μπορούν να διαλυθούν για να απορροφηθούν.

Το στομάχι μπορεί να δεχθεί φαγητό έως και 4 λίτρα. Σε περιόδους νηστείας ο όγκος του γαστρικού υγρού είναι πολύ μικρός, περίπου 25 ml (Maltby et al., 1986; Lydon et al., 1999). Η πέψη τροφίμου, ακόμα και μιας κάψουλας, προκαλεί έκκριση του γαστρικού υγρού. Το στομάχι εκκρίνει 2-3 l γαστρικού υγρού/ημέρα. Στις φαρμακοκινητικές μελέτες ο όγκος

ανέρχεται περίπου στα 200-250 ml με ταχύτητα έκκρισης 1 ml/min (Dubois et al., 1977). Έτσι σε 1 ώρα (που είναι ο μέγιστος χρόνος όπου μια γρήγορα απελευθερωμένη ουσία θα εγκαταλείψει το στομάχι) αναμένεται όγκος γαστρικού υγρού 50 ml (Kostewicz et al., 2002). Ο ρυθμός έκκρισης μπορεί να αυξηθεί από 1 ml/min σε περίοδο νηστείας σε 10-50ml/min αμέσως μετά την κατανάλωση τροφής. Αύξηση της ποσότητας του τροφίμου, την περιεχόμενης πρωτεΐνης και του ιξώδους της τροφής αυξάνει την έκκριση.

Το γαστρικό υγρό περιέχει 0,8 έως 1 mg/ml πεψίνη και περίπου 1,5 mg/ml μυκίνη. Αν ληφθεί υπόψη ο όγκος στο στομάχι σε περίοδο νηστείας 25 ml (Maltby et al., 1986; Lydon et al., 1999) στο άδειο στομάχι η ποσότητα της πεψίνης θα είναι περίπου 20 mg. Η λήψη ακόμα και ενός ποτηριού νερού (περίπου 200-250 ml) θα ελαττώσει την συγκέντρωση της πεψίνης την στιγμή της κατανάλωσης σε 0,08 mg/ml. Η γαστρική λιπάση, βρίσκεται σε ποσότητα περίπου 0,1 mg/ml (Carrierre et al., 2000). Τα επίπεδα των χολικών αλάτων βρέθηκαν σε συγκέντρωση 80 μM αμέσως μετά την κατανάλωση τροφής (Rhodes et al., 1969). Αυτή η συγκέντρωση είναι τουλάχιστον δυο φορές μικρότερη απ' ότι στο λεπτό έντερο. Η επιφανειακή τάση του γαστρικού υγρού έχει βρεθεί 36-51 mN/m (Efentakis et al., 1998). Η χαμηλή αυτή τιμή δεν αποδίδεται αποκλειστικά στις συγκεντρώσεις των χολικών αλάτων, αλλά και της φωσφατίδυλοχολίνης. Τα βασικά κατιόντα στο γαστρικό υγρό είναι το νάτριο (περίπου 70 mM) και το κάλιο (περίπου 15 mM), ενώ το κυρίαρχο ανιόν είναι το χλώριο (περίπου 100 mM).

Σε φυσιολογικές συνθήκες το ενδογαστρικό pH είναι 1,3 έως 2,5 (Efentakis et al., 1998, Schmint et al., 1970, Lambert et al., 1968). Το φαγητό μπορεί να αυξήσει το pH από 4,5 έως 5,8 (Efentakis et al., 1998), ενώ μετά από 1 h από την κατανάλωση τροφής, το pH του στομάχου ελαττώνεται σε λιγότερο από 3,1. Η σύσταση και η ποσότητα του τροφίμου καθώς και το pH του παίζουν σημαντικό ρόλο στον χρόνο που απαιτείται για να επανέλθουν τα επίπεδα του pH. Ένα υδατικό διάλυμα το οποίο αποτελείται από 0,1 N HCl (ή pH 1,2) χρησιμοποιείται συχνά για να προσομοιάσει το γαστρικό μέσο, με ταχύτητα ανάδευσης 50 έως 100 rpm.

Για την μελέτη της απελευθέρωσης και της πέψης στο στομάχι ενός συστατικού υπάρχουν 2 είδη μοντέλων: **στατικά και δυναμικά**. Τα στατικά μοντέλα δεν μιμούνται τις φυσιολογικές συνθήκες που συμβαίνουν *in vivo*, όπως την αλλαγή του pH και τις περισταλτικές κινήσεις και σπάνια λαμβάνουν υπόψη τη δομή και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της τροφής. Σε αυτό το μοντέλο το ομογενοποιημένο τρόφιμο υδρολύεται σε pH 1,5 για 1 έως 2 ώρες, με ανάμιξη

στους 37°C. Αντίθετα το δυναμικό μοντέλο προσομοιάζει τις αλλαγές του pH, της θερμοκρασίας, των περισταλτικών κινήσεων και την έκκριση των ενζύμων πέψης, των χολικών και παγκρεατικών χυμών. Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση ενθυλακωμένων συστατικών στο γαστρικό υγρό είναι το pH, τα επιφάνειοδραστικά, τα χολικά, η κινητικότητα, η ιονική ισχύς (Kong and Singh, 2008).

- ***Παράγοντες που επηρεάζουν την γαστρική εκκένωση*:**

Τα υγρά γεύματα αδειάζουν από το στομάχι με κινητική πρώτης τάξης, όπου η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη με τον όγκο που υπάρχει στο στομάχι. Ο ρυθμός εκκένωσης τους μετά την κατανάλωση ενός γεύματος, είναι 10-40 ml/min, ακολουθούμενος από έναν πιο αργό ρυθμό εκκένωσης 2-4 ml/min. Ο χρόνος ημίσειας ζωής, $t_{½}$, όπου το 50% του γεύματος εκκενώνεται, ποικίλλει από 10-60 min. Ο ρυθμός εκκένωσης των στερεών, ακολουθεί ένα διφασικό πρότυπο: μια φάση υστέρησης κατά τη διάρκεια της οποίας συμβαίνει ελάχιστη εκκένωση, ακολουθούμενη από μια γραμμική φάση εκκένωσης όπου τα στερεά σωματίδια εγκαταλείπουν το στομάχι με κινητική μηδενικής τάξης. Το στομάχι αδειάζει τελείως τα στερεά μετά από 3-4 ώρες.

- *Σύσταση τροφίμου*: Ο χρόνος παραμονής των συστατικών στο στομάχι είναι διαφορετικός: το νερό μένει 30 λεπτά, οι υδατάνθρακες 1-2 ώρες, οι πρωτεΐνες 2-3 ώρες και τα λιπαρά 4-5 ώρες. Υγρά 1 kcal/ml εκκενώνονται με ρυθμό περίπου 2-2.5 ml/min, ενώ υγρά 0.2 kcal/ml με ρυθμό 10 ml/min. Ο μέσος $t_{1/2}$ για την εκκένωση γευμάτων που αποτελούνται από κρέας, λαχανικά και αφεψήματα είναι 277, 146 και 77 min για 1692, 900 και 300 γρ. γεύματος αντίστοιχα. Η ταυτόχρονη κατανάλωση στερεών – υγρών τροφών καθυστερεί την εκκένωση του υγρού και αντιστρόφως.
- *Ιξώδες τροφίμου*: η αύξηση του ιξώδους ενός υγρού γεύματος ή η προσθήκη διαλυτών ινών, όπως η πηκτίνη, το κόμμι γκουάρ κ.α. καθυστερούν την εκκένωση.
- *Φυσικές ιδιότητες τροφίμου*: κομμάτια τροφής μεγάλου μεγέθους και πυκνότητας χρειάζονται περισσότερο χρόνο για την εκκένωση. Επίσης τα μαλακά σωματίδια εκκενώνονται γρηγορότερα σε σχέση με τα πιο σκληρά.
- *Επεξεργασία τροφίμου*: Η επεξεργασία της τροφής κατά την παρασκευή ή το μαγείρεμα τροποποιεί τις φυσικοχημικές ιδιότητες του τροφίμου, και συνεπώς επηρεάζει την απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών από το τρόφιμο. Επίσης η θερμική

επεξεργασία μπορεί να επηρεάσει την πέψη των πρωτεϊνών, του αμύλου, του λίπους, των βιταμινών κ.α. (Kong and Singh, 2008).

- *Βιολογικοί παράγοντες*, όπως η ηλικία, η μυϊκή μάζα, οι ορμόνες, τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος, το στρές και η απόγνωση καθώς και ασθένειες επηρεάζουν την γαστρική εκκένωση.

3.4. Σταθερότητα των ενθυλακωμένων συστατικών στις συνθήκες του περιβάλλοντος

Τα οφέλη των διατρόφο-δραστικών συστατικών επιτυγχάνονται εάν (1) το προϊόν την στιγμή που καταναλώνεται είναι οργανοληπτικά αποδεκτό και (2) η βιοδραστική ουσία είναι παρούσα στην απαραίτητη συγκέντρωση. Το χρονικό διάστημα μετά από την παραγωγή όπου ένα προϊόν παραμένει αποδεκτό στον καταναλωτή από άποψη ποιότητας ή ασφάλειας είναι γνωστό ως **χρόνος ζωής του προϊόντος στο ράφι.** Ένα προϊόν μπορεί να μειώσει το χρόνο ζωής του στο ράφι με διάφορους τρόπους. 1) λόγω μικροβιακής αλλοίωσης, 2) λόγω φυσικών αλλαγών, ή 3) λόγω χημικών αντιδράσεων που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης. Οι παραγωγοί των τροφίμων πρέπει να ξέρουν το ποσό του συστατικού που παραμένει στο προϊόν μετά από την επεξεργασία, τη διανομή, και την αποθήκευση του, να το υποβάλουν δηλαδή σε δοκιμές σταθερότητας. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι να προσδιοριστεί η βιοενεργός ουσία που υπάρχει στο τρόφιμο. Μετά, απαιτείται μια αναλυτική μέθοδος με μεγάλη ακρίβεια για τον προσδιορισμό της. Ακολουθεί κινητική μελέτη κάτω υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, παρουσίας οξυγόνου ή συνυπαρχόντων συστατικών και γίνεται πρόβλεψη της ζωής του προϊόντος στο ράφι (Benson, 1960; Labuza and Karnman, 1983).

Οι χημικές αντιδράσεις αποτελούνται από αντιδρώντα που μετατρέπονται σε προϊόντα:

$$aA \rightarrow bB$$

Η απώλεια του αντιδρώντος Α ή η συσσώρευση του προϊόντος *B* οδηγεί στην ελάττωση του χρόνου ζωής του προϊόντος στο ράφι. Ο χρόνος για να επιτευχθεί 50% μείωση της αρχικής συγκέντρωσης αντιδρώντος είναι γνωστός ως ***χρόνος ημιζωής του προϊόντος***. Ο χρόνος ημιζωής, $t_{1/2}$, μιας αντίδρασης ψευδό-μηδενικής-τάξης υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$t_{1/2} = [A]_0/2k_{obs}$$

όπου η σταθερά ταχύτητας k_{obs} προσδιορίζεται από την γραμμική κλίση του διαγράμματος στο οποίο η συγκέντρωση του αντιδρώντος, *[A],* παριστάνεται συναρτήσει του χρόνου.

Η κινητική εξίσωση ψευδό-πρώτης-τάξης για την απώλεια του αντιδρώντος λαμβάνει τη μορφή:

$$-d[A]/dt = k_{obs}[A]^1 = k_{obs}[A]$$

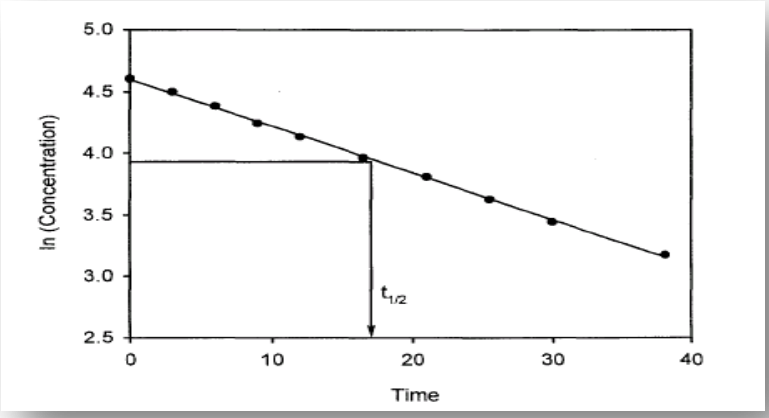
που μπορεί να γραφτεί και ως :

$$ln([A]/[A]_0) = -k_{obs}t$$

όπου $[A]_0$ είναι η αρχική συγκέντρωση αντιδρώντος και [A] είναι η συγκέντρωση του σε χρόνο t. Η σταθερά ταχύτητας της ψευδό-πρώτης-τάξης, K_{obs}, καθορίζεται από την κλίση του διαγράμματος στο οποίο ο φυσικός λογάριθμος της συγκέντρωσης του αντιδρώντος παριστάνεται συναρτήσει του χρόνου. Ο χρόνος ημιζωής, $t_{1/2}$, μιας αντίδρασης ψευδό-πρώτης-τάξης υπολογίζεται ως εξής:

$$t_{1/2} = 0.693/k_{obs}$$

Ο χρόνος ημιζωής είναι ανεξάρτητος από την αρχική συγκέντρωση αντιδρώντος για τις ψευδό-πρώτης-τάξης αντιδράσεις, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις ψευδό-μηδενικής-τάξης.



Σχήμα 3.1. *Παράδειγμα ενός διαγράμματος κινητικής ψευδό-πρώτης τάξης. Η κλίση ισοδυναμεί με την σταθερά ταχύτητας της ψευδό-πρώτης τάξης. Προσδιορίζεται ο χρόνος ημιζωής, $t_{1/2}$, της αντίδρασης.*

3.4.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα της κάψουλας

Η θερμοκρασία έχει δραματική επίδραση στην ταχύτητα μιας χημικής αντίδρασης. Η αρχική επίδραση της θερμοκρασίας είναι στη σταθερά ταχύτητας, αν και άλλες δευτερεύουσες επιδράσεις μπορεί να υπάρξουν (π.χ. αλλαγές στη ενεργότητα ύδατος, στην τήξη των λιπιδίων, στις μεταπτώσεις υαλώδους- ελαστικής φάσης). Γενικά η αποικοδόμηση των προϊόντων αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Εάν προσδιοριστεί η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά ταχύτητας μιας χημικής αντίδρασης, μπορούν να γίνουν προβλέψεις και σε άλλες θερμοκρασίες.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στις χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν σε ένα ενεργό συστατικό (ενθυλακωμένο ή μη) ακολουθεί γενικά τη σχέση Arrhenius:

$$k_{obs} = (A)\ exp(-E_a/RT)$$

όπου *A* είναι ο προ-εκθετικός παράγοντας, E_α είναι η ενέργεια ενεργοποίησης Arrhenius, *R* είναι η παγκόσμια σταθερά αερίων, και *T* είναι θερμοκρασία σε Kelvin (Levine, 1988). Χρησιμοποιώντας την τιμή 8.314 J/(mol*K) για την παγκόσμια σταθερά αερίων, η ενέργεια ενεργοποίησης εκφράζεται σε μονάδες J/mol. Εάν σχεδιαστεί το διάγραμμα του φυσικού λογαρίθμου της σταθεράς ταχύτητας μιας ψευδό-τάξης συναρτήσει της απόλυτης θερμοκρασίας παράγεται μια ευθεία γραμμή με κλίση $-E_\alpha/R$ και τεταγμένη επί της αρχής ln(A). Με αυτές τις πληροφορίες, οι σταθερές ταχύτητας σε οποιαδήποτε άλλη θερμοκρασία μπορούν να υπολογιστούν. Μια άλλη προσέγγιση για την μοντελοποίηση της επίδρασης θερμοκρασίας στις χημικές αντιδράσεις είναι με τον υπολογισμό των τιμών του Q_{10} (Labuza et al., 1983). Το Q_{10} είναι ο λόγος της σταθεράς ταχύτητας σε μια θερμοκρασία προς την σταθερά ταχύτητας 10^oC χαμηλότερα. Ένας άλλος ορισμός του Q_{10} είναι ο λόγος του χρόνου ζωής του προϊόντος στο ράφι σε μια θερμοκρασία προς μια θερμοκρασία 10^oC υψηλότερη. Το Q_{10} υπολογίζεται από το διάγραμμα του χρόνου ζωής του προϊόντος στο ράφι, όπου ο φυσικός λογάριθμος του χρόνου ζωής του προϊόντος στο ράφι (ή του χρόνου ημιζωής) παριστάνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας σε βαθμούς Κελσίου. Το Q_{10} προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας την απόλυτη τιμή της κλίσης, *β*:

$$Q_{10} = exp(|0|b||)$$

Η σχέση μεταξύ της τιμής του Q_{10} και της ενέργειας ενεργοποίησης Arrhenius παρουσιάζεται στην ακόλουθη εξίσωση (Labuza et al., 1983):

$$Ln\ (Q10) = 10E_a/RT(T + 10)$$

3.4.2. Επίδραση της υγρασίας στη σταθερότητα της κάψουλας

Η περιεκτικότητα σε υγρασία και η ενεργότητα ύδατος είναι σημαντικές για την σταθερότητα των προϊόντων, ειδικά των στερεών (Labuza, 1980; Rockland and Stewart, 1981). Γενικά, η σταθερότητα των τροφίμων σχετίζεται καλύτερα με την ενεργότητα ύδατος *(α_W)*, η οποία ορίζεται ως:

$$a_w = p/p_0$$

όπου *το p* είναι η μερική πίεση της τάσης των ατμών του νερού στο προϊόν σε μια δεδομένη θερμοκρασία και *το* p_0 είναι η μερική πίεση του καθαρού ύδατος στην ίδια θερμοκρασία. Η ενεργότητα ύδατος καθορίζει τη μεταφορά υγρασίας μεταξύ προϊόντος και περιβάλλοντος μέχρι αποκατάστασης της ισορροπίας. Η σχέση μεταξύ της ενεργότητας νερού και της περιεκτικότητας σε υγρασία μιας ουσίας παρουσιάζεται μέσω των ισόθερμων ρόφησης.

Η σταθερότητα των στερεών προϊόντων γενικά μειώνεται καθώς αυξάνεται η ενεργότητα νερού, επειδή αυξάνεται η κινητικότητα των αντιδρώντων. Συχνά σε μια ενδιάμεση τιμή ενεργότητας υπάρχει ένα ελάχιστο σταθερότητας ενώ σε μεγαλύτερες ενεργότητες η σταθερότητα μπορεί να αυξηθεί επειδή το αντιδρών διαλύεται και μειώνεται η πιθανότητα της μοριακής σύγκρουσης και επομένως και δραστικότητας. Ένα διάγραμμα του δεκαδικού λογαρίθμου της ζωής του προϊόντος συναρτήσει της ενεργότητας ύδατος δίνει συχνά μια ευθεία γραμμή. Από την κλίση, *B,* η τιμή *του* Q_A μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$Q_A = 10^{0.1|B|}$$

Παρόμοια με την τιμή του Q_{10}, το Q_A είναι ο λόγος του χρόνου ζωής του προϊόντος στο ράφι σε μια ενεργότητα νερού προς το χρόνο ζωής σε μια ενεργότητα 0.1 μονάδες υψηλότερη.

Ένας πρόσθετος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι η θερμοκρασία επηρεάζει την ενεργότητα ύδατος των τροφίμων. Από την συλλογή δεδομένων από ισόθερμες ρόφησης υγρασίας σε διαφορετικές θερμοκρασίες, η εξίσωση Clausius- Clapeyron, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί η ενεργότητα νερού σε μια συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε υγρασία για την νέα θερμοκρασία:

$$ln(a_{w2}/a_{w1}) = -(Q_s/R)(1/T_2 - 1/T_1)$$

Στην ανωτέρω εξίσωση, *το* Q_s είναι η υπερβολική θερμότητα της προσρόφησης και *το R* είναι η ιδανική σταθερά αερίων. Το διάγραμμα του φυσικού λογαρίθμου της ενεργότητας ύδατος συναρτήσει της θερμοκρασίας σε Kelvin παράγει μια ευθεία γραμμή, από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η ενεργότητα ύδατος σε άλλες θερμοκρασίες.

Η υγρασία εμπλέκεται επίσης στα άμορφα στερεά (Roos et al., 1995). Η μετατροπή ενός άμορφου στερεού από την υαλώδη φάση στην πιο ελαστική rubbery φάση (γνωστή ως *μετάπτωση υάλου*), ενισχύεται είτε με την αύξηση της θερμοκρασίας είτε με την προσρόφηση υγρασίας. Η μετάπτωση αυτή μπορεί να προωθήσει π.χ. την ανεπιθύμητη κρυστάλλωση των σακχάρων, την ελάττωση της τραγανότητας των προϊόντων αρτοποιίας, ενώ η κατάλληλη συσκευασία για να αποτρέψει την πρόσληψη υγρασίας.

3.4.3. Επίδραση του οξυγόνου στη σταθερότητα της κάψουλας

Πολλά διατρόφοδραστικά συστατικά είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο. Για την οξείδωση των λιπιδίων, η επίδραση του οξυγόνου στον ρυθμό της οξείδωσης, *R,* έχει εκφραστεί ως:

$$1/R= (1/k1)\{ l + ([O_2]/k2)\}$$

όπου K_1 και K_2 είναι σταθερές ταχύτητας και $[O_2]$ είναι η συγκέντρωση του οξυγόνου. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, ο ρυθμός οξείδωσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση οξυγόνου. Πάνω από μια κρίσιμη συγκέντρωση οξυγόνου, ο ρυθμός γίνεται ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση οξυγόνου. Η επιλογή της κατάλληλης συσκευασίας, η χρήση αντιοξειδωτικών ή η τεχνική της ενθυλάκωσης βοηθούν στην επέκταση της ζωής του προϊόντος στο ράφι (Fennema, 1996).

3.4.4. Επίδραση άλλων συστατικών στη σταθερότητα της κάψουλας

Τα ενεργά συστατικά ακόμα και αν βρίσκονται ενθυλακωμένα, έρχονται μετά την απελευθέρωση τους σε επαφή με συστατικά του τροφίμου. Τα τρόφιμα συχνά περιέχουν ουσίες που μπορεί να έχουν δραματική επίδραση στην σταθερότητα του ενεργού συστατικού. Εάν το ενεργό συστατικό περιέχει αμίνες ή καρβονύλια, μπορεί να αποικοδομηθεί μέσω της αντίδρασης Maillard. Η παρουσία μεταλλικών στοιχείων, μπορεί να επηρεάσει την σταθερότητα του: Η οξείδωση λιπιδίων καταλύεται από την παρουσία μεταλλικών στοιχείων

(π.χ., σίδηρος, χαλκός), η οποία οδηγεί σε παραγωγή δυσάρεστων αρωμάτων. Τα ρυθμιστικά άλατα που προστίθενται συχνά στα τρόφιμα για έλεγχο του pH, μπορεί να επηρεάζουν την χημική δραστικότητα.

3.4.5. Επιταχυνόμενη δοκιμή του χρόνου ζωής ενός προϊόντος στο ράφι

Αν και το ιδανικό είναι να μελετηθεί η χημική σταθερότητα ενός προϊόντος σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις πραγματικές, λόγω περιορισμών χρόνου ή κόστους μπορούν να εφαρμοστούν επιταχυνόμενες δοκιμές για την πρόβλεψη της σταθερότητας του. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται ακραίες συνθήκες οι οποίες μπορεί *να περιλαμβάνουν υψηλές θερμοκρασίες και/ή υψηλές ενεργότητες ύδατος*. Το μειονέκτημα είναι ότι υπάρχει ο κίνδυνος των λανθασμένων αποτελεσμάτων. Η υπό- ή υπερεκτίμηση του χρόνου ζωής, μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στις αλλαγές στην ενεργότητα νερού, το pH, και τη διαλυτότητα των αντιδρώντων συναρτήσει της θερμοκρασίας. Επιπλέον, οι θερμικές μεταπτώσεις (π.χ. μεταπτώσεις υάλου και τήξη λιπιδίων) και οι ανταγωνιστικές χημικές αντιδράσεις μπορούν να επηρεάσουν τις προβλέψεις. Γι’ αυτό για την εκτίμηση του χρόνου ζωής του προϊόντος στο ράφι θα πρέπει κατά’ αρχήν να χρησιμοποιηθεί η αντίδραση εκείνη που είναι κρίσιμη για την απώλεια του συστατικού κάτω υπό τυπικές συνθήκες αποθήκευσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

Η κουρκουμίνη



4.1. Εισαγωγή

Το τουρμέρικ (turmeric) είναι ένα μπαχαρικό που ευρέως χρησιμοποιείται στην Ινδία και προέρχεται από το φυτό *Curcuma Longa*. Ανήκει στην οικογένεια των ginger και καλλιεργείται κυρίως στην νότια Ασία, την Κίνα και άλλες τροπικές χώρες. Στην Αγγλία και σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες κυκλοφορεί με την ονομασία 'Ινδικό σαφράν' και στην Ελλάδα ως 'κιτρινόριζα, κουρκούμι ή κουρκουμάς' (Ravindran, 2006).

Στην αρχαία Ινδία το τουρμέρικ χρησιμοποιούταν για την ίαση χολικών διαταραχών, ανορεξίας, κρυολογημάτων, διαβητικών πληγών, ηπατικών διαταραχών, ρευματισμών και ιγμορίτιδας. Χρησιμοποιούταν επίσης για να θεραπεύσει οδοντικές παθήσεις, διαταραχές της πέψης, καθώς και για τον περιορισμό των παραισθησιογόνων επιδράσεων από ψυχότροπες ναρκωτικές ουσίες (Tilak et al., 2004). Σήμερα αυτοκόλλητα με τουρμέρικ χρησιμοποιούνται για την ίαση μολύνσεων του ματιού και την επούλωση πληγών, τσιμπημάτων, εγκαυμάτων,

ακμής και διαφόρων δερματικών παθήσεων (Hatcher et al., 2008). Η Αμερικάνικη φαρμακευτική εταιρία *Johnson & Johnson* κατασκευάζει ταινίες πρώτων βοηθειών από τουρμέρικ για την ινδική αγορά (MacGrecor et al., 2006). Στην βόρεια Ινδία οι γυναίκες μετά τη γέννα πίνουν ένα ποτήρι ζεστό γάλα με τουρμέρικ, τζίντζερ και μέλι, δυο φορές την ημέρα. Ένα δερματικό προϊόν επίσης από τουρμέρικ εφαρμόζεται στο περιτόναιο για τη θεραπεία τυχών τραυμάτων από τη γέννα (Pandeya et al 2005). Σκόνη τουρμέρικ σε βρασμένο γάλα χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του κρυολογήματος και των αναπνευστικών προβλημάτων, ενώ ψημένο τουρμέρικ χρησιμοποιείται και για την αντιμετώπιση της δυσεντερίας στα παιδιά (Thakur et al., 1989).

Το πιο δραστικό συστατικό του turmeric είναι η κουρκουμίνη, που αποτελεί το 2-5% του μπαχαρικού και η οποία απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό το 1815. Στην βιομηχανία τροφίμων η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται ως φυσική κίτρινη χρωστική (αποτελεί το E100), καθώς και ως ενισχυτικό γεύσης σε μουστάρδα και κάρυ (Tilak et al., 2004; Shishodia et al., 2005). Ως χρωστική βρίσκει εφαρμογή στο τυρί, τα μπαχαρικά, την μουστάρδα, τα δημητριακά, ψάρια, προϊόντα κρέατος, σάλτσες, αφεψήματα, τα κόρν φλέικ, σε σούπες, παγωτά και γιαούρτι και μπορεί να αντικαταστήσει τις τεχνητές χρωστικές. Μια από τις βασικές της εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων είναι στα εμπορικά ζελεδάκια (Calvo and Salvador 2000) όπου βελτιώνει την σταθερότητα τους. Τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα της κουρκουμίνης στα τρόφιμα είναι από 5 έως 500 mg/Kg. Ως εμπορικά διαθέσιμο προϊόν η κουρκουμίνη κυκλοφορεί σε μορφή ταμπλετών (Healthspan, 2005), πηκτών (ζελέ) (iherb.com, 2005), κάψουλων (Sahelian 2005) και επιδερμικού φιλμ (Purohit et al., 2002). Στο μαγείρεμα, η κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι είναι πολύ αποτελεσματική ενάντια στις ετεροκυκλικές αμίνες που σχηματίζονται κατά το μαγείρεμα τροφίμων που είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και θεωρούνται πιθανά καρκινογόνα συστατικά (Shishu, 2008).

Πέρα από την χρήση της ως μπαχαρικό και χρωστική παρατεταμένες μελέτες τα τελευταία 50 χρόνια απέδειξαν ότι η κουρκουμίνη μπορεί να βοηθήσει στην θεραπεία πολλών ασθενειών οι οποίες συνοψίζονται στο σχήμα 4.1.

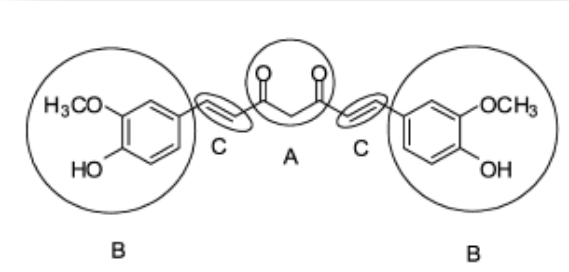


Σχήμα 4.1. *Θεραπευτικές δράσεις της κουρκουμίνης (Pari et al., 2008).*

Η κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι καταστέλλει τη μετάλλαξη, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των όγκων στο δέρμα, το συκώτι, τον πνεύμονα, το έντερο και το στήθος. Προστατεύει επίσης από τις ασθένειες του δέρματος (σκληρόδερμα, ψωρίαση, καρκίνο του δέρματος), έχει νευροπροστατευτικές δράσεις και ρυθμίζει τα ένζυμα κύκλο- και λίπο-οξυγενάσες (COX και LOX) (εξαιτίας αυτού του μηχανισμού η κουρκουμίνη εμποδίζει μια σειρά ασθενειών, περιλαμβανομένου και του καρκίνου). Η κουρκουμίνη ελαττώνει την χοληστερόλη του αίματος και παρεμποδίζει την οξείδωση της LDL (Pari et al., 2008**;** Rao et al.,1970; Patil and Shrinivasan, 1971; Keshavarz 1976; Soni and Kuttan, 1992; Husain and Chandrasekhara, 1992; Asai and Miyazawa, 2001; Naidu and Thippeswamy, 2002; Soudamini et al., 1992; Ramirez-Tortosa, et al., 1999; Patro et al., 2002; Anand et al., 2008; Braga et al., 2003; Jayaprakasha et al., 2005). Καταστέλλει επίσης την αθηροσκλήρωση (Srivastava et al., 1986; Srivastava et al., 1995), τη θρόμβωση (Srivastava et al., 1985) και τη μυοκαρδιακή απόφραξη (myocardial infraction, MI) (Dikshit et al.,1995; Nirmala and Puvanakrishnan 1996; Venkatesan 1998) καθώς και τα συμπτώματα που σχετίζονται με τον διαβήτη τύπου II (Srinivasan 1972; Babu and Srinivasan, 1995, 1997; Arun and Nalini, 2002), τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Deodhar et al., 1980), την πολλαπλή σκλήρωση (multiple sclerosis,MS) (Natarajan and Bright 2002) και τη νόσο του Alzheimer (Frautschy et al.,2001; Lim et al., 2001). Επίσης παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό του ιού της ανοσοανεπάρκειας (HIV) (Jordan and Drew, 1996; Barthelemy 1998; Li et al., 1993; Mazumder et al.,1997; Sui et al.,1993), ενισχύει την επούλωση πληγών (Phan et al., 2001; Shahed et al., 2001; Sidhu et al., 1998) και προστατεύει το συκώτι

(Morikawa et al., 2002), αναστέλλει τον σχηματισμό καταρράκτη (Awasthi et al., 1996) και την τοξικότητα και ίνωση των πνευμόνων (Venkatesan et al., 1997; Venkatesan and Chandrakasan, 1995; Venkatesan 2000).

4.2. Χημικές ιδιότητες κουρκουμίνης



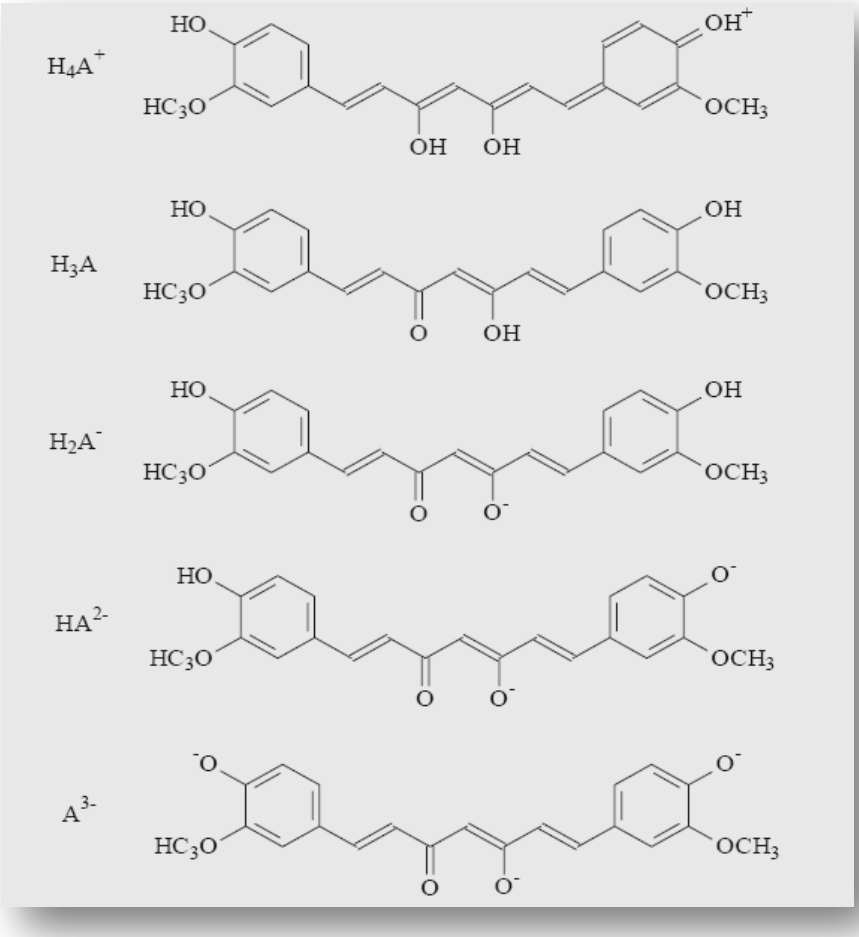
Σχήμα 4.2*. Το μόριο της κουρκουμίνης και τμήματα του: α) β- δικετόνη ή κετόνη- ενόλη, β) φαινολικοί δακτύλιοι, γ) τμήμα αλκενίου.*

Η κουρκουμίνη απομονώθηκε πρώτα το 1815, και σε κρυσταλλική μορφή το 1870, και αναγνωρίστηκε ως 1,7-δι-(4-υδρόξυ-3-μεθόξυφαινυλ)-επτά- 1,6-διεν-3,5-διόνη ή δι-φερουλόυλ-μεθάνιο (σχήμα 4.2). Είναι μια κίτρινο- πορτοκαλί σκόνη, με σημείο τήξης 183^{o}C, μοριακό τύπο $C_{21}H_{20}O_6$ και ΜΒ 368.37 g/mol. Είναι σχεδόν αδιάλυτη στο νερό (0,6 μg/ml), αλλά διαλύεται εύκολα στην ακετόνη, το διμέθυλοσουλφοξείδιο και σε άλλους οργανικούς διαλύτες (~1mg/ml) με την ακόλουθη σειρά: οξικός αιθυλεστέρας> μεθανόλη> αιθανόλη> ισοπροπανόλη > βενζόλιο> εξάνιο. Η διαλυτότητα της στην αιθανόλη είναι περίπου 1g στα 250 ml και στην ακετόνη 1g στα 20 ml (Aziz et al., 2007). Στην περιοχή του ορατού η κουρκουμίνη απορροφά: σε μεθανολικό διάλυμα έχει μέγιστο απορρόφησης στα 430 nm και το διάλυμα σε ακετόνη στα 415-420 nm. Ο φθορισμός της εμφανίζεται με μια ευρεία κορυφή με μέγιστο στα 524 nm στο ακετονιτρίλιο ή στα 549 nm στην αιθανόλη (Aggarwal et al., 2006).

Η κουρκουμίνη μπορεί να παραχθεί και με χημική σύνθεση (Lampe and Milobedzka, 1913; Pabon, 1964), αλλά οι οδηγίες του JECFA δεν επιτρέπουν στη συνθετική κουρκουμίνη να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο των τροφίμων. Από το τουρμέρικ παραλαμβάνεται με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη: το φυτό αλέθεται σε σκόνη και εκχυλίζεται με τον οργανικό διαλύτη. Μετά την απόσταξη του διαλύτη προκύπτει μια ολεορητίνη με περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη 25-35% μαζί με πτητικά συστατικά και άλλα ρητινοειδή εκχυλίσματα. Η ολεορητίνη υφίσταται επιπλέον εκπλύσεις με εκλεκτικούς διαλύτες, και έτσι παράγεται μια σκόνη, γνωστή ως

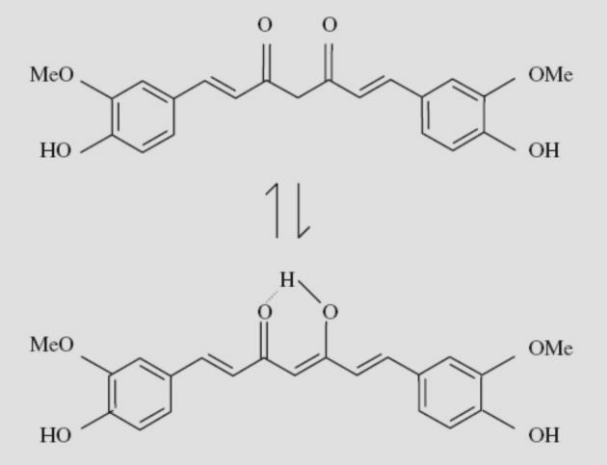
κουρκουμίνη, με περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 90% σε κουρκουμίνη. Η European Commission Directive 95/45/EC αναγνωρίζει τους εξής διαλύτες ως κατάλληλους για την εκχύλιση της: ακετόνη, διοξείδιο του άνθρακα, οξικός αιθυλεστέρας, διχλωρομεθάνιο, βουτανόλη, μεθανόλη, αιθανόλη και εξάνιο (Curcumin, CTA, FAO 2004).

Πέρα από το νερό η κουρκουμίνη είναι πρακτικά αδιάλυτη και στο όξινο και το ουδέτερο pH, αλλά η διαλυτότητά της αυξάνεται στο αλκαλικό pH. Σε pH <1 τα υδατικά διαλύματα της έχουν κόκκινο χρώμα και η κουρκουμίνη βρίσκεται στην πρωτονιωμένη μορφή (H_4A^+), όπως φαίνεται στο σχήμα 4.3. Σε pH 1-7 η κουρκουμίνη βρίσκεται στην ουδέτερη μορφή (H_3A) και σε αυτό το εύρος pH τα διαλύματα της είναι κίτρινα και η υδατοδιαλυτότητά της πολύ μικρή. Σε pH> 7,5 το χρώμα της γίνεται κόκκινο και ενώ σε αυτό το pH η υδατοδιαλυτότητα της είναι ενισχυμένη, αποικοδομείται πιο εύκολα. Βέβαια η σταθερότητά της σε υδατικά διαλύματα με πολύ υψηλά pH (>11,7) βελτιώνεται. Οι τιμές pKa για την διάσταση των τριών όξινων πρωτονίων (μορφές H_2A^-, HA_2^- και A_3^-) έχουν υπολογιστεί σε 7.8, 8.5 και 9.0, αντίστοιχα (Aggarwal et al., 2003; Bernabe-Pineda et al., 2004; Wang et al., 1997).



Σχήμα 4.3. *Η χημική διάσταση της κουρκουμίνης.*

Η κουρκουμίνη είναι μια δι-α,β- ακόρεστη β-δικετόνη και βρίσκεται σε ισορροπία με τα ενολικά ταυτομερή της, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.4. Η δι-κετονική μορφή της κυριαρχεί σε όξινα και ουδέτερα υδατικά διαλύματα και σε pH 3-7 η κουρκουμίνη δρα κυρίως ως δότης ατόμων Η. Αυτό συμβαίνει γιατί στην κετονική μορφή της, ο επταδιενοϊκός σύνδεσμος ανάμεσα στους δυο μεθόξυ-φαινολικούς δακτυλίους περιέχει ένα ιδιαίτερα δραστικό άτομο άνθρακα και οι δεσμοί C-H αυτού του άνθρακα είναι πολύ ασθενείς, λόγω απεντοπισμού των ελεύθερων ηλεκτρονίων των γειτονικών οξυγόνων. Αντίθετα σε pH>8 κυριαρχεί η ενολική μορφή και η κουρκουμίνη δρά κυρίως ως δέκτης ατόμων Η, ένας πιο τυπικός μηχανισμός για την αντιοξειδωτική της ικανότητα (Sharma et al., 2005).



Σχήμα 4.4. *Ταυτομέρεια της κουρκουμίνης σε φυσιολογικές συνθήκες. Σε όξινες και ουδέτερες συνθήκες, η δι-κετονική μορφή (πάνω) κυριαρχεί, ενώ η ενολική μορφή βρίσκεται σε pH >8 .*

Το τουρμέρικ εκτός από την κουρκουμίνη περιέχει και άλλες χημικές ουσίες, γνωστές σαν 'κουρκουμινοειδή (curcuminoids)': σε αυτά περιλαμβάνονται η κουρκουμίνη, η διμεθόξυ-κουρκουμίνη (κουρκουμίνη II, demethoxycurcumin), η δις-διμεθόξυκουρκουμίνη (κουρκουμίνη III, bis-demethoxycurcumin) και η προσφάτως ευρεθείσα κύκλο-κουρκουμίνη (Goel et al.,2008; Kiuchi et al., 1993). Τα βασικά συστατικά της εμπορικής κουρκουμίνης είναι η κουρκουμίνη I (~77%) η κουρκουμίνη II (~17%) και η κουρκουμίνη III (~3%).

4.3. Αντιοξειδωτικές-Αντικαρκινικές ιδιότητες της κουρκουμίνης: Συσχέτιση δομής-δραστικότητας

Η *αντιοξειδωτική δραστικότητα* της κουρκουμίνης έχει προσδιοριστεί με αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Σε *in vitro* μεθόδους βρέθηκε ότι παρεμποδίζει κατά 97.3% την λιπιδική υπεροξείδωση του λινολενικού οξέος σε συγκέντρωση 15 μg/ml (20 mM). Χρησιμοποιώντας BHA, BHT, α-τοκοφερόλη και trolox ως πρότυπα αντιοξειδωτικά η κουρκουμίνη ανέστειλε κατά 95.4, 99.7, 84.6 and 95.6% αντίστοιχα, την υπεροξείδωση του λινολενικού οξέος σε συγκέντρωση 45 μg/ml. Επιπλέον η κουρκουμίνη δεσμεύει αποτελεσματικά το DPPH, το ABTS, το DMPD, την ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου κ.α. (Tuba and Gulcin, 2008). Η κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι είναι τουλάχιστον δέκα φορές πιο δραστική, ως αντιοξειδωτικό, ακόμα και από την βιταμίνη Ε (Reddy and Lokesh, 1992) και είναι πιο αποτελεσματική στο να παρεμποδίζει τον σχηματισμό υπεροξειδίων συγκριτικά με το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT (Majeed et al., 2000). Αυτή η δραστικότητα της αποδίδεται στο φαινύλιο, την μεθόξυ-ομάδα του φαινυλίου καθώς και στο 1,3- δικετονικό σύστημα. Έχει βρεθεί, επίσης, ότι η αντιοξειδωτική δραστικότητα της κουρκουμίνης αυξάνεται όταν η ομάδα του φαινυλίου και η μεθόξυ- ομάδα βρίσκονται σε όρθο- θέση. Άρα τα φαινολικά ΟΗ είναι υπεύθυνα για την ικανότητα της κουρκουμίνης και σχετικών αναλόγων της να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, και η παρουσία της όρθο-μεθόξυ ομάδας (ή γενικά ορθοαλκόξυ- ομάδας) αυξάνει περαιτέρω την δραστικότητα της με πιθανή και κάποια συνεισφορά του β-δικετονικού τμήματος. Η κουρκουμίνη μπορεί να παρουσιάσει και προ-οξειδωτικές ιδιότητες, για τις οποίες οφείλονται τα ίδια δομικά τμήματά της (Aggarwal et al., 2002). Στα τρόφιμα η αντιοξειδωτική ικανότητα της κουρκουμίνης μπορεί να παρεμποδίσει την τάγγιση τους και να βοηθήσει στην παραγωγή τροφίμων που περιέχουν λιγότερο οξειδωμένο λίπος ή ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον η κουρκουμίνη δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες με το να γίνεται ασθενής ελεύθερη ρίζα η ίδια, η οποία όμως είναι μη-δραστική και μικρής διάρκειας (Majeed et al., 2000).

Όσον αφορά τις *αντικαρκινικές της ιδιότητες* έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί: αναστολή του ROI, καταστολή της φλεγμονής, ρύθμιση του ODC, αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αναστολή των ισοενζύμων του κυτοχρώματος P450, καταστολή ογκογονιδίων, των παραγόντων NF-kB και AP-1, του COX2, αναστολή των εμπλεκόμενων στον κύκλο του

κυττάρου πρωτεϊνών (PCNA, cyclin E, p34 cdc2), αναστολή της οξείδωσης των βάσεων του DNA, της μαλόνδυαλδεύδης (MDA), ενεργοποίηση της γλουταθειόνης S-τρανσφεράσης (GST) κλπ. (Aggarwal et al., 2002). Η παρουσία -OH στην ο-θέση στους αρωματικούς δακτυλίους και η δραστικότητα της β-δικετόνης ήταν βασικά στην ενεργοποίηση των Φάσης II detoxification ενζύμων, ενώ το δικετονικό τμήμα στο μόριο της κουρκουμίνης είναι βασικό στην ικανότητα της να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού (Venkatesan et al., 2000). Παράγωγα της κουρκουμίνης που περιέχουν α,β-ακόρεστο κετονικό τμήμα, παρουσιάζουν καλύτερη αντικαρκινική δράση από την κουρκουμίνη, που περιέχει 1,3–δικετονικό τμήμα. Συμπερασματικά, η ελάττωση του συνδέσμου C7 σε C5, καταλήγει σε συστατικά τα οποία είναι πιο δραστικά από την κουρκουμίνη, με την προϋπόθεση ότι οι υποκαταστάτες του φαινολικού δακτυλίου θα είναι εκτεθειμένοι. Αλκόξυ- και υδρόξυ- υποκαταστάτες ενισχύουν την δραστικότητα, και η παρουσία ακορεστότητας και μιας όξο- ομάδας είναι επιθυμητή.

Οι Dubey et al. 2007 συνέθεσαν τους μονοεστέρες της κουρκουμίνης (μια συμμετρική διφαινόλη με βαλίνη και γλυκίνη) και τους διεστέρες της με βαλίνη, γλουταμικό οξύ και διμεθυλιωμένο πιπερικό οξύ. Βρέθηκε ότι οι διεστέρες της είναι σχετικά πιο ενεργοί λόγω της αυξημένης τους διαλυτότητας, του αργού του μεταβολισμού, της καλύτερης βιοδιαθεσιμότητας και της επιβράδυνσης του μεταβολισμού λόγω της ‘ κάλυψης’ των ελεύθερων φαινολών. Οι μονοεστέρες της κουρκουμίνης παρουσίασαν καλύτερη αντιμικροβιακή δραστικότητα απ’ ότι οι διεστέρες, εξαιτίας των ελεύθερων φαινολικών ομάδων. Η ενίσχυση της αντιμικροβιακής δραστικότητας μπορεί να οφείλεται στην ‘κάλυψη’ των φαινολικών υδροξυλίων ή στην αυξημένη διαλυτότητα του μονοεστέρα.

Τέλος, η κουρκουμίνη έχει και *αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες* για τις οποίες οφείλεται το υδρόξυ-φαινολικό τμήμα της και ειδικά η παρουσία 4-υδρόξυ- φαινυλίου. Η παρουσία μικρών αλκυλικών ή μεθόξυ – ομάδων στις γειτονικές θέσεις 3 και 5 του αρωματικού δακτυλίου φαίνεται να ενισχύουν περαιτέρω την αντιφλεγμονώδη δραστικότητα της κουρκουμίνης ή των αναλόγων της (Anand et al., 2008).

4.4. Μελέτες που αφορούν τις θεραπευτικές ιδιότητες της κουρκουμίνης και την βιοδιαθεσιμότητα της

Η εύρεση των θεραπευτικών ιδιοτήτων της κουρκουμίνης προέκυψε από μια σειρά μελετών που ξεκίνησαν πριν από 50 περίπου χρόνια. Ο πίνακας 9 του παραρτήματος συνοψίζει τις μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα και ανθρώπους και αφορούν την βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης και τους μεταβολίτες της. Οι Lin et al., 2000, έδειξαν ότι η κουρκουμίνη μετατρέπεται πρώτα σε διύδροκουρκουμίνη (dihydrocurcumin) και τετραύδροκουρκουμίνη (tetrahydrocurcumin) και αυτά τα συστατικά στην συνέχεια μετατρέπονται σε συζευγμένα γλυκουρονίδια (glucuronides). Έτσι το γλυκουρονίδιο της κουρκουμίνης, το γλυκουρονίδιο της διύδροκουρκουμίνης, το γλυκουρονίδιο της τετραύδροκουρκουμίνης και η τετραύδροκουρκουμίνη είναι οι βασικοί μεταβολίτες της κουρκουμίνης στα ποντίκια. Οι Iresson et al., 2002 βρήκαν ότι οι βασικοί μεταβολίτες της κουρκουμίνης σε ηπατοκύτταρα ανθρώπου ή ποντικού είναι η εξαύδροκουρκουμίνη και η εξαύδροκουρκουμινόλη. Στο πλάσμα οι βασικοί μεταβολίτες της είναι το γλυκουρονίδιο της κουρκουμίνης και η θειική κουρκουμίνη, ενώ σε μικρό ποσοστό βρέθηκε η εξαύδροκουρκουμίνη, η εξαύδροκουρκουμινόλη και το γλυκουρονίδιο της εξαύδροκουρκουμίνης. Οι Shoba et al., 1998 βρήκαν ότι η κουρκουμίνη έχει μικρή βιοδιαθεσιμότητα λόγω του γρήγορου μεταβολισμού της στο συκώτι και το τοίχωμα του εντέρου. Η πιπερίνη ενισχύει την συσσώρευση της κουρκουμίνης στον ορό του αίματος και τη βιοδιαθεσιμότητα της χωρίς παρενέργειες. Οι Kumar et al., 2002 ενθυλάκωσαν την κουρκουμίνη σε βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή και πέτυχαν αργή απελευθέρωση, που διήρκεσε αρκετές ημέρες θεραπεύοντας πιο αποτελεσματικά την φλεγμονή.

Στον πίνακα 10 του παραρτήματος συνοψίζονται οι κλινικές μελέτες που έχουν γίνει για την κουρκουμίνη, ενώ στον πίνακα 11 αναφέρονται κλινικές μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη. Οι Deodar et al., (1980) σύγκριναν την αντιρρευματική δραστικότητα της κουρκουμίνης και της φαίνυλ-βουτανόλης: η κουρκουμίνη έχει καλή ανοχή, χωρίς παρενέργειες με συγκρίσιμη αντιρρευματική δραστικότητα. Στην μελέτη των Lal et al., (2000) παρουσιάστηκε βελτίωση στην φλεγμονή ίριδας μετά από χορήγηση 2 εβδομάδων, χωρίς παρενέργειες. Οι Satoskar et al, (1986) βρήκαν ότι η κουρκουμίνη παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση στους ασθενείς με μετεγχειρητική φλεγμονή, συγκρίσιμη με της φαίνυλβουτανόλης (100 mg) και καλύτερη από της λακτόζης. Στην μελέτη του Soni et al., (1992) απεδείχθη η προστατευτική δράση της

κουρκουμίνης στις αρτηριακές παθήσεις, καθώς ελαττώθηκαν τα επίπεδα των υπεροξειδίων των λιπιδίων (33%) αυξήθηκε η HDL χοληστερόλη (29%) και ελαττώθηκε η ολική χοληστερόλη του ορού (11,63%). Οι James et al., (1996) μελέτησαν τις αντί-ιικές ιδιότητες της κουρκουμίνης και βρέθηκε ότι αν και δεν είναι αξιοσημείωτες, οι ασθενείς παρουσίαζαν καλή ανοχή και αισθάνονταν καλύτερα. Οι Lal et al., (2000) βρήκαν ότι η κουρκουμίνη είναι αποτελεσματική και ασφαλής στη θεραπεία των ιδιοπαθών φλεγμονωδών ψευδο-όγκων. Ο Cheng et al., (2001) μελέτησε την τοξικότητα, την φαρμακόκινητική και την αποτελεσματική δόση σε ασθενείς με 1 από τους παρακάτω 5 κινδύνους: 1) πρόσφατα αφαιρούμενο καρκίνο της ουροδόχου κύστης, 2) ασθένεια Bowen's του δέρματος, 3) αυχενικό ενδοεπιθηλιακό νεόπλασμα (CIN), 4) στοματική λευκοπλακία, 5) εντερική μεταπλασία του στομάχου. Η κουρκουμίνη λαμβάνονταν από το στόμα για 3 μήνες, με αρχική δόση 500 mg/ ημέρα η οποία αυξανόταν σε 1000, 2000, 4000, 8000 ή 12000 mg/ημέρα εάν η τοξικότητα τύπου ΙΙ δεν παρουσιαζόταν σε τουλάχιστον 3 ασθενείς. Η αποβολή της κουρκουμίνης στα ούρα ήταν μη ανιχνεύσιμη. Απεδείχθη ότι η κουρκουμίνη δεν είναι τοξική σε συγκεντρώσεις έως 8000 mg/ημέρα, όταν λαμβάνεται από το στόμα για 3 μήνες. Στην μελέτη των Sharma et al., (2001) χορηγήθηκε κουρκουμίνη σε μορφή κάψουλας σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου που δεν δέχονταν τις κλασσικές χημειοθεραπείες. Απέδειξαν ότι: 1) το τουρμέρικ μπορεί να λαμβάνεται με ασφάλεια σε δόσεις έως 2.2 g/ημέρα (που περιέχουν 180 mg κουρκουμίνης) και 2) η κουρκουμίνη στον άνθρωπο έχει μικρή βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα και μπορεί να μεταβολιστεί στο έντερο. Οι Garcea et al., (2004), μελέτησαν εάν η λήψη δια του στόματος της κουρκουμίνης προκαλεί συγκέντρωση της στο κανονικό και με όγκο ανθρώπινο ήπαρ σε αρκετή ποσότητα ώστε να παρουσιαστεί φαρμακολογική δραστικότητα και προέκυψε ότι οι δόσεις κουρκουμίνης που απαιτούνται δεν είναι εφικτές στον άνθρωπο. Η ίδια επιστημονική ομάδα (Garcea et al., 2005) χορήγησε κάψουλες κουρκουμίνης σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Προέκυψε ότι μια καθημερινή δόση 3,6 g κουρκουμίνης είναι αποτελεσματική στο παχύ έντερο.

Από τις παραπάνω κλινικές μελέτες προκύπτουν και κάποια αποτελέσματα όσον αφορά τη μέγιστη επιτρεπόμενη ασφαλή δόση της. Ανέκδοτες αναφορές της κουρκουμίνης αναφέρουν ότι η διαιτητική πρόσληψη 150 mg κουρκουμίνης/ημέρα δεν έχει παρενέργειες στον άνθρωπο (Eigner et al., 1999). Συστηματικές προ-κλινικές μελέτες από το US Εθνικό Καρκινικό Ινστιτούτο έδειξαν ότι δεν υπήρχαν παρενέργειες σε αρουραίους, σκύλους ή πιθήκους που λάμβαναν 3.5 g/Kg σ.β. κουρκουμίνης για 3 μήνες (NCI, 1996). Στις πιο πρόσφατες προ-κλινικές μελέτες δεν

βρέθηκε τοξικότητα από την λήψη 2% διαιτητικά κουρκουμίνης (~ 1.2 g/Kg σ.β.) σε αρουραίους για 14 ημέρες (Sharma et al., 2001) ή από την λήψη 0.2% διαιτητικά κουρκουμίνης (~ 300 mg/Kg σ.β.) σε ποντίκια για 14 ημέρες (Perkins et al., 2002). Η χορήγηση 1.2-2.1 g κουρκουμίνης από το στόμα καθημερινά σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα στην Ινδία για 2-6 εβδομάδες δεν προκάλεσε παρενέργειες (Deodhar et al., 1980). Όμοια οι Cheng et al., 2001, χορήγησαν 8 γρ. κουρκουμίνης καθημερινά σε ασθενείς σε θανάσιμες συνθήκες και δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα. Σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου στο Ηνωμένο Βασίλειο, η κουρκουμίνη ήταν ανεκτή και σε δόσεις έως 3.6 g/ημέρα για 4 μήνες (Sharma et al., 2004). Αναφέρθηκαν μόνο 2 είδη παρενεργειών από την λήψη κουρκουμίνης: ένας ασθενής που λάμβανε 0.45 γρ. καθημερινά και ένας που λάμβανε 3.6 γρ καθημερινά παρουσίασαν διάρροια (HB Εθνικό Καρκινικό Ινστιτούτο, βαθμοί 1 ή 2) μετά από 1 μήνα και 4 μήνες, αντίστοιχα. Ένας ασθενής που λάμβανε 0.9 γρ. κουρκουμίνης καθημερινά παρουσίασε ναυτία (NCI τοξικότητα βαθμού 2) η οποία πέρασε αυθόρμητα παρά την συνέχιση της θεραπείας. Δυο ανωμαλίες εντοπίστηκαν στις εξετάσεις αίματος, που πιθανώς σχετίζονται με τη θεραπεία: 1) αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης ορού σε 4 ασθενείς, που συμφωνεί με την NCI βαθμού 1 τοξικότητα και 2) η γαλακτική αφυδρόγονάση του ορού αυξήθηκε κατά 150% σε 3 ασθενείς. Οι ανώμαλες αυτές τιμές πιθανότατα οφείλονται στην εξέλιξη της νόσου παρά στην τοξικότητα της θεραπείας (Sharma et al., 2005).

Η μέγιστη ημερήσια αποδεκτή δόση για την κουρκουμίνη είναι 0.1 mg/Kg σωματικού βάρους (FAO, 2000). Στα τρόφιμα επιτρέπεται να προστίθενται στα σνακ ως ενισχυτικό χρώματος σε ανώτατο όριο τα 200 ppm σύμφωνα με το Curcumin–INS:1001 standard by Codex (2001).

4.5. Μειονεκτήματα της κουρκουμίνης

Βασικά μειονεκτήματα της κουρκουμίνης είναι η σχεδόν ανύπαρκτη υδατοδιαλυτότητα της και η μικρή σχετικά *in vivo* βιοδιαθεσιμότητα. Όπως αναφέρθηκε, ήδη, η κουρκουμίνη έχει μικρή διαλυτότητα, αλλά μεγάλη σταθερότητα στο όξινο pH, ενώ στο ουδέτερο προς αλκαλικό pH, όπου αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητα της, είναι ασταθής. Στο όξινο pH η αυξημένη σταθερότητα πιθανόν να οφείλεται στην συζευγμένη δομή διενίου, ενώ σε ουδέτερο-βασικό pH, το πρωτόνιο αποχωρίζεται από την φαινολική ομάδα, οδηγώντας σε απώλεια αυτής της δομής. Μετά από παραμονή της για 30 min στους 37^{o}C, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1M pH 7.2 το 90% της κουρκουμίνης αποικοδομήθηκε. Το βασικό προϊόν αποικοδόμησής της

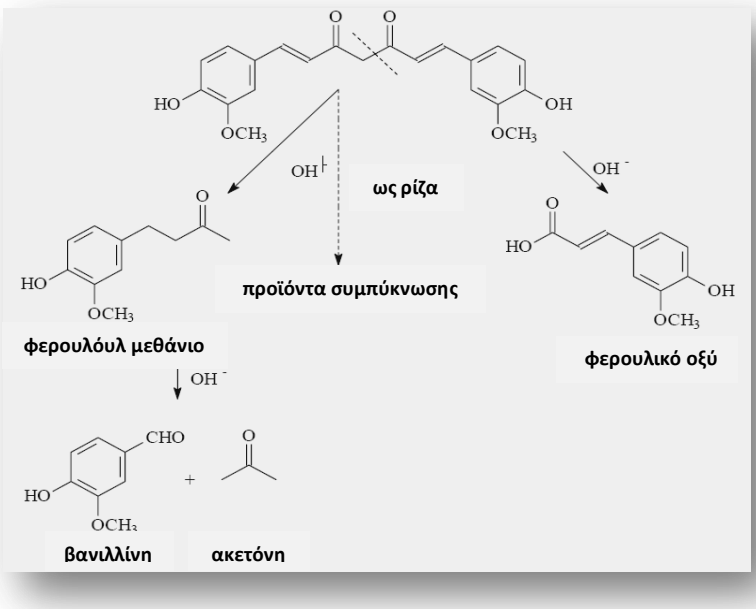
σε αλκαλικό pH είναι η trans-6-(4'- υδρόξυ- 3'- μεθόξυφαίνυλ)-2,4-διόξο-5-εξενάλη, και ως δευτερεύοντα προϊόντα το φερουλικό οξύ, το φερουλόυλ- μεθάνιο, η βανιλλίνη και η ακετόνη ως προϊόντα υδρόλυσης του φερουλόυλ-μεθανίου, ενώ με την πάροδο του χρόνου το ποσοστό της βανιλλίνης αυξάνεται (Lin et al., 2000; Tomren, Masson, Loftsson, & Tonnesen , 2007). Στο ανθρώπινο αίμα ή με την προσθήκη αντιοξειδωτικών όπως το ασκορβικό οξύ, ή με γλουταθειόνη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό η αποικοδόμηση της με λιγότερο από 20% να αποικοδομείται σε 1 ώρα (Wang et al., 1997; Oetari et al., 1996). Η κινητική της pH-εξαρτώμενης αποικοδόμησης της κουρκουμίνης σε υδατικά διαλύματα μελετήθηκε από τους Tonnesen & Karlsen, (1985). Στο στομάχι η αποικοδόμηση της κουρκουμίνης είναι εξαιρετικά αργή και ένας από τους βασικούς μεταβολίτες της κουρκουμίνης, η τετραυδρόξυκουρκουμίνη (THC) είναι σχετικά σταθερή σε ουδέτερο ή βασικό pH και εμφανίζει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Somparn et al., 2007; Pari and Murugan 2007).

Η ίδια ομάδα μελέτησε και την φωτοχημική σταθερότητα της κουρκουμίνης: σε αλκαλικό pH χάνει το χρώμα της και άρα σε υδατικά διαλύματα με pH > 7 η κουρκουμίνη δεν είναι κατάλληλη ως χρωστική. Η κουρκουμίνη είναι γενικά φωτοευαίσθητη και αποικοδομείται όταν εκτίθεται σε ακτινοβολία υπεριώδους/ορατού, τόσο όταν βρίσκεται σε διάλυμα (μεθανολικό ή αιθανολικό) όσο και στην στερεή κατάσταση δίνοντας ως βασικό προϊόν ένα κυκλικό παράγωγο που προκύπτει από την απώλεια δυο ατόμων υδρογόνου από το μόριο της και ως δευτερεύοντα προϊόντα βανιλλικό οξύ, βανιλλίνη και φερουλικό οξύ. Η χρήση σκουρόχρωμων υαλικών μπορεί να προστατεύσει την κουρκουμίνη από το φως εάν αποκλειστούν και οι υπόλοιπες πηγές οξυγόνου, γιατί η φωτόαποικοδόμηση της περιλαμβάνει και άλλους μηχανισμούς ανεξάρτητους του οξυγόνου, π.χ. με το μπλε του μεθυλενίου χάνει το χρώμα της (Tonnessen et al., 1986; Sasaki et al, 1998). Έχει παρατηρηθεί περίπου 5% μείωση στην απορρόφησή της κατά τον χρόνο που απαιτείται για μια απλή προετοιμασία της μέτρησης όταν χρησιμοποιείται απλό γυαλί και όχι σκουρόχρωμο (Wang et al., 1997). Κατά την ενθυλάκωσή της σε β-κυκλοδεξτρίνη η φωτοαποικοδόμησή της σε οργανικούς διαλύτες αυξήθηκε, ενώ η υδρολυτική της σταθερότητα αυξήθηκε. Η αποσταθεροποίηση στην κοιλότητα της β- κυκλοδεξτρίνης μπορεί να ερμηνευτεί με τον σχηματισμό ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Αντίθετα, στην α και γ – κυκλοδεξτρίνη η πολικότητα εντός της κοιλότητας, ο προσανατολισμός του μορίου της κουρκουμίνης και ο βαθμός των ένδο- και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου ενίσχυσαν την σταθερότητα της σε σχέση με την β.

Υπεύθυνο για την αστάθεια της κουρκουμίνης είναι το β-δικετονικό τμήμα των 7 ανθράκων και η παρουσία μεθυλενικής ομάδας, γι' αυτό έχει επιτευχθεί η σύνθεση αναλόγων κουρκουμίνης μόνο- καρβονυλικής αλυσίδας 5 ανθράκων (Liang et al., 2008).

Όσον αφορά τις <u>υψηλές θερμοκρασίες</u> η κουρκουμίνη μπορεί να αποικοδομηθεί με 3 τρόπους:

1) τροποποιώντας τους συζευγμένους διπλούς δεσμούς, 2) πολυμερισμό και 3) διάσπαση σε μόρια μικρότερου ΜΒ. Βασικά προϊόντα αποικοδόμησής της κατά την θέρμανση είναι: το φερουλικό οξύ, η βανιλλίνη και το βανιλλικό οξύ, υποδηλώνοντας την ευαισθησία της δικετονικής της γέφυρας και συγκεκριμένα του πρώτου ατόμου άνθρακα της αλκυλικής αλυσίδας που συνδέεται με τα 2 φαινύλια, στην θέρμανση (Suresh et al., 2008). Οι Ahn et al., (2007) μελέτησαν την σταθερότητα μεθανολικών διαλυμάτων κουρκουμίνης μετά από θέρμανση στον φούρνο (100^{o}C) και σε συνθήκες οξείδωσης H_2O_2/UV/O_2 (PER). Τα βασικά προϊόντα αποικοδόμησης από τα δείγματα στον φούρνο ήταν τα εξής: κουρκουμένιο, ο-κουμαρικό οξύ, βανιλλίνη, 2,4-δι-tert-βουτυλφαινόλη, βενζόλιο, 1-(3-κυκλοπεντυλπροπυλ)-2,4-διμεθυλ-4, 1-(4-υδροξυ-βενζυλιδεν) ακετόνη, φερουλόυλμεθάνιο, 2-προπενοικό οξύ, 3-[4-(ακετυλόξυ)-3-μεθόξυ φαίνυλ]- μεθυλεστέρας. Από τα PER δείγματα ανιχνεύτηκαν επιπλέον προϊόντα: βενζοϊκό οξύ και βανιλλικό οξύ. Στο σχήμα 4.5 παρουσιάζονται κάποια από τα προϊόντα αποικοδόμησης της κουρκουμίνης.



Σχήμα 4.5. *Κάποια από τα προϊόντα αποικοδόμησης της κουρκουμίνης που σχηματίζονται σε αλκαλικό pH ή κατά την θέρμανση ή την φωτοαποικοδόμησή της.*

Όσον αφορά τη συμπεριφορά της στα τρόφιμα η κουρκουμίνη μπορεί να αντιδράσει με συστατικά των τροφίμων, όπως το διοξείδιο του θείου ή να σχηματίσει σύμπλοκα με κάποια άλατα, όπως κιτρικό ή φθαλικό και να αποχρωματιστεί. Είναι επίσης επιρρεπής σε χλωρίδια, φωσφορικά και δικαρβοξυλικά (Tonnesen and Karlsen, 1985).

4.6. Ανάλογα της κουρκουμίνης

Για να υπερνικηθούν κάποια από τα παραπάνω μειονεκτήματα της κουρκουμίνης έχουν δοκιμαστεί διάφοροι τρόποι: ανακάλυψη φυσικών αναλόγων της κουρκουμίνης, σύνθεση τεχνητών αναλόγων της, ενθυλάκωση της κουρκουμίνης, σχηματισμός λιποσωμάτων και νανοσωματιδίων της, σύμπλεξη της με πολυαιθυλενολική γλυκόλη (Anand et al., 2008).
Τα ανάλογα της κουρκουμίνης χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:
I) ανάλογα από το τουρμέρικ,
II) ανάλογα από την φύση και
III) συνθετικά Ανάλογα

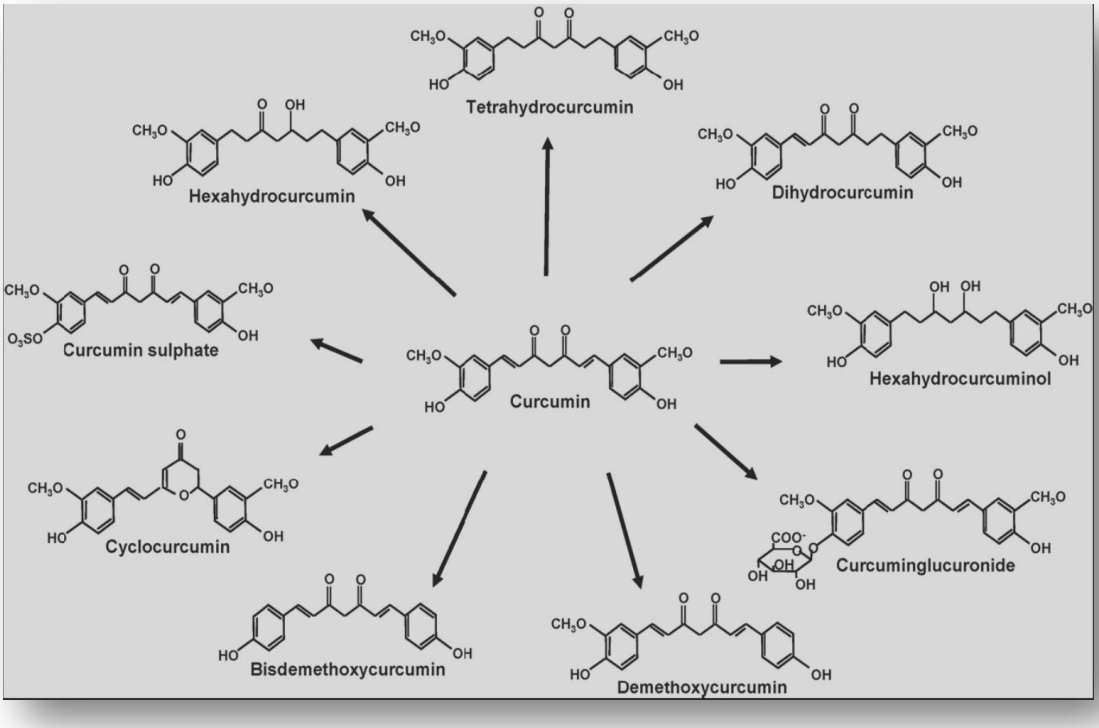
I) Τα **ανάλογα της κουρκουμίνης** που περιέχονται στο τουρμέρικ (σχήμα 4.6) είναι η διμεθόξυκουρκουμίνη (DMC) και η βισδιμεθόξυκουρκουμίνη (BMDC). Το τουρμέρικ περιέχει 77% κουρκουμίνη, 17% DMC και 3% BDMC. Ένα λιγότερο γνωστό κουρκουμινοειδές είναι η κυκλοκουρκουμίνη, με μικρή αντικαρκινική δραστικότητα. Αν και η κουρκουμίνη, η DMC, και η BDMC διαφέρουν στην χημική δομή τους μόνο στην μεθόξυ-υποκατάσταση παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετικές αντιοξειδωτικές και αντί-φλεγμονώδεις δραστικότητες. Η κουρκουμίνη έχει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα, ακολουθεί η DMC και έπεται η BDMC. Ωστόσο η BDMC έχει βρεθεί πιο δραστική από την DMC ή την κουρκουμίνη στα ακόλουθα: ενάντια στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, στην καταστολή της καρκινογένεσης κ.α. (Anand et al., 2008).

Στους μεταβολίτες της κουρκουμίνης ανήκει και η διύδροκουρκουμίνη (DHC), η τετραύδρο-κουρκουμίνη (THC), η εξαύδροκουρκουμίνη (HHC), η οκταύδροκουρκουμίνη (OHC), το γλυκουνορίδιο της κουρκουμίνης και η θειική κουρκουμίνη. Η THC, η οποία είναι άχρωμη και πιο υδρόφιλη από την κουρκουμίνη, εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα από την κουρκουμίνη. Επιπλέον είναι πιο δραστική ενάντια στην λιπιδιακή υπεροξείδωση των

λιπιδίων του εγκεφάλου, στην ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος, της ινσουλίνης του πλάσματος, στην καταστολή της οξείδωσης της LDL (Anand et al., 2008).

II) Φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ, καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, καψαΐνη, τζιντζερόλη, παραδόλη , ευγενόλη, διβενζόυλμεθάνιο.

Πιο δραστικά από την κουρκουμίνη είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ στην αναστολή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, η καψαΐνη στην ελάττωση της γλύκοπρωτεΐνης και στην φλεγμονή σε αρθριτικούς αρουραίους. Αντίθετα το καφεϊκό, το φερουλικό και το χλωρογενικό είναι λιγότερο δραστικά από την κουρκουμίνη στην εξάπλωση του καρκίνου του δέρματος κ.λ.π. (Anand et al., 2008).



Σχήμα 4.6. *Φυσικά ανάλογα της κουρκουμίνης από το τουρμέρικ και μεταβολίτες της κουρκουμίνης.*

III) Τα **Συνθετικά Ανάλογα** της κουρκουμίνης από τον άνθρωπο κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

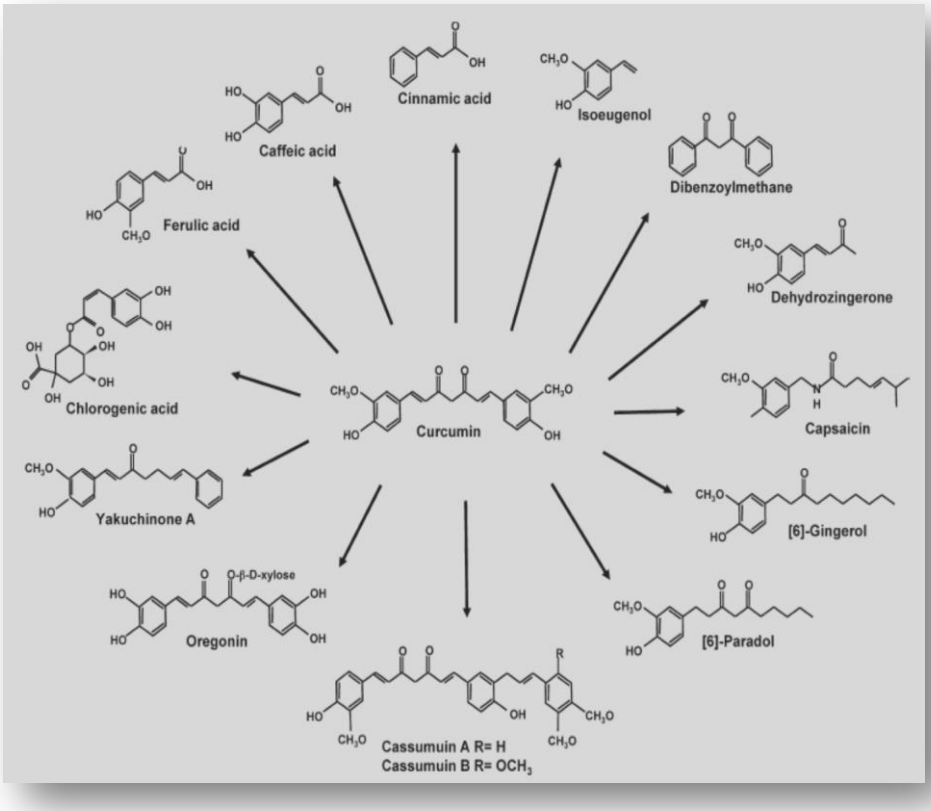
i) *παράγωγα της κουρκουμίνης (curcumin derivatives)*: εδώ ανήκουν συστατικά τα οποία έχουν τα βασικά δομικά συστατικά της κουρκουμίνης, όπως τους δυο διόξο- υποκατεστημένους

βενζολικούς δακτυλίους, την σύνδεση –C=C-CO-CH_2-CO-C=C, και τους όξο-υποκαταστάτες των βενζολικών δακτυλίων.

ii) *ανάλογα της κουρκουμίνης* (*curcumin analogues*): ουσίες με δομή ανάλογη της κουρκουμίνης.

iii) *μεταλλικά σύμπλοκα της κουρκουμίνης και των αναλόγων της* (Anand et al., 2008).

Τα σύμπλοκα κουρκουμίνης μαγγανίου ή χαλκού, ή βανδυλίου, ή ινδίου ή γαλλίου εμφάνισαν καλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα απ' ότι η κουρκουμίνη από μόνη της. Η ελάττωση του συνδέσμου C7 σε C5, καταλήγει σε συστατικά τα οποία είναι πιο δραστικά από την κουρκουμίνη, με την προϋπόθεση ότι οι υποκαταστάτες του φαινολικού δακτυλίου θα είναι εκτεθειμένοι.



Σχήμα 4.7. *Ανάλογα της κουρκουμίνης από τη μητέρα φύση.*

4.7. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης

Προκειμένου να υπερνικηθούν τα μειονεκτήματα και να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης έχουν εφαρμοστεί και άλλες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της ενθυλάκωσης:

1) *Adjuvants: ουσίες που εμποδίζουν τον γρήγορο μεταβολισμό της κουρκουμίνης, αλληλεπιδρώντας με τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τον μεταβολισμό της.*
2) *Νανοσωματίδια*
3) *Λιποσώματα , μικκύλια*
4) *Σύμπλοκα με φωσφολιπίδια*

σκοπός: η αύξηση της απορρόφησης της κουρκουμίνης στους ιστούς.

Τα νανοσωματίδια ενισχύουν την είσοδο της κουρκουμίνης στις μεμβράνες λόγω του μικρού τους μεγέθους και μπορούν να στοχεύσουν σε συγκεκριμένα όργανα. Τα λιποσώματα, τα μικκύλια και τα φωσφολιπίδια ελαττώνουν την υδροφοβικότητα της κουρκουμίνης και μπορεί να αυξήσουν την διαπερατότητα των μεμβρανών, αλληλεπιδρώντας με συστατικά της μεμβράνης.

1) Adjuvants (ουσίες με συνεργιστική δράση)

Όταν η κουρκουμίνη συνδυάστηκε με την πιπερίνη αυξήθηκε η βιοδιαθεσιμότητά της στους αρουραίους κατά 154%, και στον άνθρωπο κατά 2000%. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της πιπερίνης στην απορρόφηση της κουρκουμίνης σε ιστούς ποντικιών και βρέθηκε 48% καλύτερη πρόσληψη της κουρκουμίνης στον εγκέφαλο μετά από 2 λεπτά, αλλά στα υπόλοιπα όργανα η πιπερίνη δεν ενίσχυσε την απορρόφησή της. Η ίδια ομάδα μελέτησε την συνεργιστική δράση που μπορεί να έχει η κερκετίνη σε ασθενείς με πολύποδες. Εξετάστηκε, επιπλέον, η συνεργιστική ανασταλτική δράση γενιστείνης (genistein)- κουρκουμίνης στα καρκινικά MCF-7 κύτταρα του μαστού, μετά από την επίδραση μικροβιοκτόνων φαρμάκων. Ο συνδυασμός του ανέστειλε πλήρως τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και αυτή η ανασταλτική δράση ήταν ανώτερη από την μεμονωμένη της κουρκουμίνης ή της γενιστείνης. Επίσης, σε μελέτη που έγινε σε αρουραίους η ευγενόλη και η τερπενόλη αυξάνουν την απορρόφηση της κουρκουμίνης στο δέρμα (2.5 φορές) (Anand et al 2007).

2) Νανοσωματίδια

Πρόσφατα παρασκευάστηκε ένα νανοσωματίδιο της κουρκουμίνης με πολυμερές, με το όνομα ‘νανοκουρκουμίνη’. Αυτό βρέθηκε να έχει την ίδια *in vitro* ενεργότητα με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη στις καρκινικές κυτταρικές σειρές στο πάγκρεας, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του παράγοντα μετεγγραφής NF-κβ και ελαττώνοντας τα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Λιπίδια νανοσωματίδια της κουρκουμίνης βρέθηκαν σταθερά για 6 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου και σε *in vitro* εφαρμογή τους παρέτειναν την

απελευθέρωση της κουρκουμίνης για 12 ώρες, προστατεύοντας την ταυτόχρονα από το οξυγόνο και το φως (Anand et al 2007).

3) Μικκύλια και ενθυλάκωση σε λιποσώματα και κυκλοδεξτρίνες

Προσδιορίστηκαν οι αντικαρκινικές ιδιότητες, *in vitro* και *in vivo*, της ενθυλακωμένης σε λιποσώματα κουρκουμίνης, ενάντια σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος ανθρώπου και βρέθηκε ότι η λιποσωμική κουρκουμίνη όχι μόνο αναστέλλει την καρκινική ανάπτυξη αλλά παρουσιάζει και αντιαγγειογονική δράση. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της λιποσωμικής κουρκουμίνης στον καρκίνο του παχέος εντέρου και συγκρίθηκε με την οξαλιπλατίνη, το πιο κοινό φάρμακο που χρησιμοποιείται στις χημειοθεραπείες του καρκίνου του παχέος εντέρου. *In vitro* παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση λιποσωμικής κουρκουμίνης- οξαπλατίνης σε λόγο 4:1 και *in vivo* η λιποσωμική κουρκουμίνη είχε καλύτερη ή τουλάχιστον συγκρίσιμη ανασταλτική δράση σε σχέση με την οξαλιπλατίνη (Anand et al., 2007).

Οι Gal et al., (2007) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δραστικότητα της λιποσωμικής κουρκουμίνης ενάντια στην υπεροξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τον χαλκό. Από τους Lee et al., (2008) παρασκευάστηκε ένα μικρογαλάκτωμα κουρκουμίνης με αίθυλ- ελαϊκό, λεκιθίνη και tween 80. Οι Thangapazham et al., (2008), αναφέρουν ότι η λιποσωμική κουρκουμίνη έχει 10 φορές υψηλότερη δράση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, απ' ότι η ελεύθερη κουρκουμίνη.

Η κουρκουμίνη έχει ενθυλακωθεί και σε διαλύματα μικκυλίων όπου επιτεύχθηκε αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς της (~740 μg/ml). Μελετήθηκε επίσης η χημική σταθερότητα της κουρκουμίνης σε pH 5 και 8 και σε διάφορα διαλύματα επιφάνειοδραστικών, όπως τα Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), το Triton X-100 (TX-100), το Tetradecyl Trimethylammonium Bromide (TTAB). Τα SDS και TX-100 μικκύλια σταθεροποίησαν την κουρκουμίνη, ενώ τα μικκύλια του TTAB δεν ήταν τόσο αποτελεσματικά (Tonnesen et al., 2002).

Μικκύλιο κουρκουμίνης με φωσφολιπίδιο και χολικό άλας μελετήθηκε ως προς την *in vitro* εντερική απορρόφηση του σε μοντέλα εντέρου αρουραίων και βρέθηκε ότι η απορρόφηση της κουρκουμίνης στο έντερο αυξάνεται από 47 σε 56% όταν βρίσκεται στα μικκύλια (Anand et al., 2007). Σε μια μελέτη επίσης των Lin et al., (2009) παρασκευάστηκε μικκύλιο κουρκουμίνης με φωσφολιπίδιο (μικρογαλάκτωμα) το οποίο διαλύεται σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και

παραμένει σταθερό για 48 ώρες. Μελετήθηκε η ικανότητα του γαλακτώματος να διαπερνά την επιφάνεια του δέρματος. Επίσης μικκύλια κουρκουμίνης με καζεΐνη με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις έχουν χρησιμοποιηθεί σε καρκινικά κύτταρα (Sahu et al., 2008).

Οι Leung et al., (2008) μελέτησαν την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε μικκύλια για να περιοριστεί η αλκαλική της υδρόλυση σε pH 13. Η κουρκουμίνη σε υδατικά διαλύματα έχει τρεις τιμές pKα 8.38, 9.88 και 10.51, που αντιστοιχούν στην αποπρωτονίωση των τριών ομάδων υδροξυλίου, οπότε σε pH 13 αποπρωτονιώνεται τελείως για να σχηματίσει Cur^{3-}. Τα κατιονικά μικκύλια σταθεροποιούν την αποπρωτονιωμένη κουρκουμίνη λόγω των ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων της με τις κεφαλές των μικκυλίων. Τα SDS μικκύλια δεν είναι ικανά να παρεμποδίσουν την αλκαλική υδρόλυση, επειδή οι ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ της Cur^{3-} και των αρνητικά φορτισμένων κεφαλών καταλήγουν στην αποσύνδεση της Cur^{3-} από το μικκύλιο.

Η κουρκουμίνη έχει ενθυλακωθεί και σε κυκλοδεξτρίνες με μοριακή αναλογία 1:2: ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης ενθυλακώνει στην κοιλότητά του έναν από τους δύο φαινολικούς δακτυλίους της κουρκουμίνης. Η σταθερά ισορροπίας για το δεύτερο μόριο της κυκλοδεξτρίνης είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με το πρώτο μόριο, γιατί υπάρχει επιπλέον η στερεοχημική παρεμπόδιση από το πρώτο μόριο κυκλοδεξτρίνης. Καθένας από τους δύο βενζολικούς δακτυλίους της κουρκουμίνης, εγκλείεται στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης κάτω από την επιρροή των δυνάμεων van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την ταυτόχρονη συνεισφορά των δεσμών υδρογόνου από τα –OH της κουρκουμίνης που καθιστούν το σύμπλοκο πιο σταθερό (Tang et al., 2002). Οι Tonnesen et al., (2002) αναφέρουν την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στην β-cd με μοριακή αναλογία 1:1 όταν η συγκέντρωση της β-cd είναι λίγα mM, ενώ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 10 mM σχηματίζεται σύμπλοκο μοριακής αναλογίας 2:1. Η συμπλοκοποίηση της κουρκουμίνης με την κυκλοδεξτρίνη μπορεί να βελτιώσει της υδατοδιαλυτότητα της (έως 10^4 φορές), την υδρολυτική σταθερότητα, καθώς και την σταθερότητα της κατά την αποθήκευση (Szente et al., 1998), αλλά είναι πιθανό να ελαττώσει την φωτοχημική της σταθερότητα (Tonnesen et al., 2002; Baglole et al.,2005). Κατά τον εγκλεισμό της σε διάφορες κυκλοδεξτρίνες ελαττώνεται η ικανότητα της κουρκουμίνης να φθορίζει σε σχέση με την μη εγκλεισμένη κουρκουμίνη (Baglole et al. , 2005), ενώ ο εγκλεισμός της σε cucurbituril ενισχύει την ικανότητα της να φθορίζει (Rankin and Wagner, 2004).

Όταν χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης έδειξαν ισοδύναμη ή καλύτερη δραστικότητα απέναντι σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα σε σχέση με την ελεύθερη κουρκουμίνη (Li et al., 2005). Η κουρκουμίνη συνδέεται με τα λιποσώματα τόσο με δεσμούς υδρογόνου όσο και με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις: σε pH 5, όταν η κουρκουμίνη βρίσκεται στην ουδέτερη μορφή βρίσκεται κυρίως στην υδρόφοβη φάση, ενώ σε pH 9, όπου βρίσκεται στην ανιονική της μορφή εντοπίζεται κυρίως στην επιφάνεια των λιποσωμάτων. Σε pH 7 κατανέμεται μη-ομοιόμορφα σε διαφορετικά τμήματα της λιποσωμικής διπλοστοιβάδας, κατά προτίμηση εντός του υδρόφοβου τμήματος, σημαντικό για μεγάλο ποσοστό ενθυλάκωσης (Priyadarsini, 2009). Οι Bruzell et al., (2005) μελέτησαν τις φωτοτοξικές επιδράσεις της κουρκουμίνης ενθυλακωμένης σε κυκλοδεξτρίνες και λιποσώματα. Τα λιποσώματα βρέθηκαν ως πιο κατάλληλο σύστημα για την κουρκουμίνη. Βέβαια, η κουρκουμίνη στην κυκλοδεξτρίνη προκάλεσε μεγαλύτερο ρυθμό θανάτου των κυττάρων σε σχέση με την ελεύθερη κουρκουμίνη.

Οι Aziz et al., (2007) ενθυλάκωσαν την κουρκουμίνη σε ζελατίνη για να ενισχύσουν την φωτοσταθερότητά της και να ελαττώσουν την χρωστική της ικανότητα (colour staining), που αποτελεί βασικό μειονέκτημά της για εφαρμογή σε δερματικά επιθέματα. Οι Wang et al., (2009) βελτίωσαν την σταθερότητα της κουρκουμίνης στο φώς, τη θέρμανση, το pH και αύξησαν την υδατοδιαλυτότητα της μετά την ενθυλάκωση της σε μικροκάψουλα ζελατίνης-αμύλου που παρασκευάστηκε με ξήρανση με ψεκασμό. Η ενθυλάκωση του τουρμέρικ σε μίγμα αραβικού κόμμεος-μαλτοδεξτρίνης με την προσθήκη pullutan (μια υδατοδιαλυτή γλυκάνη που παράγεται από τον ζυμομύκητα *Aureobasidium pullulans*) με ξήρανση με ψεκασμό αύξησε την σταθερότητα της κατά την αποθήκευση (Kshirsagar et al., 2009). Η χρησιμοποίηση πορώδους αμύλου και ζελατίνης ως μέσον ενθυλάκωσης με ξήρανση με ψεκασμό επίσης βελτίωσε την σταθερότητά της στην θέρμανση, το φώς το pH και την υδατοδιαλυτότητα της (Wang et al., 2009). Επίσης η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε τροποποιημένο άμυλο αύξησε κατά 1670 φορές την υδατοδιαλυτότητα της λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και των δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ τους και ενίσχυσε την *in vitro* αντικαρκινική δραστικότητα της (Yu and Huang, 2010).

4) Σύμπλοκα με φωσφολιπίδια

Κουρκουμίνη ή σύμπλοκο κουρκουμίνης- φωσφολιπιδίου χορηγήθηκε από το στόμα σε αρουραίους σε δόση 100 mg/kg. Το σύμπλοκο έδειξε χρόνο ημιζωής της κουρκουμίνης 1.5 φορές μεγαλύτερο απ' ότι η ελεύθερη. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι το σύμπλοκο αυξάνει 3 φορές την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης και βελτιώνει την ηπατοπροστατευτική της δράση σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη. Μελετήθηκε επίσης εάν το μεταβολικό προφίλ της κουρκουμίνης σε αρουραίους *in vivo* επηρεάζεται από την σύζευξή της με την φωσφατίδυλοχολίνη. Στο πλάσμα, στην βλεννώδη μεμβράνη του εντέρου και στο συκώτι ανιχνεύτηκαν τα εξής: κουρκουμίνη, DMC, BDMC, και οι μεταβολίτες της THC, HHC, γλυκουρονίδιο κουρκουμίνης και θειική κουρκουμίνη. Τα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα ήταν 5 φορές μεγαλύτερα απ' ότι με τη λήψη ελεύθερης κουρκουμίνης και όμοια στο συκώτι ήταν μεγαλύτερα σε σχέση με την ελεύθερη κουρκουμίνη. Αντίθετα στην γαστρεντερική βλεννώδη μεμβράνη, η συγκέντρωση της κουρκουμίνης ήταν σχετικά μικρότερη όταν έγινε λήψη με μορφή φωσφολιπιδίου, απ' ότι ελεύθερη (Anand et al., 2007). Ένα σύμπλοκο κουρκουμίνης: φωσφολιπίδια με μοριακή αναλογία 1:1 παρασκευάστηκε από τους Maiti et al., (2007) έδειξε καλύτερη προστασία σε σχέση με την ελεύθερη κουρκουμίνη στην ηπατίτιδα που προκλήθηκε από τον τετραχλωράνθρακα.

5) Σύμπλεξη με πολυαιθυλενολική γλυκόλη (PEGylation)

Σκοπός αυτής της σύμπλεξης είναι η αύξηση της διαλυτότητας και της σταθερότητάς της. Η υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης αυξήθηκε όταν συμπλέχτηκε με το MePEG-b-PCL. (Letchford et al., 2008). Μια πρόσφατη μελέτη των Salmaso et al., (2007) απέδειξε ότι η υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης αυξάνεται σημαντικά (κατά 3200 φορές σε σχέση με την β-κυκλοδεξτρίνη) όταν συζεύγνυται με το PEG και την κυκλοδεξτρίνη και επιπλέον ελαττώνεται ο ρυθμός αποικοδόμησής της σε pH 6.5 και 7.2 κατά 10 και 45 φορές, αντίστοιχα. Επιπλέον έχει συντεθεί νανοοσωματίδιο κουρκουμίνης με μεθόξυ-πολυαίθυλενο-γλυκόλη, (mPEG) ως υδρόφιλο τμήμα και παλμιτικό οξύ ως υδρόφοβο τμήμα, το οποίο αύξησε την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης και την σταθερότητά της σε pH 7.4, σε συνθετικό γαστρικό υγρό (pH 1.2) και σε συνθετικό παγκρεατικό υγρό (pH 6.8) (Sahu et al., 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

Ταυτοποίηση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης σε κύτταρα Saccharomyces cerevisiae

Η επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης ενός διατρόφοδραστικού συστατικού, όπως η κουρκουμίνη, σε κύτταρα του S. *cerevisiae*, μπορεί να πραγματοποιηθεί με τεχνικές οι οποίες μπορούν να διακριθούν σε άμεσες και έμμεσες.

5.1. Έμμεσες τεχνικές για την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης

Δύο είναι οι βασικές τεχνικές που έμμεσα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την επιτυχία της ενθυλάκωσης: η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης και η Φασματοσκοπία Υπερύθρου.

5.1.1. Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*)

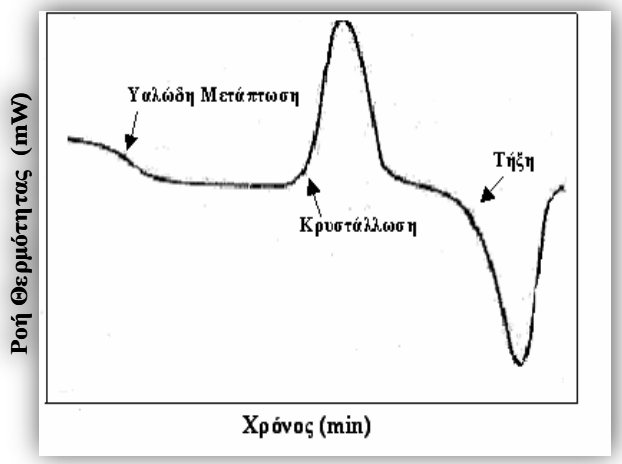
Η μέθοδος της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) ανήκει στις θερμικές μεθόδους ανάλυσης και χρησιμοποιείται στην μελέτη τροφίμων και άλλων υλικών, κυρίως για την εκτίμηση των φυσικών ιδιοτήτων τους και για τον προσδιορισμό της σταθερότητάς τους στη θέρμανση ή την οξείδωση (Clas et al., 1999). Η ετοιμολογία της λέξης 'Θερμιδομετρία' προέρχεται από την λατινική λέξη 'Θερμίδα' και την ελληνική ' μέτρο' (Demetzos, 2008). Η μέθοδος DSC μελετά τις μεταβολές της ενθαλπίας που συμβαίνουν σε ένα δείγμα όταν αυτό θερμαίνεται ή ψύχεται σε καθορισμένο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Μπορούν να μελετηθούν εξώθερμα ή ενδόθερμα φαινόμενα, όπως τήξη, κρυστάλλωση, εξαέρωση, εξάχνωση, υαλώδης μετάπτωση κ.α. (Roos, 1995), όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 5.1.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι ότι μετράται η θερμοχωρητικότητα ενός υλικού σε ατμοσφαιρική πίεση, διαβιβάζοντας θερμότητα στο προς μελέτη δείγμα σε σχέση με ένα

δείγμα αναφοράς, το οποίο θερμαίνεται με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Οι μονάδες της θερμοχωρητικότητας είναι cal/^{o}C ή J/^{o}C. Η θερμοχωρητικότητα κανονικοποιείται διαιρώντας τη θερμοχωρητικότητα του δείγματος με τα γραμμάρια του, για να υπολογιστεί η θερμότητα που απαιτείται για να ανέβει η θερμοκρασία 1 γρ. δείγματος κατά 1^{o}C. Αυτό αναφέρεται στην ειδική θερμοχωρητικότητα Cp, οπότε:

$$\Delta H = Cp\ (T1 - To) = Cp\ \Delta T\ ,$$ (Demetzos, 2008)

Η καμπύλη καταγράφει τη διαφορική ροή της θερμότητας στο δείγμα (dH/dt σε $mJ \cdot s^{-1}$ ή $mcal \cdot s^{-1}$) ως προς τη θερμοκρασία (T) ή το χρόνο (t). Τα ενδόθερμα φαινόμενα σχεδιάζονται με καθοδικές καμπύλες, ενώ τα εξώθερμα με ανοδικές.



Σχήμα 5.1. *Κύριες μεταβολές που μπορούν να μελετηθούν με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Clas et al., 1999).*

Μια τυπική διάταξη DSC αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

α) Δύο υποδοχείς: έναν για το δείγμα (S) και ένα αναφοράς (R). Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό μεταλλικό καψίδιο που εξασφαλίζει ιδανική θερμική αγωγιμότητα. Το καψίδιο μπορεί να είναι ανοιχτό, ερμητικά κλειστό ή να έχει οπή. Το μέγεθος του δείγματος είναι 3-5 mg και πρέπει να καταλαμβάνει τον πυθμένα του καψιδίου για να εξασφαλίζεται ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας στο δείγμα. Στους δύο υποδοχείς παρέχεται θερμότητα από τον κλίβανο, συνήθως με σταθερό και στους δύο ρυθμό. Η θερμοκρασία μετράται με πολύ ευαίσθητα θερμοστοιχεία και πρέπει να παραμένει η ίδια και στους δύο υποδοχείς.

β) Έναν κλίβανο, ο οποίος πρέπει να παρέχει ομοιόμορφη θέρμανση και να μην επιτρέπει αλληλεπιδράσεις.

γ) Ένα σύστημα ψύξης, το οποίο να δίνει τη δυνατότητα επίτευξης θερμοκρασιών χαμηλότερων της θερμοκρασίας δωματίου, π.χ. νερό ή υγρό άζωτο.

δ) Φιάλες παροχής είτε αδρανούς αερίου (άζωτο) είτε οξυγόνου, με ρυθμιζόμενη ροή.

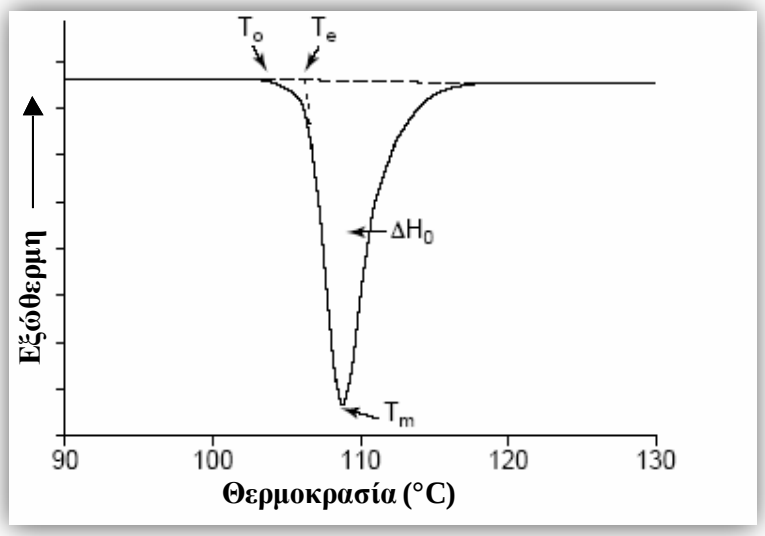
δ) Ένα λογισμικό.

ε) Ένα καταγραφικό σύστημα.

Βασικά πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι το χαμηλό κόστος της, και το γεγονός ότι αποτελεί μια απλή και γρήγορη τεχνική, από την οποία μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες από πολύ μικρή ποσότητα δείγματος.

- ***Εφαρμογές της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης***

Δύο πολύ βασικές εφαρμογές της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης είναι ο προσδιορισμός του Σ.Τ. μιας ουσίας και η μελέτης της σταθερότητάς του σε οξειδωτικές συνθήκες ή στην θέρμανση.



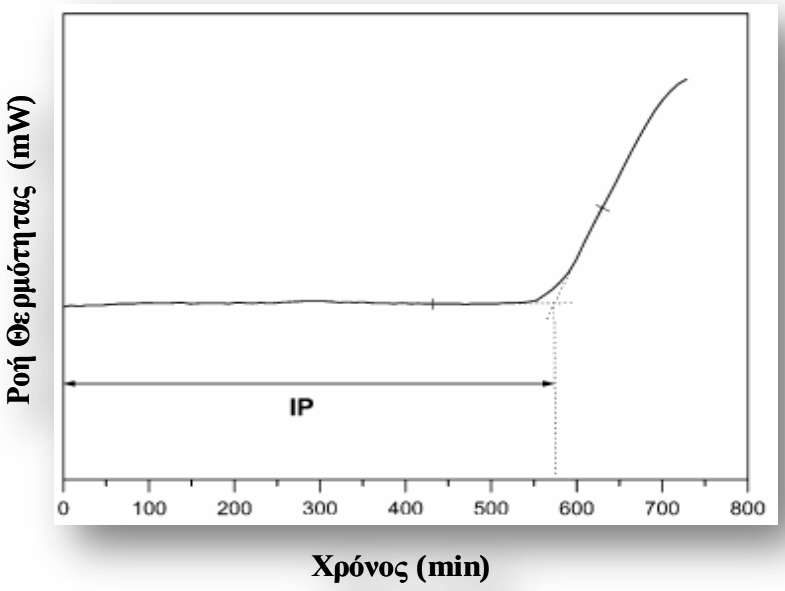
Σχήμα 5.2. *Θερμογράφημα ενός φαρμάκου στο οποίο παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες T_o, T_e και T_m (Clas et al., 1999).*

- Με την τεχνική της DSC μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια το σημείο τήξεως μίας κρυσταλλικής ουσίας. Μια ουσία 100% κρυσταλλική παρουσιάζει μια οξεία κορυφή, αλλά όταν το δείγμα δεν είναι απόλυτα καθαρό, μπορεί να παρατηρηθεί διεύρυνση της κορυφής και ελάττωση της θερμοκρασίας τήξεως. Στο σχήμα 5.2 παρουσιάζεται το θερμογράφημα μιας φαρμακευτική ουσίας. Χαρακτηριστικά σημεία της ενδόθερμης μεταβολής είναι η T_o, που είναι η θερμοκρασία στην οποία η καμπύλη αρχίζει να αποκλίνει από τη βασική γραμμή, η T_e, η οποία είναι η θερμοκρασία στο σημείο τομής της

προέκτασης της βασικής γραμμής με την προέκταση της γραμμής από το σημείο που η καμπύλη φτάνει στο ελάχιστο σημείο, και η $T_{m,}$ που είναι η θερμοκρασία στην κορυφή της καμπύλης. Το σημείο τήξεως είναι η θερμοκρασία $T_{e,}$ αν και πολλοί ερευνητές αναφέρουν ως σημείο τήξεως τη θερμοκρασία T_m.

- Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης μπορεί σε ισόθερμες συνθήκες με ταυτόχρονη ροή οξυγόνου, να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της πορείας της οξείδωσης σε δείγματα π.χ. ελαίου. Ο **χρόνος επαγωγής (IP)** λαμβάνεται από το σημείο (σχήμα 5.3) που αρχίζει η καμπύλη να αλλάζει κλίση λόγω της εξώθερμης αντίδρασης της οξείδωσης. Η μέθοδος παρουσιάζει καλή συσχέτιση με άλλες μεθόδους επιταχυνόμενης οξείδωσης, όπως είναι η μέθοδος Rancimat (Valesco et al., 2004).

  Η αποτελεσματικότητα ενός αντιοξειδωτικού, που περιέχεται σε ένα έλαιο, μπορεί να εκφραστεί με τον παράγοντα σταθεροποίησης, F. Ο παράγοντας σταθεροποίησης δίνεται από την εξίσωση ($F=IP/IP_o$), όπου IP είναι ο χρόνος επαγωγής παρουσία του αντιοξειδωτικού και IP_o είναι ο χρόνος επαγωγής απουσία του αντιοξειδωτικού. Επομένως, ο παράγοντας F είναι ίσος με τη μονάδα απουσία αντιοξειδωτικού, μεγαλύτερος από τη μονάδα παρουσία αντιοξειδωτικού και μικρότερος της μονάδας παρουσία προοξειδωτικού.



Σχήμα 5.3. *Προσδιορισμός του χρόνου επαγωγής (IP) με χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε ισόθερμες συνθήκες (Valesco et al., 2004).*

- Στη μελέτη της ενθυλάκωσης

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) έχει εφαρμοστεί για τη μελέτη του εγκλεισμού φαρμακευτικών μορίων σε κυκλοδεξτρίνες. Συνήθως το θερμογράφημα του συστατικού συγκρίνεται με το θερμογράφημα του συμπλόκου και η μη εμφάνιση του σημείου τήξεως στο θερμογράφημα αποτελεί πιστοποίηση σχηματισμού του συμπλόκου. Συνήθως λαμβάνονται και τα θερμογραφήματα του μέσου ενθυλάκωσης και του φυσικού μίγματος του με την ουσία. Η μέθοδος DSC μπορεί να εφαρμοσθεί και για τη μελέτη της σταθερότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων σε συνθήκες οξείδωσης (Clas et al., 1999).

Η τεχνική του DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης μιας ουσίας στα κύτταρα του *S. cerevisiae* (Normand et al., 2005). Ο τρόπος είναι παρόμοιος με αυτόν στις κυκλοδεξτρίνες, δηλαδή με τη σύγκριση των θερμογραφημάτων των άδειων κυττάρων του ζυμομύκητα, της ουσίας, του φυσικού μίγματός τους και της κάψουλας ενθυλάκωσης. Για την απόδειξη της πλήρους ενθυλάκωσης, όμως, εκτός από την εξαφάνιση του Σ.Τ. της ενθυλακωμένης ουσίας στην κάψουλα, πολύ σημαντικό ρόλο για την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης παίζει και η ενδόθερμη κορυφή των κυττάρων που αντιστοιχεί στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των άκυλοομάδων των φωσφολιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης.

Ειδικότερα, μεταξύ των μη πολικών υδρογονανθρακικών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων (ομάδες R) αναπτύσσονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις van der Waals (ελκτικές δυνάμεις) και όταν αυτές είναι ισχυρές, (όπως στην περίπτωση που τα κύτταρα είναι σε στερεή κατάσταση-λυοφιλιωμένα και οι κεφαλές των φωσφολιπιδίων τους βρίσκονται σε πιο στενή επαφή) η μεμβράνη των φωσφολιπιδίων βρίσκεται στην οργανωμένη *φάση πηκτής (gel phase)*. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως συμβαίνει κατά την DSC ανάλυση, η μεμβράνη μεταβαίνει από την *φάση πηκτής (gel phase)* στην *υγροκρυσταλλική (liquid crystalline)* επειδή ελαττώνονται οι δυνάμεις VDW μεταξύ των άκυλοομάδων των φωσφολιπιδίων, οπότε στο θερμογράφημα του DSC λαμβάνεται αυτή η θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης Tm (από την φάση πηκτής στην υγροκρυσταλλική). Στην φάση πηκτής οι υδρογονανθρακικές ακυλοαλυσίδες βρίσκονται στην *all trans* διαμόρφωση και με την αύξηση της θερμοκρασίας μεταβαίνουν σε μια λιγότερο οργανωμένη φάση (disordered) διαμόρφωση που περιλαμβάνει μια σειρά διαμορφώσεων gauche (120^{o} περιστροφή των απλών δεσμών C-C) και έτσι

προκύπτει η υγρο-κρυσταλλική φάση. Η Tm διαφοροποιείται ανάλογα με την ενεργότητα νερού του περιβάλλοντος και τη σύσταση της μεμβράνης (μήκος αλυσίδων, ποσοστό ακορεστότητας, στερολών). Κατά την ενθυλάκωση μίας ουσίας στα κύτταρα των ζυμομυκήτων η θερμοκρασία αυτή της μετάπτωσης φάσης των φωσφολιπιδίων θα ελαττώνεται εφόσον η ουσία παρεμβάλλεται στην φωσφολιπιδική στοιβάδα, μεταξύ των άκυλοομάδων, γιατί έτσι ελαττώνονται οι υδρόφοβες δυνάμεις VDW μεταξύ των φωσφολιπιδίων. Αυτό αποτελεί απόδειξη ότι η ουσία έχει εισέλθει στο κύτταρα και έχει παρεμβληθεί στην διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων (Demetzos et al., 2008; Maiti et al., 2007).

Στις μεμβράνες φωσφολιπιδίων, όχι κυττάρων, παρατηρούνται δυο κορυφές στα θερμογραφήματα του DSC: μια στους ~70^{o} C που αντιστοιχεί στις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων και μια πιο μετά, στους ~140^{o}C που αντιστοιχεί στην μετάπτωση φάσης των φωσφολιπιδίων. Κατά την ενσωμάτωση μιας ουσίας στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες η ουσία μπορεί να αλληλεπιδρά:

Α) με το λιπόφιλο τμήμα των φωσφολιπιδίων (τις άκυλοομάδες), οδηγώντας σε μεταβολές στην Tm, είτε

Β) με την πολική κεφαλή των φωσφολιπιδίων, εξαφανίζοντας την μετάπτωση (Gardikis et al., 2006).

Κατά την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε μεμβράνες φωσφολιπιδίων παρατηρήθηκε μετατόπιση της δεύτερης κορυφής σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, γιατί η κουρκουμίνη και συγκεκριμένα οι αρωματικοί της δακτύλιοι, παρεμβλήθηκαν σε αυτές με υδρόφοβους δεσμούς και ελάττωσαν τις δυνάμεις VDW μεταξύ τους, κάνοντας τις μεμβράνες πιο ρευστές. Η πρώτη κορυφή εξαφανίστηκε γιατί τα -OH της κουρκουμίνης αλληλεπίδρασαν με δεσμούς υδρογόνου με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων (Maiti et al., 2007).

- Άλλες εφαρμογές της τεχνικής αυτής περιλαμβάνουν:

1) θερμική μελέτη της μετουσίωσης των πρωτεϊνών.

2) την υαλώδη μετάπτωση πολυμερών: Glass transition (Tg) είναι μια μεταβολή που συμβαίνει στα άμορφα ή τα ημικρυσταλλικά υλικά.

3) την κρυσταλλοποίηση: είναι μια εξώθερμη κορυφή, και η θερμοκρασία κρυστάλλωσης (Tc) είναι μεταξύ της Tg και της θερμοκρασίας τήξης, Tm. Η κρυστάλλωση συμβαίνει μόνο σε δείγματα που μπορούν να κρυσταλλωθούν, και τα οποία δεν είναι ήδη κρυσταλλωμένα.

5.1.2. Η Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR Spectroscopy)

Όταν μια οργανική ένωση προσβληθεί από μια δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, απορροφά ενέργεια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, και αφήνει να διέλθει ενέργεια σε διαφορετικά μήκη κύματος. Αν ένα δείγμα ακτινοβοληθεί με ενέργεια πολλών διαφορετικών μηκών κύματος και εντοπιστούν ποια απορροφώνται και ποια εκπέμπονται, λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης της ένωσης. Όταν απορροφά ακτινοβολία (UV, IR) ένα μόριο αποκτά μια επιπλέον ενέργεια που πρέπει να κατανεμηθεί σε ολόκληρο το μόριο. Π.χ. η απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να αυξήσει την κινητική ενέργεια και οι δεσμοί να αποκτήσουν μεγαλύτερο μήκος ή να κάμπτονται περισσότερο. Εναλλακτικά, η απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να αναγκάσει ένα ηλεκτρόνιο να μεταπηδήσει από ένα τροχιακό χαμηλής ενέργειας σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Διαφορετικές συχνότητες, δηλαδή διαφορετικά μήκη κύματος επιδρούν στα μόρια με διάφορους τρόπους και παρέχουν πληροφορίες για τη δομή του μορίου.

Σκοπός της φασματοσκοπίας υπερύθρου είναι να εντοπιστούν τί δεσμοί υπάρχουν στο μόριο. Κάθε μόριο έχει συγκεκριμένη ενέργεια που κατανέμεται στην δομή του και προκαλεί στους δεσμούς του δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις, περιστροφές κ.λ.π. Η ενέργεια που περιλαμβάνει ένα μόριο δεν είναι συνεχή, αλλά κβαντισμένη, δηλαδή ένα μόριο μπορεί να επιμηκύνεται, να κάμπτεται ή να πάλλεται σε συγκεκριμένες συχνότητες ή ενέργειες. Όταν το μόριο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφά ενέργεια όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας ισούται με την διαφορά της ενέργειας μεταξύ δύο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η δόνηση που έχει συχνότητα ίση με την συχνότητα της ακτινοβολίας αυξάνει το πλάτος της, δηλαδή το μήκος του δεσμού εκτείνεται και συμπιέζεται περισσότερο. Με αυτό τον τρόπο από το IR διαπιστώνονται οι κινήσεις του μορίου.

Τα φασματόμετρα IR δίνουν φάσματα στην περιοχή 4000-650 cm^{-1} (2.5- 15.4 μm) ή σε κάποιες περιπτώσεις έως τα 200 cm^{-1} (50 μm). Τα Fourier Transform φασματόμετρα (FT-IR) χρησιμοποιούν πολυχρωματική ακτινοβολία και δίνουν το φάσμα στην περιοχή συχνοτήτων από τα αρχικά δεδομένα με μετασχηματισμούς Fourier. Το φάσμα δίνεται συναρτήσει την διαπερατότητας, το πηλίκο της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία αλλά μπορεί επίσης να εκφράζεται και σε μονάδες απορρόφησης. Η απορρόφηση Α ορίζεται ως ο δεκαδικός λογάριθμος του αντιστρόφου της διαπερατότητας Τ:

$$A = \log_{10}(1/T) = \log_{10}(Io/I),$$

όπου:

T= I/Io

Io= η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

I= η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας

- *Προετοιμασία του δείγματος:*
  - ✓ *Υγρά δείγματα*: σχηματίζεται ένα φίλμ ανάμεσα σε δυο πλάκες διαπερατές στο IR, ή τοποθετείται το δείγμα σε κυψελίδα κατάλληλου μήκους.
  - ✓ *Υγρά ή στερεά δείγματα διαλυμένα σε διαλύτη*: παρασκευάζεται διάλυμα σε κατάλληλο διαλύτη με συγκέντρωση και μήκος κυψελίδας τέτοιο ώστε να δώσει ικανοποιητικό φάσμα. Γενικά, καλά αποτελέσματα επιτυγχάνονται με συγκεντρώσεις 10-100 g/l για μήκος κυψελίδας 0.5-0.1 mm. Η απορρόφηση του διαλύτη υπολογίζεται τοποθετώντας στη δέσμη αναφοράς μια κυψελίδα που να περιέχει τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη.
  - ✓ *Στερεά δείγματα*: Τα στερεά διασπείρονται σε κατάλληλο υγρό (mull) ή μένουν ως στερεά (δισκίο). Στην περίπτωση του mull η ποσότητα της ουσίας διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα παραφίνης. Στην περίπτωση του δισκίου 1–2 mg της ουσίας αναμιγνύονται σε 300–400 mg KBr ή KCl. Αυτές οι ποσότητες είναι αρκετές για να δώσουν δισκία διαμέτρου 10 -15 mm και φάσμα κατάλληλης έντασης. Για το σχηματισμό του δισκίου εφαρμόζεται πίεση περίπου 800 MPa (European Pharmacopedia 6.0).

5.2. Άμεσες μέθοδοι για την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης: Μικροσκοπικές τεχνικές

Οι διάφορες τεχνικές μικροσκόπησης διαφέρουν ως προς τον τρόπο παραγωγής της εικόνας, την ανάλυση και το είδος του ανιχνευόμενου σήματος. Ο καλύτερος τρόπος είναι να υποβληθεί κάθε δείγμα σε διάφορες τεχνικές μικροσκόπησης για σύγκριση και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Δυο βασικές κατηγορίες μικροσκοπικών τεχνικών είναι η οπτική μικροσκοπία και η ηλεκτρονική μικροσκοπία.

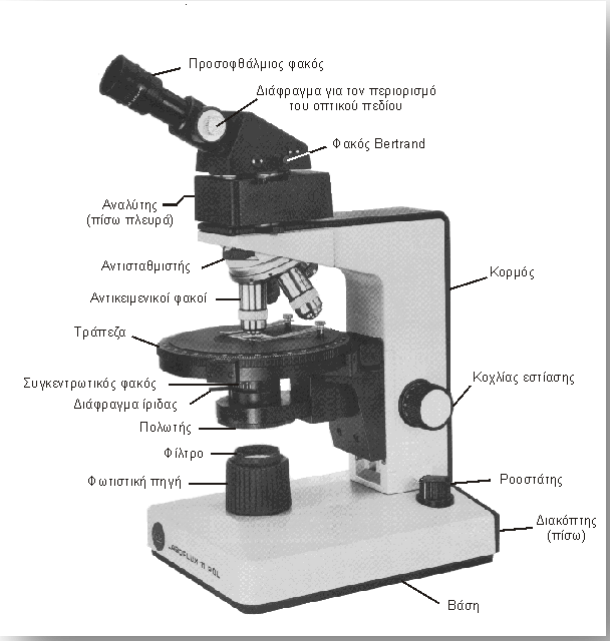
5.2.1. Οπτική Μικροσκοπία (*Light Microscopy*)

Το οπτικό μικροσκόπιο είναι οπτικό σύστημα για την παρατήρηση αντικειμένων υπό μεγέθυνση, με την βοήθεια του φωτός. Η παρατήρηση μπορεί να γίνεται είτε μέσω του ανακλώμενου είτε μέσω του διερχόμενου, από το παρατηρούμενο αντικείμενο, φωτός. Το σύνθετο μικροσκόπιο χρησιμοποιείται για την παρατήρηση αντικειμένων υπό μεγέθυνση (μέχρι και 2000×). Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.4 το μικροσκόπιο περιλαμβάνει τέσσερα βασικά τμήματα: α) μια πηγή φωτός, β) έναν συγκεντρωτικό φακό, γ) έναν αντικειμενικό φακό και δ) έναν προσοφθάλμιο φακό.

Το αντικείμενο τοποθετείται πολύ κοντά σε έναν συγκλίνοντα φακό (τον αντικειμενικό ή αντιοφθάλμιο φακό), ο οποίος σχηματίζει ένα πραγματικό είδωλο, ανεστραμμένο και με μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο με την απόσταση ανάμεσα στο αντικείμενο και την εστία. Το είδωλο αυτό μεγεθύνεται από έναν άλλο συγκλίνοντα φακό (τον προσοφθάλμιο φακό), ο οποίος σχηματίζει ένα φανταστικό είδωλο σε μια απόσταση από το μάτι που βρίσκεται ανάμεσα στην ελάχιστη και την μέγιστη απόσταση ευκρινούς οράσεως. Το μάτι παρατηρεί αυτό το είδωλο.

Το μηχανικό σύστημα του μικροσκοπίου συγκροτείται από: α) τη βάση στήριξης του οργάνου, β) την τράπεζα, όπου τοποθετείται το αντικείμενο μικροσκόπησης, γ) το βραχίονα με τους κοχλίες μετακίνησης της τράπεζας και δ) τον οπτικό σωλήνα. Στον οπτικό σωλήνα προσαρμόζεται το σύστημα των φακών, οι προσοφθάλμιοι και οι αντικειμενικοί. Η μεγέθυνση που επιτυγχάνουν οι φακοί κυμαίνεται μεταξύ 6x και 25x για τους προσοφθάλμιους και 2,5x έως 100x για τους αντικειμενικούς. Η συνολική μεγέθυνση που εξασφαλίζει το μικροσκόπιο ισούται εμπειρικά με το γινόμενο της μεγέθυνσης των δύο φακών.

Σε κάθε παρασκεύασμα ανάμεσα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και στην καλυπτρίδα παρεμβάλλεται ένα λεπτό στρώμα αέρα που αυξάνει την εκτροπή των φωτεινών ακτίνων δυσχεραίνοντας τη μικροσκοπική παρατήρηση. Προς αποφυγή του παραπάνω προβλήματος τα αντικείμενα μικροσκόπησης παρατηρούνται μέσα σε σταγόνες νερού ή άλλου υγρού (έλαιο) με μεγάλο δείκτη διάθλασης, το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στο δείγμα και τον αντικειμενικό φακό, έτσι ώστε να περιορίζεται η εκτροπή των ακτίνων και να αυξάνεται η διακριτική ικανότητα.



Σχήμα 5.4. *Βασικά μέρη του σύνθετου οπτικού μικροσκοπίου.*

Η παρατήρηση των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων γίνεται είτε άμεσα είτε μετά από νέκρωση ή χρώση. Η παρατήρηση ενός παρασκευάσματος, όπως τα κύτταρα ζυμομυκήτων βελτιώνεται σημαντικά με τη χρησιμοποίηση ορισμένων μη τοξικών χρωστικών ουσιών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να χρωματίζουν συγκεκριμένα κύτταρα ή ενδοκυτταρικά στοιχεία *in vivo*, διαπερνώντας τις πλασματικές μεμβράνες χωρίς να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα τους. Η χρωστική συνδέεται χημικά με ορισμένα ενδοκυτταρικά συστατικά. Η πλειονότητα των χρωστικών είναι οργανικές αρωματικές ενώσεις. Οι χρωστικές διακρίνονται χημικά σε δύο κατηγορίες στις βασικές ή κατιονικές και στις όξινες ή ανιονικές. Σε μια βασική χρωστική η χρωμοφόρος ομάδα είναι κατιονική και η ένταση της χρώσης αυξάνεται όσο πιο χαμηλό είναι το pH. Τέτοιες βασικές χρωστικές είναι το κυανούν του μεθυλενίου και το πράσινο του μεθυλίου. Μια όξινη χρωστική, περιέχει ανιονική χρωμοφόρο, όπως το κυανούν της ανιλίνης και δίνει εντονότερη χρώση σε υψηλό pH.

Το κυανούν του μεθυλενίου είναι βασική χρωστική της ομάδας της θειαζίνης με μικρή διαλυτότητα στο νερό (3.55%) και μικρότερη στην αλκοόλη (1.48%). Ανάγεται μετά από πρόσληψη δύο ηλεκτρονίων από ένα δέκτη και με τη σειρά του θα δώσει τα ηλεκτρόνια στο O_2. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί η μεταβολική δραστηριότητα των μικροβίων με την αναγωγή (αποχρωματισμό) του κυανού του μεθυλενίου δίνοντας πληροφορίες π.χ. εάν τα κύτταρα είναι ζωντανά (άχρωμα) ή νεκρά (μπλε).

Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι οπτικής μικροσκόπησης είναι η μικροσκοπία φωτεινού- πεδίου (bright-field microscopy), πόλωσης (polarizing) και φθορισμού (fluorescence).

- **φωτεινού πεδίου**: η φωτεινή δέσμη εκπέμπεται διαδοχικά διαμέσου ενός πυκνωτή, του δείγματος και του αντικειμενικού φακού, παράγοντας μια εικόνα που είναι ανάποδα και ανεστραμμένη, και μεγεθύνεται εντός του σωλήνα του μικροσκοπίου. Η πραγματική εικόνα μεγεθύνεται από τους προσοφθάλμιους φακούς.
- **πόλωσης**: Ένα μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου μπορεί να μετατραπεί σε πόλωσης με την εισαγωγή δύο πολωτών στην δέσμη φωτός: έναν ανάμεσα στην δέσμη φωτός και το δείγμα, και έναν δεύτερο ανάμεσα στον αντικειμενικό φακό και τον προσοφθάλμιο.
- **φθορισμού**: φώς συγκεκριμένου μήκους κύματος απορροφάται από συγκεκριμένα μόρια που υπάρχουν στο δείγμα, και η ενέργεια που απορροφούν επανεκπέμπεται ως φώς μακρύτερου μήκους κύματος και χαμηλότερης έντασης (φθορισμός). Τα πιο διαδεδομένα μικροσκόπια φθορισμού χρησιμοποιούν προσπίπτων φώς ή epi-illumination παρά εκπεμπόμενο φώς. Πολλές ουσίες αυτοφθορίζουν, όπως τα καροτενοειδή, οι χλωροφύλλες, κάποια φαινολικά συστατικά, όπως η κουρκουμίνη ή στο ζωικό βασίλειο το κολλαγόνο, η ελαστίνη και κάποια λιπίδια. Για ουσίες που δεν φθορίζουν από μόνες τους υπάρχουν φθορίζουσες probes.
- **confocal laser-scanning microscopy (CLSM)**: Αν και η confocal μικροσκοπία είχε ανακαλυφθεί το 1957, μόλις το 1980 άρχισε η εμπορική παραγωγή της. Η βασική διαφορά ανάμεσα σε αυτή και σε ένα απλό μικροσκόπιο είναι η παρουσία μιας μικρής τρύπας στο εστιακό επίπεδο του ειδώλου, η οποία απομακρύνει το χωρίς- εστίαση φως, παρέχοντας πιο καθαρή εικόνα. Επίσης ενώ στο οπτικό μικροσκόπιο όλο το δείγμα ή το οπτικό πεδίο φωτίζεται ομοιόμορφα, στην confocal μικροσκοπία το δείγμα φωτίζεται κατά ένα σημείο την φορά, μέσω της τρύπας (γι' αυτό και ονομάζεται μικροσκοπία σάρωσης).

Βασικό πλεονέκτημα της οπτικής μικροσκόπησης είναι ότι μπορεί να συνδυαστεί με πολλά είδη φασματοσκοπίας, και έτσι μπορεί να ταυτοποιηθούν ειδικές χημικές ομάδες. Για παράδειγμα η χρήση Υπεριώδους απορρόφησης μπορεί να οδηγήσει στην διάκριση δειγμάτων με αδιάλυτες ίνες σε προϊόντα αρτοποιίας. Η *Fourier Transform Infrared Microspectroscopy* έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της βακτηριακής μόλυνσης σε πατάτες και για το χαρακτηρισμό της χημικής φύσης δημητριακών, ελαιούχων σπόρων, βοτάνων και αρωματικών συστατικών (Kalab et al., 1995).

5.2.2. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (*Electron Microscopy, EM*)

Ο σχηματισμός ειδώλου στην ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι παρόμοιος με της οπτικής μικροσκοπίας, με την διαφορά ότι στην ηλεκτρονική μικροσκοπία η πηγή φωτός είναι ηλεκτρόνια, εστιασμένα με μαγνητικούς φακούς, παρά πρωτόνια εστιασμένα με γυάλινους φακούς. Καθώς τα ηλεκτρόνια απορροφώνται από τον αέρα, η ηλεκτρονική μικροσκόπηση γίνεται υπό κενό, έτσι το δείγμα δεν πρέπει να απελευθερώνει καθόλου πτητικά συστατικά όταν τοποθετείται στο μικροσκόπιο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με ξήρανση ή κατάψυξη του δείγματος πριν την εξέταση, ή με αντιγραφή του με πλατίνα και άνθρακα και εξέταση του αντιγράφου. Υπάρχουν δυο βασικές μέθοδοι ηλεκτρονικής μικροσκοπίας: η *Ηλεκτρονική μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)* και η *Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)*.

- ***Ηλεκτρονική μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)***

Χρησιμοποιείται κυρίως για την μελέτη των επιφανειών των δειγμάτων. Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης χρησιμοποιεί μια λεπτή δέσμη ηλεκτρονίων (ενέργειας 0 έως 50 KeV), η οποία αφού περάσει από μια ακολουθία δυο ή τριών φακών εστίασης, καταλήγει να έχει διάμετρο 2-10 nm. Η λεπτή αυτή δέσμη κατευθύνεται με την βοήθεια ενός πηνίου οδήγησης, έτσι ώστε να σαρώνει με περιοδικό τρόπο την επιφάνεια του δείγματος. Η προσπίπτουσα δέσμη προκαλεί την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων με ενέργειες 2 έως 5 eV και οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων με ενέργειες που κυμαίνονται από την ενέργεια των ηλεκτρονίων της δέσμης μέχρι περίπου 50 eV. Εκπέμπονται επίσης ηλεκτρόνια που έχουν υποστεί ελαστική σκέδαση ή χαμηλή απώλεια ενέργειας, καθώς και ακτίνες Χ ή φωταύγεια. Τα προηγούμενα σήματα και κυρίως τα σήματα δευτερογενών και οπισθοσκεδαζόντων ηλεκτρονίων ενισχύονται και διαμορφώνουν την ένταση μιας ανεξάρτητης εξωτερικής καθοδικής δέσμης, η οποία προσπίπτει σε φθορίζουσα οθόνη. Το αποτέλεσμα είναι η μεγεθυμένη απεικόνιση της επιφάνειας του δείγματος στην οθόνη. Ανάλογα με το σήμα που θα χρησιμοποιηθεί για την αναπαραγωγή της εικόνας, αναδεικνύονται διάφορα χαρακτηριστικά του δείγματος.

Τα προς μελέτη δείγματα είτε ξηραίνονται (συμβατική SEM) ή καταψύχονται σε θερμοκρασίες κάτω από -80^{o}C (cryo-SEM). Μια 5-20 nm πάχους μεταλλική (χρυσή) επικάλυψη παρέχει εστιασμένη ηλεκτρονική αγωγιμότητα. Το δείγμα σαρώνεται με μια εστιασμένη ηλεκτρονική

δέσμη, και δευτερεύοντα ή επανασκεδαζόμενα ηλεκτρόνια χρησιμοποιούνται για την μεγέθυνση της εικόνας. Η μέθοδος της cryo-SEM είναι πολύ χρήσιμη για την μελέτη λιπαρών δειγμάτων και για άλλα δείγματα τροφίμων τα οποία είναι δύσκολο να σταθεροποιηθούν κάτω υπό συμβατικές μεθόδους παρασκευής. Μειονεκτήματα της είναι ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων που μπορεί να καταστρέψουν την αρχική δομή (Kalab et al., 1995).

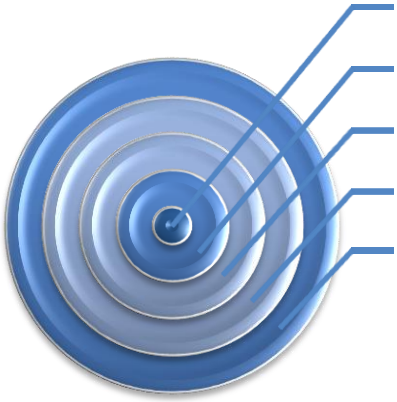
- ***Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)***

Η TEM είναι χρήσιμη για την μελέτη της εσωτερικής δομής των τροφίμων ή των κυττάρων μικροοργανισμών. Λεπτά (15-90 nm) τμήματα του δείγματος επικολλώνται σε επόξυ-ρητίνη ή αντιγράφονται σε πλατίνα- άνθρακα και τοποθετούνται στην πορεία της δέσμης των ηλεκτρονίων και η μεγεθυμένη εικόνα παρατηρείται σε μια φθορίζουσα οθόνη ή φωτογραφίζεται σε φιλμ. Διαφορές στην ηλεκτρονική πυκνότητα των δομών που αποτυπώνονται στην ρητίνη με άλατα βαρέων μετάλλων (π.χ. ουράνιο ή χρυσό) ή διαφορές στο πάχος των μεταλλικών αντιγράφων λόγω διαφορών στις γωνίες που τοποθετείται το μέταλλο στο κομματιασμένο δείγμα, καταλήγουν στον σχηματισμό της εικόνας. Οι εικόνες των αντιγράφων μοιάζουν με αυτές που παρατηρούνται με την cryo-SEM και τα δείγματα μπορεί να αποθηκευτούν για μελλοντικές μελέτες (Kalab et al., 1995).

Ο συνδυασμός των διαφόρων ΕΜ τεχνικών παρέχει τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Στο ΤΕΙ Αθήνας υπάρχει Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης JEOL 5310, εφοδιασμένο με φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή διασποράς (EDS) με χρήση τάσης 3 ή 20 KV.

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ



Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της παγκόσμιας βιομηχανίας τροφίμων έχει στραφεί στα διατρόφοδραστικά συστατικά (*nutraceuticals*), δηλαδή στα συστατικά εκείνα που έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου (κυρίως βιταμίνες και αντιοξειδωτικά). Η ενθυλάκωση (εγκλεισμός, encapsulation) αποτελεί μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία τροφίμων για την μεταφορά των δραστικών αυτών συστατικών στα τρόφιμα και περιλαμβάνει την ενσωμάτωση του δραστικού συστατικού σε ένα άλλο μέσο (μέσο ενθυλάκωσης). Βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η προστασία που παρέχει στο ενθυλακωμένο συστατικό απέναντι στην εξάτμιση, την οξείδωση ή την θέρμανση (φυσικοχημικές διαδικασίες που μπορεί να συμβούν κατά την αποθήκευση ή την επεξεργασία ενός τροφίμου). Επιπλέον μπορεί να εφαρμοστεί για να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητα ενός μη υδατοδιαλυτού συστατικού και η βιοδιαθεσιμότητά του ή για να επιτευχθεί (ελεγχόμενη) απελευθέρωση, σε επιθυμητό τόπο και χρόνο ή με συγκεκριμένο ρυθμό.

Βασικός στόχος της έρευνας

Η αξιολόγηση των κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae, του ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται ευρέως στην αρτοποιία και την ζυθοποιία, ως μέσου ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης.

Το 1970 περιγράφεται για πρώτη φορά η ενθυλάκωση χρωστικών ουσιών σε κύτταρα του *S. cerevisiae* για την παρασκευή χαρτιού καρμπόν και μετέπειτα η τεχνολογία αυτή επεκτείνεται και στην βιομηχανία τροφίμων για την ενθυλάκωση αρωματικών συστατικών. Σήμερα μια ελβετική εταιρεία παρασκευής αρωματικών συστατικών ενθυλακώνει πτητικά συστατικά, για να παραμένουν αναλλοίωτα κατά το μαγείρεμα και την επεξεργασία του τροφίμου, και για να επιτυγχάνεται ελεγχόμενη απελευθέρωση μετά την κατανάλωση του. Ωστόσο, αν και η εφαρμογή των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσου ενθυλάκωσης έχει επεκταθεί στην βιομηχανία τροφίμων και η διαδικασία της ενθυλάκωσης διαφόρων συστατικών έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας (πατεντών), μόλις 5 επιστημονικές αναφορές υπάρχουν μέχρι σήμερα.

Το βασικότερο πλεονέκτημα αυτού του συστήματος ενθυλάκωσης είναι ότι αποτελεί ένα ασφαλές (*food grade*), φυσικό και σε μεγάλη αφθονία προϊόν, με ελάχιστο κόστος παρασκευής και με ευρύ πεδίο εφαρμογής στον τομέα των τροφίμων (προϊόντα αρτοποιίας, ζαχαροπλαστικής, σάλτσες, σούπες κ.λ.π.). Ένα επιπλέον πλεονέκτημά του οφείλεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, η οποία λόγω των αμφιφιλικού χαρακτήρα της επιτρέπει την ενθυλάκωση τόσο υδρόφιλων μορίων στο εσωτερικό τμήμα του κυττάρου όσο και λιποδιαλυτών συστατικών εντός της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας. Αυτό το σύστημα ενθυλάκωσης προσομοιάζει και μπορεί να αντικαταστήσει τα λιποσώματα, των οποίων η χρήση στην βιομηχανία τροφίμων είναι περιορισμένη λόγω του υψηλού κόστους και της πολύπλοκης διαδικασίας προετοιμασίας τους, της έλλειψης μηχανικής αντοχής και της ευαισθησίας τους στην οξείδωση. Επιπλέον, το κυτταρικό τοίχωμα του *S. cerevisiae* τους προσδίδει επιπλέον μηχανική αντοχή και εμποδίζει την ρήξη του κυττάρου σε περίπτωση μεγάλου ποσοστού ενθυλάκωσης της δραστικής ουσίας.

Για την μελέτη των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσο ενθυλάκωσης επιλέγεται το διατρόφοδραστικό συστατικό κουρκουμίνη. Η κουρκουμίνη, το δραστικό πολυφαινολικό συστατικό του ινδικού μπαχαρικού τουρμέρικ, πέρα από την εφαρμογή της ως φυσική χρωστική των τροφίμων (E100) έχει αποτελέσει τα τελευταία χρόνια το αντικείμενο μελέτης πολλών κλινικών μελετών ενάντια σε μια πληθώρα ασθενειών, λόγω των αντικαρκινικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της. Η μικρή υδατοδιαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητά της, η αστάθεια της σε αλκαλικό pH και η ευαισθησία της στο φώς και τη θέρμανση αποτελούν βασικά μειονεκτήματα που περιορίζουν τη χρήση της τόσο στα τρόφιμα όσο και στην φαρμακευτική βιομηχανία, γι’ αυτό και έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες ενθυλάκωσής της σε κυκλοδεξτρίνες, τροποποιημένο άμυλο, κόμμεα, λιποσώματα, φωσφολιπίδια και νανοσωματίδια.

Στόχοι της έρευνας

- Προσδιορισμός του πληθυσμού και της ζωτικότητας των κυττάρων του *S. cerevisiae* που αποτέλεσαν το μέσο ενθυλάκωσης.

- Μελέτη των βέλτιστων συνθηκών ενθυλάκωσης. Η % κ.β. περιεκτικότητα των κυττάρων σε κουρκουμίνη (*%Encapsulation Yield, %EY*) και η απόδοση της ενθυλάκωσης (*%Encapsulation Efficiency, %EE*) συσχετίστηκαν με τις ακόλουθες παραμέτρους:
  - Πλασμόλυση των κυττάρων του *S. cerevisiae*: με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Οι επιπτώσεις της πλασμόλυσης στη σύσταση και την οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης μελετήθηκαν με DSC και FT-IR.
  - Θερμοκρασία ενθυλάκωσης από 25 έως 55^{o}C.
  - Παρουσία αιθανόλης: η ενθυλάκωση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα υδατικό ή 50% v/v αλκοολικό. Για την διάλυση της κουρκουμίνης είναι απαραίτητη η παρουσία της αιθανόλης.
  - Αναλογία μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα. Μελετήθηκε εάν η χρήση περίσσειας κουρκουμίνης ή περίσσειας κυττάρων κατά την διαδικασία προετοιμασίας των μικροκαψουλών, αυξάνει το ποσοστό ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης.

- Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης και μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της κουρκουμίνης με τα κύτταρα του *S. cerevisiae* με:
  - Μικροσκόπιο Φθορισμού (Fluorescence Microscopy)
  - Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)
  - DSC: ταυτόχρονη μελέτη και της σταθερότητας της ελεύθερης και της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε συνθήκες οξείδωσης
  - FT-IR

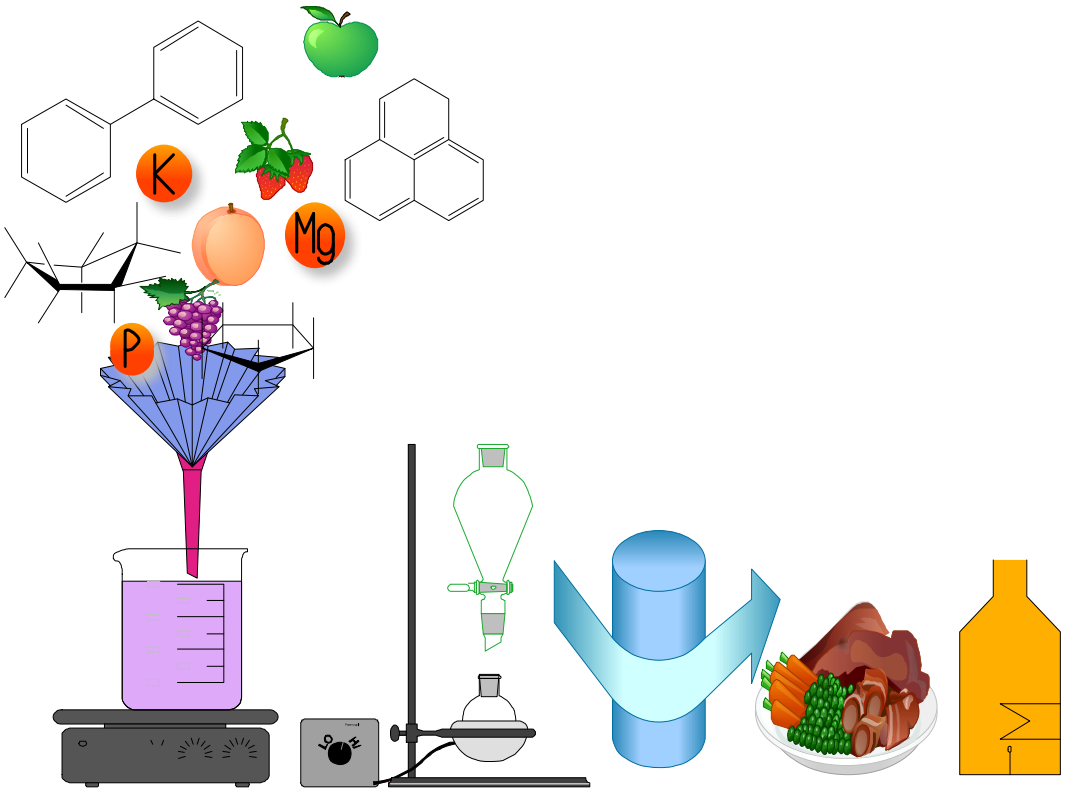
- Ιδιότητες ενθυλακωμένης κουρκουμίνης:
  - Υδατοδιαλυτότητα
  - Προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής (Kc)
  - Προφίλ της απελευθέρωσης-διαλυτοποίησης (*dissolution profile*) της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες των κυττάρων σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό
  - Χρωστική ικανότητα
  - Αντιοξειδωτική δραστικότητα

- Μελέτη της σταθερότητας της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης σε κύτταρα και μη) και της κινητικής απελευθέρωσής της κατά την αποθήκευση σε συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές που επικρατούν σε ένα τρόφιμο κατά την αποθήκευση ή επεξεργασία του:
  - Υπό την επίδραση του φωτός
  - Σε περιβάλλον ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας (32.8-90.0% RH)
  - Στην θέρμανση: έκθεση σε αυξανόμενες θερμοκρασίες και χρονικά διαστήματα, υπό αδρανείς ή οξειδωτικές συνθήκες
  - Σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων τιμών pH (2, 4, 7, 8) και θερμοκρασιών (30, 60, και 100^{o}C)

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη (παρασκευάστηκαν σύμπλοκα κουρκουμίνης: β-κυκλοδεξτρίνης μοριακής αναλογίας 1:2 με 5 διαφορετικές μεθόδους) και σε τροποποιημένο άμυλο. Τα παρασκευασθέντα σύμπλοκα συμμετείχαν σε όλα τα παραπάνω πειράματα για την μελέτη των ιδιοτήτων/σταθερότητας της κουρκουμίνης και συγκρίθηκαν με τις μικροκάψουλες των κυττάρων.

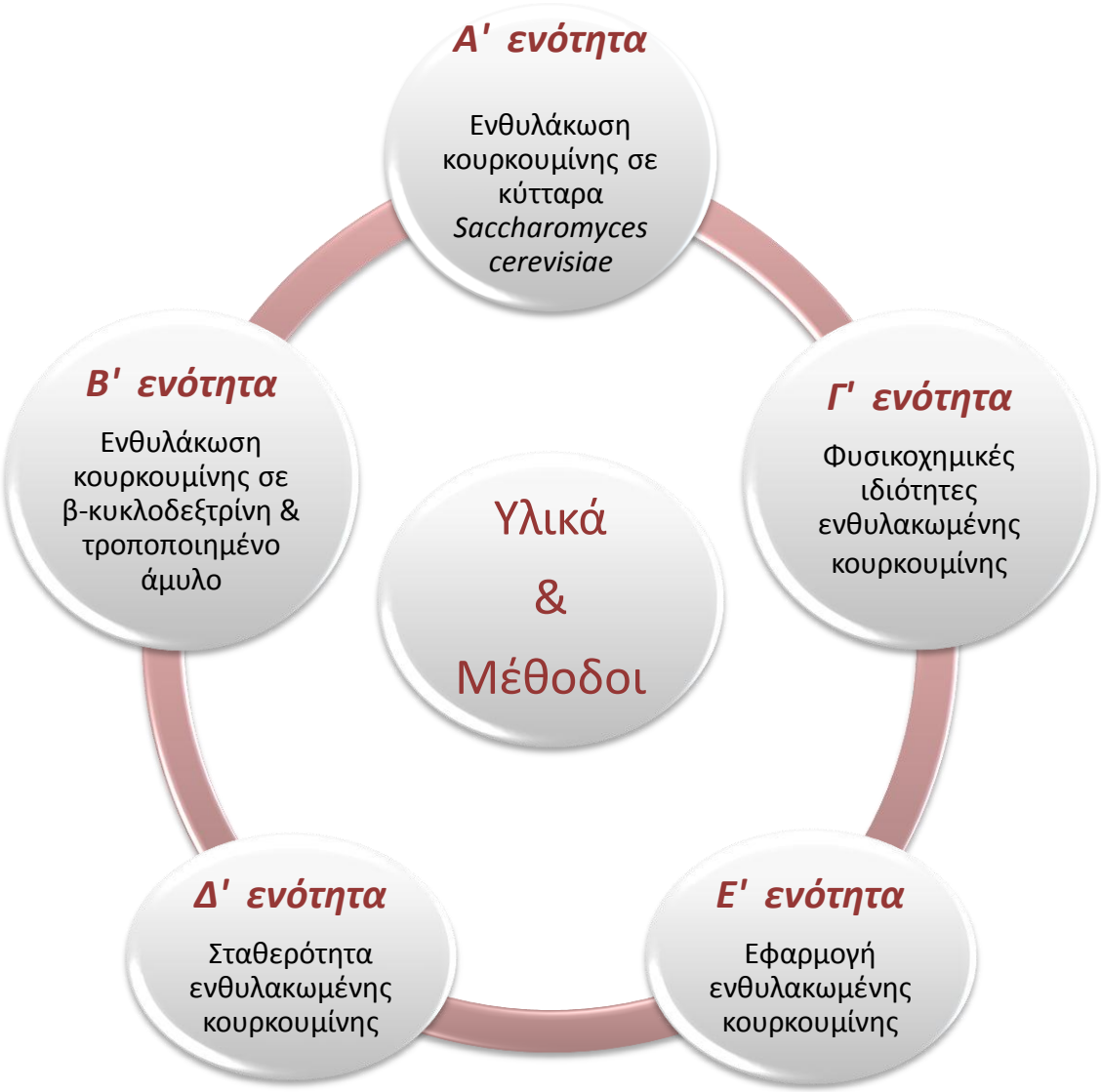
- Εφαρμογή ενθυλακωμένης σε κύτταρα κουρκουμίνης σε τρόφιμο:
  - Μελέτη με Rancimat της οξειδωτικής σταθερότητας ηλιέλαιου παρουσία κουρκουμίνης
  - Εμπλουτισμός προϊόντος αρτοποιίας με κουρκουμίνη: προσδιορισμός περιεκτικότητας και σταθερότητας κουρκουμίνης, αντιοξειδωτικής δραστικότητας και οξειδωτικής σταθερότητας προϊόντος

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

Υλικά & Μέθοδοι



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

Α' ενότητα:

Ενθυλάκωση της Κουρκουμίνης σε Κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae

6.Α.1. Παραλαβή των κυττάρων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

***Σκοπός**: για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης χρησιμοποιήθηκαν συμπιεσμένα (compressed) κύτταρα αρτοποιίας του S. cerevisiae στα οποία κατά την βιομηχανική παρασκευή τους συνήθως προστίθενται γαλακτωματοποιητές (μονογλυκερίδια, τριγλυκερίδια), εστέρες σορβιτόλης και λεκιθίνη σε ποσοστό 0.1-0.2% w/w (Joseph, 2004). Γι' αυτό προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης προηγείται έκπλυση τους με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.*

Αντιδραστήρια

- Συμπιεσμένη νωπή ζύμη αρτοποιίας (compressed *Saccharomyces cerevisiae*) εμπορικώς διαθέσιμη με την ονομασία "*L' hirondelle® blue pack, Lesaffre group, France*" (42 γρ.)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.2)
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Φυγόκεντρος (Sorvall, PC-3 7909040)
- Υποδοχείς φυγοκέντρου των 250 ml
- Συσκευή λυοφιλίωσης (Thermosavant με μονάδα συμπύκνωσης και παγίδα Model ModulyoD χωρητικότητας 5 L, με ενσωματωμένο συμπιεστή απόδοσης 1/3 HP και αντλία κενού ThermoSavant, Model FDP 80, απόδοσης 76 L/min, που επιτυγχάνει μέγιστο κενό 1.5 mtorr)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 42 γρ. της εμπορικώς διαθέσιμης νωπής ζύμης αρτοποιίας και εκπλένονται με 200 ml του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.
- Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, 10 min.
- Απόχυση του υπερκειμένου και επανάληψη της έκπλυσης άλλες 4 φορές, έως ότου το υπερκείμενο υγρό να είναι διαυγές.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με την βοήθεια απεσταγμένου νερού και στην συνέχεια:
  1) οδηγούνται για πλασμόλυση (βλ. § 6.Α.2) οπότε λαμβάνονται τα **'πλασμολυμένα κύτταρα'**

     είτε
  2) ψύχονται στους -40^{o}C για 2 ώρες και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης. Με αυτό τον τρόπο παραλαμβάνονται τα λυοφιλιωμένα, '**μη πλασμολυμένα κύτταρα'**.

Και στις 2 περιπτώσεις υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που περιέχονται ανά γραμμάριο λυοφιλιωμένης σκόνης κυττάρων καθώς και το ποσοστό της ζωτικότητας τους (πριν και μετά την λυοφιλίωση ή την πλασμόλυση) (βλ. §6.Α.4, §6.Α.5). Τα κύτταρα τα οποία χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης συνοψίζονται στο σχήμα 6.1.

6.Α.2. Πλασμόλυση των κυττάρων του *S. cerevisiae* με χλωριούχο νάτριο

Σκοπός: *Η απομάκρυνση του νερού και ίσως και κάποιων υδατοδιαλυτών συστατικών του κυτταροπλάσματος της ζύμης (ένζυμα, πρωτεΐνες, αμινοξέα, σάκχαρα, νουκλεϊνικά οξέα) για αύξηση του διαθέσιμου για ενθυλάκωση χώρου στο κύτταρο. Εξ' ορισμού με την πλασμόλυση συρρικνώνεται και 'απομακρύνεται' η πλασματική μεμβράνη από το κυτταρικό τοίχωμα.*

Αντιδραστήρια

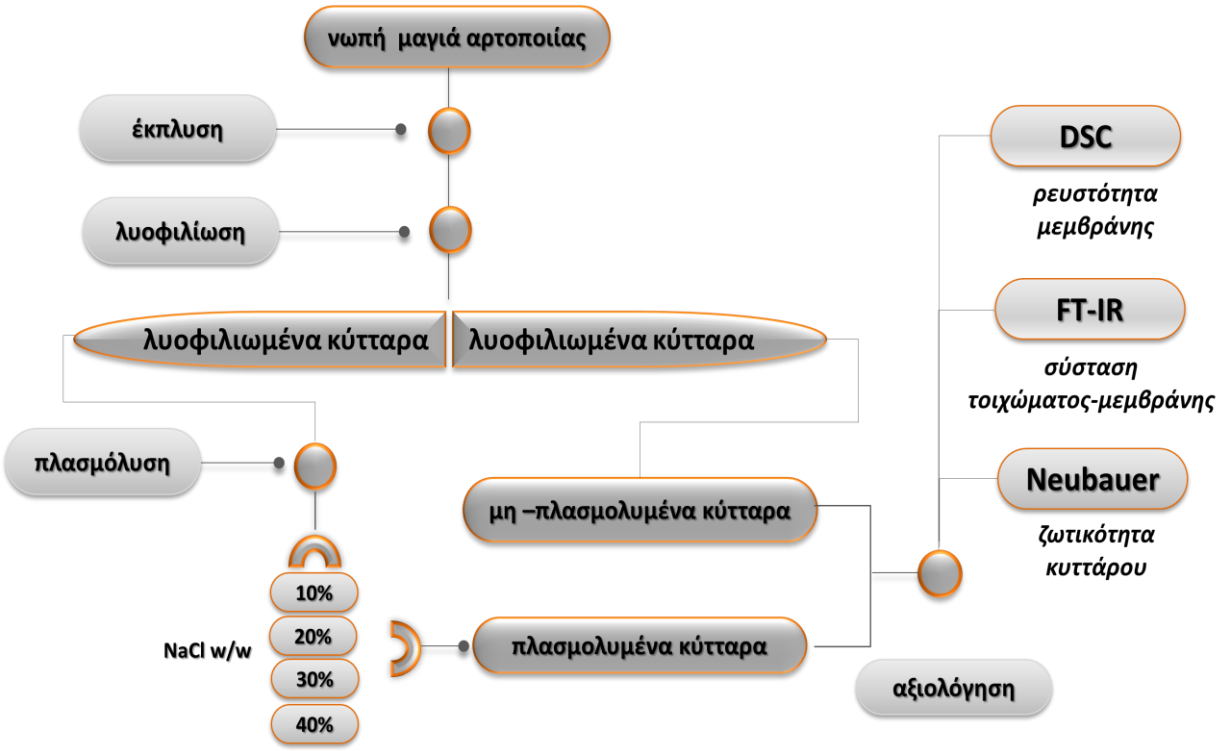
- Κύτταρα ζύμης (*S. cerevisiae*) μετά από εκπλύσεις με Ρ.Δ. φωσφορικών (§ 6.Α.1)
- Χλωριούχο νάτριο (Merck, Darmstadt, Germany)
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Φυγόκεντρος (Sorvall, PC-3 7909040)
- Συσκευή λυοφιλίωσης (Thermosavant, Model ModulyoD)
- Κωνικές φιάλες των 1000 ml
- Eppendorf των 2 ml
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm, UK)
- Μικροσκόπιο (Leica DC 300, Cambridge, UK)

Αναλυτική Πορεία

- Παρασκευή 300 ml υδατικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων: 10% κ.β., 20% κ.β., 30% κ.β. και 40% κ.β.
- 42 γρ. κυττάρων μετά από τις εκπλύσεις με το Ρ.Δ. φωσφορικών μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 1000 ml, όπου προστίθενται το υδατικό διάλυμα 10% κ.β. χλωριούχου νατρίου.
- Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με τα υπόλοιπα διαλύματα χλωριούχου νατρίου.
- Ανάδευση (180 rpm) στους 55^{o}C για 48 h. Μετά το πέρας της ανάδευσης 1 ml από το αιώρημα των κυττάρων στο εκάστοτε άλας μεταφέρεται σε eppendorf των 2 ml και οδηγείται για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (§ 6.Α.3).
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, 10 min.
- Το υπερκειμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου αποχύνεται και ακολουθούν 4 εκπλύσεις των κυττάρων με απεσταγμένο νερό, φυγοκέντρηση (4000 rpm, 10 min) και απόχυση του υπερκειμένου.
- Μετά το πέρας των εκπλύσεων τα πλασμολυμένα πλέον κύτταρα συλλέγονται με την βοήθεια απεσταγμένου νερού και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.



Σχήμα 6.1. *Προετοιμασία των κυττάρων του S. cerevisiae που χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης.*

6.Α.3. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο των μη-πλασμολυμένων και των πλασμολυμένων κυττάρων

Σκοπός: *Η επίδραση της πλασμόλυσης στο σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων.*

Αντιδραστήρια

- Κύτταρα του *S. cerevisiae* μη-πλασμολυμένα (§ 6.Α.1) και πλασμολυμένα με χλωριούχο νάτριο (10% κ.β., 20% κ.β., 30% κ.β., 40% κ.β.) (§ 6.Α.2)
- Απιονισμένο νερό
- Κεδρέλαιο

Όργανα

- Μικροσκόπιο (Leica DC 300, Cambridge, UK)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες
- Μικροβιολογικός κρίκος

Αναλυτική Πορεία

- Λαμβάνεται με την βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου μια μικρή ποσότητα του εκάστοτε αιωρήματος ζύμης και διασπείρεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Καλύπτεται με καλυπτρίδα.
- Ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο των κυττάρων των ζυμομυκήτων με αυξανόμενη μεγέθυνση (*10, *40 και *100 με σταγόνα κεδρέλαιου). Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στο σχήμα των κυττάρων όσο παραμένουν στα διαλύματα του χλωριούχου νατρίου πριν την έκπλυση τους, προκειμένου να εξακριβωθεί η επιτυχία της πλασμόλυσης.

6.Α.4. Μέθοδος Neubauer: προσδιορισμός της βιωσιμότητας και του πληθυσμού των κυττάρων

Σκοπός: *Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων του S. cerevisiae που περιέχονται ανά γραμμάριο λυοφιλιωμένης σκόνης κυττάρων (μη-πλασμολυμένων ή πλασμολυμένων) και προσδιορισμός της βιωσιμότητας τους με την βοήθεια της χρωστικής μπλε του μεθυλενίου. Το κυανούν του μεθυλενίου διαπερνά την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου χωρίς να επηρεάζει την λειτουργικότητα της, συνδέεται με ενδοκυτταρικά συστατικά και ανάγεται (αποχρωματίζεται) μετά από πρόσληψη δυο ηλεκτρονίων από ένζυμα των κυττάρων που έχουν μεταβολική δραστικότητα (ζωντανά). Αντιθέτως, εάν τα ένζυμα των κυττάρων είναι ανενεργά/μετουσιωμένα τα κύτταρα χρωματίζονται μπλε (Vairo, 1961; Cristian et al., 2009; Sanders et al., 1961).*

Αντιδραστήρια

- Κύτταρα του *S. cerevisiae* μετά από εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών πριν και μετά την λυοφιλίωση (§ 6.Α.1)
- Κύτταρα *S. cerevisiae* μετά από πλασμόλυση με χλωριούχο νάτριο (10, 20, 30, 40% κ.β.), εκπλύσεις με νερό και λυοφιλίωση (§ 6.Α.2)
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Πλάκα Neubauer (ProSciTech, Thuringowa, Australia)
- Καλυπτρίδα
- Διάλυμα χρωστικής μπλε του μεθυλενίου 0.01% v/v σε Ρ.Δ. φωσφορικών (pH 6.8)
- Μικροσκόπιο (Leica DC 300, Cambridge, UK)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 3 mg από το κάθε δείγμα.
- Προστίθενται 1 ml Ρ.Δ. φωσφορικών και 1 ml του διαλύματος μπλε του μεθυλενίου.
- Επιλέγεται μια από τις 2 εσοχές της πλάκας Neubauer και τοποθετείται μια ελαφρώς βρεγμένη καλυπτρίδα. Με έναν κρίκο λαμβάνεται ελάχιστη ποσότητα του εκάστοτε αιωρήματος και τοποθετείται στην άκρη της καλυπτρίδας.
- Ακολουθεί παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση×40). Η πλάκα αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα, το καθένα από 25 μικρότερα τετράγωνα και το τελευταίο από 16 μικρότερα. Εντοπίζεται το πρώτο πάνω αριστερά τετράγωνο και μετράται ο αριθμός των κυττάρων. Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλε, ενώ τα ζωντανά παραμένουν άχρωμα. Γίνεται καταμέτρηση και στα υπόλοιπα τετράγωνα της διαγωνίου και λαμβάνεται ο μέσος όρος.

Τα αποτελέσματα δίνονται σε αριθμό κυττάρων/ml δείγματος από την ακόλουθη σχέση :

$$\Sigma = 25 * 10^4 * N * \chi$$

όπου:
χ= συντελεστής αραίωσης μετά την προσθήκη της χρωστικής και
N= Μ.Ο κυττάρων σε 1 από τα 25 τετράγωνα της πλάκας.

Με βάση την ζυγισθείσα ποσότητα (mg) του κάθε δείγματος και τον όγκο του νερού (ml) που χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό του αιωρήματος, μπορεί να βρεθεί ο αριθμός κυττάρων/ mg λυοφιλιωμένης σκόνης κυττάρων.

Στον παραπάνω τύπο έχει ληφθεί υπόψη ότι στην πλάκα, το καθένα από τα 25 τετραγωνίδια έχει βάθος 0.1 mm και το εμβαδόν κάθε τετραγωνιδίου είναι 1 mm^2, άρα ο όγκος κάθε τετραγωνιδίου είναι 0.1 mm^3.

6.Α.5. Μέθοδος PDA για τον προσδιορισμό της ζωτικότητας των κυττάρων

Σκοπός: *ενώ η μέθοδος Neubauer προσδιορίζει τον συνολικό αριθμό των κυττάρων (ζωντανών και νεκρών) η μέθοδος PDA είναι πιο εκλεκτική στον προσδιορισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Υπάρχει εκλεκτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και μετά από επώαση των κυττάρων στις βέλτιστες συνθήκες (οξυγόνου, θερμοκρασίας) μετράται ο αριθμός των αποικιών, οι οποίες σχηματίζονται από τα ζωντανά κύτταρα.*

Αντιδραστήρια

- Λυοφιλιωμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* μη-πλασμολυμένα (§ 6.Α.1) και πλασμολυμένα (§ 6.Α.2)
- Αραιωτικό (δισκία Ringer, Merck): 1 δισκίο διαλύεται σε 500ml νερό και το διάλυμα διανέμεται ανά 9ml σε γυάλινα φιαλίδια με πώμα, τα οποία αποστειρώνονταν στους 121^{o}C, για 15 min.

- Υπόστρωμα PDA: τα συστατικά του υποστρώματος (meat extract, yeast extract, NaCl, D-glucose, peptone from casein, dipotassium dehydrogenate phosphate) διαλύονται εν θερμώ και υπό συνεχή ανάδευση στην κατάλληλη αναλογία σε απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121^{o}C, για 15 min.

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Τρυβλία επιστρωμένα με θρεπτικό υπόστρωμα PDA
- Πιπέττες 100-1000μl (pipetman, eppendorf)
- Γυάλινα φιαλίδια με πώμα των 35 ml (7,5 × 2,5 cm), αποστειρωμένα
- Κλίβανος (Memmert, UK)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 1.6 mg από κάθε δείγμα, τα οποία μεταφέρονται σε ένα φιαλίδιο με αραιωτικό (αραίωση 10^{-1}). Ακολουθεί ανάδευση σε vortex.
- Από το φιαλίδιο με την αραίωση 10^{-1}, λαμβάνεται με την βοήθεια πιπέττας 1 ml και διασπείρεται στο 2^{o} φιαλίδιο που περιέχει 9 ml αραιωτικού (αραίωση 10^{-2}). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση στο vortex. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί αραίωση 10^{-7}.
- Για το κάθε δείγμα λαμβάνονται 7 τρυβλία επιστρωμένα με PDA. Από το κάθε φιαλίδιο με το αραιωτικό, αφού πραγματοποιηθεί ανάδευση με vortex, λαμβάνονται 100 μl από το πιο αραιό αιώρημα (10^{-7}), υπό ασηπτικές συνθήκες, και αποχύνονται στο κέντρο του τρυβλίου. Ακολουθεί διασπορά σε όλο το τρυβλίο με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου. Η γυάλινη ράβδος στη συνέχεια αποστειρώνεται στην φλόγα λύχνου και εμβαπτίζεται σε αιθανόλη.
- Ομοίως, από το ίδιο δείγμα λαμβάνονται 100 μl από το αιώρημα της επόμενης αραίωσης (10^{-6}), αφού προηγηθεί vortex, και ακολουθεί διασπορά σε νέο τρυβλίο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τις υπόλοιπες αραιώσεις του δείγματος. Ομοίως προετοιμάζονται όλα τα δείγματα.
- Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων σε κλίβανο στους 30^{o}C, για 48h.
- Γίνεται καταμέτρηση του αριθμού των σχηματιζόμενων αποικιών από κάθε δείγμα, για καθεμιά από τις 7 αραιώσεις και υπολογίζεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων ανά ml του αρχικού αιωρήματος.

6.Α.6. Μελέτη των κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae* (μη-πλασμολυμένων και πλασμολυμένων) με DSC και FT-IR

Σκοπός: *με την μέθοδο DSC (Differential Scanning Calorimetry) μπορεί να προσδιοριστεί η θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας από την φάση πηκτής (gel phase) στην ρευστή υγροκρυσταλλική φάση (liquid crystalline phase) και να μελετηθεί εάν η πλασμόλυση προκαλεί αλλαγές σε αυτή και άρα και στην σύσταση/οργάνωση και τη ρευστότητα της μεμβράνης.*

Η Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR, Infrared spectroscopy) μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της πλασμόλυσης ή της λυοφιλίωσης στη σύσταση και την οργάνωση των επιμέρους συστατικών του κυττάρου και ιδιαίτερα του κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης.

Αντιδραστήρια

- Λυοφιλιωμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* πλασμολυμένα (§ 6.Α.2) και μη (§ 6.Α.1)
- Βρωμιούχο κάλιο (Merck, Darmstadt, Germany)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Διάταξη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθήνας, DSC 6 Pyris (Perkin- Elmer, Boston, USA)
- Καψίδια αλουμινίου (DSC pans) 50 μl (Perkin Elmer, Boston, USA) με καπάκια αλουμινίου με οπή ή όχι
- Φασματοφωτόμετρο Υπερύθρου (Perkin Elmer, Model GX)

Αναλυτική Πορεία

- **DSC**: 5 mg από το κάθε δείγμα ζυγίζονται με ακρίβεια ±0.01 mg σε καψίδια αλουμινίου των 50 μl και κλείνονται ερμητικά. Λαμβάνονται τα θερμογραφήματα σάρωσης των δειγμάτων με την διαβίβαση αερίου αζώτου με ροή 20 ml/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν το εξής: Τα δείγματα παραμένουν στους 30^{o}C για 1min, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας και στην συνέχεια θερμαίνονται από τους 30^{o}C έως τους 380^{o}C, με ρυθμό αύξησης 10^{o}C/min. Το κάθε δείγμα σαρώνεται τρεις φορές.
- **FT-IR**: Το κάθε δείγμα αναμιγνύεται με 200 mg KBr και σχηματίζεται δισκίο, του οποίου λαμβάνεται το φάσμα υπερύθρου (3 φορές).

6.Α.7. Παράμετροι που επηρεάζουν την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα του *S. cerevisiae*

6.Α.7.Α. Πλασμολυμένα, μη-πλασμολυμένα και ζωντανά κύτταρα

Σκοπός: *Η σύγκριση των μη-πλασμολυμένων και των πλασμολυμένων λυοφιλιωμένων κυττάρων ως προς την αποτελεσματικότητα τους να ενθυλακώνουν την κουρκουμίνη σε σχέση με ζωντανά, μη-λυοφιλιωμένα κύτταρα. Ως πλασμολυμένα κύτταρα λαμβάνονται αυτά που πλασμολύθηκαν και με τις 4 συγκεντρώσεις του χλωριούχου νατρίου, όπως συνοψίζεται στο σχήμα 6.2.*

Αντιδραστήρια

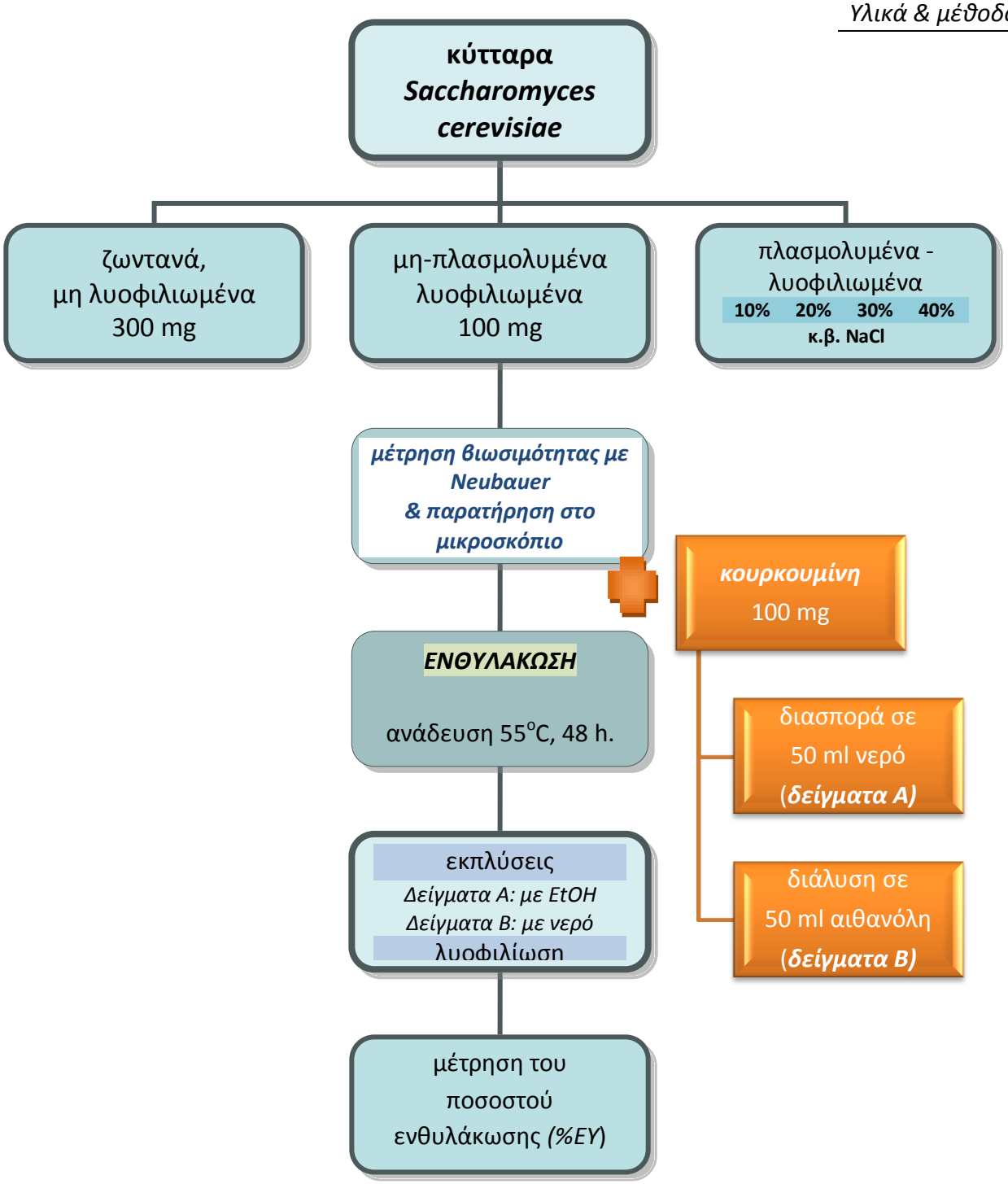
- Λυοφιλιωμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* πλασμολυμένα (§ 6.A.2) και μη (§ 6.A.1)
- Νωπά, ζωντανά κύτταρα του *S. cerevisiae*
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Κωνικές φιάλες και ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 ml
- Φυγόκεντρος (Hermle Z200A, Germany)
- Falcon των 50 ml
- Συσκευή λυοφιλίωσης (Thermosavant, Model ModulyoD)
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm, UK)

Αναλυτική Πορεία

- Για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης χρησιμοποιούνται 6 διαφορετικά είδη κυττάρων: μη-πλασμολυμένα, πλασμολυμένα με 10, 20, 30 και 40% κ.β. χλωριούχο νάτριο και ζωντανά κύτταρα.
- Σε κωνικές φιάλες των 100 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 100 mg κυττάρων από κάθε δείγμα, με εξαίρεση τα ζωντανά συμπιεσμένα κύτταρα όπου ζυγίζονται 300 mg για να περιέχουν όλα τον ίδιο αριθμό κυττάρων (περίπου $4.7*10^9$ κύτταρα) και προστίθενται 50 ml νερού προς την δημιουργία αιωρήματος κυττάρων.
- Στο κάθε αιώρημα προστίθενται 100 mg κουρκουμίνης διεσπαρμένης σε 50 ml απιονισμένο νερό, οπότε το διάλυμα της ενθυλάκωσης που προκύπτει είναι υδατικό (***Δείγματα Α*).**
- Δεδομένης της μικρής διαλυτότητας της κουρκουμίνης στο νερό, η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τα ίδια δείγματα κυττάρων, με την διαφορά ότι προστίθεται η κουρκουμίνη διαλυμένη σε αλκοόλη (50 ml), οπότε το διάλυμα της ενθυλάκωσης που προκύπτει είναι 50% v/v αλκοολικό (***Δείγματα Β***).
- Τα δείγματα σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο και αναδεύονται στην θερμαντική συσκευή ανάδευσης για 48 h, στους 55^{o}C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 6000 rpm και απόχυση του υπερκειμένου.
- Απομάκρυνση της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης ανάλογα με το διάλυμα της ενθυλάκωσης (υδατικό ή 50% v/v αλκοολικό):
  Δείγματα Α: 3 εκπλύσεις με 20 ml αιθανόλης κάθε φορά, μία με 20 ml νερό, φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min), απομάκρυνση υπερκειμένου και λυοφιλίωση.
  Δείγματα Β: έκπλυση με 10 ml νερό, φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min), απομάκρυνση υπερκειμένου και λυοφιλίωση.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο των λυοφιλιωμένων μικροκαψουλών και προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης (%ΕΥ) και της απόδοσης ενθυλάκωσης (%ΕΕ) της κουρκουμίνης στα κύτταρα (§ 6.A.8, § 6.A.9).



Σχήμα 6.2. *Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε ζωντανά, μη-πλασμολυμένα και πλασμολυμένα κύτταρα του S. cerevisiae.*

6.Α.7.Β. Θερμοκρασία, αιθανόλη, λόγος μάζας κουρκουμίνη: κύτταρα

Σκοπός*: Η επίδραση που ασκεί ο καθένας από τους παραπάνω παράγοντες στην αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης, όπως αυτή εκφράζεται με τις τιμές % ΕΥ και % ΕΕ. Η πορεία που ακολουθείται συνοψίζεται στο σχήμα 6.3. Μετά την μελέτη των διαφορετικά πλασμολυμένων κυττάρων με DSC, FT-IR, και μετά την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης και του προσδιορισμού των %ΕΥ τιμών (§ 6.Α.7.Α), ως πλασμολυμένα κύτταρα επιλέγονται αυτά που έχουν υποστεί πλασμόλυση με 10% κ.β. αλάτι και τα οποία συγκρίνονται με τα μη-πλασμολυμένα κύτταρα.*

Αντιδραστήρια

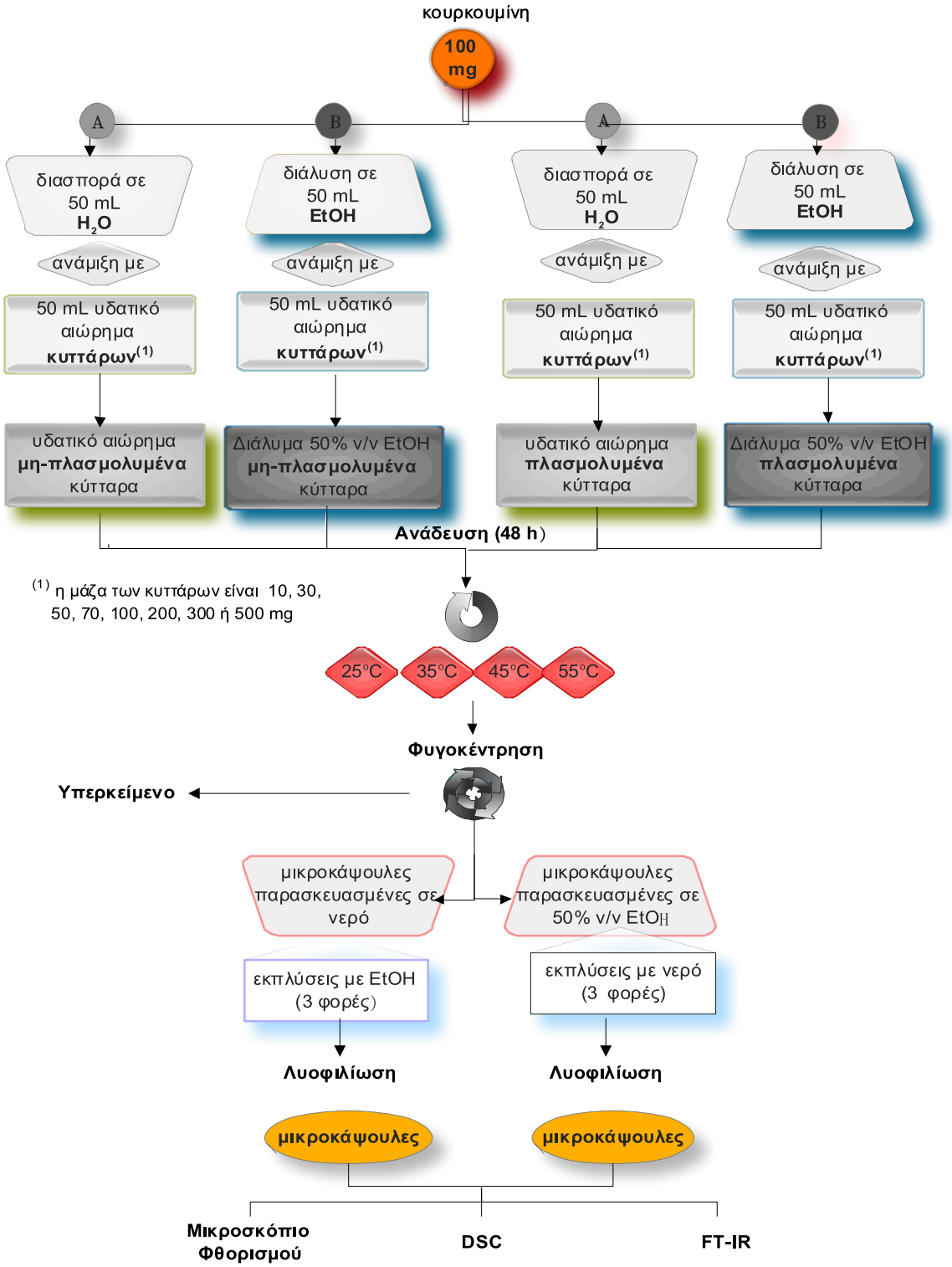
- Λυοφιλιωμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* μη-πλασμολυμένα (§ 6.Α.1) και πλασμολυμένα με 10% κ.β. χλωριούχο νάτριο (§ 6.Α.2).
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Φυγόκεντρος (Hermle Z200A, Germany)
- Συσκευή λυοφιλίωσης (Thermosavant, Model ModulyoD)
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm, UK)

Αναλυτική Πορεία

- Σε 8 κωνικές φιάλες των 100 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια οι ακόλουθες ποσότητες μη-πλασμολυμένων κυττάρων: 10, 30, 50, 70, 100, 200, 300 και 500 mg. Όμοια σε άλλες 8 φιάλες ζυγίζονται οι ίδιες ποσότητες των πλασμολυμένων με 10% κ.β. αλάτι κυττάρων.
- Στην καθεμία φιάλη προστίθεται 50 ml απιονισμένου νερού για την δημιουργία αιωρήματος κυττάρων.
- Στο κάθε αιώρημα προστίθενται 100 mg κουρκουμίνης διεσπαρμένης σε 50 ml απιονισμένο νερό (διάλυμα ενθυλάκωσης υδατικό) (***Δείγματα Α*)**, οπότε ο λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα είναι 10.0, 3.3, 2.0, 1.4, 1.0, 0.5, 0.3 και 0.2.
- Δεδομένης της μικρής υδατοδιαλυτότητας της κουρκουμίνης, η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τα ίδια δείγματα κυττάρων, με την διαφορά ότι προστίθεται 100 mg κουρκουμίνης διαλυμένης σε 50 ml αλκοόλη (διάλυμα ενθυλάκωσης 50% v/v αλκοολικό) (***Δείγματα Β***).
- Τα δείγματα (συνολικά 32) σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο και αναδεύονται (180 rpm) για 48 h, στους 25^{o}C.
- Η όλη διαδικασία της ενθυλάκωσης, επαναλαμβάνεται και στις εξής θερμοκρασίες ενθυλάκωσης: 35, 45 και 55^{o}C.
- Μετά το πέρας της ανάδευσης τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 min στις 6000 rpm και ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου.
- **Δείγματα Α**: 3 εκπλύσεις με 20 ml αιθανόλης και μια με 20 ml νερό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min), απομάκρυνση υπερκειμένου και λυοφιλίωση.
  Δείγματα Β: έκπλυση με 10 ml νερό, φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min), απομάκρυνση υπερκειμένου και λυοφιλίωση.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο των λυοφιλιωμένων μικροκαψουλών και προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης *(% ΕΥ)* και της απόδοσης ενθυλάκωσης *(% ΕΕ)* της κουρκουμίνης στα κύτταρα (§ 6.Α.8, 6.Α.9).



Σχήμα 6.3. *Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του S. cerevisiae. Βασικές παράμετροι που εμπλέκονται είναι η κατάσταση των κυττάρων (πλασμολυμένα και μη), το διάλυμα της ενθυλάκωσης (υδατικό ή 50% v/v αιθανολικό), η θερμοκρασία ενθυλάκωσης και αναλογία μάζας κύτταρα: κουρκουμίνη.*

6.Α.8. Απεγκλωβισμός και προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae*

Σκοπός: *Ο προσδιορισμός της ποσότητας της κουρκουμίνης που ενθυλακώνεται στις μικροκάψουλες κυττάρων του S. cerevisiae και υπολογισμός των τιμών %Encapsulation Yield (% EY) και %Encapsulation Efficiency (% EE) προς εύρεση της αποτελεσματικότητας της ενθυλάκωσης, όπως φαίνεται στο σχήμα 6.4.*

Encapsulation YIELD
% κ.β. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

$$\text{EY (\%)} = \frac{\text{g ενθυλακωμένης κουρκουμίνης}}{\text{100 g κάψουλας}}$$

Encapsulation EFFICIENCY
ΑΠΟΔΟΣΗ (%)

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{g ενθυλακωμένης κουρκουμίνης}}{\text{αρχικά g κουρκουμίνης}} * 100$$

Αντιδραστήρια

- Μικροκάψουλες κουρκουμίνης σε κύτταρα *S. cerevisiae* (§ 6.Α.7)
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF, (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Συσκευή vortex
- Φυγόκεντρος (Orto Alpresa, Digicen 20)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 20 mg του κάθε δείγματος και προστίθεται 2 ml απιονισμένο νερό και 8 ml αιθανόλης.
- Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά στο vortex, για 10 min. Ακολουθεί παραμονή για μια νύχτα (overnight) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό την προστασία από το φώς.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min) και διήθηση του υπερκειμένου με τη βοήθεια φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.45 μm.
- Η περιεχόμενη στα εκχυλίσματα ποσότητα κουρκουμίνης προσδιορίζεται με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Επίδοσης (HPLC) (§ 6.Α.9).

6.Α.9. Ποσοτικός προσδιορισμός της κουρκουμίνης με HPLC

Αντιδραστήρια

- Μικροκάψουλες κουρκουμίνης σε κύτταρα *S. cerevisiae*
- ακετονιτρίλιο (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany)
- δις-απεσταγμένο νερό
- οξικό οξύ (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany)

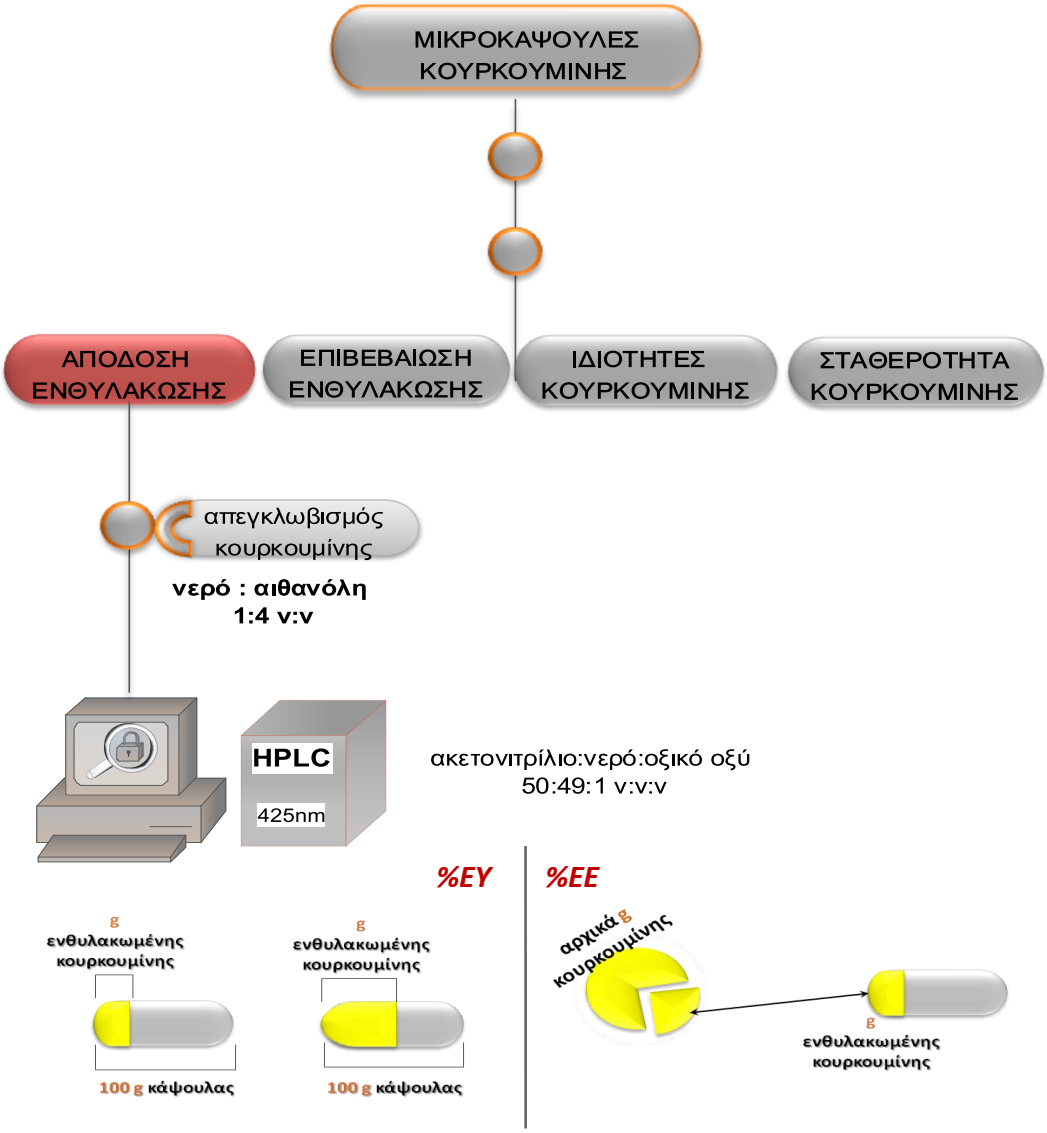
Όργανα

- Διάταξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (Shimatzu LC-Atvp) με αυτόματο δειγματολήπτη
- Ανιχνευτής φωτοδιοδίων (photodiode array, L-2455, 210nm)
- Αντλία (binary pump)
- στήλη C18 column (Waters symmetry 150-3.9mm, id 5μm) με προστήλη Waters Symmetry (5-3.9mm, id 5μm)

Αναλυτική Πορεία

- Παρασκευάζεται το ακόλουθο σύστημα διαλυτών: ακετονιτρίλιο:νερό:οξικό οξύ 50:49:1 v:v:v.
- Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται ισοκρατικά στους 40^{o}C σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στους Suresh et al., (2007). Η ροή του συστήματος διαλυτών είναι 1.0 ml/min. Ποσότητα 10 μl του δείγματος ή των προτύπων εισάγεται στον Υγρό Χρωματογράφο και η μέτρηση της κουρκουμίνης γίνεται στα 425 nm.
- Μετά το πέρας της κάθε ανάλυσης λαμβάνεται το χρωματογράφημα όπου αναγράφεται το εμβαδόν της κορυφής της κουρκουμίνης. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη μετά από ανάλυση πρότυπων αιθανολικών διαλυμάτων κουρκουμίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων (10-1000 μg/ml): Area= f (C), με την βοήθεια της οποίας υπολογίζεται η ποσότητα κουρκουμίνης που περιέχεται στα δείγματα.

Εναλλακτικά, ο ποσοτικός προσδιορισμός της κουρκουμίνης μπορεί να γίνει επιτυχώς και φασματοφωτομετρικά, μετρώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 425 nm (μετά την λήψη του φάσματος απορρόφησης), εφόσον τα κύτταρα του *S. cerevisiae* δεν απορροφούν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Για την εύρεση της ποσότητας κουρκουμίνης που περιέχεται στα δείγματα κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με αιθανολικά διαλύματα κουρκουμίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων (10-1000 μg/ml): Absorbance= f (C).



Σχήμα 6.4. *Προσδιορισμός των τιμών %ΕΥ και %ΕΕ των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης στα κύτταρα του S. cerevisiae.*

6.Α.10. Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae*.

Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* επιβεβαιώνεται άμεσα και έμμεσα, όπως φαίνεται στο σχήμα 6.5:

Α) Άμεσα:

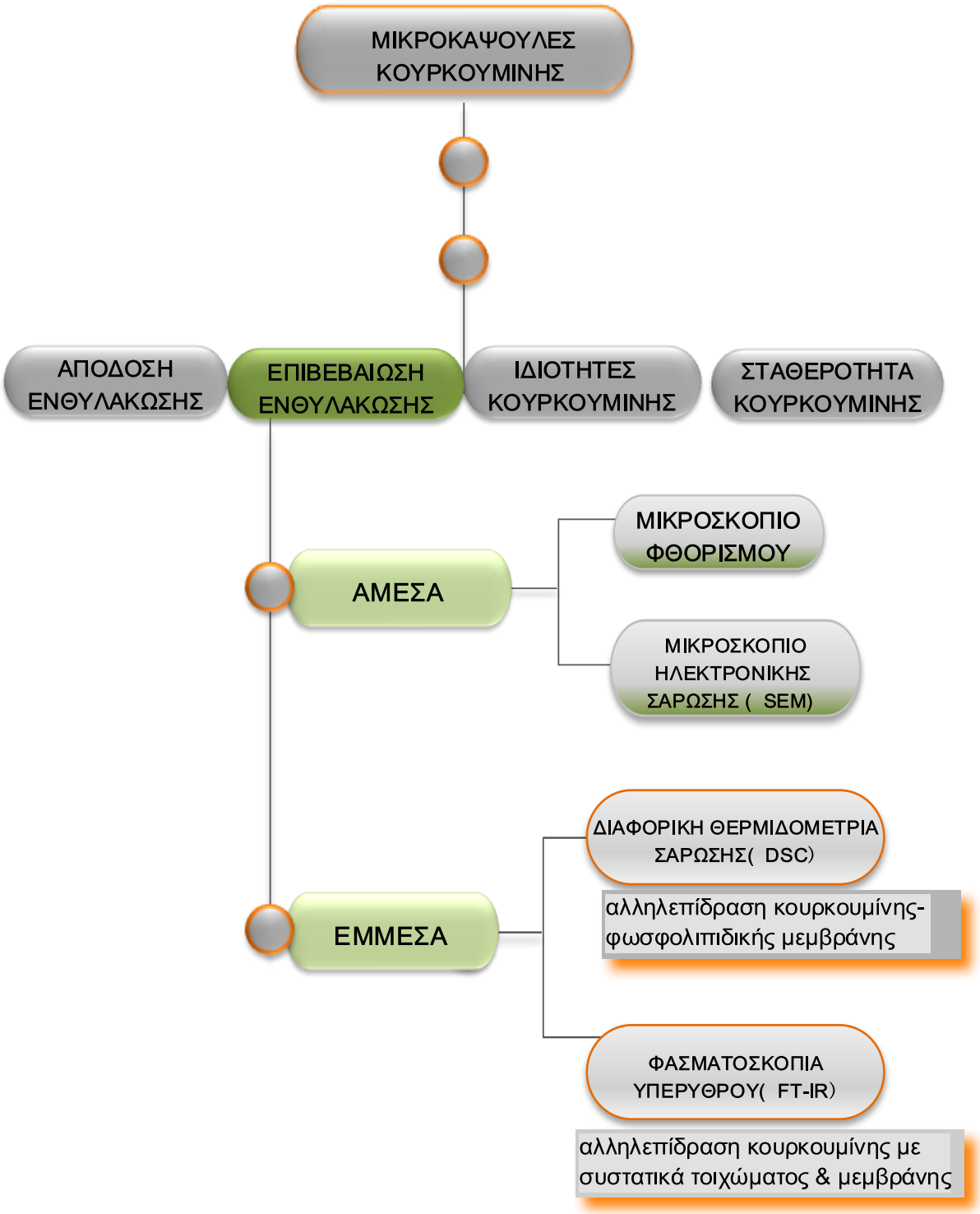
Χρησιμοποιούνται μικροσκοπικές τεχνικές :

- Οπτικό Μικροσκόπιο (§ 6.Α.3, 6.Α.7)
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)
- Μικροσκόπιο Φθορισμού (Fluorescence microscopy)

Β) Έμμεσα:

- Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

- Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)



Σχήμα 6.5. *Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του S. cerevisiae.*

6.A.10.1. Μικροσκόπιο Ηλεκτρονικής Σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy, SEM*)

Αντιδραστήρια

- Μικροκάψουλες κουρκουμίνης σε κύτταρα του *S. cerevisiae* (§ 6.A.7)
- Κύτταρα λυοφιλιωμένα του *S. cerevisiae* (§ 6.A.1 & 6.A.2)
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Όργανα

Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) (Jeol JSM-5310) (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) εφοδιασμένο με Φασματοφωτομετρικό Ανιχνευτή διασποράς (EDS)

Αναλυτική Πορεία

- Μελετάται η επιφανειακή μορφολογία στα εξής δείγματα: κουρκουμίνη, κύτταρα *S. cerevisiae*, μικροκάψουλες κουρκουμίνης.
- Τα δείγματα επιγραφιτώνονται και αναλύονται στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης. Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης είναι εφοδιασμένο με Φασματοφωτομετρικό Ανιχνευτή διασποράς (EDS) οπότε πραγματοποιείται και στοιχειακή ανάλυση των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης.

6.A.10.2. Μικροσκόπιο Φθορισμού (*Fluorescence Microscopy*)

Αντιδραστήρια

- Μικροκάψουλες κουρκουμίνης σε κύτταρα του *S. cerevisiae* (§ 6.A.7)
- Κύτταρα λυοφιλιωμένα του *S. cerevisiae* (§ 6.A.1 & 6.A.2)
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες-Καλυπτρίδες

Όργανα

Μικροσκόπιο Φθορισμού (Leica DM 2500, Wetzlar, Germany) συνδεδεμένο με κάμερα (Leica DFC 420, Wetzlar, Germany) με το πρόγραμμα Suite V 3.2.

Αναλυτική Πορεία

Σχηματίζονται υδατικά αιωρήματα των προς μελέτη δειγμάτων τα οποία στην συνέχεια διασπείρονται με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου σε αντικειμενοφόρες πλάκες και καλύπτονται με καλυπτρίδα. Λαμβάνονται οι εικόνες σε λειτουργία φωτεινού πεδίου και φθορισμού με την βοήθεια του μικροσκοπίου φθορισμού σε μεγέθυνση 60×.

6.Α.10.3. Μελέτη των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης στα κύτταρα με DSC

Σκοπός: *με την μέθοδο DSC μπορεί έμμεσα να επιβεβαιωθεί η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα του S. cerevisiae συγκρίνοντας το θερμογράφημα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης με την ενθυλακωμένη στα κύτταρα του ζυμομύκητα, καθώς και με τα θερμογραφήματα των άδειων κυττάρων ζυμομύκητα και του φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων.*

Με την τεχνική αυτή είναι δυνατό επίσης να μελετηθεί η σταθερότητα των δειγμάτων σε οξειδωτικές συνθήκες, με την ταυτόχρονη διαβίβαση αερίου οξυγόνου.

Αντιδραστήρια

- Μικροκάψουλες κουρκουμίνης σε κύτταρα του *S. cerevisiae* (§ 6.Α.7)
- Κύτταρα λυοφιλιωμένα του *S. cerevisiae* (§ 6.Α.1 & 6.Α.2)
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Φυσικό μίγμα κουρκουμίνης-κυττάρων, στις ίδιες ποσότητες που παρασκευάστηκε και η εξεταζόμενη μικροκάψουλα: πραγματοποιείται ανάμιξη σε κάψα πορσελάνης για 5 min, προκειμένου να σχηματιστεί ομοιογενές μίγμα τους.

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Διάταξη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθήνας, DSC 6 Pyris (Perkin- Elmer, Boston, USA)
- Καψίδια αλουμινίου (DSC pans) 50μl (Perkin Elmer, Boston, USA) με καπάκια αλουμινίου με οπή ή χωρίς

Αναλυτική Πορεία

- 5 mg μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από το κάθε δείγμα ώστε να περιέχει 5 mg κουρκουμίνης ζυγίζονται με ακρίβεια ±0.01mg σε καψίδια αλουμινίου των 50 μl και κλείνονται ερμητικά.
- Λαμβάνονται τα θερμογραφήματα σάρωσης των δειγμάτων με την διαβίβαση αερίου αζώτου με ροή 20 ml/min, με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα με αυτό που περιγράφηκε στην § 6.Α.6 και παρατηρούνται οι διαφορές που παρουσιάζονται.
- Για την μελέτη της σταθερότητας στην οξείδωση της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης και μη) χρησιμοποιείται το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, με την διαφορά ότι διαβιβάζεται αέριο οξυγόνο σε ροή 20 ml/min για την επίτευξη οξειδωτικών συνθηκών. Λαμβάνονται πάλι τα θερμογραφήματα των τεσσάρων δειγμάτων (τρεις φορές το καθένα) και συγκρίνονται μεταξύ τους.

6.Α.10.4. Μελέτη των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης στα κύτταρα με FT-IR

Σκοπός: *με την μέθοδο αυτή μπορεί να ληφθούν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης της κουρκουμίνης με επιμέρους συστατικά του κυττάρου.*

Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν με DSC (§ 6.Α.10.3) μελετήθηκαν και με FT-IR και η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην § 6.Α.6. Για να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα όλα τα δισκία, συμπεριλαμβανομένων των μικροκαψουλών και του φυσικού μίγματος περιέχουν 2 mg κουρκουμίνης και 200 mg KBr.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}

Β' ενότητα :

Ενθυλάκωση της Κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη & Τροποποιημένο άμυλο

6.Β.1. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη

Σκοπός: *Η κουρκουμίνη μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα εγκλεισμού με την β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) σε μοριακή αναλογία κουρκουμίνη: β-CD 1:2, όπου ο καθένας φαινολικός δακτύλιος της κουρκουμίνης εγκλείεται στην κοιλότητα της β-CD, υπό την επίδραση δυνάμεων van der Waals, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου.*

Παρασκευάζονται σύμπλοκα κουρκουμίνης:β-CD σε μοριακή αναλογία 1:2 με 5 διαφορετικές μεθόδους βασισμένες στην βιβλιογραφία:

1) Σε υδατικό διάλυμα με ρύθμιση του pH: (**freeze drying method, F.D.**) (pH 5- ανάμιξη- διήθηση- λυοφιλίωση) (Tonnesen et al., 2002)
2) Ανάμιξη στερεής σκόνης: Kneading method I (**K.M.I**) (ανάμιξη- προσθήκη νερού- θέρμανση- διήθηση- λυοφιλίωση) (Vertzoni et al., 2006)
3) Ανάμιξη στερεής σκόνης: Kneading method II (**K.M.II**) (ανάμιξη σε μίγμα αιθανόλη:νερό 1:1 v:v- ξήρανση στο φούρνο) (Mura et al., 1999)
4) Συν-εξάτμισης: Co–evaporation (**C.E.**) (ανάμιξη σε μίγμα αιθανόλη: νερό 1:1 v:v- συμπύκνωση- λυοφιλίωση) (Manolikar & Sawant, 2003)
5) Συγκαταβύθιση: Co-precipitation (**C.P.**) (διάλυση κουρκουμίνης σε μεθανόλη και της β-CD σε νερό- θέρμανση 70^{o}C - εκπλύσεις με μεθανόλη- ξήρανση στον φούρνο) (Tang et al., 2002).

Στις 2 πρώτες μεθόδους, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το νερό, ενώ στις υπόλοιπες μίγμα αιθανόλης ή μεθανόλης: νερό 1:1 v:v. Ο σχηματισμός ή όχι συμπλόκου επιβεβαιώνεται με DSC.

Αντιδραστήρια

- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη, μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- β-κυκλοδεξτρίνη (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Φούρνος (Memmert, UK)
- Περιστροφικός Εξατμιστήρας (Rotary Evaporator)

- Κωνικές φιάλες των 100 ml και ποτήρια ζέσεως των 250 ml
- Συσκευή λυοφιλίωσης (Thermosavant, Model ModulyoD)
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm, UK)
- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Κάψα πορσελάνης και γουδί

Αναλυτική Πορεία

Ανάμιξη σε ρυθμιστικό διάλυμα (Freeze Drying, F.D.) (Tonnesen et al., 2002)

- Σε 60 ml υδατικού Ρ.Δ. pH 5 προστίθενται 1.11 γρ. β-CD (1.6 mM) και 0.18 γρ. κουρκουμίνης (μοριακή αναλογία κουρκουμίνη: β- κυκλοδεξτρίνη 1:2)
- Το δείγμα σκεπάζεται με αλουμινόχαρτο και αναδεύεται στην συσκευή ανάδευσης, στους 25^{o}C, για 7 ημέρες, για να επιτευχθεί ο εγκλεισμός.
- Μετά το πέρας της ανάδευσης τα δείγματα διηθούνται με την βοήθεια φίλτρου διαμέτρου πόρων 0.45 μm και το διήθημα ψύχεται στους –40°C για 24 h. Το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

Kneading method I (K.M.I) (Vertzoni et al., 2006)

- Σε κάψα πορσελάνης προστίθενται 0.18 γρ. κουρκουμίνης και 1.11 γρ. β–CD. Τα δύο συστατικά αναμιγνύονται σε στερεή κατάσταση στην κάψα πορσελάνης για 15 min για το σχηματισμό ομογενούς μίγματος, υπό την προστασία από το φως.
- Προστίθεται 1 ml απεσταγμένο νερό και ακολουθεί ανάμιξη για 5 min. Ακολουθεί προσθήκη πάλι 1 ml απεσταγμένου νερού και ανάδευση για άλλα 5 min μέχρι να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός ομογενούς πάστας.
- Η πάστα στην συνέχεια μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml, όπου προστίθεται 60 ml απεσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί ανάδευση στην θερμαντική συσκευή ανάδευσης στους 40^{o}C, για 30 min.
- Μετά το πέρας της ανάδευσης το δείγμα διηθείται με την βοήθεια φίλτρου διαμέτρου πόρων 0.45 μm και το διήθημα ψύχεται στους –40°C για 24 h. Το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

Μέθοδος Kneading method II (K.M.II) (Mura et al., 1999)

- Σε κάψα πορσελάνης προστίθενται 0.18 γρ. κουρκουμίνης και 1.11 γρ. β–CD. Τα δύο συστατικά αναμιγνύονται στην κάψα πορσελάνης με την βοήθεια γουδιού και προστίθεται η ελάχιστη δυνατή ποσότητα μίγματος αιθανόλης: νερό 1:1 v:v.
- Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση, υπό την προστασία από το φως, μέχρι να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός ομογενούς πάστας.
- Ακολουθεί ξήρανση στον φούρνο στους 35^{o}C, για περίπου 8 h, μέχρι σταθερού βάρους.

Μέθοδος Co – evaporation (C.E) (Manolikar & Sawant, 2003)

- Σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml προστίθενται οι προαναφερθείσες ποσότητες κουρκουμίνης και β-CD: 0.18 γρ. και 1.11 γρ., αντίστοιχα.
- Προστίθενται 80 ml διαλύματος 50% v/v αιθανόλη και ακολουθεί ανάμιξη στην θερμαντική

συσκευή ανάδευσης στους 50°C, για 30 min, υπό την προστασία από το φώς.
- Η πάστα στην συνέχεια μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 250 ml, και οδηγείται στον περιστροφικό εξατμιστήρα για εξάτμιση του διαλύτη, στους 40°C.
- Μετά το πέρας της εξάτμισης το δείγμα ψύχεται στους –40°C για 24 h και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

Co- precipitation (C.P.) *(Tang* et al., 2002)

Αυτή η μέθοδος παρασκευής προσομοιάζει με την μέθοδο της συγκαταβύθισης με μικρές διαφοροποιήσεις.

- Σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml διαλύονται 1.11 γρ. β–CD σε 50 ml απ. νερό, στους 60°C. Όμοια 0.18 γρ. κουρκουμίνης διαλύονται στον ελάχιστο όγκο μεθανόλης στους 60°C και προστίθενται στο υδατικό διάλυμα της β-CD στάγδην, με ισχυρή ανάδευση, υπό την προστασία από το φως.
- Το διάλυμα στην συνέχεια μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 250 ml, και οδηγείται για βρασμό, με τη βοήθεια ψυκτήρα (reflux) στους 70°C, για 4 h.
- Μετά το πέρας του βρασμού το δείγμα μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και αναδεύεται στους 70°C, για να απομακρυνθεί η μεθανόλη.
- Το δείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί ανάδευση για 8 h, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C για ένα βράδυ, και μετά διηθείται με την βοήθεια φίλτρου διαμέτρου πόρων 0.45 μm.
- Το στερεό ξεπλένεται 3 φορές με μεθανόλη για να απομακρυνθεί η μη ενθυλακωμένη κουρκουμίνη και ξηραίνεται σε φούρνο στους 50°C για περίπου 8 h, μέχρι σταθερού βάρους.

6.Β.2. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε τροποποιημένο άμυλο με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό (*spray drying*)

Σκοπός*: Για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης χρησιμοποιείται και άμυλο το οποίο έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή οκτένυλοηλεκτρικής ομάδας στην αλυσίδα του. Η τροποποίηση του αμύλου μεταβάλλει τον υδρόφιλο χαρακτήρα του και το καθιστά πιο υδρόφοβο, ικανό να αλληλεπιδράσει με ένα υδρόφοβο μόριο, όπως η κουρκουμίνη. Κατά την παρασκευή του γαλακτώματος γίνεται προαιρετικά και χρήση του μικρότερου σε μοριακό μέγεθος γαλακτωματοποιητή Tween 80 με σκοπό την μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων του γαλακτώματος και τη δημιουργία ενός πιο σταθερού συστήματος. Η απομάκρυνση του νερού από το γαλάκτωμα γίνεται με ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) και όχι με λυοφιλίωση η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα την καταστροφή του γαλακτώματος.*

Παρασκευάζονται 2 σύμπλοκα κουρκουμίνης-τροποποιημένου αμύλου με ή χωρίς την προσθήκη του ομογενοποιητή tween.

Αντιδραστήρια

- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Απιονισμένο νερό
- Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany)
- Τροποποιημένο άμυλο με ομάδες οκτένυλο-ηλεκτρικού (Cargill, Food & Pharma Specialties, USA)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Συσκευή ξήρανσης με ψεκασμό SD-04 του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Αθήνας (Buchi Mini Spray Dryer B-290, IKA)
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm, UK)
- Συσκευή ομογενοποίησης Ultra Turrax Junke & Kunkel, (IKA – Labortechnik, Taufen, Germany)

Αναλυτική Πορεία

Ακολουθήθηκε η μέθοδος παρασκευής γαλακτώματος (Mourtzinos et al., 2008).

- Διαλύονται 20 γρ. τροποποιημένου αμύλου σε 50 ml απεσταγμένο νερό. Προστίθενται 1 γρ. κουρκουμίνης, και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση στην συσκευή ανάδευσης, για 10 min.
- Το διάλυμα χωρίζεται στα δυο: στο ένα μέρος προστίθενται 50 mg του ομογενοποιητή Tween 80, ενώ στο άλλο όχι.
- Και τα δυο ομογενοποιούνται σε συσκευή ομογενοποίησης Ultra Turax στις 8000 rpm για 5 min.
- Μετά το πέρας της ομογενοποίησης τα δείγματα οδηγούνται στην διάταξη της ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying), για απομάκρυνση του νερού. Οι συνθήκες είναι οι ακόλουθες: αέρας από το περιβάλλον εισάγεται στον ξηραντήρα με τη βοήθεια φυσητήρα με μέγιστη παροχή 35m^3/h. Η διάμετρος εξόδου του ψεκαζόμενου διαλύματος είναι 0.7 mm. Η παροχή του αέρα 10 mL/min. Η μέγιστη δυναμικότητα εξάτμισης του ξηραντήρα είναι 1L νερό/h για θερμοκρασία εισόδου του αέρα ξήρανσης 130°C και θερμοκρασία εξόδου του αέρα 85°C. Η μέγιστη ισχύς θέρμανσης είναι 2300 W. Η διάμετρος τα παραγόμενων σωματιδίων είναι 1-25 μm.

6.Β.3. Προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στην β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο

Σκοπός: *Ο απεγκλωβισμός της κουρκουμίνης από την β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο και ο προσδιορισμός των τιμών Encapsulation Yield (%EY) και Encapsulation Efficiency (%EE) (§ 6.Α.8) προς εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της ενθυλάκωσης.*

Σε όσα δείγματα πραγματοποιήθηκε διήθηση για την απομάκρυνση της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης, η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη, προκύπτει από την διαφορά: ολική αρχικά προστιθέμενη (-) ενθυλακωμένη.

Χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο των Soottitantawat et al., (2005), Loksuwan (2007), με ορισμένες τροποποιήσεις.

Αντιδραστήρια

- Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο (§ 6.Β.1, 6.Β.2)
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF, (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Φυγόκεντρος (Orto Alpresa Digicen 20)
- Συσκευή vortex

Αναλυτική Πορεία

Προσδιορισμός ολικής κουρκουμίνης

Η ολική ποσότητα κουρκουμίνης προσδιορίζεται μετά από προσθήκη του εκάστοτε δείγματος σε νερό για την διάλυση της β-κυκλοδεξτρίνης/τροποποιημένου αμύλου και απεγκλωβισμό της κουρκουμίνης, ακολουθούμενη από παραλαβή της με οξικό αιθυλεστέρα.

- Ζυγίζονται 10 mg του κάθε δείγματος και προστίθεται 8 ml του διαλύτη νερό: οξικός αιθυλεστέρας 1:1 v:v. Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά στο vortex, για 5 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min) και παραλαβή της υπερκείμενης στοιβάδας του οξικού αιθυλεστέρα. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Το υπερκείμενο διηθείται με τη βοήθεια φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.45 μm.
- Η περιεχόμενη στα εκχυλίσματα ποσότητα κουρκουμίνης προσδιορίζεται με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) (§ 6.Α.9)

Προσδιορισμός ελεύθερης (μη-ενθυλακωμένης) κουρκουμίνης

Η ελεύθερη (επιφανειακή) κουρκουμίνη προσδιορίζεται με παραλαβή της με οργανικό διαλύτη από την επιφάνεια του εκάστοτε δείγματος.

- Ζυγίζονται 10 mg του κάθε δείγματος και προστίθεται 10 ml οξικού αιθυλεστέρα.
- Τα δείγματα αναδεύονται στις 150 rpm, για 30 min, προστατεύοντας τα από το φως και στη συνέχεια διηθούνται με τη βοήθεια φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.45 μm.
- Η περιεχόμενη στα διηθήματα ποσότητα κουρκουμίνης προσδιορίζεται με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) (§ 6.Α.9)

6.Β.4. Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης με DSC

Σκοπός: *με την μέθοδο DSC μπορεί να επιβεβαιωθεί έμμεσα η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στην β-CD συγκρίνοντας το θερμογράφημα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης με την ενθυλακωμένη στην β-CD, καθώς και με τα θερμογραφήματα της β-CD και του φυσικού μίγματος κουρκουμίνη/β-CD. Στην περίπτωση της ενθυλάκωσης στο τροποποιημένο άμυλο η επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης πραγματοποιείται συγκρίνοντας τα θερμογραφήματα της ενθυλακωμένης και μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης.*

Μελετήθηκαν όλα τα σύμπλοκα κουρκουμίνης με την β–CD, και τα 2 που παρασκευάστηκαν με το τροποποιημένο άμυλο.

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην § 6.Α.10.3. Λαμβάνονται τα θερμογραφήματα σάρωσης των δειγμάτων με την διαβίβαση αερίου αζώτου με ροή 20 ml/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν το εξής: Τα δείγματα παραμένουν στους 50^{o}C για 1 min, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας και στην συνέχεια θερμαίνονται από τους 50^{o}C έως τους 380^{o}C, με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 20^{o}C/min. Η εξαφάνιση του σημείου τήξης (Σ.Τ.) της κουρκουμίνης από τα θερμογραφήματα των δειγμάτων αποτελεί απόδειξη σχηματισμού συμπλόκου εγκλεισμού και όχι ενός απλού φυσικού μίγματος.

Μελετήθηκε και η σταθερότητα των δειγμάτων στην οξείδωση με την διαβίβαση αέριου οξυγόνου με ροή 20 ml/min στο εξής θερμοκρασιακό πρόγραμμα: Τα δείγματα θερμαίνονται από την θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 110^{o}C με ρυθμό σάρωσης 30°C/min. Τα δείγματα παραμένουν στους 110^{o}C για 1 min, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο δείγμα και μετά θερμαίνονται έως τους 380^{o}C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 20°C/min.

6.Β.5. Μελέτη της διαλυτότητας της κουρκουμίνης παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης

Σκοπός: *Η διαλυτότητα της κουρκουμίνης παρουσία β-CD μελετάται με βάση την μέθοδο των Higuchi & Connors (1965). Η μελέτη διαλυτότητας δεν επαληθεύει τον σχηματισμό συμπλόκου, απλά περιγράφει εάν η αύξηση στην συγκέντρωση της CD επηρεάζει την διαλυτότητα της κουρκουμίνης. Η μελέτη της διαλυτότητας πραγματοποιείται σε διαφορετικές θερμοκρασίες και επιτρέπει τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων του σχηματισμού του συμπλόκου (μεταβολή ενθαλπίας, μεταβολή εντροπίας) με βάση την εξίσωση Van't Hoff:*

$$\ln K_C = -\frac{\Delta H^{\neq}}{RT} + \frac{\Delta S^{\neq}}{R}$$

όπου $\Delta H^{\neq}$ η μεταβολή της ενθαλπίας, $\Delta S^{\neq}$ η μεταβολή της εντροπίας, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (R=8,314 J/mol K) και T η απόλυτη θερμοκρασία (K).
Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs λόγω των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά το σχηματισμό του συμπλόκου υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\Delta G_{25} = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Αντιδραστήρια

- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Απιονισμένο νερό
- β-κυκλοδεξτρίνη (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm)
- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF, (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο: Specord 200 (Analytikjena, Jena, Germany)

Αναλυτική Πορεία

- Παρασκευάζονται 5 ml υδατικών διαλυμάτων β-CD συγκέντρωσης 0.000, 0.003, 0.006, 0.009, 0.012 και 0.015 M. Στο καθένα προστίθεται περίσσεια κουρκουμίνης (τριπλάσια mol του πιο πυκνού διαλύματος κυκλοδεξτρίνης, δηλαδή 0.083 γρ).
- Τα δείγματα, προστατευμένα από το φως, αναδεύονται στην συσκευή ανάδευσης, στους 25^{o}C, για 48 h, για να επιτευχθεί η ισορροπία.
- Μετά το πέρας της ανάδευσης τα δείγματα διηθούνται με την βοήθεια φίλτρου διαμέτρου πόρων 0.45 μm και η ποσότητα της κουρκουμίνης σε κάθε διάλυμα προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 425 nm. Το πείραμα επαναλαμβάνεται σε θερμοκρασίες 35 και 45^{o}C.
- Οι σταθερές ισορροπίας, Kc, υπολογίζονται από την εξίσωση της ευθείας του διαγράμματος της μελέτης διαλυτότητας σύμφωνα με την εξίσωση των Higuchi–Connors:

$$K_C = \frac{slope}{\text{int}\, ercept \cdot (1 - slope)}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}

Γ' ενότητα:

Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Ενθυλακωμένης Κουρκουμίνης

Σκοπός: *Αρχικά μελετάται εάν η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα μπορεί να αυξήσει την μικρή υδατοδιαλυτότητα της. Μελετάται επίσης ο μηχανισμός κατανομής (partition coefficient) της ενθυλακωμένης (σε κύτταρα, β-CD και MS) κουρκουμίνης σε σύστημα οκτανόλης/νερού, καθώς και το προφίλ της απελευθέρωσης/διαλυτοποίησης της (dissolution profile) σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό. Στην συνέχεια εξετάζεται εάν η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης ενδέχεται να προκαλέσει τροποποιήσεις στην αντιοξειδωτική της δραστικότητα και στην χρωστική της ικανότητα (colour staining effect).*

Τα **δείγματα** τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τις παραπάνω μελέτες καθώς και για την μελέτη της σταθερότητας της κουρκουμίνης (κεφ. 6.Δ) είναι τα ακόλουθα:

1) μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη (control).
2) 8 δείγματα κουρκουμίνης ενθυλακωμένης σε κύτταρα του *S. cerevisiae.* Τα δείγματα διαφοροποιούνται ως προς τις συνθήκες παρασκευής και την % κ.β. περιεκτικότητα τους σε κουρκουμίνη (%ΕΥ). Συγκεκριμένα 4 από τα δείγματα που επιλέγονται παρασκευάστηκαν με μη-πλασμολυμένα κύτταρα, 4 με πλασμολυμένα κύτταρα (σε διάλυμα υδατικό ή 50% κ.ο. αλκοολικό), χρησιμοποιώντας περίσσεια κουρκουμίνης ή περίσσεια κυττάρων (λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα 2.0 ή 0.2).
3) 5 δείγματα συμπλόκου κουρκουμίνης/β-CD, παρασκευασμένα με 5 διαφορετικές μεθόδους.
4) 2 δείγματα κουρκουμίνης ενθυλακωμένης σε τροποποιημένο άμυλο (με ή χωρίς tween).

Τα δείγματα της ενθυλακωμένης στα κύτταρα κουρκουμίνης (δείγματα 1-8) που επιλέγονται για τις παραπάνω μελέτες της σταθερότητας συνοψίζονται στο σχήμα 6.6. Για τα δείγματα της ενθυλακωμένης στην β-CD κουρκουμίνης χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες συντμήσεις, σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής τους (βλ.§ 6.Β.1):

Σύμπλοκο β- κυκλοδεξτρίνης		***Ονομασία- συντομογραφία***
Σε υδατικό διάλυμα με ρύθμιση του pH	→	freeze drying method (F.D.)
Ανάμιξη στερεής σκόνης: Kneading method I	→	K.M.I
Ανάμιξη στερεής σκόνης: Kneading method II	→	K.M.II
Συν-εξάτμιση: Co-evaporation	→	C.E.
Συν-καταβύθιση: Co-precipitation	→	C.P.



Σχήμα 6.6. *Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε κύτταρα, β-CD και MS, που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των ιδιοτήτων και της σταθερότητάς της.*

6.Γ.1. Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης παρουσία κυττάρων του *S. cerevisiae*

Σκοπός: *Πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα:*

A. Επίδραση της παρουσίας αυξανόμενης ποσότητας κυττάρων S. cerevisiae στην υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης, σε διάφορες θερμοκρασίες

B. Μελέτη της υδατοδιαλυτότητας των παρασκευασθέντων μικροκαψουλών της κουρκουμίνης στα κύτταρα σε διάφορες θερμοκρασίες

Αντιδραστήρια

- Λυοφιλιωμένα κύτταρα *S. cerevisiae*, μη-πλασμολυμένα (§ 6.Α.1) και πλασμολυμένα με 10% κ.β. χλωριούχο νάτριο (§ 6.Α.2)
- Απιονισμένο νερό
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- 8 δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε κύτταρα (§ 6.Α.7)

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Φυγόκεντρος (Orto Alpresa, Digicen 20)
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm)
- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF, (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο (UV-VIS, Shimadzu mini 1240)

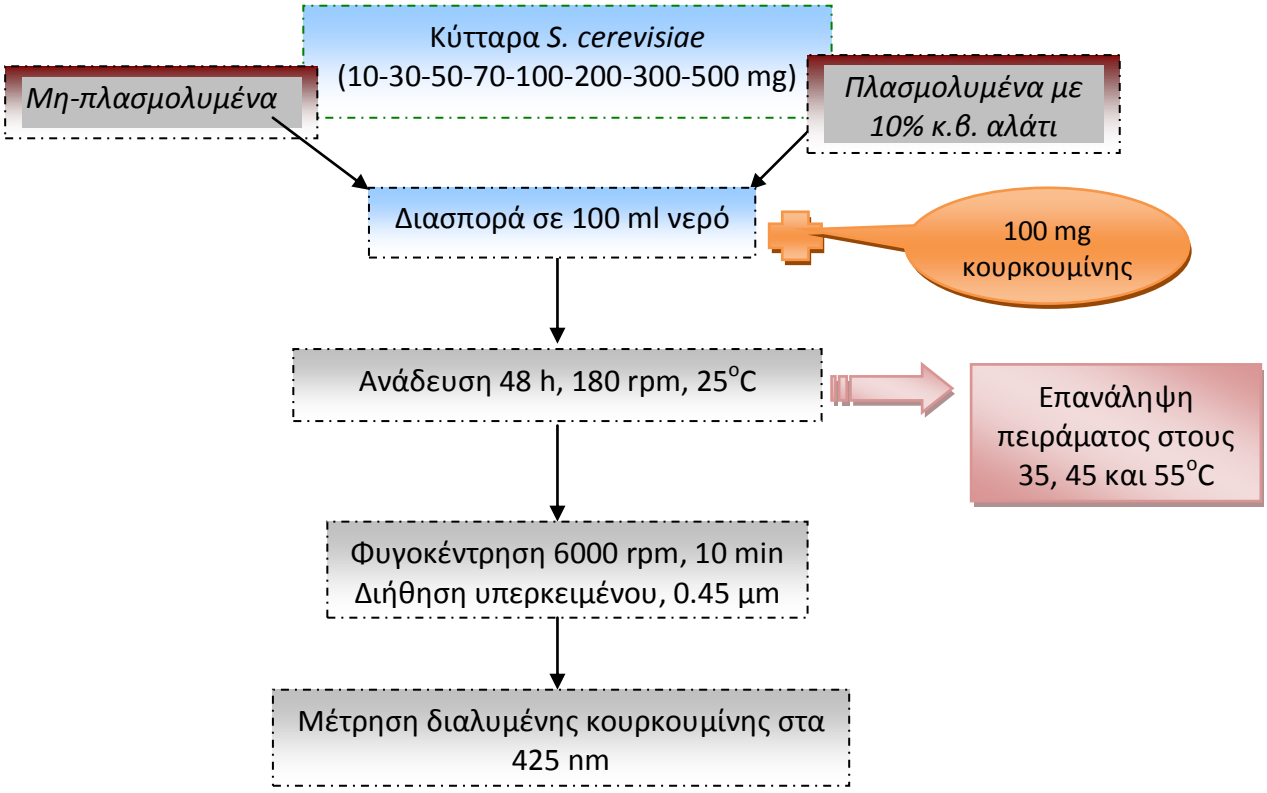
Αναλυτική Πορεία

Πείραμα Α: *Τροποποιείται η μέθοδος των Higuchi and Connors (1965) η οποία εφαρμόζεται για την μελέτη της διαλυτότητας της β-CD, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και η παρουσία αυξανόμενης ποσότητας κυττάρων (πλασμολυμένων με διάλυμα χλωριούχου νατρίου 10% κ.β. ή μη) επηρεάζει την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης σε τέσσερις θερμοκρασίες : 25, 35, 45 και 55^{o}C, όπως παρουσιάζεται συνοπτικά στο σχήμα 6.7.*

- Σε 8 κωνικές φιάλες των 100 ml, προστίθενται αυξανόμενες ποσότητες των μη-πλασμολυμένων κυττάρων: 10, 30, 50, 70, 100, 200, 300, 500 mg. Όμοια ζυγίζονται οι ίδιες ποσότητες των πλασμολυμένων κυττάρων.
- Σχηματίζεται αιώρημα κυττάρων προσθέτοντας 100 ml απιονισμένου νερού.
- Στο καθένα αιώρημα προστίθενται 100 mg κουρκουμίνης.
- Ως control χρησιμοποιούνται 100 mg στερεής κουρκουμίνης τα οποία διασπείρονται σε 100 ml νερό.
- Τα δείγματα σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο και αναδεύονται (180 rpm) για 48 h, στους

25°C. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται και στις εξής θερμοκρασίες: 35, 45 και 55°C.

- Μετά το πέρας της ανάδευσης τα δείγματα φυγοκεντρούνται (10 min, 6000 rpm) και το υπερκείμενο συλλέγεται και διηθείται σε φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm.
- Στο κάθε δείγμα προσδιορίζεται η ποσότητα της κουρκουμίνης που διαλύθηκε στο νερό μετρώντας την απορρόφηση στα 425 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg διαλυμένης κουρκουμίνης/100 ml νερό.



Σχήμα 6.7. *Επίδραση της παρουσίας κυττάρων S. cerevisiae (πλασμολυμένων και μη) στην υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης.*

Πείραμα Β: Από τα παρασκευασθέντα σε διαφορετικές συνθήκες δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (§ 6.Α.7), επιλέγονται 8 δείγματα και μελετάται εάν η υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης τροποποιείται σε σχέση με ίδια ποσότητα μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης, σε τέσσερις θερμοκρασίες : 25, 35, 45 και 55°C.

- Σε φιάλες των 100 ml ζυγίζεται τόση ποσότητα από κάθε μικροκάψουλα ώστε να περιέχει 10 mg κουρκουμίνης (με βάση την % ΕΥ τιμή της) και προστίθεται 100 ml απιονισμένου νερού. Ως control 10 mg μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης προστίθεται σε 100 ml νερό.
- Τα δείγματα αναδεύονται (180 rpm) για 24 h στους 25°C.
- Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται στους 35°C, 45°C και 55°C.
- Φυγοκέντρηση για 10 min στις 6000 rpm. Το υπερκείμενο του κάθε δείγματος διηθείται σε φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm. Προσδιορίζεται η ποσότητα της κουρκουμίνης που διαλύθηκε στο νερό φασματοφωτομετρικά μετρώντας την απορρόφηση στα 425 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg διαλυμένης κουρκουμίνης/ 100 ml νερό.

6.Γ.2. Προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε σύστημα οκτανόλης/νερό

Σκοπός: *Partition (P) ή Distribution coefficient (D) είναι ο λόγος της συγκέντρωσης ενός συστατικού στις δυο φάσεις ενός μίγματος μη αναμιγνυόμενων διαλυτών αφού αυτοί βρεθούν σε ισορροπία. Αποτελεί μέτρο του πόσο υδρόφιλη ή υδρόφοβη είναι η ουσία. Το P αναφέρεται σε μη-ιονιζόμενες ουσίες, ενώ το D σε ιονιζόμενες. Ισχύει:*

$$P_{οκτανόλη/νερό} = C_{οκτανόλη} / C_{μη\text{-}ιον\ νερό}$$

$$D_{οκτανόλη/νερό} = C_{οκτανόλη} / [C_{μη\text{-}ιον\ νερό} + C_{ιον\ νερό}]$$

Αντιδραστήρια

- Στερεή κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε κύτταρα, β-CD και MS
- Οκτανόλη (Merck, Darmstadt, Germany)
- Απιονισμένο νερό
- Ρυθμιστικά διαλύματα πέντε pH : 4, 7.4, 8, 9, 10

pH		
4	Όξινο φθαλικό κάλιο	50 mmol/l
7.4	Ρ.Δ. φωσφορικών	0.01M PBS, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl
8	Tris Buffer Saline	0.05M Tris, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl
9	Ρ.Δ. φωσφορικών	0.49M Na_2HPO_4, ρύθμιση pH με NaOH 12M
10	Ρ.Δ. φωσφορικών	0.49M Na_2HPO_4, ρύθμιση pH με NaOH 12M

Όργανα

- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Πιπέττες των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)
- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF, (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο (UV-VIS, Shimadzu mini 1240)

Αναλυτική πορεία

- Ζυγίζονται 4 mg μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από κάθε δείγμα με βάση την %ΕΥ ώστε να περιέχονται 4 mg κουρκουμίνης. Όσον αφορά την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη λαμβάνονται 2 δείγματα: ένα με μικρή %ΕΥ (δείγμα 6) και ένα

με μεγάλη (δείγμα 1).

- Τα κάθε δείγμα διαλύεται σε 4 ml οκτανόλης και το διάλυμα (1 mg/ml) γίνεται κορεσμένο με την προσθήκη 20% κ.ο. νερού. Ακολουθεί η προσθήκη 4 ml του εκάστοτε ρυθμιστικού διαλύματος. Το κάθε δείγμα προστίθεται επίσης σε 4 ml ελαιολάδου ή σε 4 ml νερού.
- Ανάδευση στο vortex για 10 min και ανακίνηση στις 180 rpm για 1 h.
- Παραμονή για 24 h προς αποκατάσταση της ισορροπίας και διαχωρισμό των 2 φάσεων.

Η συγκέντρωση της κουρκουμίνης στην υδατική φάση προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 424 nm. Η τιμή του logD, η οποία εξαρτάται από το pH, υπολογίζεται από τον λόγο της συγκέντρωσης στην φάση της οκτανόλης προς την υδατική φάση.

6.Γ.3. *In vitro* μελέτη της διαλυτοποίησης (*dissolution profile*) της κουρκουμίνης σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό

Σκοπός: *Η in vitro μελέτη της διαλυτοποίησης (και απελευθέρωσης) της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης ή μη) σε συνθετικό γαστρικό υγρό και παγκρεατικό υγρό. Η πορεία συνοψίζεται στο σχήμα 6.8.*

Για την μελέτη της διαλυτοποίησης ακολουθείται η πορεία των Naim et al., (2004). Το 'συνθετικό γαστρικό υγρό' (**SGF**) παρασκευάζεται ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στους Molly et al., (1994) και περιέχει τελικώς τα ακόλουθα συστατικά (σε g/L): 0.4 γλυκόζη, 3.0 yeast extract, 1.0 Bacto-Peptone, 4.0 porcine mucin, 0.5 κυστεΐνη, 0.08 NaCl, 0.4 $NaHCO_3$, 0.04 K_2HPO_4, KH_2PO_4, 0.008 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.008 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 xylan, 3.0 soluble starch, 2.0 USP πηκτίνης/L και 1 ml Tween 80/L. Το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 2.0 με πυκνό HCl (12 N). Ακολουθεί αποστείρωση και μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου το pH διορθώνεται (με 12 N HCl ή 5.0 N NaOH). Στο τέλος προστίθεται πεψίνη (P-7000; Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 3 g/L.

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε κύτταρα, β-CD και MS
- Συνθετικό γαστρικό υγρό (SGF)

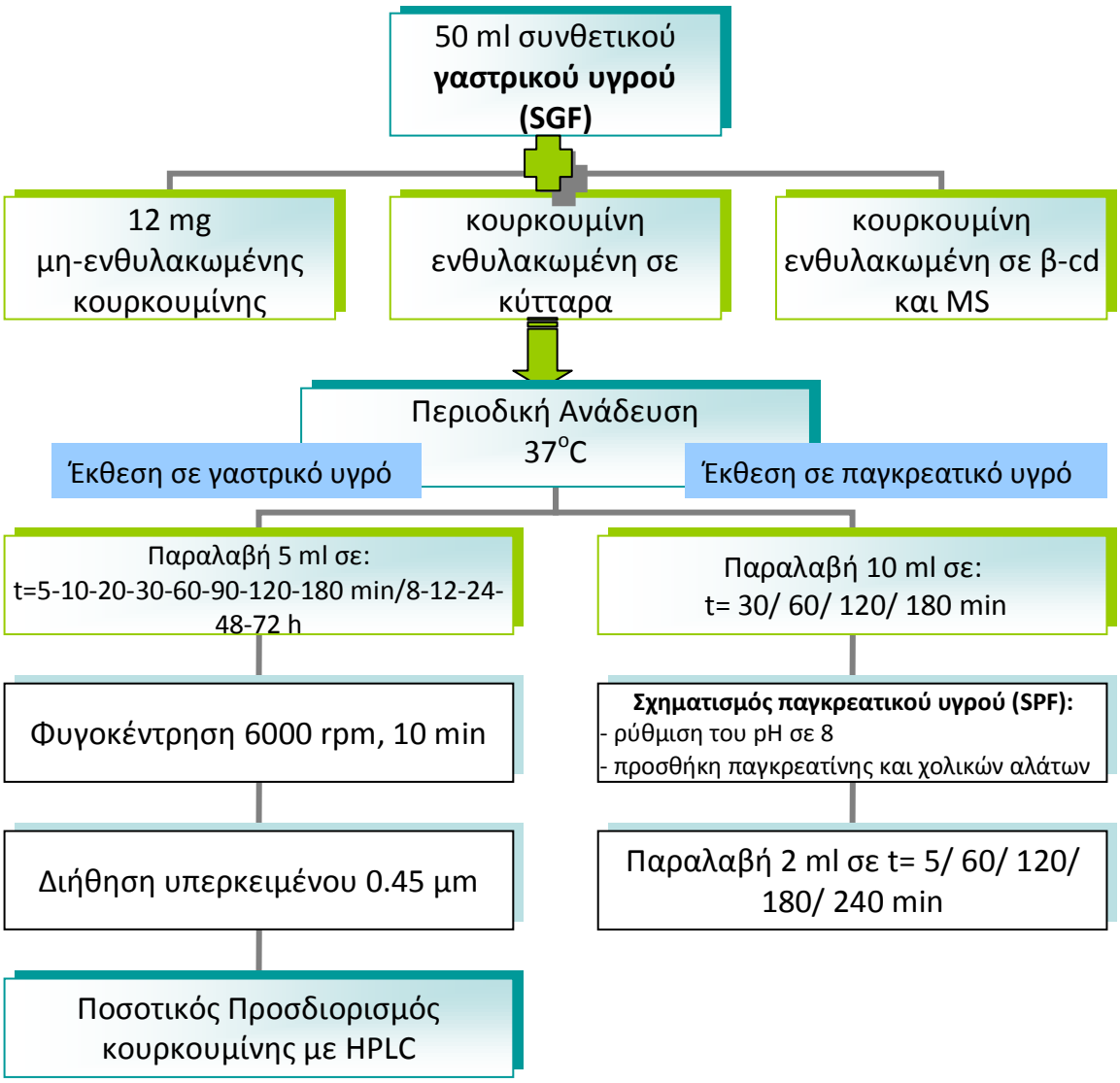
Όργανα

- Ζυγός ακριβείας (OHAUS, Cambridge, UK)
- Vortex
- Φυγόκεντρος (Orto Alpresa, Digicen 20)
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης (Selecta P, Rotaterm)
- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF, (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο (UV-VIS, Shimadzu mini 1240)

Αναλυτική Πορεία

Διαλυτοποίηση στο γαστρικό υγρό

- Ζυγίζονται με ακρίβεια 12 mg κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από το κάθε δείγμα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης που να περιέχει 12 mg κουρκουμίνης (με βάση την %EY τιμή) και προστίθεται 50 ml συνθετικού γαστρικού υγρού. Ως control χρησιμοποιείται διάλυμα 50 ml γαστρικού υγρού με και χωρίς ποσότητα του μέσου ενθυλάκωσης.
- Τα δείγματα σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο και αναδεύονται στους 37°C (150 rpm).
- Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα για μέγιστο 72 h λαμβάνονται 5 ml από το κάθε δείγμα, τα οποία φυγοκεντρούνται (10 min, 6000 rpm).
- Το υπερκείμενο διηθείται σε φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm PVDF filter.
- Στο διήθημα προσδιορίζεται η ποσότητα της κουρκουμίνης που διαλύθηκε-απελευθερώθηκε στο γαστρικό υγρό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg απελευθερωμένης κουρκουμίνης/ml γαστρικού υγρού.



Σχήμα 6.8. *Διαλυτοποίηση (dissolution profile) της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης και μη) σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό.*

Αναλυτική Πορεία

Διαλυτοποίηση στο παγκρεατικό υγρό

Μετά την παραμονή των δειγμάτων στο γαστρικό υγρό για 30, 60, 120 και 180 min (προσομοιάζοντας την γαστρική εκκένωση, η οποία αρχίζει περίπου μετά από 30 min από την κατανάλωση τροφής) λαμβάνονται 10 ml του εκάστοτε δείγματος και υποβάλλονται σε παγκρεατική έκθεση ως εξής: το pH των συλλεχθέντων δειγμάτων από το SGF ρυθμίζεται στο 8.0 με διάλυμα NaOH 5N. Ακολουθεί προσθήκη παγκρεατίνης (P-1500, Sigma-Aldrich) και χολικών αλάτων χοίρου (porcine bile extract, B8631, Sigma- Aldrich) σε ποσότητα 0.1 και 0.3% κ.β., αντίστοιχα, οπότε ουσιαστικά το συνθετικό παγκρεατικό υγρό (**SPF**) προέρχεται από το SGF με την προσθήκη παγκρεατίνης και χολικών αλάτων. Το κάθε δείγμα στο SPF παραμένει στους 37^{o}C και στα ακόλουθα χρονικά διαστήματα: 5 min, 60 min, 120 min, 180 min και 240 min λαμβάνονται 2 ml δείγματος, φυγοκεντρούνται (6000 rpm, 10min) και διηθούνται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm. Στο διήθημα προσδιορίζεται η κουρκουμίνη που απελευθερώθηκε-διαλυτοποιήθηκε με HPLC.

6.Γ.4. Χρωστική Ικανότητα Κουρκουμίνης (Colour Staining)

***Σκοπός**: Η κουρκουμίνη βρίσκει πολλές εφαρμογές στα δερματικά επιθέματα για τη θεραπεία φλεγμονών και πολλών δερματικών παθήσεων, αλλά η χρήση της περιορίζεται από το γεγονός ότι χρωματίζει το δέρμα και τα ενδύματα. Η χρωστική της ικανότητα κάποιες φορές επιβάλλεται να είναι περιορισμένη και για την εφαρμογή της σε τρόφιμα. Ακολουθείται η μεθοδολογία των Aziz et al., (2007) προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση που μπορεί να έχει η ενθυλάκωση στη χρωστική της ικανότητα.*

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε κύτταρα, β-CD και MS
- Άσπρες ετικέτες (4X4 cm)

Όργανα

- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Χρωματόμετρο Miniscan XE plus , Hunterlab

Αναλυτική Πορεία

Λειτουργία Χρωματομέτρου

- Η συσκευή φορτίζεται για περίπου 4 h και μετά το άνοιγμα αφήνεται για ~30 min.
- Γίνεται βαθμονόμηση, με 2 πλάκες: πρώτα με την μαύρη πλάκα και μετά με την άσπρη. Αν η διαφορά άσπρης – μαύρης πλάκας είναι < 0.4 το όργανο είναι έτοιμο για χρήση, αν είναι μεγαλύτερη γίνεται βαθμονόμηση.
- Η οπή της συσκευής εφαρμόζεται στα δείγματα και λαμβάνονται οι τιμές.

Πορεία

- Ζυγίζονται 2 mg μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από κάθε δείγμα με βάση την % ΕΥ ώστε να περιέχουν 2 mg κουρκουμίνης.
- Σε δίσκο αλουμινίου επικολλώνται άσπρα χαρτάκια (4×4 cm) και το κάθε δείγμα διασπείρεται στα άσπρα χαρτάκια. Όσα δείγματα ενθυλακωμένης σε κύτταρα κουρκουμίνης παρασκευάστηκαν με πλασμολυμένα κύτταρα (B) είχαν πιο κοκκώδη μορφή σε σχέση με τα μη-πλασμολυμένα.
- Τα δείγματα παραμένουν στο σκοτάδι για 24 h. Στην συνέχεια αναποδογυρίζεται ο δίσκος και ακολουθεί ελαφρό χτύπημα. Τα χαρτάκια ζυγίζονται πάλι για να υπολογιστεί το % κ.β. ποσοστό συγκράτησης της κουρκουμίνης.
- Ακολουθεί οπτική παρατήρηση και μετρήσεις με το χρωματόμετρο στα άσπρα χαρτάκια των χαρακτηριστικών χρώματος (L, a, b). Οι τιμές L, a και b για την πλάκα αναφοράς είναι 97.47, -0.29 και -3.83 αντίστοιχα.
- Παράλληλα μετρήθηκε και το χρώμα όλων των δειγμάτων.

Η τιμή του L δείχνει την διαφορά άσπρου (100)- μαύρου (0) και ουσιαστικά μετρά την φωτεινότητα (lightness).
Το α δείχνει το κόκκινο (-100) προς πράσινο (+100) και
Το b δείχνει το κίτρινο (+100) και μπλε (-100).
Η διαφορά χρώματος, ΔΕ υπολογίζεται ως εξής:

$$\Delta E^2 = \Delta\alpha^{\,2} + \Delta b^{\,2} + \Delta L^2$$

6.Γ.5. Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας της κουρκουμίνης βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH)

Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων και ατόμων υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό στη ρίζα $DPPH^{\bullet}$. Το αντιοξειδωτικό δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα $DPPH^{\bullet}$ και η μείωση της συγκέντρωσης της παρακολουθείται από τη μείωση της απορρόφησης στα 515 nm. Το χρώμα από μωβ που είναι στο αρχικό διάλυμα μετατρέπεται σε κίτρινο, όταν όλη η ποσότητα της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευθεί.

Η μείωση του $DPPH^{\bullet}$ υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet}_{\text{μείωση}} = [(A_{\text{DPPH}^{\bullet}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{DPPH}^{\bullet}}] \bullet 100$$

όπου $A_{\text{DPPH}^{\bullet}}$ είναι η απορρόφηση του διαλύματος $\text{DPPH}^{\bullet}$ σε αιθανόλη ($6*10^{-5}$ M) (control) και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του κάθε δείγματος μετά από 30 min.

Η κουρκουμίνη έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και έχει βρεθεί τουλάχιστον 10 φορές πιο δραστική από την βιταμίνη Ε. Η αντιοξειδωτική της δραστικότητα αποδίδεται στον φαινολικό δακτύλιο, την μεθόξυ-ομάδα του και στο 1,3-δικετονικό της σύστημα με τον ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου, ο οποίος ενισχύει την ικανότητα της να δεσμεύει ρίζες (Pari, Tewas & Eckel, 2008).

Για την εύρεση της αντιοξειδωτικής δραστικότητας πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα, όπως συνοψίζονται στο σχήμα 6.9:

Α) Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης. Γίνεται σύγκριση όλων των δειγμάτων λαμβάνοντας κατάλληλη ποσότητα από κάθε δείγμα ώστε να περιέχεται σε όλα η ίδια ποσότητα κουρκουμίνης. Η μέτρηση γίνεται σε αιθανολικά εκχυλίσματα αφού προηγηθεί απεγκλωβισμός της κουρκουμίνης από τα δείγματα.

Β) Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας-συγκέντρωσης κουρκουμίνης.

Γ) Κινητική μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας της κουρκουμίνης: στα δυο προηγούμενα πειράματα μελετήθηκε η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης εφόσον προηγήθηκε απεγκλωβισμός της. Σε αυτό το πείραμα παρασκευάστηκαν αιθανολικά διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης αλλά δεν προηγήθηκε απεγκλωβισμός της, οπότε μελετήθηκε η ικανότητα της να δρα ως αντιοξειδωτικό με την πάροδο του χρόνου.

Αντιδραστήρια

- 1,1- διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα ($\text{DPPH}^{\cdot}$) (Sigma).
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Δείγματα: διαλύματα κουρκουμίνης μετά από απεγκλωβισμό της από τις μικροκάψουλες των κυττάρων, της β-CD και του MS σε μίγμα αιθανόλης:νερού 80:20 v:v. Η παρασκευή αποκλειστικά αιθανολικών διαλυμάτων θα δυσκόλευε τον απεγκλωβισμό της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες.

Όργανα

- Αναδευτήρας (Vortex)
- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Φασματοφωτόμετρο Specord 200, (analytikjena, UV-VIS)
- Πιπέττες των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)

Αναλυτική Πορεία

Μέθοδος DPPH

- Ζυγίζονται 4 mg προτύπου DPPH και διαλύονται σε 100 ml αιθανόλης (0.100 mM).
- Σε κάθε δείγμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης έτσι ώστε να προκύπτουν διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης κουρκουμίνης. Τα διαλύματα της κουρκουμίνης, ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, πρέπει να είναι <1 mg/ml.
- Παραλαμβάνονται 25 μL από το κάθε διάλυμα και προστίθεται 975 μL του διαλύματος DPPH 0.100 mM. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε vortex.
- Τα δείγματα παραμένουν για 1 h στο σκοτάδι, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στην συνέχεια φωτομετρούνται στα 515 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου γίνεται με αιθανόλη. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων φωτομετρείται και το διάλυμα του DPPH.
- Τα αποτελέσματα μπορεί να εκφραστούν και σε ισοδύναμα Trolox (TRE: Trolox Equivalents), με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox (ανάλογο βιταμίνης E-DPPH): από πυκνό διάλυμα Trolox 1.6 mM (0.004 γρ/10 ml αιθανόλη) με αραιώσεις παρασκευάζονται τα πιο αραιά δείγματα. Μετράται η αντιοξειδωτική ικανότητα των προτύπων του Trolox. Η πορεία που ακολουθείται είναι ίδια με των δειγμάτων .

Πείραμα Α

- Ζυγίζονται 1.2 mg μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από το κάθε δείγμα της ενθυλακωμένης ώστε να περιέχονται 1.2mg κουρκουμίνης με βάση την % ΕΥ.
- Στα δείγματα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης προστίθενται 20 ml διαλύματος νερό:αιθανόλη 1:4 v:v. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση στο vortex για 10 min, για να απελευθερωθεί η κουρκουμίνη και παραμονή των δειγμάτων για 4 h στο ψυγείο, στο σκοτάδι. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται (6000 rpm, 10 min) και προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του υπερκειμένου με την μέθοδο DPPH. Τελικά όλα τα δείγματα περιέχουν 60 μg κουρκουμίνης/ ml διαλύματος.
- Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH και ως mM Trolox. Υπολογίζεται και η αντιοξειδωτική δραστικότητα του μέσου ενθυλάκωσης (κύτταρα, β-CD, MS) η οποία αφαιρείται από τα δείγματα.

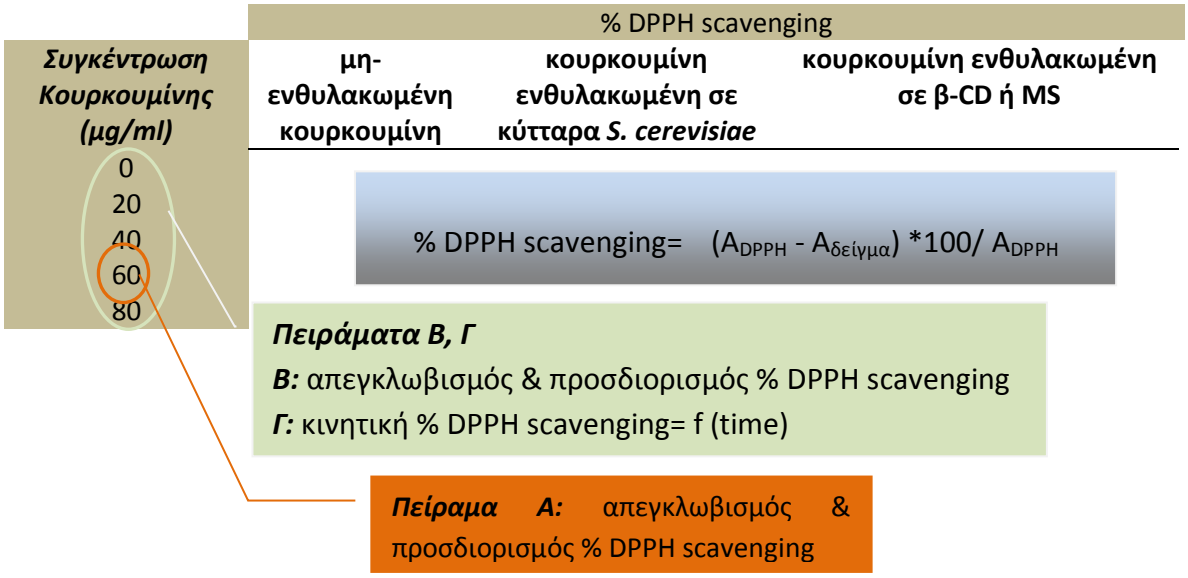
Πείραμα Β

Σκοπός: *Η συσχέτιση % DPPH= f (C μg κουρκουμίνης/ml διαλύματος).*

- Παρασκευάζονται αιθανολικά διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων (0-80 μg/ml) αρχικά της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (σχήμα 6.9). Για την μελέτη της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης λαμβάνεται τόση ποσότητα από κάθε δείγμα ώστε μετά από εκχύλιση με μίγμα αιθανόλης: νερό v:v 4:1 να λαμβάνονται οι παραπάνω συγκεντρώσεις κουρκουμίνης (σχήμα 6.9).
- Ακολουθείται η ίδια πορεία με αυτή που περιγράφηκε στο πείραμα Α.
- Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH και ως mM Trolox.

Πείραμα Γ

- Παρασκευάζονται αιθανολικά διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων (0-80μg/ml) αρχικά της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (σχήμα 6.9). Για την μελέτη της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης δεν προηγείται απεγκλωβισμός της. Σε κάθε δείγμα προστίθεται η ελάχιστη ποσότητα νερού και στην συνέχεια η κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης έτσι ώστε μετά από πλήρη απεγκλωβισμό να προκύπτουν διαλύματα με συγκεντρώσεις ανάλογες με τις παραπάνω. Η παρουσία νερού είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της σταδιακής απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από την μικροκάψουλα.
- Κατασκευάζεται καμπύλης αναφοράς $A= f (C_{DPPH})$.
- Σε κυψελίδα του 1 ml προστίθεται 25 μl του δείγματος και 975 μl του διαλύματος DPPH 100 μM.
- Γίνεται εκκίνηση της καταγραφής της μείωσης της συγκέντρωσης του διαλύματος DPPH σε σχέση με τον χρόνο στα 515 nm. Τα δείγματα καταγράφονται για 8 h, και ακολούθως λαμβάνεται και μια μέτρηση της επόμενη ημέρα (24 h).



Σχήμα 6.9*. Μελέτη αντιοξειδωτικής δραστικότητας κουρκουμίνης (πειράματα Α, Β και Γ).*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}

Δ΄ ενότητα:

Επίδραση της Ενθυλάκωσης στην Σταθερότητα της Κουρκουμίνης

Σκοπός: *Δεδομένου ότι η κουρκουμίνη παρουσιάζει αστάθεια στο αλκαλικό pH, στις υψηλές θερμοκρασίες και στο φως μελετάται εάν η ενθυλάκωσή της στα κύτταρα του S. cerevisiae μπορεί να υπερνικήσει κάποια από τα παραπάνω μειονεκτήματα της και να αυξήσει την σταθερότητα κατά την αποθήκευσή της. Η σταθερότητα που μπορεί να προσφέρει αυτό το σύστημα ενθυλάκωσης συγκρίνεται με την β-CD και το MS.*

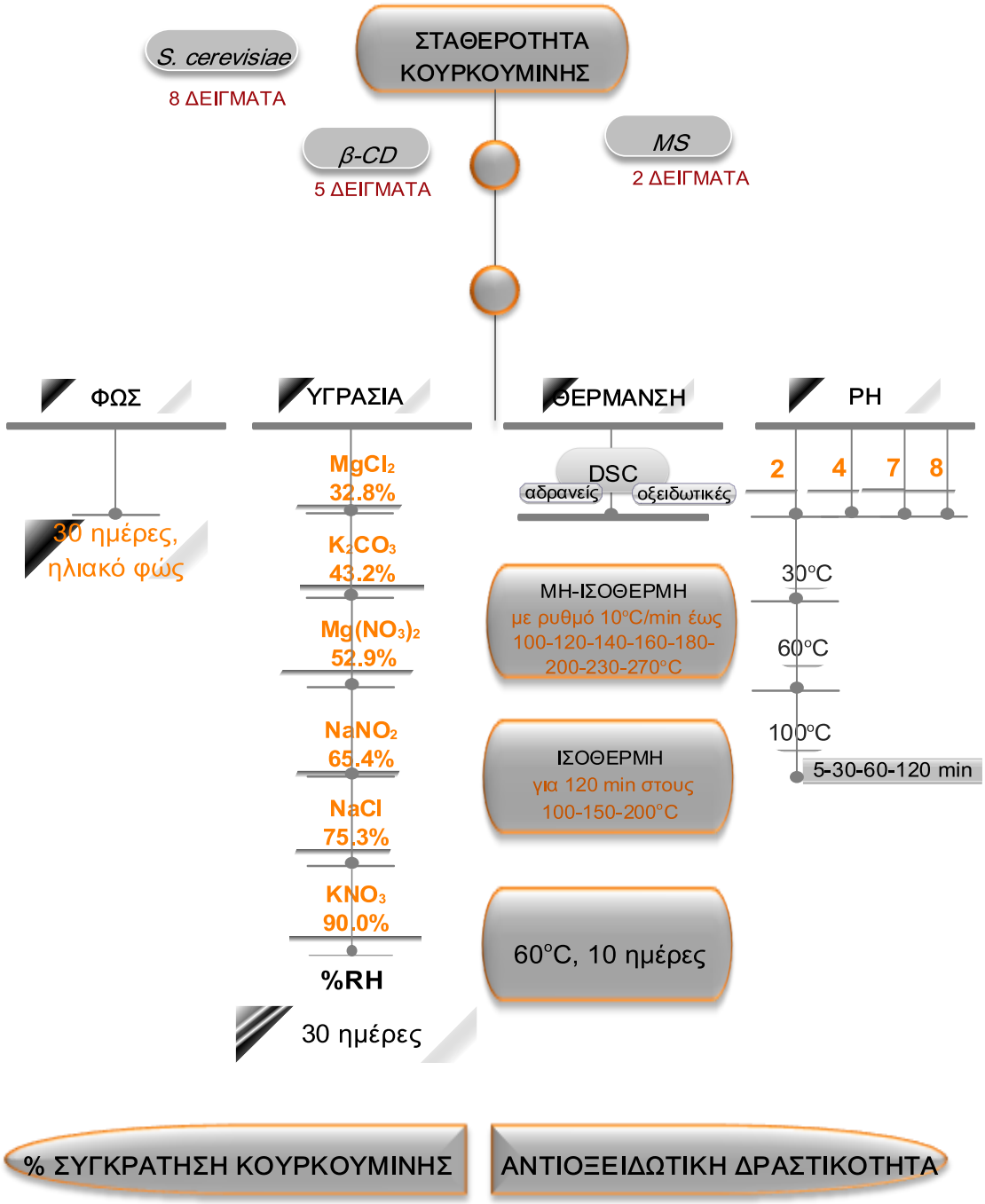
Συγκεκριμένα πραγματοποιούνται τα εξής πειράματα, τα οποία συνοψίζονται στο σχήμα 6.10:

1) Μελέτη της σταθερότητας στο **φώς**: σύγκριση της σταθερότητας της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε σχέση με την ενθυλακωμένη σε κύτταρα, β-CD και MS μετά από έκθεση στο ηλιακό φώς για 30 ημέρες.
2) Μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας κατά την αποθήκευση σε διάφορες τιμές **σχετικής υγρασίας** (32.8-90% RH).
3) Μελέτη της σταθερότητας στην **θέρμανση**: σύγκριση της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε σχέση με την ενθυλακωμένη, μετά από παραμονή σε διάφορες θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα σε αδρανείς ή οξειδωτικές συνθήκες.
4) Μελέτη της σταθερότητας-διαλυτότητας της κουρκουμίνης (μη-ενθυλακωμένης και ενθυλακωμένης) μετά από παραμονή της για διάφορους **χρόνους** σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων τιμών **pH** (2,4,7,8) και **θερμοκρασιών** (30, 60, 100^{o}C).

Τα δείγματα που επιλέγονται αναφέρθηκαν στο σχήμα 6.6: 8 δείγματα κουρκουμίνης ενθυλακωμένης σε κύτταρα, 5 δείγματα ενθυλακωμένης στην β-CD και 2 στο MS.

6.Δ.1. Φωτοχημική σταθερότητα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Σκοπός: *Η κουρκουμίνη ανήκει στις φωτοευαίσθητες ουσίες και αποικοδομείται όταν εκτίθεται σε UV/VIS ακτινοβολία, τόσο ως στερεή όσο και σε διάλυμα, κυρίως μέσω αποικοδόμησης του β-δικετονικού συνδέσμου, το οποίο οδηγεί στον σχηματισμό μικρότερων φαινολικών προϊόντων, όπως βανιλλίνη, φερουλικό οξύ, φερουλόυλμεθάνιο, βανιλλικό οξύ, φερουλική αλδεΰδη, τα οποία μπορεί να πολυμεριστούν σε φαινολικά πολυμερή (Priyadarsini, 2009). Ωστόσο, το βασικό προϊόν αποικοδόμησης της είναι ένα προϊόν κυκλοποίησης, η trans-6-(4'-υδρόξυ-3'-μεθόξυφαινυλ)-2,4-διόξο-5-εξενάλη (Tomren et al., 2007), ενώ κατά την έκθεση της στο ηλιακό φως παράγονται και άλλα προϊόντα αποικοδόμησης. Η ενθυλάκωση μπορεί να τροποποιήσει την φωτοσταθερότητά της.*



Σχήμα 6.10. *Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της σταθερότητας της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης και μη).*

Για την μελέτη της σταθερότητας της κουρκουμίνης στο φως τα δείγματα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης εκτίθενται για ένα μήνα, στο ηλιακό φως για 12 h/ ημέρα για συνολικά 1 μήνα. Ανά 5 ημέρες λαμβάνεται μια ποσότητα του δείγματος και προσδιορίζονται:

α) η εναπομείνουσα κουρκουμίνη (% συγκράτηση)

β) τα χαρακτηριστικά χρώματος

γ) η αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος DPPH)

Αντιδραστήρια

- Στερεή κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Απιονισμένο νερό
- 1,1- διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα (DPPH$^{\cdot}$), Sigma.
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε κύτταρα, β-CD και MS. Για την μέτρηση της % συγκράτησης της κουρκουμίνης και της αντιοξειδωτικής δραστικότητας προηγείται απεγκλωβισμός της κουρκουμίνης με μίγμα αιθανόλης:νερού 4:1 v:v ακολουθώντας την πορεία της § 6.Γ.5.

Όργανα

- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Χρωματόμετρο (Miniscan XE plus , Hunterlab)
- Συσκευή Ανάδευσης (vortex)
- Πιπέττες των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 200 mg μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από κάθε δείγμα ενθυλακωμένης με βάση την % ΕΥ ώστε να περιέχονται 200 mg κουρκουμίνης.
- Τα δείγματα εκτίθενται στον ήλιο (12 h/ ημέρα) για 30 ημέρες.
- Ανά χρονικά διαστήματα 5 ημερών μετράται σε κάθε δείγμα το ποσοστό της κουρκουμίνης που έχει απομείνει, το χρώμα και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα (DPPH). Η μέτρηση του χρώματος γίνεται με το χρωματόμετρο (§ 6.Γ.4), ενώ για τον υπολογισμό της σταθερότητας (% συγκράτηση) της κουρκουμίνης, προηγείται απεγκλωβισμός της, ακολουθώντας την πορεία που περιγράφηκε στην § 6.Γ.5: σε 2 mg κάθε δείγματος προστίθεται 10 ml μίγματος αιθανόλη: νερό 4:1 v:v. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση στο vortex (10 min), παραμονή για μια νύχτα (overnight), φυγοκέντρηση (10 min, 6000 rpm) και διήθηση του υπερκειμένου με τη βοήθεια φίλτρου.
- Στα εκχυλίσματα γίνεται και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστικότητας με την μέθοδο της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, όπως περιγράφηκε στην § 6.Γ.5. Τα δείγματα που βρίσκονται διαλυμένα σε 10 ml διαλύματος αιθανόλη: νερό 4:1 v:v περιέχουν το μέγιστο 200 μg κουρκουμίνης/ ml, αλλά πρακτικά περιέχουν τόση κουρκουμίνη όση τους είχε απομείνει στα 10 ml. Επειδή είναι πολύ πυκνά για να μετρηθούν με την συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιείται αραίωση 1:10, και ακολουθεί μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν και σε ισοδύναμα Trolox (TRE: Trolox Equivalents), με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox (ανάλογο βιταμίνης Ε - DPPH*) (βλ. § 6.Γ.5).

Η επίδραση της ενθυλάκωσης στην σταθερότητα της κουρκουμίνης στο φώς εκφράζεται ως ποσοστό συγκράτησης % (% retention), δηλαδή με τον λόγο της ποσότητας της περιεχόμενης κουρκουμίνης, προς την αρχική ποσότητα κουρκουμίνης στο δείγμα, (κουρκουμίνη που παρέμεινε*100/ αρχική κουρκουμίνη).

Πραγματοποιείται και κινητική μελέτη απ' όπου προέκυψε ότι το διάγραμμα της % συγκράτησης= f(ημέρες) είναι γραμμικό, οπότε η αποικοδόμηση της κουρκουμίνης ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξης. Από το διάγραμμα υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας (k) (κλίση ευθείας) και ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$) της κουρκουμίνης σε κάθε δείγμα, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται γα να μειωθεί η συγκέντρωση της στο δείγμα σε 50% ($t_{1/2}=[A]_0/2k$).

6.Δ.2. Επίδραση της σχετικής υγρασίας στην οξειδωτική σταθερότητα της κουρκουμίνης

Σκοπός: *Τα κύτταρα του S. cerevisiae είναι υγροσκοπικά, συνεπώς η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος επηρεάζει την διάχυση και συνεπώς την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από την κάψουλα. Επιπλέον η ενεργότητα νερού σχετίζεται με την οξειδωτική σταθερότητα: υψηλές τιμές ενεργότητας ύδατος ευνοούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις.*

Πραγματοποιείται έκθεση όλων των δειγμάτων για ένα μήνα, σε διάφορες τιμές ενεργότητας (32.8-90%). Ανά 5 ημέρες λαμβάνεται μια ποσότητα δείγματος και προσδιορίζονται:

α) ποσοστό εναπομείνων κουρκουμίνης

β) η αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος DPPH)

Τα δείγματα παραμένουν σε κλειστό χώρο που περιέχει υπέρκορα υδατικά διαλύματα αλάτων. Τα άλατα δημιουργούν περιβάλλον με τις ακόλουθες τιμές σχετικής υγρασίας:

Άλας	**% RH**
$MgCl_2$	32.8
K_2CO_3	43.2
$Mg(NO_3)_2$	52.9
$NaNO_2$	65.4
NaCl	75.3
KNO_3	90.0

Αντιδραστήρια

- Στερεή κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Απιονισμένο νερό
- 1,1- διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα ($DPPH^{\cdot}$) (Sigma).
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας, (Merck, Darmstadt, Germany)
- Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης. Για την μέτρηση της εναπομείνων κουρκουμίνης και της αντιοξειδωτικής δραστικότητας προηγείται απεγκλωβισμός της κουρκουμίνης με μίγμα αιθανόλης: νερού αναλογίας v:v 4:1 ακολουθώντας την πορεία της § 6.Γ.5.

Όργανα

- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Συσκευή Ανάδευσης (vortex)
- Πιπέττες των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 2 mg μη ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και με βάση την %ΕΥ τόση ποσότητα από κάθε δείγμα ενθυλακωμένης ώστε να περιέχονται 2 mg κουρκουμίνης. Τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηραντήρες που περιέχουν τα υπέρκορα διαλύματα αλάτων τα οποία δημιουργούν περιβάλλον με 6 διαφορετικές ενεργότητες.
- Ανά χρονικά διαστήματα 5 ημερών τα δείγματα απομακρύνονται και μετράται το ποσοστό της κουρκουμίνης που έχει απομείνει και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα (μέθοδος DPPH, αφού προηγηθεί αραίωση 1:10), όπως αναφέρθηκε στην § 6.Δ.1. Πραγματοποιείται και πάλι κινητική μελέτη, απ' όπου προκύπτει ότι η αποικοδόμηση ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Από την γραφική αναπαράσταση του ln (% συγκράτηση κουρκουμίνης)= f(χρόνος) υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας (k) (ως η κλίση του διαγράμματος) και ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$=0.693/k) της κουρκουμίνης σε κάθε δείγμα. Η αποικοδόμηση ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης,

6.Δ.3. Επίδραση της θέρμανσης στη σταθερότητα της κουρκουμίνης

Σκοπός: *Κατά την θερμική επεξεργασία της κουρκουμίνης μπορεί να τροποποιηθούν οι συζευγμένοι διπλοί δεσμοί της, να πολυμεριστεί ή να αποικοδομηθεί σε χαμηλότερου ΜΒ συστατικά. Στις υψηλές θερμοκρασίες η κουρκουμίνη αποικοδομείται σε διάφορα προϊόντα όπως βανιλλίνη, βανιλλικό οξύ και φερουλικό οξύ καθώς και σε κουρκουμένιο και κουμαρικό οξύ, κάποια από τα οποία παρουσιάζουν και αντιοξειδωτική δραστικότητα, μικρότερη της κουρκουμίνης ή όχι. Μελετάται εάν η ενθυλάκωση μπορεί να ενισχύσει τη σταθερότητα και την αντιοξειδωτική της δραστικότητα, μετά από παραμονή της σε διάφορες θερμοκρασίες και για διάφορους χρόνους.*

Ουσιαστικά πραγματοποιούνται 2 πειράματα, αποκλείοντας την παρουσία φωτός, τα οποία συνοψίζονται στο σχήμα 6.10:

α) θέρμανση στους 60^{o}C για 10 ημέρες
β) ελεγχόμενη θέρμανση με την διάταξη του DSC με 2 τρόπους:
I) μη ισόθερμη θέρμανση και
II) ισόθερμη θέρμανση

Και στα 2 πειράματα προσδιορίζονται τα εξής:
Α) η κουρκουμίνη που απέμεινε (% συγκράτηση κουρκουμίνης)
Β) αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος DPPH)

Αντιδραστήρια

- Στερεή κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Απιονισμένο νερό
- 1,1- διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα ($DPPH^{\cdot}$), Sigma.
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Δείγματα ενθυλακωμένης κουρκουμίνης: για την μέτρηση της εναπομείνουσας κουρκουμίνης και της αντιοξειδωτικής δραστικότητας προηγείται απεγκλωβισμός της κουρκουμίνης με 20 ml μίγμα αιθανόλης:νερό 4:1 v:v ακολουθώντας την πορεία της § 6.Γ.5.

Όργανα

- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Πιπέττες των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)
- Διάταξη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC 6 Pyris, Perkin Elmer) του ΤΕΙ Αθήνας
- Καψίδια Αλουμινίου (Pans) 50μL, με καπάκι με οπή ή χωρίς

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 2 mg μη ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από κάθε δείγμα ενθυλακωμένης ώστε να περιέχει 2 mg κουρκουμίνης.

Πείραμα Α

Τα δείγματα θερμαίνονται σε σκοτάδι, στο φούρνο, στους 60^{o}C για 10 ημέρες. Ακολούθως προσδιορίζεται το ποσοστό της κουρκουμίνης που έχει παραμείνει στις μικροκάψουλες και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, ακολουθώντας την πορεία που περιγράφηκε στην § 6.Δ.1. Τα εκχυλίσματα της κουρκουμίνης περιέχουν το μέγιστο 100 μg κουρκουμίνης/ml και πραγματοποιείται αραίωση 1:5 (μέγιστη συγκέντρωση 20 μg/ml κουρκουμίνης).

Πείραμα Β

Για την μελέτη της σταθερότητας της κουρκουμίνης στην θέρμανση υπό ελεγχόμενες συνθήκες χρησιμοποιείται η διάταξη του DSC, σε συνθήκες αζώτου (**μη οξειδωτικές)** και οξυγόνου (**οξειδωτικές**) με την διαβίβαση αερίου αζώτου και οξυγόνου, αντίστοιχα. Οι ροές των αερίων ήταν 20 ml/min.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε καψίδια από αλουμίνιο και με την βοήθεια του οργάνου πραγματοποιούνται 2 πειράματα:

Ι) **Θέρμανση των δειγμάτων σε μη ισόθερμες συνθήκες**: τα δείγματα θερμαίνονται από τους 30^{o}C έως τις εξής τελικές θερμοκρασίες: 60^{o}C, 100^{o}C, 120^{o}C, 140^{o}C, 160^{o}C, 180^{o}C, 200^{o}C, 230^{o}C και 270^{o}C με ρυθμό 10^{o}C/min.

II) Θέρμανση των δειγμάτων ισόθερμα: τα δείγματα θερμαίνονται από την θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τις εξής τελικές θερμοκρασίες: 100, 150 και 200^{o}C με ρυθμό αύξησης 10^{0}C/ min και στη συνέχεια παραμένουν σε αυτή την θερμοκρασία για 30, 60 και 120 min.

Το πείραμα πραγματοποιείται τόσο σε συνθήκες αζώτου όσο και συνθήκες οξυγόνου.

Μετά το πέρας της θέρμανσης σε κάθε πείραμα απομακρύνονται τα δείγματα, διαλύονται σε 20 ml διαλύματος νερού:αιθανόλης 1:4 v:v και μετράται το ποσοστό της κουρκουμίνης που απέμεινε και η αντιοξειδωτική του δραστικότητα, όπως περιγράφηκε στο πείραμα Α.

6.Δ.6. Υδρολυτική σταθερότητα της κουρκουμίνης: επίδραση του pH και της υψηλής θερμοκρασίας

Σκοπός: *Μελετάται η συνδυαστική επίδραση pH–θερμοκρασία-χρόνος στην διαλυτότητα-σταθερότητα της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης ή μη) καθώς και στο προφίλ της απελευθέρωσής της από το μέσο ενθυλάκωσης (κύτταρα, β-CD, MS). Το pH και η θερμοκρασία παίζουν βασικό ρόλο στην σταθερότητα και την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης: σε pH<7 η κουρκουμίνη είναι σταθερή, αλλά έχει μικρή υδατοδιαλυτότητα. Αντίθετα σε pH>7 έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα, επειδή είναι πιο πολική, αλλά αποικοδομείται πιο γρήγορα (σε φερουλικό οξύ, φερουλόυλ-μεθάνιο, βανιλλίνη και ακετόνη). Σε pH 7.2 το 90% της κουρκουμίνης αποικοδομείται σε 30 min σε τρανς-εξενάλη και λιγότερο σε βανιλλίνη και φερουλικό οξύ. Στις υψηλές θερμοκρασίες η κουρκουμίνη αποικοδομείται σε βανιλλίνη, βανιλλικό οξύ και φερουλικό οξύ καθώς και σε κουρκουμένιο και κουμαρικό οξύ.*

Τα δείγματα παραμένουν σε 3 θερμοκρασίες: 30, 60 και 100^{o}C αρχικά σε υδατικό διάλυμα (pH 7.0) για 5, 30, 60 και 120 min. Τα ίδια δείγματα μελετώνται και στα εξής pH: 2, 4 και 8 στις ίδιες θερμοκρασίες και χρόνους και μετά το πέρας κάθε χρόνου προσδιορίζεται το ποσοστό κουρκουμίνης που διαλύθηκε-απελευθερώθηκε στο εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα καθώς και η αντιοξειδωτική του ικανότητα (DPPH).

Παρατήρηση: τα δείγματα της ενθυλακωμένης σε β-CD κουρκουμίνης διαλύονται στα ρυθμιστικά διαλύματα σχεδόν στιγμιαία, οπότε με αυτό το πείραμα υπολογίζεται η διαλυτότητα της κουρκουμίνης συναρτήσει του pH-θερμοκρασίας και ειδικά στις υψηλές θερμοκρασίες μετράται και η σταθερότητα της. Αντίθετα, οι κάψουλες κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae*, επειδή δεν διαλύονται άμεσα στα ρυθμιστικά διαλύματα αλλά σχηματίζουν αιώρημα, με το πείραμα αυτό ουσιαστικά προσδιορίζεται αρχικά η κινητική της

απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα κύτταρα σε διαφορετικές τιμές pH-θερμοκρασίας, και μετέπειτα η σταθερότητα της απελευθερωμένης πλέον κουρκουμίνης.

Αντιδραστήρια

- 1,1- διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα ($DPPH^{\cdot}$), Sigma.
- Στερεή κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ρυθμιστικά διαλύματα τεσσάρων pH : 2, 4, 7, 8:

pH		
7	Ρ.Δ. φωσφορικών	0.01M PBS, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl
8	Tris Buffer Saline	0.05M Tris, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl
2	Ρ.Δ. 0.2M KCl/ HCl 0,2M	50 ml 0.2 M KCl & 13ml HCl
4	Ρ.Δ 0.2M NaH_2PO_4/ κιτρικό οξύ 0.1M	38.55 ml 0.2M NaH_2PO_4 & 61.45ml κιτρικού οξέος 0.1M

Όργανα

- Vortex
- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Φυγόκεντρος (Orto Alpresa Digicen 20)
- Πιπέττες των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)
- Υδατόλουτρο
- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.45 μm, PVDF, (Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζονται 2 mg μη ενθυλακωμένης κουρκουμίνης και τόση ποσότητα από κάθε δείγμα με βάση την %ΕΥ ώστε να περιέχονται 2 mg κουρκουμίνης.
- Στο καθένα δείγμα προστίθεται 20 ml νερό ή το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια οδηγούνται στο υδατόλουτρο, το οποίο ρυθμίζεται στις εξής θερμοκρασίες: 30, 60 και 100^{o}C.
- Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (5, 30, 60 και 120 min) τα δείγματα αναδεύονται και λαμβάνεται από το καθένα 5 ml.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min).
- Το υπερκείμενο διηθείται με την βοήθεια φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.45 μm και μετράται η περιεκτικότητα του σε κουρκουμίνη καθώς και η αντιοξειδωτική του δραστικότητα με την μέθοδο DPPH (§6.Γ.5).

***Παρατήρηση*:**
Η υδατοδιαλυτότητα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης έχει υπολογιστεί ως εξής:

Θερμοκρασία (^oC)	*μg κουρκουμίνης /100 ml νερό*
25	121
35	210
45	242
55	311

Σε κάθε δείγμα προστίθεται 20 ml νερό, οπότε η μέγιστη διαλυτότητα κουρκουμίνης που μπορεί να επιτευχθεί είναι 2 mg/20 ml ή 10 mg/100 ml, δηλαδή προστίθεται περίσσεια κουρκουμίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}

Ε' ενότητα:

Εφαρμογή της Ενθυλακωμένης στα Κύτταρα Κουρκουμίνης σε Τρόφιμο

Σκοπός: *Το τροποποιημένο άμυλο και η β-κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποικιλία τροφίμων (σάλτσες, σούπες, κρεατοσκευάσματα κ.λ.π.) ως μέσα ενθυλάκωσης διαφόρων διατροφοδραστικών συστατικών. Κύτταρα του S. cerevisiae κυκλοφορούν στο εμπόριο ως συμπληρώματα διατροφής (πηγή απαραίτητων αμινοξέων, βιταμινών Β, μαγνησίου, φωσφόρου, μαγγανίου, καλίου, ψευδαργύρου) ενώ βρίσκεται υπό συνεχή έρευνα η δράση τους έναντι μιας σειράς ασθενειών (σπαστική κολίτιδα, διάφορες μορφές καρκίνου). Σήμερα, πτητικά αρωματικά συστατικά ενθυλακωμένα σε κύτταρα του S. cerevisiae κυκλοφορούν ήδη στο εμπόριο για εφαρμογή σε τηγανητά τρόφιμα, σούπες, σάλτσες από την εταιρία Mincap plc (Merseyside, UK) σε συνεργασία με την Firmenich SA. Η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη μπορεί να έχει ευρεία εφαρμογή σε προϊόντα αρτοποιίας-ζαχαροπλαστικής. Ο σκοπός από την προσθήκη της κουρκουμίνης σε αυτά μπορεί να είναι διπλός: ι) η παρασκευή λειτουργικών τροφίμων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, για την προαγωγή της υγείας (health benefits) και ιι) η αύξηση του χρόνου ζωής (shelf-life) του προϊόντος, αντικαθιστώντας τα συνθετικά αντιοξειδωτικά.*

Στο κεφάλαιο αυτό αρχικά μελετάται η θερμό-οξειδωτική σταθερότητα ηλιελαίου στο οποίο προστίθεται ενθυλακωμένη (σε κύτταρα, β-cd, MS) κουρκουμίνη. Σκοπός δεν είναι η δημιουργία ενός καινοτομικού ηλιελαίου, αλλά η μελέτη τού κατά πόσο η κουρκουμίνη (ενθυλακωμένη ή μη) που υπάρχει σε ένα τρόφιμο και η οποία κατά το τηγάνισμα ή μαγείρεμα του θα βρεθεί στο έλαιο, θα επιβραδύνει την οξείδωση του. Στην συνέχεια γίνεται παρασκευή κριτσινιών στα οποία προστίθεται κουρκουμίνη (ενθυλακωμένη στα κύτταρα ή μη). Στα κριτσίνια θα πραγματοποιηθεί καταρχήν οργανοληπτικός έλεγχος, δίνοντας έμφαση στα χρωματικά χαρακτηριστικά (L, a, b) τους. Δεδομένου ότι η κουρκουμίνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική δραστικότητα, θα προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δραστικότητα των κριτσινιών με μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Μελετάται επίσης το προφίλ της απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια σε συνθετικό γαστρικό και εντερικό υγρό και προσδιορίζεται και η σταθερότητα του προϊόντος κατά την αποθήκευση σε διάφορες τιμές σχετικής υγρασίας και σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης.

6.Ε.1. Μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητα ηλιελαίου παρουσία κουρκουμίνης με Rancimat

Η μέθοδος Rancimat έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για την μελέτη της αντοχής των ελαίων στην οξείδωση. Πρόκειται για μια σχετικά γρήγορη, αυτοματοποιημένη μέθοδο με την οποία προσδιορίζεται ο χρόνος επαγωγής (induction time), δηλαδή ο χρόνος όπου ένα έλαιο υφίσταται τις πρώτες αλλαγές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (ο χρόνος που ξεκινάει η οξείδωση του ελαίου). Όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο χρόνος τόσο πιο σταθερό είναι το έλαιο. Εάν σε ένα έλαιο έχει προστεθεί κάποιο αντιοξειδωτικό τότε μπορεί να προσδιοριστεί ο παράγοντας προστασίας (protection factor), PF:

PF = χρόνος επαγωγής με αντιοξειδωτικό/ χρόνος επαγωγής χωρίς αντιοξειδωτικό.

Εάν PF > 1, τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιήθηκε.

Με την τεχνική του Rancimat μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα 3 έως 6 δείγματα. Οι καμπύλες οξείδωσης καταγράφονται συνεχώς με καταγραφικό χαρτί, με ένα εύρος του καταγραφέα από 0-200 μSiemens/cm. Για την επίτευξη της οξείδωσης, το δείγμα θερμαίνεται σε μια υψηλή θερμοκρασία (50-200^{o}C) με ταυτόχρονη διαβίβαση αέρα, συγκεκριμένης ροής (4-25 l/h).

Ααρχή λειτουργίας: Ζυγίζεται συγκεκριμένη ποσότητα του δείγματος (τουλάχιστον 3 ml) σε ειδική φιάλη στην οποία διαβιβάζεται ο αέρας και η οποία θερμαίνεται στην επιλεγμένη θερμοκρασία. Σε μια δεύτερη φιάλη με δις-απεσταγμένο νερό συγκεντρώνονται τα δευτερογενή πτητικά προϊόντα της οξείδωσης, τα οποία αποτελούνται κυρίως από μυρμηγκικό οξύ και άλλα πολικά παραπροϊόντα (πτητικά καρβοξυλικά οξέα). Τα παραπροϊόντα αυτά είναι διαφορετικά από αυτά που σχηματίζονται κατά την διάρκεια του τηγανίσματος ή κατά την αποθήκευση υπό φυσιολογικές συνθήκες: σε αυτές τις περιπτώσεις σχηματίζονται κυρίως υδροϋπεροξείδια, καρβονυλικά και άλλα πολικά προϊόντα (TPA). Το όργανο διαθέτει αγωγιμόμετρο το οποίο μετρά την αγωγιμότητα της φιάλης του νερού (όπου διαβιβάζονται τα προϊόντα της οξείδωσης) και καταγράφει αυτόματα τις διαφορές που παρατηρούνται στην αγωγιμότητα, σχηματίζοντας την τυπική καμπύλη οξείδωσης, από την οποία προσδιορίζεται ο χρόνος επαγωγής.

Για την επίτευξη καλών αποτελεσμάτων πολύ σημαντικό ρόλο παίζει το σωστό πλύσιμο όλων των εξαρτημάτων. Για αυτό και μετά το πέρας κάθε πειράματος ακολουθείται μια διαδικασία καθαρισμού των εξαρτημάτων: αρχικά πλύσιμο με σαπούνι, ξέπλυμα με δις-απεσταγμένο νερό και εμβάπτιση σε διάλυμα σάπωνος (3% σε δις- απεσταγμένο νερό, Fluca Chemica 83460 RBS 25 concentrate) για 24 ώρες και τελικό ξέπλυμα με δις- απεσταγμένο νερό. Με το διάλυμα σάπωνος ξεπλένονται και τα ηλεκτρόδια για 1-2 min.

***Σκοπός**: Σκοπός δεν είναι η δημιουργία ενός καινοτομικού ηλιελαίου με κουρκουμίνη, (εκτός εάν η τροποποίηση του χρώματος που προκαλεί, είναι επιθυμητή) αλλά να εξεταστεί εάν η κουρκουμίνη που ενδέχεται να βρεθεί σε ένα έλαιο μπορεί, και σε ποιό βαθμό, να το προστατεύσει από την οξείδωση στις υψηλές θερμοκρασίες που δημιουργούνται π.χ. κατά το μαγείρεμα. Η κουρκουμίνη είναι πιθανό, έμμεσα να βρεθεί σε ένα έλαιο: κατά την επαφή του ελαίου με τρόφιμο που περιέχει κουρκουμίνη (ενθυλακωμένη ή μη) κατά την διαδικασία του μαγειρέματος ή του τηγανίσματος.*

Αντιδραστήρια

- Στερεή κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα ενθυλακωμένης σε κύτταρα κουρκουμίνης (3, 6), σε β-cd (F.D.) και σε MS
- Ηλιέλαιο

Όργανα

- Αναδευτήρας (Vortex)
- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Συσκευή RANCIMAT (679 Metrohm, UK, Ltd)
- DSC 6 Pyris, Perkin Elmer του ΤΕΙ Αθήνας
- Καψίδια Αλουμινίου (Pans) 50μL , με καπάκι με οπή ή χωρίς

Αναλυτική Πορεία

Στα ειδικά δοχεία της συσκευής Rancimat ζυγίζονται τα παρακάτω δείγματα χρησιμοποιώντας σε όλα 3 ml ή 2.7 γρ. ηλιέλαιου. Ρυθμίζεται η θερμοκρασία του οργάνου στους 90^{o}C, και η παροχή αέρα στα 20 l/h. Λαμβάνονται οι καμπύλες οξείδωσης από το Rancimat και για το κάθε δείγμα υπολογίζεται ο χρόνος επαγωγής.

Δείγμα
ηλιέλαιο 2.7 γρ
ηλιέλαιο + 100/200 ppm κουρκουμίνη
ηλιέλαιο + 20 mg άδεια κύτταρα *S. cerevisiae*
ηλιέλαιο + 100/200 ppm ενθυλακωμένη κουρκουμίνη σε κύτταρα (δείγμα 3)
ηλιέλαιο + 100/200 ppm ενθυλακωμένη κουρκουμίνη σε κύτταρα (δείγμα 6)
ηλιέλαιο + 20 mg β-CD
ηλιέλαιο + 100/200 ppm ενθυλακωμένη κουρκουμίνη σε β-CD (δείγμα F.D.)
ηλιέλαιο + 20 mg MS
ηλιέλαιο + 100/200 ppm ενθυλακωμένη κουρκουμίνη σε MS

Παρατήρηση: Από τα δείγματα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης λαμβάνεται τόση ποσότητα με βάση την %ΕΥ ώστε να προστίθενται στο έλαιο η κουρκουμίνη σε ποσότητα 100 και 200

ppm. Έτσι, για παράδειγμα στην περίπτωση των 200 ppm (0.54 mg κουρκουμίνης), προστίθενται σε 2.7 γρ. ηλιελαίου 1.76 mg από το δείγμα 3 (%ΕΥ 30.6) και 16.4 mg από το δείγμα 6 (%ΕΥ 3.3), οπότε ουσιαστικά προστίθενται διαφορετικές ποσότητες κυττάρων. Γι' αυτό μελετάται και η επίδραση που μπορεί έχει, στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαίου, η περίσσεια του μέσου ενθυλάκωσης.

6. Ε. 2. Παρασκευή κριτσινιών με κουρκουμίνη

Αντιδραστήρια

- Νερό
- Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Αλλατίνη
- Ελαιόλαδο Άλτις
- Μπέικιν πάουντερ Γιώτης
- Στερεή κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Μικροκάψουλα κουρκουμίνης: επιλέγεται το δείγμα 5 που περιέχει 15.3% κ.β. κουρκουμίνη

Όργανα

- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Φούρνος
- Χρωματόμετρο Miniscan XE plus , Hunterlab

Αναλυτική Πορεία

Θα παρασκευαστεί περίπου 1.5 Kg ζύμης, από την οποία θα προκύψουν περίπου 1 Kg κριτσίνια.

- Αναμιγνύονται περίπου 400 γρ. ελαιόλαδο με 400 γρ. νερό, 10 γρ. αλάτι και 5γρ. μπέικιν πάουντερ. Ακολουθεί η προσθήκη περίπου 800 γρ. αλεύρου και το μίγμα ζυμώνεται μέχρι να προκύψει σφιχτή ζύμη.
- Η ζύμη στην συνέχεια χωρίζεται σε τρία ισοβαρή μέρη: το ένα παραμένει ως έχει, στο δεύτερο προστίθεται κουρκουμίνη σε τόση ποσότητα ώστε θεωρητικά στο τελικό προϊόν, μετά το ψήσιμο να περιέχονται περίπου 200 ppm κουρκουμίνης (περίπου 80 mg κουρκουμίνης) και στο τρίτο τόση ποσότητα από την μικροκάψουλα της κουρκουμίνης (με βάση την ΕΥ 15.3%) ώστε ομοίως στο τελικό προϊόν να περιέχονται 200 ppm κουρκουμίνης (περίπου 523 mg μικροκάψουλας).
- Όλα τα μέρη της ζύμης πλάθονται σε ραβδάκια και ψήνονται στον φούρνο στους 180^{o}C στον αέρα για 20 min.

Ακολουθεί οργανοληπτικός έλεγχος των παραγόμενων κριτσινιών. Συγκρίνονται τα κριτσίνια που περιέχουν την κουρκουμίνη ως στερεή με αυτά που την περιέχουν σε ενθυλακωμένη μορφή για τυχόν διαφοροποιήσεις στο σχήμα, το μέγεθος, την γεύση, το άρωμα, έχοντας ως σημείο αναφοράς τα κριτσίνια που δεν περιέχουν κουρκουμίνη. Ακολουθεί και μέτρηση των χαρακτηριστικών του χρώματος (L, a, b) των κριτσινιών με το χρωματόμετρο (βλ. § 6.Γ.4).

6. Ε. 3. Προσδιορισμός περιεκτικότητας κουρκουμίνης και αντιοξειδωτικής δραστικότητας των κριτσινιών με DPPH

Σκοπός: *Η κουρκουμίνη από μόνη της παρουσιάζει αντιοξειδωτική δραστικότητα. Εξετάζεται εάν η προσθήκη της στα κριτσίνια (ενθυλακωμένης και μη) οδηγεί στην παρασκευή 'λειτουργικού' τροφίμου με αντιοξειδωτική δραστικότητα*.

Αντιδραστήρια

- 1,1- διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα ($DPPH^{\cdot}$), Sigma.
- Κουρκουμίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Αιθανόλη, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Αναδευτήρας (Vortex)
- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Φασματοφωτόμετρο Specord 200, (analytikjena, UV-VIS)
- Πιπέττες σταθερού όγκου των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)

Αναλυτική Πορεία

- Ζυγίζεται 1 γρ. από κάθε δείγμα κριτσινιού: α) σκέτο κριτσίνια, β) κριτσίνια με θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης, γ) κριτσίνια με θεωρητικά 200 ppm ενθυλακωμένης κουρκουμίνης.
- Προκειμένου να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια δοκιμάζονται οι ακόλουθοι διαλύτες: αιθανόλη, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, απ' όπου μετά από ποσοτικό προσδιορισμό της εκχυλισμένης κουρκουμίνης επιλέχθηκε η αιθανόλη.
- Στο κάθε δείγμα προστίθεται 4 ml αιθανόλης και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση στο vortex για 10 min.
- Τα δείγματα παραμένουν ~10 ώρες στο ψυγείο, προστατεύοντας τα από το φώς.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min) και 25 μl του υπερκειμένου λαμβάνονται για προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δραστικότητας. Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην § 6.Γ.5.
- Παράλληλα με την αντιοξειδωτική δραστικότητα στα εκχυλίσματα της κουρκουμίνης προσδιορίζεται και η ποσότητα κουρκουμίνης με HPLC (βλ. § 6.Α.9). Δεδομένου ότι τα δείγματα β και γ περιέχουν 200 ppm =200 μg/g κουρκουμίνη και προστίθενται 4 ml διαλύτη, τα εκχυλίσματα περιέχουν θεωρητικά 50 μg/ml κουρκουμίνη.

6.Ε.4. Μελέτη των κριτσινιών σε αδρανείς και οξειδωτικές συνθήκες με DSC

Σκοπός: *Η μελέτη της σταθερότητας του προϊόντος στην θέρμανση υπό αδρανείς και οξειδωτικές συνθήκες.*

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην § 6.Α.6. Λαμβάνονται τα θερμογραφήματα σάρωσης των δειγμάτων με την διαβίβαση αερίου αζώτου ή οξυγόνου με ροή 20 ml/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν το εξής: Τα δείγματα παραμένουν στους 30^{o}C για 1 min, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο δείγμα και στην συνέχεια θερμαίνονται από τους 30 έως τους 380^{o}C, με ρυθμό 10^{o}C/min.

6.Ε.5. Μελέτη της απελευθέρωσης (*dissolution profile*) της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό

Σκοπός: *Η μελέτη του προφίλ της απελευθέρωσης/διαλυτοποίησης της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια σε γαστρικό και ακολούθως σε παγκρεατικό υγρό.*

Πορεία: Ζυγίζονται 3 γρ. από το κάθε δείγμα και προστίθενται στο καθένα 40 ml γαστρικού υγρού. Δεδομένου ότι τα δείγματα περιέχουν το μέγιστο 200 ppm κουρκουμίνης η μέγιστη διαλυμένη ποσότητα που μπορεί να βρεθεί είναι 600 μg/40 ml= 15 μg/ml. Ακολουθείται η ίδια πορεία, όπως περιγράφηκε στην § 6.Γ.3. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg απελευθερωμένης-διαλυμένης κουρκουμίνης/ ml γαστρικού ή εντερικού υγρού.

6.Ε.6. Προσδιορισμός της υγρασίας των κριτσινιών

Σκοπός: *Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας νερού σε υγρή και ξηρή βάση των τριών δειγμάτων. Θα κατασκευαστούν επίσης οι ισόθερμες ρόφησης, δηλαδή οι γραφικές παραστάσεις μεταξύ της ολικής περιεκτικότητας νερού σε ξηρή βάση και της αντίστοιχης ενεργότητας υγρασίας, όπως προκύπτουν μετά από έκθεση των δειγμάτων σε ατμόσφαιρες σταθερής υγρασίας, οι οποίες δημιουργούνται με κορεσμένα διαλύματα αλάτων.*

Αντιδραστήρια

- Δείγματα κριτσινιών: α) κριτσίνι, β) κριτσίνι με θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης και γ) κριτσίνι με θεωρητικά 200 ppm ενθυλακωμένης κουρκουμίνης
- Άλατα για την δημιουργία σχετικής υγρασίας: $MgCl_2$, K_2CO_3, $Mg(NO_3)_2$, $NaNO_2$, NaCl (βλ.§ 6.Δ.2)

Όργανα

- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)

- Κλίβανος
- Ξηραντήρες
- Καψίδια αλουμινίου

Αναλυτική Πορεία

Προσδιορισμός υγρασίας

- Ζυγίζεται περίπου 1 γρ. από κάθε δείγμα και τοποθετείται σε καψίδιο αλουμινίου.
- Τα δείγματα θερμαίνονται στο φούρνο, στους 105^{o}C, για 24 h.
- Ακολουθεί επαναζύγιση των δειγμάτων, μέχρι σταθερού βάρους.
- Υπολογίζεται η περιεκτικότητα νερού σε υγρή βάση και ξηρή βάση:

Xw.b= Kg νερού / Kg τροφίμου

Xd.b= Kg νερού / Kg στερεού τροφίμου

Κατασκευή Ισόθερμων ρόφησης

- Ζυγίζεται περίπου 1 γρ. από κάθε δείγμα και τοποθετείται σε καψίδιο αλουμινίου. Κάθε δείγμα λαμβάνεται 5 φορές όπου εκτίθεται σε ατμόσφαιρα συγκεκριμένης σχετικής υγρασίας, χρησιμοποιώντας κορεσμένα άλατα, όπως περιγράφηκε στην § 6.Δ.2 .
- Μετά από την εξισορρόπηση για 7 ημέρες τα δείγματα ζυγίζονται πάλι και στην συνέχεια τοποθετούνται στον κλίβανο στους 105^{o}C, για 24 h όπου ζυγίζονται πάλι για τον προσδιορισμό της υγρασίας.
- Κατασκευάζονται οι ισόθερμες ρόφησης: % υγρασία (ξ.β.)= f (RH)

6.Ε.7. Σταθερότητα της περιεχόμενης κουρκουμίνης κατά την αποθήκευση

Σκοπός: *Η μελέτη του κατά πόσο το περιεχόμενο κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης και μη), η αντιοξειδωτική δραστικότητα και το χρώμα των δειγμάτων μπορεί να επηρεαστεί: ι) κατά την έκθεση τους στο φως, σε περιβάλλον ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας και ιι) κατά την επιταχυνόμενη οξείδωση τους, στους 60^{o}C για 20 ημέρες.*

Τα δείγματα αποθηκεύονται σε περιβάλλον ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας για 2 μήνες, χωρίς να προστατεύονται από το φως (στους 25^{o}C), καθώς και στους 60^{o}C για 20 ημέρες.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα απομακρύνεται μια ποσότητα του δείγματος και προσδιορίζονται:
Α) χαρακτηριστικά χρώματος
Β) ποσοστό εναπομείνουσας κουρκουμίνης (% retention)
Γ) αντιοξειδωτική δραστικότητα (ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH)

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- 1,1- διφαίνυλο-2-πικρύλοϋδράζυλο ελεύθερη ρίζα (DPPH$^{\cdot}$) (Sigma).

- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας, (Merck, Darmstadt, Germany)
- Άλατα για την δημιουργία σχετικής υγρασίας: $MgCl_2$, K_2CO_3, $Mg(NO_3)_2$, $NaNO_2$, NaCl, KNO_3 (βλ. §6.Δ.2)

Όργανα

- Ζυγός (OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120)
- Χρωματόμετρο (Miniscan XE plus , Hunterlab)
- Συσκευή Ανάδευσης (vortex)
- Πιπέττες των 1000 μL και 100 μL (Pipetman, Eppendorf)

Αναλυτική Πορεία

Τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηραντήρες που περιέχουν τα 6 υπέρκορα διαλύματα αλάτων καθώς και σε κλίβανο, στους 60^{o}C. Ανά χρονικά διαστήματα 10 ημερών απομακρύνεται μια ποσότητα του εκάστοτε δείγματος και προσδιορίζεται το χρώμα, το ποσοστό της κουρκουμίνης που έχει απομείνει και η αντιοξειδωτική του ικανότητα (DPPH).

Ι) Μέτρηση Χρώματος

Καταγράφονται τα χαρακτηριστικά χρώματος με το χρωματόμετρο (βλ. § 6.Γ.4).

ΙΙ) Ποσοστό εναπομείνουσας κουρκουμίνης

Ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφηκε στην § 6.Δ.1., με την προσθήκη 10 ml αιθανόλης σε κάθε δείγμα (~1 γρ), ισχυρή ανάδευση και παραμονή για 10 h στο ψυγείο. Η περιεχόμενη στα εκχυλίσματα ποσότητα κουρκουμίνης προσδιορίζεται με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) στα 425 nm (βλ. § 6.Α.9),

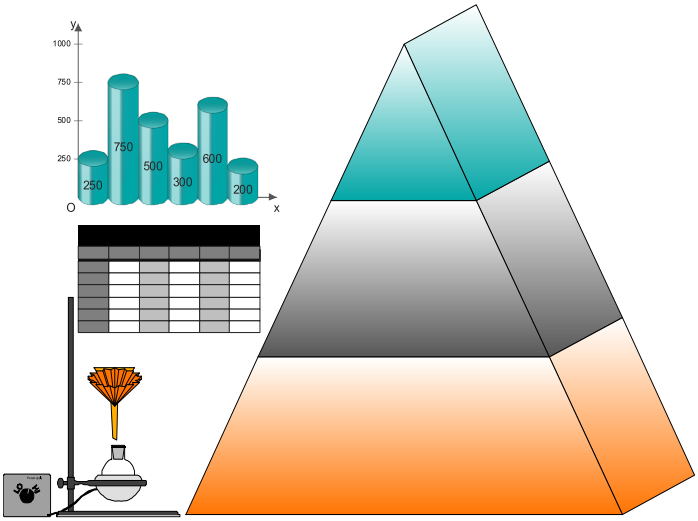
ΙΙΙ) Μέτρηση της Αντιοξειδωτικής Δραστικότητας με την μέθοδο DPPH.

Μετριέται η αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων, ακολουθώντας την πορεία που περιγράφηκε στην § 6.Γ.5.

6.Ε.8. Επίδραση της κουρκουμίνης στην οξειδωτική σταθερότητα των κριτσινιών με Rancimat

Σκοπός: *Η μελέτη του κατά πόσο η παρουσία κουρκουμίνης στα κριτσίνια, στην δεδομένη ποσότητα, επηρεάζει τον χρόνο ζωής (shelf-life) του προϊόντος. Η μελέτη γίνεται σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης, χρησιμοποιώντας την συσκευή Rancimat.*

Η λειτουργία της συσκευής περιγράφηκε στην § 6.Ε.1. Για την ανάλυση ακολουθήκε η πορεία που περιγράφεται στο Application Bulletin No 237/3e, ΩMetrohm. Συνοπτικά, 0.5 γρ. κάθε δείγματος κονιοποιούνται πλήρως, τοποθετούνται στα ειδικά δοχεία και στην συνέχεια προστίθεται στο καθένα 2.5 γρ. λαρδί το οποίο έχει προηγουμένως θερμανθεί στους 60^{o}C. Ως control χρησιμοποιούνται 3 γρ. σκέτο λαρδί. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 110^{o}C, με ροή αέρα 20 l/h.



Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο

Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae

7.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1 η ενθυλάκωση αποτελεί ένα τρόπο προστασίας του ενθυλακωμένου συστατικού ή ένα τρόπο για να επιτευχθεί ελεγχόμενη απελευθέρωσή του και τα μέσα ενθυλάκωσης ποικίλλουν: πρωτεΐνες, λιποσώματα, μικκύλια, υδατάνθρακες (μαλτοδεξτρίνες, κυκλοδεξτρίνες, κόμμεα, τροποποιημένο άμυλο) (Madene et al., 2006). Το κύτταρο του *S. cerevisiae* και ειδικότερα η φωσφολιπιδική μεμβράνη μπορεί να συμπεριφερθεί ως λιπόσωμα και έχει χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων μορίων. Σε αντίθεση με τα λιποσώματα, το κύτταρο του ζυμομύκητα προστατεύεται εξωτερικά από το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην § 2.3.2., αποτελείται από μια στοιβάδα μαννοπρωτεΐνης, το δίκτυο των β-1,3-γλυκανών, και ένα μικρό ποσοστό χιτίνης, τα οποία προσδίδουν μηχανική αντοχή στο κύτταρο. Το δίκτυο των β-γλυκανών καθορίζει την ακαμψία του κυττάρου ενώ η στοιβάδα μαννοπρωτεΐνης το πορώδες του. Το κυτταρικό τοίχωμα επιτρέπει σε μόρια με ΜΒ έως 760 να διαχέονται ελεύθερα εντός του κυττάρου (αν και έχει αναφερθεί η διάχυση μορίων με ΜΒ έως 200000 ή 400000) σε αντίθεση με την πλασματική μεμβράνη που έχει τον έλεγχο της διαπερατότητας του κυττάρου (De Nobel et al., 1990).

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ικανότητα των κυττάρων του ζυμομύκητα της αρτοποιίας *S. cerevisiae* να χρησιμοποιηθούν ως μέσο ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης. Ειδικότερα δίνεται έμφαση στις παραμέτρους που επηρεάζουν την διαδικασία της ενθυλάκωσης: α) η

πλασμόλυση των κυττάρων με χλωριούχο νάτριο, β) το διάλυμα της ενθυλάκωσης (υδατικό ή 50% v/v αιθανολικό), γ) η θερμοκρασία της ενθυλάκωσης (25, 35, 45 και 55^{o}C) και δ) η αναλογία μάζας κουρκουμίνης:κύτταρα (10.0, 3.3, 2.0, 1.4, 1.0, 0.5, 0.3 και 0.2) δηλαδή η χρήση περίσσειας κουρκουμίνης ή περίσσειας κυττάρων κατά την ενθυλάκωση.

Όλα τα κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης (πλασμολυμένα και μη) μελετώνται με DSC και FT-IR με σκοπό να διαπιστωθεί εάν η πλασμόλυση των κυττάρων επηρεάζει την ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης και την οργάνωση/σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης, τμήματα του κυττάρου τα οποία ελέγχουν την διαδικασία της ενθυλάκωσης.

Η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* εκφράζεται ποσοτικά με δυο παραμέτρους: α) την % κ.β. (% w/w) περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη των παρασκευασθέντων μικροκαψουλών (*% Encapsulation Yield, %EY*) και β) την απόδοση της ενθυλάκωσης (*% Encapsulation Efficiency, %EE*).

Η επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του S. cerevisiae πραγματοποιείται: α) με οπτικές τεχνικές και ειδικότερα με μικροσκόπηση φθορισμού (Fluorescence Microscopy) και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Electron Scanning Microscopy) και β) με DSC και FT-IR, από τις οποίες μελετάται και η αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης με συστατικά του κυττάρου.

7.2. Επίδραση της λυοφιλίωσης και της πλασμόλυσης στην ζωτικότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae*

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται κυρίως η χρησιμοποίηση πλασμολυμένων κυττάρων ως μέσο ενθυλάκωσης. Στόχος της πλασμόλυσης είναι η κυρίως η απομάκρυνση του νερού και μαζί ίσως και κάποιων υδατοδιαλυτών συστατικών του κυττάρου (ένζυμα, πρωτεΐνες, αμινοξέα, σάκχαρα, νουκλεϊνικά οξέα) προκειμένου να αυξηθεί ο διαθέσιμος για ενθυλάκωση χώρος στο κύτταρο. Αποτέλεσμα της πλασμόλυσης είναι βασικά η συρρίκνωση του κυττάρου λόγω της 'απομάκρυνσης-συρρίκνωσης' της κυτταρικής μεμβράνης από το κυτταρικό τοίχωμα, εξαιτίας της απώλειας νερού. Η επίδραση της πλασμόλυσης στο κύτταρο του *S. cerevisiae* περιγράφηκε

αναλυτικά στην § 2.4.2. Η αποτελεσματικότητα της πλασμόλυσης επηρεάζεται τόσο από το μέσο το οποίο χρησιμοποιείται για την πλασμόλυση, όσο και από την θερμοκρασία ή το pH και πέρα από την απώλεια νερού/κυτταρικών συστατικών ενδέχεται να προκαλέσει τροποποιήσεις και στην ζωτικότητα ή την μορφολογία του κυττάρου καθώς και στην λιπιδική σύσταση της μεμβράνης του (Hohnman, 1997; Slaninova et al., 2000; Adya et al., 2006).

Στην παρούσα μελέτη η πλασμόλυση πραγματοποιείται με χλωριούχο νάτριο σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (10% κ.β., 20% κ.β., 30% και 40% κ.β.) προκειμένου να βρεθεί η συγκέντρωση εκείνη που είναι πιο αποτελεσματική για την επιτυχή πλασμόλυση. Όλα τα κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης (πλασμολυμένα ή μη) ήταν σε μορφή λυοφιλιωμένης σκόνης και η ποσότητά τους η οποία χρησιμοποιήθηκε εκφράζεται ως μάζα (γρ.) κυττάρων. Δεδομένου ότι τα κύτταρα κατά την ενθυλάκωση δρουν ως 'βιολογικά οχήματα' θα ήταν ίσως πιο ακριβές να εκφραστεί η ποσότητα των κυττάρων ως 'αριθμός' παρά ως 'μάζα' κυττάρων. Με την μέθοδο Neubauer προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων που περιέχονται σε 1 mg λυοφιλιωμένης σκόνης κυττάρων, συσχετίζοντας έτσι τον αριθμό με τη μάζα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 7.1 απ' όπου φαίνεται ότι 1 mg λυοφιλιωμένης σκόνης κυττάρων (πλασμολυμένων ή μη) περιέχει κατά μέσο όρο $4.7*10^7$ κύτταρα. Ομοίως η μέτρηση νωπών ζωντανών κυττάρων έδειξε ότι σε 1 mg περιέχονται $1.1*10^7$ κύτταρα. Τα αποτελέσματα του πίνακα επιβεβαιώθηκαν και με την μέθοδο μέτρησης του αριθμού των σχηματιζόμενων αποικιών, μετά από επώαση των κυττάρων σε εκλεκτικό υπόστρωμα (PDA).

Με τη μέθοδο Neubauer, χρησιμοποιώντας ως χρωστική το μπλε του μεθυλενίου, μετρήθηκε επίσης η ζωτικότητα των λυοφιλιωμένων κυττάρων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.1 η λυοφιλίωση είναι μια θανατηφόρα διαδικασία για τα κύτταρα, αφού μόλις το 3% των μη-πλασμολυμένων κυττάρων και περίπου το 7% των πλασμολυμένων καταφέρνουν να επιβιώσουν. Η μικρή αυτή διαφορά στην ζωτικότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ πλασμολυμένων και μη-πλασμολυμένων κυττάρων πιθανότατα να οφείλεται σε μηχανισμούς προσαρμογής τους οποίους αναπτύσσουν τα κύτταρα κατά την πλασμόλυση τους ενάντια στο στρες, κάτι που πιθανώς τα καθιστά πιο ανθεκτικά στην επακόλουθη θανατηφόρα διαδικασία της λυοφιλίωσης. Εξαιτίας της θανατηφόρας επίδρασης της λυοφιλίωσης στα κύτταρα, για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης αξιολογούνται και (μη-λυοφιλιωμένα) ζωντανά κύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση βέβαια η ποσότητα των κυττάρων που χρησιμοποιείται για την

ενθυλάκωση εκφράζεται καλύτερα ως 'αριθμός' παρά ως 'μάζα' κυττάρων. Ωστόσο, δεδομένης της μεγάλης ποσότητας κυττάρων που απαιτείται για την εκτέλεση των πειραμάτων καθώς και για πρακτικούς λόγους, για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης χρησιμοποιήθηκε μια λυοφιλιωμένη, ομοιογενής σκόνη νεκρών κυττάρων (με γνωστό αριθμό κυττάρων/g σκόνης). Σύμφωνα με τον Bishop et al, (1998) η ενθυλάκωση διατρόφοδραστικών συστατικών μπορεί να επιτευχθεί με επιτυχία και με νεκρά κύτταρα, καθότι η όλη διαδικασία της ενθυλάκωσης επιτυγχάνεται κυρίως με παθητική διάχυση της ουσίας κατά μήκος του κυτταρικού φακέλου.

***Πίνακας 7.1**. Αριθμός και βιωσιμότητα κυττάρων που περιέχονται σε 1 mg νωπής (compressed) μάζας κυττάρων καθώς και σε 1 mg λυοφιλιωμένης σκόνης κυττάρων (πλασμολυμένων και μη), όπως μετρήθηκαν με την μέθοδο Neubauer και χρωστική μπλε του μεθυλενίου.*

Κύτταρα S. cerevisiae	*αριθμός κυττάρων/ mg λυοφιλιωμένης σκόνης*	*% ζωντανά κύτταρα*
Μη πλασμολυμένα	$3,1 * 10^7$	3
Πλασμολυμένα σε 10% κ.β. NaCl	$6,9* 10^7$	7
Πλασμολυμένα με 20% κ.β. NaCl	$6,9* 10^7$	8
Πλασμολυμένα με 30% κ.β. NaCl	$5,7* 10^7$	7
Πλασμολυμένα με 40% κ.β. NaCl	$5,0* 10^7$	7
Νωπά (compressed) κύτταρα	$1,1* 10^7$ /mg νωπής μάζας	100

7.3. DSC και FT-IR των πλασμολυμένων κυττάρων

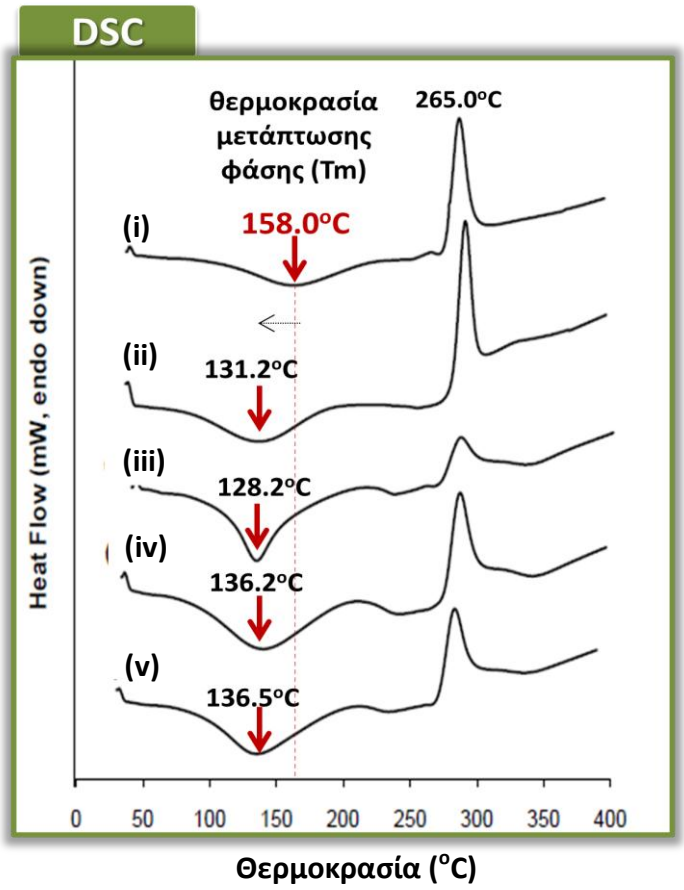
Τα πλασμολυμένα (λυοφιλιωμένα) κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης μελετήθηκαν με DSC και FT-IR και συγκρίθηκαν με τα μη-πλασμολυμένα προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφοροποιήσεις στην δομή/σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης. Στην Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), όπου εμφανίζονται οι εξώθερμες και οι ενδόθερμες μεταβολές ενός συστήματος, η απουσία ή η εμφάνιση νέων κορυφών καθώς και αλλαγές στο σχήμα ή την ενθαλπία τους, υποδηλώνουν πιθανές αλληλεπιδράσεις στο προς μελέτη σύστημα. Στο σχήμα 7.1 παρουσιάζονται τα DSC

θερμογραφήματα των άδειων κυττάρων. Στο θερμογράφημα των μη-πλασμολυμένων κυττάρων (σχήμα 7.1 i) υπάρχει μια ευρεία ενδόθερμη κορυφή με μέγιστο στους 158.0^{o}C, η οποία αποδίδεται στην θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης (Tm) της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας από την φάση πηκτής (gel phase) στην υγροκρυσταλλική φάση (liquid crystalline phase) (Maiti et al., 2007). Συγκεκριμένα, στην θερμοκρασία δωματίου η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα των λυοφιλιωμένων κυττάρων βρίσκεται στην φάση πηκτής, διότι η απώλεια του νερού ελαττώνει την απόσταση μεταξύ των κεφαλών των φωσφολιπιδίων, αυξάνοντας τις δυνάμεις van der Waals μεταξύ των άκυλο-ομάδων των λιπιδίων. Κατά την διάρκεια της ανάλυσης, με την άνοδο της θερμοκρασίας, οι υδρόφοβες δυνάμεις van der Waals ελαττώνονται και η διπλοστοιβάδα μεταβαίνει στην ρευστή υγροκρυσταλλική φάση, συνεπώς στους 158.0^{o}C οι υδρόφοβες άκυλο-αλυσίδες των φωσφολιπιδίων τήκονται.

Στα θερμογραφήματα των κυττάρων που είχαν πλασμολυθεί με 10%, 20%, 30% και 40% κ.β. NaCl εμφανίζεται μια ενδόθερμη κορυφή με μέγιστο στους 131.2^{o}C (σχήμα 7.1 ii), 128.2^{o}C (σχήμα 7.1 iii), 136.2^{o}C (σχήμα 7.1 iv) και 136.5^{o}C (σχήμα 7.1 v), αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις τα πλασμολυμένα κύτταρα έχουν μικρότερη Tm ($p<0.05$) σε σχέση με τα μη-πλασμολυμένα κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η πλασμόλυση αυξάνει τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης. Καθώς η Tm, σε δεδομένη aw, επηρεάζεται από τη σύσταση της μεμβράνης (Laroche et al., 2003) φαίνεται ότι η πλασμόλυση τροποποιεί σε κάποιο βαθμό τη λιπιδική σύσταση και/ή την οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης. Η απόδειξη ότι η δεδομένη κορυφή αποδίδεται στην μετάπτωση φάσης των φωσφολιπιδίων και όχι για παράδειγμα στην απώλεια νερού, αναφέρεται αναλυτικά στην μελέτη των Normand et al., (2005), όπου η ανάλυση με DSC σε άδεια πλασμολυμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* μετά την ξήρανση τους με την τεχνική του ψεκασμού (spray drying) έδωσε μόνο μια ενδόθερμη κορυφή σε υψηλή θερμοκρασία (173^{o}C), η οποία αποδόθηκε στην μετάπτωση φάσης των φωσφολιπιδίων. Στην συγκεκριμένη μελέτη η ερμηνεία της συγκεκριμένης κορυφής ως Tm ενισχύθηκε σημαντικά από την θερμοσταθμική ανάλυση (TGA, Thermogravimetric analysis) η οποία έδειξε μια μικρή απώλεια μάζας μεταξύ 25^{o}C και 110^{o}C που αποδόθηκε στην απώλεια νερού από τα δείγματα, ενώ η ανάλυση με DSC δεν έδωσε κάποια κορυφή σε αυτό το εύρος θερμοκρασιών. Αντιθέτως μεταξύ 110^{o}C και 246^{o}C, όπου στα δείγματα το περιεχόμενο νερό τους είχε πλέον απομακρυνθεί, η μάζα τους ήταν σχεδόν σταθερή, επομένως η εμφάνιση οποιαδήποτε κορυφής στα θερμογραφήματα του DSC σε αυτή την περιοχή θερμοκρασιών (συμπεριλαμβανομένης και της ενδόθερμης στους 173^{o}C) δεν θα μπορούσε να οφείλεται στην

απώλεια νερού από τα δείγματα. Όσον αφορά τα δείγματα των πλασμολυμένων κυττάρων της παρούσης μελέτης πραγματοποιήθηκε ένα ανεξάρτητο πείραμα για τον προσδιορισμό της υγρασίας των λυοφιλιωμένων δειγμάτων, με δυο μεθόδους: α) την τεχνική της ξήρανσης στο φούρνο (Lodato et al., 1999) υποβάλλοντας τα δείγματα σε θέρμανση στους 90^{o}C για 48h, μέχρι σταθερού βάρους και β) ξήρανση σε ξηραντήρα σε συνθήκες μηδενικής ενεργότητας νερού (Pitombo et al., 1994) με άλας P_2O_5, υπό κενό, για περίπου 15 ημέρες. Με την πρώτη μέθοδο η υγρασία των λυοφιλιωμένων άδειων κυττάρων προσδιορίστηκε στο 3.2±0.2% κ.β. σε ξηρή βάση και των μικροκαψουλών σε 2.9±0.4% κ.β.. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της υγρασίας των δειγμάτων και με την δεύτερη μέθοδο: 3.3±0.3% κ.β. για τα άδεια κύτταρα και 3.1±0.3% κ.β. για τις μικροκάψουλες κουρκουμίνης. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα άδεια κύτταρα και οι μικροκάψουλες στην μελέτη των Normand et al., (2005) είχαν παρόμοια περιεκτικότητα σε νερό: 3.8±0.2% και 3.3±0.3% κ.β. νερό, αντίστοιχα. Δεδομένου ότι η Tm εξαρτάται από την περιεκτικότητα νερού του συστήματος, καθώς και από τη σύσταση/ δομή των φωσφολιπιδίων (Laroche et al., 2003) οι διαφορές που παρατηρούνται στην Tm των άδειων πλασμολυμένων κυττάρων στην παρούσα μελέτη (περίπου 131^{o}C) σε σχέση με τη μελέτη των Normand et al., (2005) (173^{o}C) μπορούν να αποδοθούν στο διαφορετικό στέλεχος του *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε, στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων (οξυγόνο, θερμοκρασία, μέσο ανάπτυξης) ή στο διαφορετικό στάδιο της φάσης ανάπτυξης όπου βρίσκονταν τα κύτταρα κατά την συλλογή τους. Έχει αναφερθεί ότι όλα τα παραπάνω όπως επίσης και το περιβαλλοντικό στρες, όπως η θέρμανση ή η πλασμόλυση (οσμωτικό στρες) καθορίζουν την λιπιδική σύσταση/δομή της πλασματικής μεμβράνης (Cerbon et al., 1995; Sharma, 2001; Sajbidor, 1997). Έτσι, είναι πιθανόν και το διαφορετικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την πλασμόλυση των κυττάρων να επηρέασε τη σύσταση/δομή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και συνεπώς την Tm.

Η εξώθερμη κορυφή που παρατηρείται στους περίπου 265.0^{o}C στα θερμογραφήματα όλων των κυττάρων (πλασμολυμένων και μη), όπως φαίνεται στο σχήμα 7.1, αποδίδεται στην καταστροφή του κυττάρου.



Σχήμα 7.1. *Θερμογραφήματα DSC των λυοφιλιωμένων κυττάρων του S. cerevisiae μη-πλασμολυμένων (i) και πλασμολυμένων σε διάλυμα (ii) 10% κ.β., (iii) 20% κ.β., (iv) 30% κ.β. και (v) 40% κ.β. NaCl.*

Τα δείγματα των κυττάρων μελετώνται επίσης με Fourier Transform Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR) για πιθανές αλλαγές στη σύσταση/δομή τους λόγω της πλασμόλυσης και τα φάσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.2. Σε όλα τα φάσματα υπάρχει μια ευρεία κορυφή στα 3700-3000 cm^{-1} η οποία περιλαμβάνει τις δονήσεις τάσεως των O-H των υδατανθράκων, τις δονήσεις τάσεως των NH των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων καθώς και τη δόνηση (overtone) των αμιδίων II (Burattini et al., 2008). Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα φάσματα των κυττάρων τα οποία είχαν πλασμολυθεί σε 10% κ.β. NaCl (σχήμα 7.2 ii), 20% κ.β. NaCl (σχήμα 7.2 iii), 30% κ.β. NaCl (σχήμα 7.2 iv) και 40% κ.β. NaCl (σχήμα 7.2 v) ενώ μετά από σύγκριση τους με το φάσμα των μη-πλασμολυμένων κυττάρων (σχήμα 7.2 i) προκύπτει ότι κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές/απορροφήσεις διαφέρουν και συνεπώς η πλασμόλυση επιδρά στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες, τα νουκλεϊνικά οξέα και τους υδατάνθρακες του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα του κυτταρικού τοιχώματος ή της μεμβράνης.

Η περιοχή στα 3000-2800 cm^{-1} δίνει σημαντικές πληροφορίες που αφορούν τα λιπίδια. Οι κορυφές στα 2958 cm^{-1} και 2929 cm^{-1} των μη-πλασμολυμένων κυττάρων (σχήμα 7.2 i), οι οποίες αποδίδονται στις ασύμμετρες δονήσεις τάσεως των CH_3 και CH_2 μετατοπίζονται στα 2964 cm^{-1} και 2948 cm^{-1}, αντίστοιχα, στα πλασμολυμένα κύτταρα (σχήματα 7.2 ii, iii, iv, v) και η ένταση της απορρόφησής τους παρουσιάζει μια μικρή αύξηση (Burattini et al., 2008). Οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με αλλαγές στο μήκος των αλυσίδων των λιπιδίων και τη δομή της πλασματικής μεμβράνης και έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του DSC. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα πλασμολυμένα κύτταρα έχουν μικρότερη Tm σε σχέση με τα μη-πλασμολυμένα, επομένως η πλασμόλυση τροποποίησε τη λιπιδική δομή της μεμβράνης και αύξησε την κινητικότητα, και συνεπώς την ρευστότητά της. Η μικρή κορυφή στα 1740 cm^{-1} των μη-πλασμολυμένων κυττάρων λόγω της C=O τάσης των εστέρων των λιπιδίων, μετατοπίζεται στα 1748 cm^{-1} και η έντασή της αυξάνεται στα πλασμολυμένα κύτταρα (Burattini et al., 2008). Αυτή η αλλαγή πιθανόν να οφείλεται στη σχετική αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου του κυττάρου μετά την πλασμόλυση, πιθανότατα εξαιτίας της απώλειας κυτταρικών συστατικών εκτός του κυττάρου.

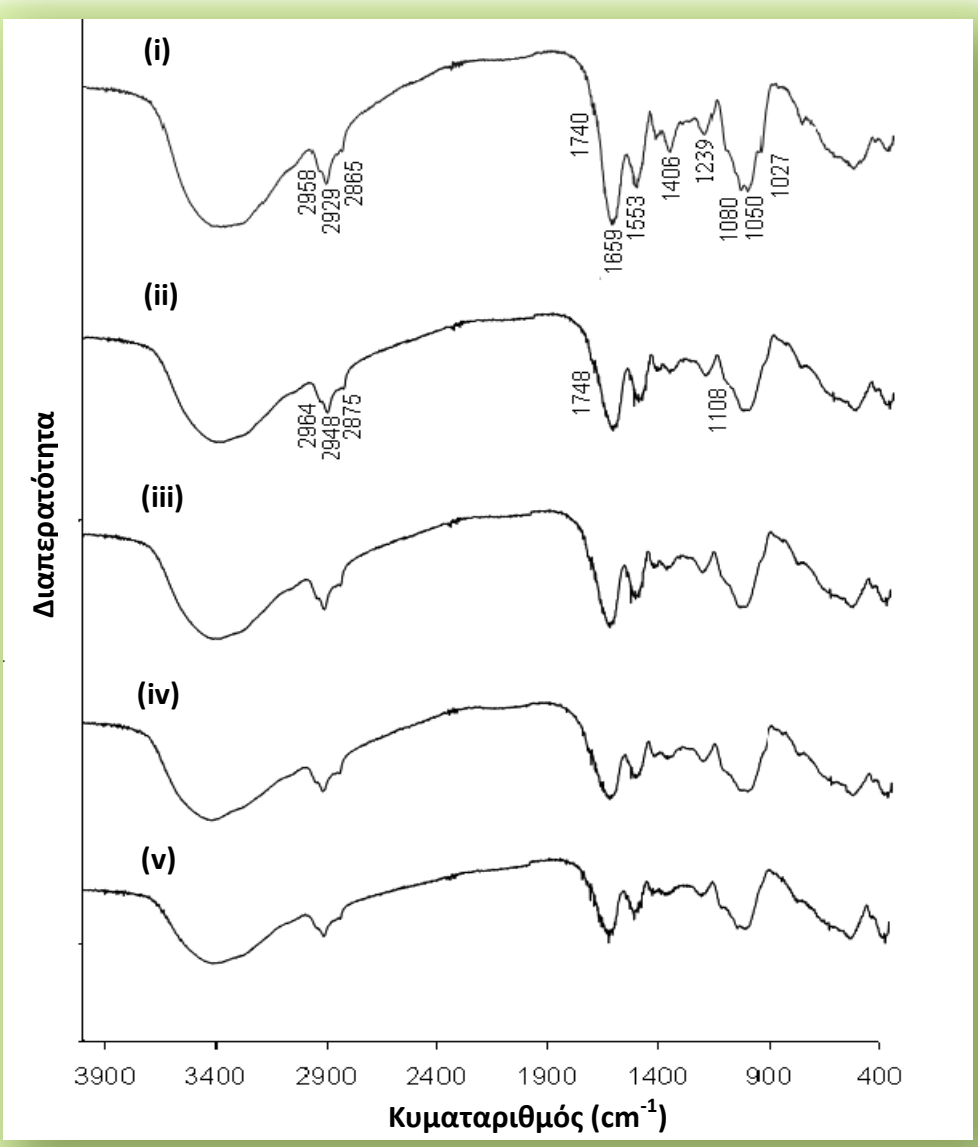
Η πλασμόλυση επιδρά και στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο του κυττάρου. Η μικρής έντασης απορρόφηση στα 2865 cm^{-1} των μη-πλασμολυμένων κυττάρων η οποία αποδίδεται στις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια μετατοπίζεται στα 2875 cm^{-1} και η ένταση της αυξάνεται μετά την πλασμόλυση λόγω μιας μικρής πρωτεϊνικής αποικοδόμησης του κυττάρου. Ομοίως, οι αλλαγές που παρατηρούνται στην ένταση των κορυφών στην περιοχή 1740-1500 cm^{-1} οφείλονται σε μερική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών κυρίως του κυτταρικού τοιχώματος. Ειδικότερα, οι κορυφές στα 1659 cm^{-1} και στα 1553 cm^{-1}, οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις C=O των πρωτεϊνικών αμιδίων I και στις N-H και C-N δονήσεις των αμιδίων II των κυττάρων, αντίστοιχα, διαφοροποιούνται μετά την πλασμόλυση. Σύμφωνα με τον Burattini et al., (2008) οι παραπάνω αλλαγές είναι αποτέλεσμα της μερικής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών και της περαιτέρω οργάνωσης τους σε μια ‘ανοιχτή’ (unfolded) δομή. Επιπλέον, η περιοχή από τα 1500 cm^{-1} έως τα 1390 cm^{-1} επιβεβαιώνει την αποικοδόμηση ενός ποσοστού των πρωτεϊνών του κυττάρου (κυρίως του τοιχώματος και της μεμβράνης) σε πεπτίδια και αμινοξέα: η ένταση της απορρόφησης στα 1406 cm^{-1} των μη-πλασμολυμένων κυττάρων λόγω των δονήσεων των πρωτεϊνών ελαττώνεται σημαντικά μετά την πλασμόλυση.

Η περιοχή από τα 1166 cm^{-1} έως τα 780 cm^{-1} οφείλεται σε απορροφήσεις από τις μαννάνες και τις γλυκάνες του κυττάρου. Η σύγκριση των φασμάτων των κυττάρων (σχήμα 7.2) δείχνει ότι η πλασμόλυση προκαλεί αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, η απορρόφηση στα 1050 cm^{-1} των μαννανών μετατοπίζεται στα 1080 cm^{-1} στα πλασμολυμένα κύτταρα (κοντά στην κορυφή της ριβόζης του RNA) και η ένταση της ελαφρώς μειώνεται λόγω της μικρής αποικοδόμησης των μαννανών. Όσον αφορά τις γλυκάνες του κυττάρου η κορυφή στα 1108 cm^{-1} των β-1,3 γλυκανών δε διαφοροποιείται μετά την πλασμόλυση των κυττάρων, σε αντίθεση με την απορρόφηση των β-1,4 γλυκανών στα 1027 cm^{-1} της οποίας η ένταση ελαττώνεται σημαντικά στα πλασμολυμένα κύτταρα. Με βάση αυτή την τελευταία παρατήρηση προκύπτει ότι είναι οι β-1,3 γλυκάνες αυτές που συνεισφέρουν στην συνοχή του κυτταρικού τοιχώματος των πλασμολυμένων κυττάρων. Όμοια, στην μελέτη των Burattini et al., (2008) βρέθηκε ότι οι διακλαδισμένες β-1,4 και β-1,6 γλυκάνες του *S. cerevisiae* είναι περισσότερο ασταθείς κατά την αυτόλυση των κυττάρων σε αντίθεση με τις β-1,3 γλυκάνες.

Τέλος, η πλασμόλυση των κυττάρων προκαλεί και μερική αποικοδόμηση των νουκλεϊνικών οξέων του κυττάρου σε νουκλεοτίδια, όπως φαίνεται από τη μικρή ελάττωση της έντασης στα 1239 cm^{-1}, η οποία οφείλεται στις ασύμμετρες δονήσεις των PO_2^- των μορίων του DNA και RNA. Είναι αξιοσημείωτο ότι η κορυφή στα 1239 cm^{-1} μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τα πλασμολυμένα κύτταρα, καθώς αυτή η κορυφή οφείλεται στα μόρια DNA/RNA, μόρια τα οποία βρίσκονται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (πυρήνας και μιτοχόνδρια). Η παρουσία αυτής της κορυφής στα φάσματα των πλασμολυμένων κυττάρων (σχήμα 7.2 ii, iii, iv, v) υποδηλώνει ότι τα πλασμολυμένα κύτταρα δεν είναι τελείως άδεια, όσον αφορά το κυτταροπλασματικό τους υλικό, αφού μόρια DNA, RNA βρίσκονται ακόμα στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο αν και στα πλασμολυμένα κύτταρα υπάρχει ακόμα κυτταροπλασματικό υλικό, τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα πλασμολυμένα κύτταρα μπορούν να θεωρηθούν ως ‘μερικώς άδεια’, αφού το νερό καθώς και ένα μέρος του κυτταροπλασματικού υλικού είχε μερικώς αφαιρεθεί. Όσον αφορά το νερό, μόλις 3.2±0.2% κ.β. απέμεινε μετά από την πλασμόλυση και την λυοφιλίωση των κυττάρων. Όσον αφορά το κυτταροπλασματικό υλικό μετά από την πλασμόλυση των κυττάρων σε 10, 20, 30 και 40% κ.β. NaCl παρατηρήθηκε απώλεια μάζας περίπου 15% κ.β. σε ξηρή βάση, ενώ μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων όσο αυτά βρίσκονταν στο διάλυμα NaCl, πριν την λυοφιλίωση, έδειξε ότι τα κύτταρα ήταν

συρρικνωμένα σε σχέση με τα μη-πλασμολυμένα. Παρόμοια μικροσκοπική παρατήρηση έχει αναφερθεί στην μελέτη των Morris et al., (1983).

FT-IR



Σχήμα 7.2*. Φάσματα FT-IR των λυοφιλιωμένων κυττάρων του S. cerevisiae (i) μη-πλασμολυμένων και πλασμολυμένων με (ii) 10% κ.β., (iii) 20% κ.β., (iv) 30% κ.β. και (v) 40% κ.β. NaCl.*

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του DSC και του FT-IR, η πλασμόλυση των κυττάρων (η οποία πραγματοποιήθηκε ακόμα και με μόλις 10% κ.β. NaCl) αποδιοργανώνει έως ένα βαθμό την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και αυξάνει την ρευστότητά της. Επιπλέον το κυτταρικό τοίχωμα των πλασμολυμένων κυττάρων είναι πιο 'λεπτό' καθώς ένα μέρος των

μαννοπρωτεϊνών καθώς και των β-1,4 και β-1,6 γλυκανών αποικοδομείται. Περίσσεια NaCl κατά την πλασμόλυση (20%, 30% ή 40% κ.β. αντί για 10% κ.β.) δεν φαίνεται να προκαλεί καμία επιπλέον σημαντική τροποποίηση στη σύσταση/δομή του κυττάρου.

7.4. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* και παράμετροι που την επηρεάζουν

7.4.1. Πλασμολυμένα, μη-πλασμολυμένα και ζωντανά κύτταρα

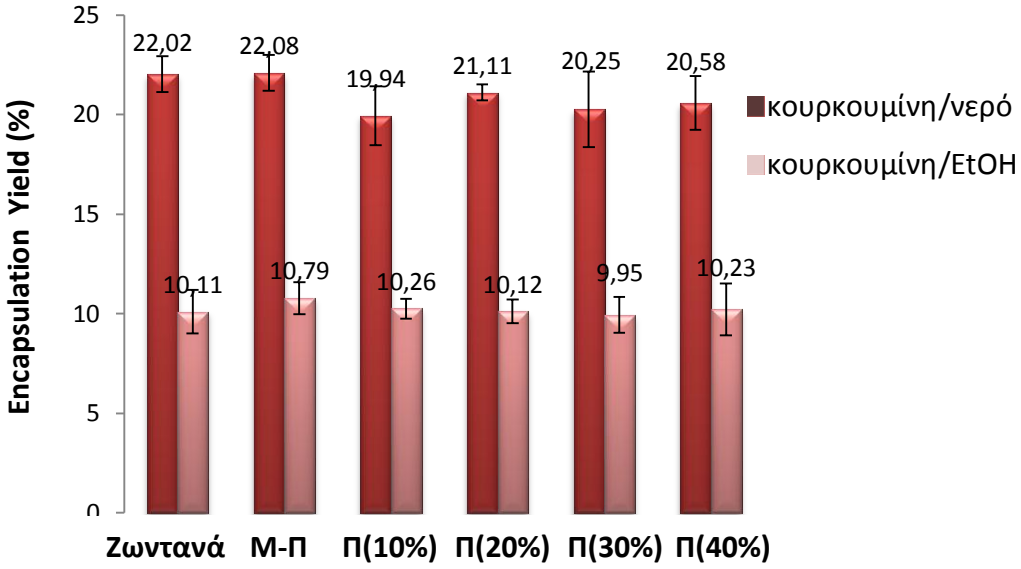
Κατά την πλασμόλυση των κυττάρων το ενδοκυτταρικό νερό απομακρύνεται από το κύτταρο με αποτέλεσμα η κυτταρική μεμβράνη να απομακρύνεται από το κυτταρικό τοίχωμα (Korber et al, 1996). Ταυτόχρονα με την απώλεια νερού μπορεί να απομακρυνθούν και υδατοδιαλυτά συστατικά του κυττάρου (πρωτεΐνες, σάκχαρα, ένζυμα, αμινοξέα, νουκλεϊνικά οξέα) αυξάνοντας τον ενδοκυτταρικό χώρο γι' αυτό και πλασμολυμένα κύτταρα έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί ως μέσα ενθυλάκωσης. Ως μέσα πλασμόλυσης έχουν χρησιμοποιηθεί σάκχαρα (σακχαρόζη), γλυκερόλη, χλωριούχο νάτριο, πολικοί οργανικοί διαλύτες (π.χ. κατώτερες αλκοόλες, οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη) ή ένζυμα, όπως η λυσοζύμη. Για παράδειγμα στην μελέτη των Chow et al., (2004) χρησιμοποιήθηκε η επιφάνειοδραστική ουσία (Triton X-100) για την πλασμόλυση των κυττάρων του *S. cerevisiae.* Στους Inoue et al., (1991) ενθυλακώθηκαν υδρόφοβες ουσίες σε κύτταρα τα οποία είχαν πλασμολυθεί με αιθανόλη ή ακετόνη. Πρόσφατα, κύτταρα ζυμομυκήτων τα οποία είχαν πλασμολυθεί με NaCl (Shi et al., 2007; Shi et al., 2008) χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση της ρεσβερατρόλης και του χλωρογενικού οξέος.

Στο σχήμα 7.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα (τιμές % ΕΥ) από την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα ζωντανά, μη-πλασμολυμένα και πλασμολυμένα (σε 10%, 20%, 30% και 40% κ.β. NaCl). Όπως φαίνεται η % κ.β. περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη (% ΕΥ τιμές) των μικροκαψουλών οι οποίες παρασκευάστηκαν με πλασμολυμένα, μη-πλασμολυμένα και ζωντανά κύτταρα είναι στατιστικώς όμοια ($p>0.05$), όταν η κουρκουμίνη προστέθηκε διασπαρμένη σε νερό (οπότε το διάλυμα ενθυλάκωσης είναι υδατικό). Παρόμοια είναι η τάση όταν η κουρκουμίνη προστίθεται διαλυμένη σε αλκοόλη (δηλαδή όταν το διάλυμα ενθυλάκωσης είναι 50% v/v αλκοολικό). Ωστόσο στην τελευταία περίπτωση η μέση % ΕΥ τιμή

των μικροκαψουλών είναι 10.24% (±0.28) ενώ στην πρώτη 21.02 % (±0.90), περίπου δυο φορές μεγαλύτερη. Επιπλέον, δεν υπάρχουν διαφορές ($p>0.05$) στην % κ.β. περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη των μικροκαψουλών που παρασκευάστηκαν με πλασμολυμένα κύτταρα, ανεξαρτήτως εάν η πλασμόλυση είχε πραγματοποιηθεί σε 10%, 20%, 30% ή 40% κ.β. NaCl. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μεγάλη διάρκεια της πλασμόλυσης (48 h), μετά το πέρας της οποίας η απώλεια μάζας για τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 10%, 20%, 30% ή 40% κ.β. NaCl ήταν παρόμοια ($p>0.05$), περίπου 15% κ.β. σε ξηρή βάση. Συνεπώς η περίσσεια NaCl κατά την πλασμόλυση (>10% κ.β.) δεν ελαττώνει αλλά ούτε και ενισχύει την % κ.β. ποσότητα της κουρκουμίνης που τελικά ενθυλακώνεται στα κύτταρα. Επομένως, ανεξαρτήτως από την επίδραση της πλασμόλυσης στην δομή του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην § 7.3., όλα τα πλασμολυμένα κύτταρα είναι ικανά να ενθυλακώσουν την κουρκουμίνη αποτελεσματικά. Σύγκριση μεταξύ πλασμολυμένων και μη-πλασμολυμένων κυττάρων ως προς την αποτελεσματικότητα τους ως μέσο ενθυλάκωσης, έχει αναφερθεί στην μελέτη των Shi et al., (2007), όπου ενθυλακώθηκε το χλωρογενικό οξύ και αποδείχθηκε ότι η απόδοση της ενθυλάκωσης (% ΕΕ) ήταν δυο φορές υψηλότερη όταν χρησιμοποιούνται πλασμολυμένα κύτταρα αντί για μη-πλασμολυμένα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αφού το χλωρογενικό οξύ, σε αντίθεση με την κουρκουμίνη, είναι υδατοδιαλυτό συστατικό και πιθανότατα ενθυλακώνεται στον εσωτερικό χώρο (κυτταρόπλασμα) του κυττάρου. Επιπρόσθετα, στην μελέτη των Bishop et al., (1998) καθώς και σε μια πληθώρα πατεντών περιγράφεται η αποτελεσματική ενθυλάκωση αιθέριων ελαίων σε μη-πλασμολυμένα κύτταρα του *S. cerevisiae*.

Από τα αποτελέσματα του σχήματος 7.3 φαίνεται, επίσης, ότι η ζωτικότητα των κυττάρων δεν αποτελεί προϋπόθεση για την αποτελεσματική ενθυλάκωση της κουρκουμίνης: οι τιμές % ΕΥ των μικροκαψουλών που παρασκευάστηκαν με ζωντανά κύτταρα είναι όμοιες ($p>0.05$) με αυτές που παρασκευάστηκαν με μη-ζωντανά (λυοφιλιωμένα) κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα των Bishop et al., (1998) ως προς το ότι η ενθυλάκωση μιας ουσίας σε κύτταρα του *S. cerevisiae* πραγματοποιείται με παθητική διάχυση της κατά μήκος του κυτταρικού φακέλου και μπορεί να συμβεί ανεξαρτήτως εάν το κύτταρο είναι ζωντανό ή νεκρό. Συνεπώς το (θανατηφόρο) στάδιο της λυοφιλίωσης των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν ως μέσα ενθυλάκωσης μπορεί να παραληφθεί, απλουστεύοντας τη

διαδικασία της ενθυλάκωσης, ωστόσο για πρακτικούς λόγους, όπως αναφέρθηκε στην § 7.2, πραγματοποιείται.



Σχήμα 7.3*. % ΕΥ (% κ.β. περιεκτικότητα) των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα (κουρκουμίνη/νερό) ή σε 50% v/v αιθανόλη (κουρκουμίνη/EtOH) με ζωντανά ή λυοφιλιωμένα κύτταρα του S. cerevisiae, μη-πλασμολυμένα (Μ-Π) και πλασμολυμένα (Π) σε 10%, 20%, 30% και 40% κ.β. NaCl.*

7.4.2. Λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα, θερμοκρασία, αιθανόλη

Στο σχήμα 7.4 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι τιμές % ΕΥ (σχήμα 7.4.α) και % ΕΕ (σχήμα 7.4.β) των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης οι οποίες παρασκευάστηκαν με τα κύτταρα του *S. cerevisiae*, σε σχέση με τις εξής παραμέτρους:

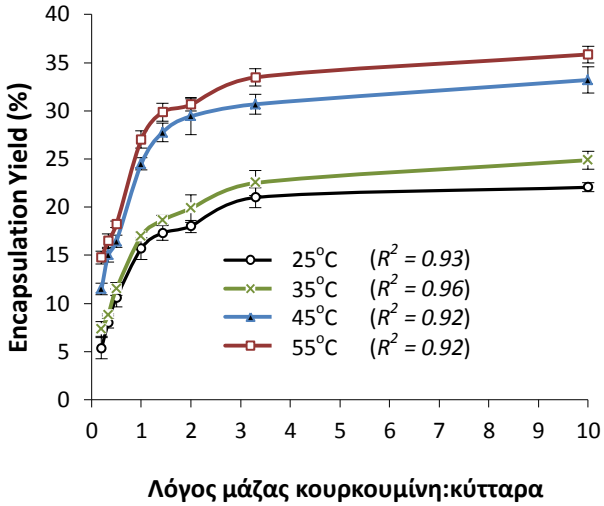
- ✓ τον λόγο μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα (10.0, 3.3, 2.0, 1.4, 1.0, 0.5, 0.3, 0.2)
- ✓ την θερμοκρασία ενθυλάκωσης (25°C, 35°C, 45°C, 55°C)
- ✓ το διάλυμα ενθυλάκωσης (υδατικό ή 50% v/v αλκοολικό)

Όλα τα παραπάνω μελετούνται σε συνδυασμό με την φυσική κατάσταση των κυττάρων: χρησιμοποιούνται κύτταρα πλασμολυμένα σε 10% κ.β. NaCl ή μη-πλασμολυμένα. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από την μελέτη με DSC και FT-IR των πλασμολυμένων κυττάρων (§ 7.2) που αφορούν την οργάνωση/σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης καθώς και την αποτελεσματικότητα τους στην ενθυλάκωση της κουρκουμίνης (§ 7.4.1), όπου δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ως πλασμολυμένα

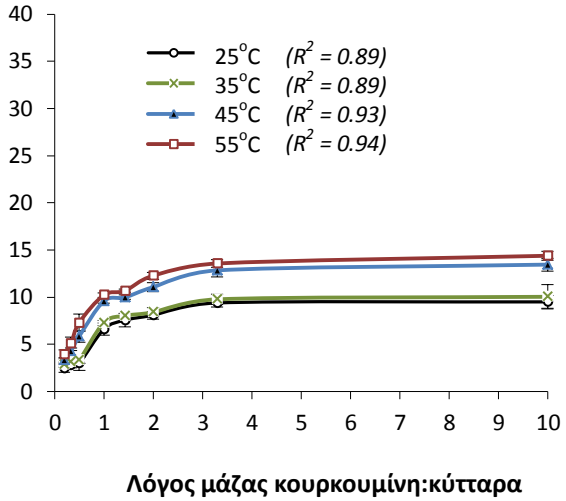
κύτταρα για την εκτέλεση των πειραμάτων επιλέγονται αυτά που είχαν πλασμολυθεί σε 10% κ.β. NaCl.

[α]

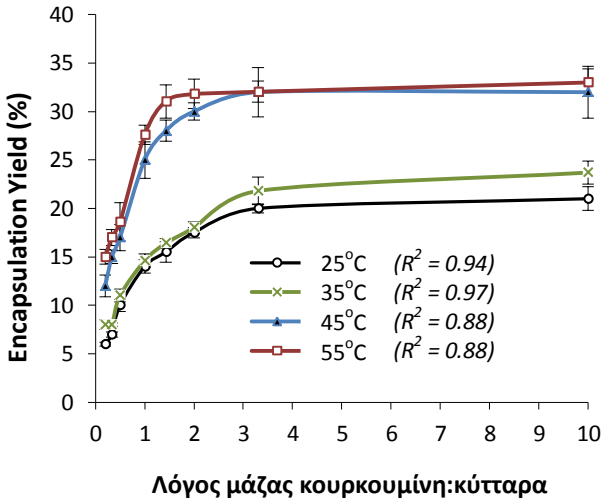
(i) κουρκουμίνη-νερό
(*πλασμολυμένα κύτταρα*)



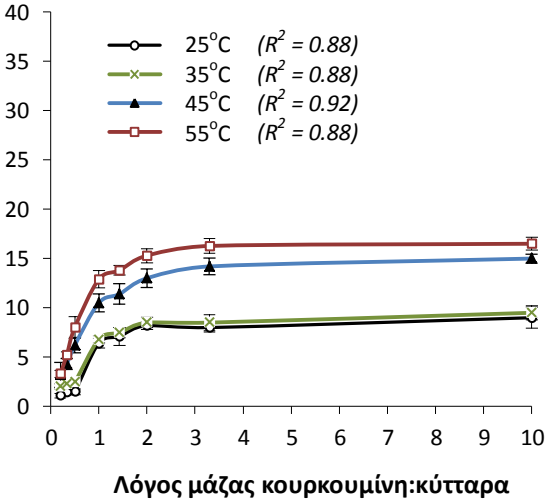
(ii) κουρκουμίνη-αιθανόλη
(*πλασμολυμένα κύτταρα*)



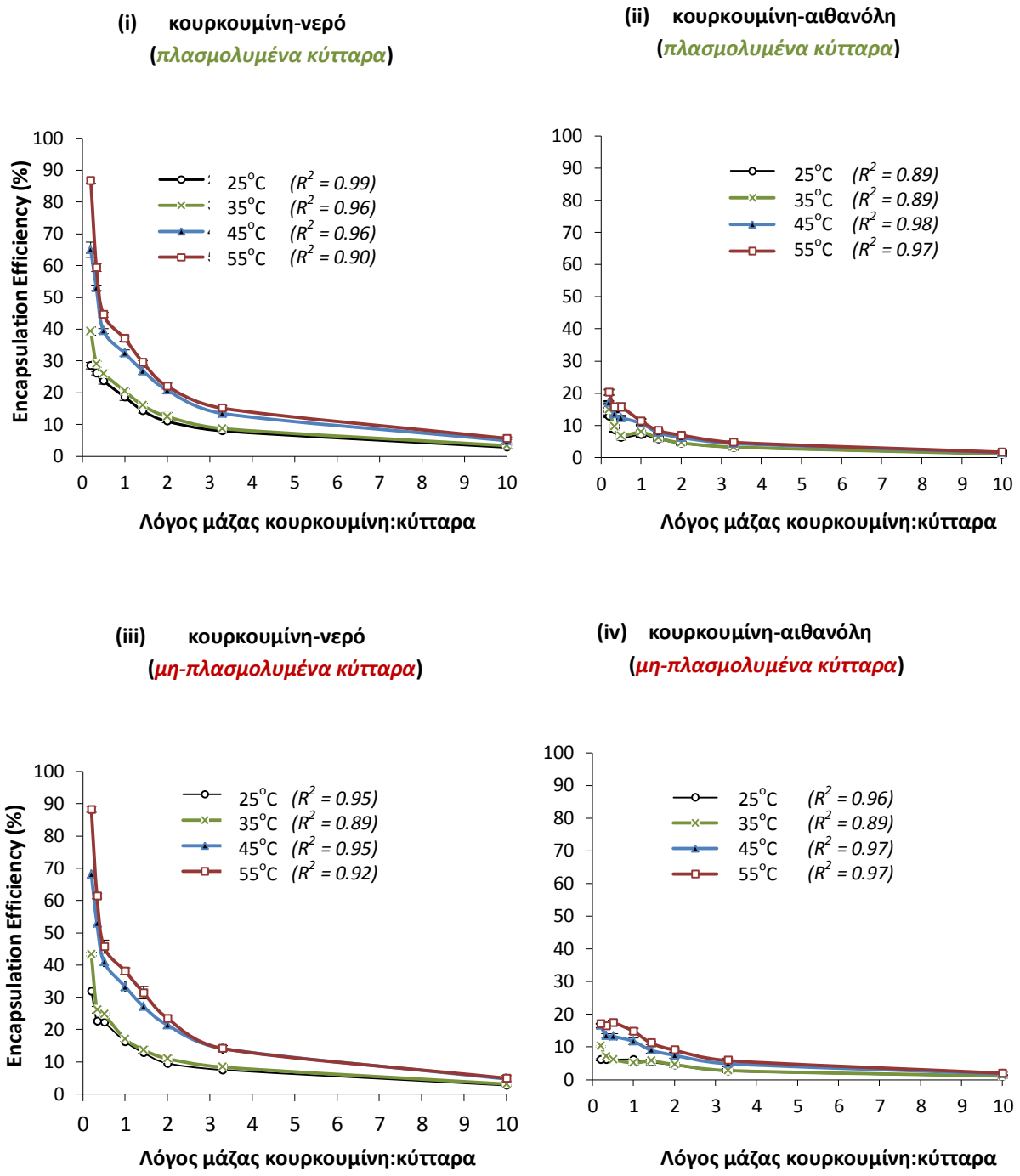
(iii) κουρκουμίνη-νερό
(*μη-πλασμολυμένα κύτταρα*)



(iv) κουρκουμίνη-αιθανόλη
(*μη-πλασμολυμένα κύτταρα*)



[β]



Σχήμα 7.4*. % ΕΥ (α) και % ΕΕ (β) των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν στους 25°C, 35°C, 45°C και 55°C με λόγο μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα από 0.2 έως 10.0 χρησιμοποιώντας λυοφιλιωμένα κύτταρα του S. cerevisiae πλασμολυμένα σε 10% κ.β. NaCl (i, ii) καθώς και μη πλασμολυμένα (iii, iv). Η ενθυλάκωση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα υδατικό (i, iii) είτε 50% v/v αιθανολικό (ii, iv).*

Σε όλες τις περιπτώσεις ο λόγος μάζας κουρκουμίνης: κύτταρα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των μικροκαψουλών έχει σημαντική επίδραση στις τιμές % ΕΥ όσο και % ΕΕ, δηλαδή στην ποσότητα της κουρκουμίνης που τελικά ενθυλακώνεται στα κύτταρα. Από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι υπάρχει λογαριθμική συσχέτιση μεταξύ των % ΕΥ τιμών και του λόγου μάζας κουρκουμίνης. Για λόγο μάζας από 0.2 έως 1.42 οι % ΕΥ τιμές αυξάνονται λογαριθμικά, ενώ μετά από αυτή την τιμή η περαιτέρω αύξηση είναι ήπια. Όταν κατά την ενθυλάκωση η κουρκουμίνη προστίθεται σε περίσσεια (λόγος μάζας >3.3) η τιμή του % ΕΥ φτάνει σε ένα πλατώ. Αυτή η τάση παρατηρείται σε όλα τα δείγματα και μπορεί να ερμηνευτεί από το ότι κάθε κύτταρο μπορεί να συγκρατήσει μέχρι έναν συγκεκριμένο αριθμό μορίων (έχει συγκεκριμένη '*loading capacity*', πάνω από την οποία δεν μπορεί να συγκρατήσει περισσότερα μόρια κουρκουμίνης). Αντίστροφη είναι η τάση που παρατηρείται για τις τιμές % ΕΕ των μικροκαψουλών, όπου η απόδοση της ενθυλάκωσης ευνοείται όταν ο λόγος μάζας κουρκουμίνης:κύτταρα είναι μικρός. Σε αυτή την περίπτωση, όπου υπάρχει περίσσεια κυττάρων, αυξάνεται και η ποσότητα της κουρκουμίνης που ενθυλακώνεται σε σχέση με την αρχικά προστιθέμενη ποσότητα. Όπως αναμένεται για δεδομένη ποσότητα κουρκουμίνης όσο αυξάνεται η ποσότητα των κυττάρων αυξάνεται και ο αριθμός των διαθέσιμων μέσων για ενθυλάκωση. Με βάση τα παραπάνω από πρακτική άποψη, όταν ο στόχος της ενθυλάκωσης είναι η παρασκευή μικροκαψουλών με υψηλό % κ.β. περιεχόμενο σε κουρκουμίνη, δηλαδή μικροκαψουλών με υψηλές τιμές % ΕΥ, τότε κατά την προετοιμασία τους πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίσσεια κουρκουμίνης και συγκεκριμένα ο λόγος μάζας κουρκουμίνης: κύτταρα που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 2.0. Αντιθέτως, όταν σκοπός είναι η αξιοποίηση του μεγαλύτερου μέρους της αρχικά διαθέσιμης ποσότητας κουρκουμίνης, δηλαδή η παρασκευή μικροκαψουλών με υψηλές % ΕΕ τιμές, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίσσεια κυττάρων και συγκεκριμένα ο λόγος μάζας κουρκουμίνη: κύτταρα πρέπει να είναι μικρότερος από 0.5,δηλασή να υπάρχει διπλάσια ποσότητα κυττάρων.

Καθοριστικό ρόλο στην ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα παίζει και η θερμοκρασία επώασης του διαλύματος της ενθυλάκωσης. Όπως φαίνεται στα σχήματα 7.4.α και 7.4.β, σε όλες τις περιπτώσεις, οι τιμές % ΕΥ και % ΕΕ των παρασκευασθέντων μικροκαψουλών είναι μεγαλύτερες ($p<0.05$) όταν η επώαση του διαλύματος πραγματοποιείται στις υψηλότερες θερμοκρασίες (45^{o}C, 55^{o}C) παρά στις χαμηλότερες (25^{o}C, 35^{o}C). Για παράδειγμα, η % ΕΥ τιμή των μικροκαψουλών που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα με λόγο μάζας κουρκουμίνη:μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1.0 (σχήμα 7.4.α, iii) είναι 14.0±0.78% και

14.6±0.70% στους 25°C και 35°C, αντίστοιχα, ενώ στους 45°C και στους 55°C οι αντίστοιχες τιμές αυξάνονται σε 25.0±0.86% και 27.6±0.98%, αντίστοιχα. Σε όλα τα διαγράμματα αξίζει να αναφερθεί το 'κενό' που παρατηρείται στις % ΕΕ και % ΕΥ τιμές μεταξύ των χαμηλότερων (25°C, 35°C) και των υψηλότερων θερμοκρασιών ενθυλάκωσης (45°C, 55°C). Από αυτό συμπεραίνεται ότι η θερμοκρασία μεταξύ 35°C και 45°C είναι κρίσιμη: σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τους 35°C τα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης βρίσκονται σε μια πιο ρευστή κατάσταση (υγροκρυσταλλική φάση) οπότε και η 'εισβολή' των μορίων της κουρκουμίνης εντός της μεμβράνης ενισχύεται. Αντιθέτως, σε θερμοκρασία μικρότερη από τους 35°C τα λιπίδια βρίσκονται πιθανότατα στην φάση πηκτής και έχουν περιορισμένη κινητικότητα, η οποία περιορίζει την είσοδο τους στο κύτταρο. Παρόμοια μελέτη που αφορά την συσχέτιση % ΕΥ-θερμοκρασία έχει πραγματοποιηθεί από την ομάδα του Bishop et al., (1998) όπου ενθυλακώθηκε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και βρέθηκε ότι ο ρυθμός ενθυλάκωσης αυξάνεται όταν η ενθυλάκωση πραγματοποιείται μεταξύ 40°C και 50°C. Ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται ο ρόλος της μεμβράνης στον έλεγχο της διαπερατότητας των μορίων εντός του κυττάρου.

Ανάλογα με την μορφή με την οποία η κουρκουμίνη προστέθηκε στο αιώρημα της κυττάρων (διεσπαρμένη σε νερό ή διαλυμένη σε αιθανόλη) το διάλυμα της ενθυλάκωσης είναι υδατικό ή 50% v/v αλκοολικό. Τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 7.4 δείχνουν ότι, ανεξαρτήτως εάν χρησιμοποιούνται κύτταρα πλασμολυμένα ή μη, σε όλες τις θερμοκρασίες και τους λόγους μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα που μελετήθηκαν οι τιμές % ΕΥ και % ΕΕ των παρασκευασθέντων μικροκαψουλών είναι σημαντικά μεγαλύτερες ($p<0.005$) όταν τα μόρια της κουρκουμίνης προστίθενται διεσπαρμένα σε νερό παρά διαλυμένα σε αιθανόλη. Έτσι, όταν το διάλυμα της ενθυλάκωσης είναι αποκλειστικά υδατικό (δηλαδή όταν η κουρκουμίνη προστίθεται σε νερό) η μέγιστη % ΕΥ τιμή είναι 33.85±0.86%, ενώ η αντίστοιχη τιμή όταν το διάλυμα της ενθυλάκωσης είναι 50% v/v αλκοολικό (όταν η κουρκουμίνη διαλύεται σε αλκοόλη) είναι 16.6±0.66%. Αντίστοιχα, όταν η ρεσβερατρόλη ενθυλακώθηκε σε πλασμολυμένα κύτταρα χρησιμοποιώντας διάλυμα σε 50% v/v αιθανόλης και λόγο μάζας ρεσβερατρόλη:κύτταρα 1:3 (0.33) (Shi et al., 2008) η % ΕΥ ήταν 4.52%. Στην παρούσα μελέτη, σε αντίστοιχες συνθήκες η τιμή της ΕΥ κυμαίνεται από 2.76±0.26% στους 25°C σε 5.06±0.73% στους 55°C, τονίζοντας τον σημαντικό ρόλο της θερμοκρασίας στην αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης. Αποτελέσματα αντίστοιχα της παρούσας μελέτης έχουν αναφερθεί κατά την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε φωσφολιπίδια (32.04% κ.β.) (Maiti et al., 2007).

Το βασικό εμπόδιο στην όλη διαδικασία της ενθυλάκωσης είναι η πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae* αφού το κυτταρικό τοίχωμα είναι διαπερατό σε μόρια με ΜΒ έως 760 (De Nobel et al., 1990). Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ΜΒ της κουρκουμίνης είναι 368 τα μόρια της κουρκουμίνης είναι πιθανό να εισέρχονται εντός του κυττάρου με παθητική διάχυση και να αλληλεπιδρούν με την πλασματική μεμβράνη. Όπως έχει αναφερθεί, η πλασματική μεμβράνη του κυττάρου είναι μια λιπιδική διπλοστοιβάδα και η δομή της εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις λιπιδίου-λιπιδίου (αλληλεπιδράσεις van der Waals). Επιπλέον ένα δίκτυο μορίων νερού, το οποίο αναφέρεται ως 'δίκτυο δεσμών υδρογόνου' (hydrogen-bonded-network) εκτείνεται μεταξύ των λιπιδίων και σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις λιπιδίου-λιπιδίου, συμβάλλοντας στην διατήρηση της δομής της μεμβράνης. Όταν η ρευστότητα της μεμβράνης αυξάνεται, τότε η μεμβράνη δυσλειτουργεί, διότι τα λιπίδια απομακρύνονται μεταξύ τους. Η παρουσία αιθανόλης επηρεάζει σημαντικά την δομή της πλασματικής μεμβράνης. Στην μελέτη των Slater et al., (1993) αναφέρεται ότι η αιθανόλη αλληλεπιδρά με το 'δίκτυο των δεσμών υδρογόνου' και/ή αντικαθιστά τα μόρια νερού σε αυτό το δίκτυο, παρεμβαίνοντας στις αλληλεπιδράσεις λιπιδίου-λιπιδίου. Ως αποτέλεσμα, η απόσταση μεταξύ των λιπιδίων της μεμβράνης αυξάνεται προκαλώντας επίσης αύξηση στην ρευστότητα της μεμβράνης και κάποιες φορές ακόμα και λύση του κυττάρου. Έχει αναφερθεί ότι η αιθανόλη μπορεί να προκαλέσει μέχρι και εκθετική αύξηση στη ρευστότητα της μεμβράνης (Jones et al., 1987).

Η απόσταση μεταξύ των λιπιδίων η οποία αυξάνεται από την παρουσία της αιθανόλης, σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση της αιθανόλης (κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου) με τις πρωτεΐνες και άλλα ενυδατωμένα συστατικά του κυττάρου, ελαττώνει τα διαθέσιμα μέρη του κυττάρου για την ενθυλάκωση των μορίων της κουρκουμίνης. Είναι πιθανό η αποδιοργάνωση της πλασματικής μεμβράνης λόγω της παρουσίας αιθανόλης σε συνδυασμό με την πλασμόλυση, η οποία επίσης αποδιοργάνωσε την μεμβράνη (§ 7.2), να περιορίζει τις αλληλεπιδράσεις της κουρκουμίνης με τα λιπίδια της μεμβράνης και συνεπώς να ελαττώνει τον αριθμό των μορίων της κουρκουμίνης τα οποία ενθυλακώνονται, οπότε προκύπτουν μικροκάψουλες με χαμηλές τιμές % ΕΥ και % ΕΕ. Επιπλέον η κουρκουμίνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την αιθανόλη παρά για το νερό. Έτσι στην περίπτωση όπου η ενθυλάκωση πραγματοποιείται υπό την παρουσία αιθανόλης, είναι πιθανό τα μόρια της κουρκουμίνης να αλληλεπιδρούν με τη αιθανόλη παρά με συστατικά του κυττάρου. Είναι επίσης πιθανό η

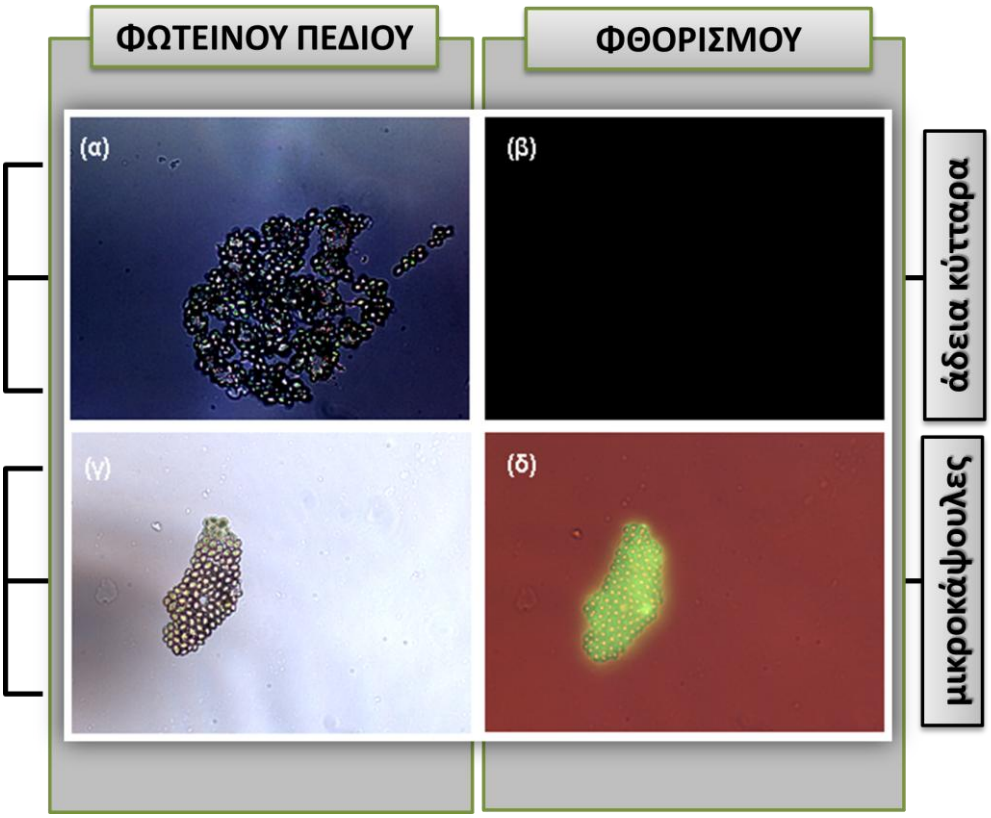
παρατεταμένη επώαση των κυττάρων στην αιθανόλη να προκαλεί την αποκατάσταση μιας ισορροπίας μεταξύ των μορίων της κουρκουμίνης που ενθυλακώνονται και κάποιων που οδηγούνται εκτός του κυττάρου: μια διαδικασία ταυτόχρονου 'εγκλωβισμού-απεγκλωβισμού'. Αντιθέτως, όταν η ενθυλάκωση πραγματοποιείται σε νερό αντί για αιθανόλη, οι τιμές % ΕΥ και % ΕΕ των παρασκευασθέντων μικροκαψουλών είναι σημαντικά μεγαλύτερες, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας της κουρκουμίνης για τα συστατικά του κυττάρου παρά για το νερό.

Σε σύγκριση με άλλα μέσα ενθυλάκωσης οι μικροκάψουλες κουρκουμίνης με τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτες τιμές % ΕΥ και % ΕΕ. Οι Adamiec et al., (2006) ενθυλάκωσαν έλαιο ελεμιού και μέντας σε μαλτοδεξτρίνη με ξήρανση με ψεκασμό με ποσοστό 2.9-9.6% κ.β και 7.06-18.17% κ.β., αντίστοιχα. Οι Vaidya et al., (2006) ενθυλάκωσαν ολεορητίνη κανέλλας σε μίγματα αραβικού κόμμεος, μαλτοδεξτρίνης και τροποποιημένου αμύλου ως μέσο ενθυλάκωσης σε ποσοστό 10% κ.β. Οι Baranauskiene et al., (2006) χρησιμοποίησαν πρωτεΐνες γάλακτος ως μέσο ενθυλάκωσης ρίγανης (ΕΕ 80%), κιτρονέλλας (ΕΕ 80.6%) και μαντζουράνας (ΕΕ 84.7%). Οι Shaikh et al., (2006) χρησιμοποίησαν αραβικό κόμμι και τροποποιημένο άμυλο για την ενθυλάκωση ολεορητίνης μαύρου πιπεριού και επιτεύχθηκε 39.1% ΕΥ. Όσον αφορά τα διάφορα μέσα ενθυλάκωσης τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για την κουρκουμίνη στην μελέτη των Wang et al., (2009), όπου χρησιμοποιείται πορώδες άμυλο και ζελατίνη ως μέσον ενθυλάκωσης αναφέρονται τιμές % ΕΕ έως και 98.4% ανάλογα με τον λόγο μάζας κουρκουμίνη: μέσο ενθυλάκωσης και τις συνθήκες της ξήρανσης με ψεκασμό (θερμοκρασία, πίεση αέρα κατά την είσοδο, ρυθμός ροής). Τιμή % ΕΥ 32.04 έχει βρεθεί κατά την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε φωσφατίδυλοχολίνη σόγιας σε μοριακή αναλογία 1:1 (Maiti et al., 2007). Υψηλές τιμές % ΕΥ και % ΕΕ (44.25 και 75.53, αντίστοιχα) έχουν επίσης, βρεθεί σε μικροκάψουλες κουρκουμίνης σε ζελατίνη (Aziz et al., 2007). Αντιθέτως, οι τιμές % ΕΕ των νανοσωματιδίων της κουρκουμίνης σε πολυμερές αλγινικού-χιτοζάνης ήταν περίπου 13 (Das et al., 2010), ενώ μικρά ποσοστά ενθυλάκωσης έχουν επίσης αναφερθεί στα σύμπλοκα εγκλεισμού της κουρκουμίνης με τις κυκλοδεξτρίνες με μοριακή αναλογία 1:1 ή 1:2 (θεωρητική μέγιστη % ΕΥ τιμή 24.5 ή 13.9, αντίστοιχα) (Tomren et al., 2002).

7.5. Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae*

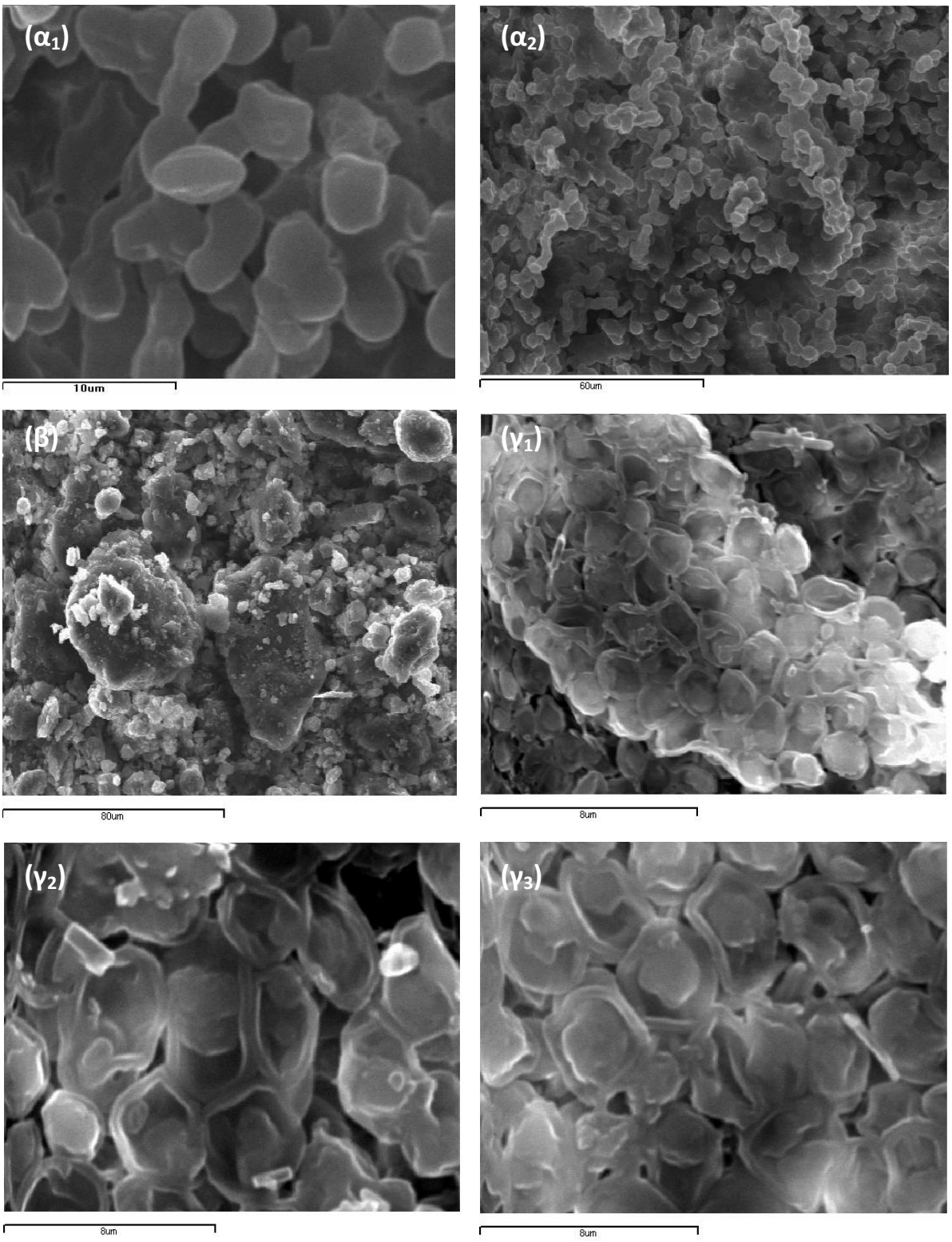
7.5.1. Μικροσκοπικές τεχνικές: Μικροσκόπιο φθορισμού και Μικροσκόπιο Ηλεκτρονικής Σάρωσης

Στο σχήμα 7.5 παρουσιάζονται τα μικρογραφήματα φωτεινού πεδίου και φθορισμού των άδειων κυττάρων του *S. cerevisiae* καθώς και των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης με τα κύτταρα. Μελετήθηκαν όλες οι μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην § 7.4 αλλά δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Στο μικρογράφημα φωτεινού πεδίου των άδειων κυττάρων (σχήμα 7.5 α) φαίνεται το κοκκώδες σχήμα τους, ενώ στο μικρογράφημα του φθορισμού (σχήμα 7.5 β) τα άδεια κύτταρα δεν φθορίζουν. Αντιθέτως, οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης φθορίζουν λόγω της παρουσίας κουρκουμίνης (σχήμα 7.5 δ) η οποία έχει ιδιότητες φθορισμού, δηλώνοντας ότι η κουρκουμίνη αλληλεπιδρά με συστατικά του κυττάρου. Το μικρογράφημα των κυττάρων που περιέχουν ενθυλακωμένη την κουρκουμίνη, φαίνεται στην εικόνα 7.5 γ. Όλες οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης, οι οποίες παρασκευάστηκαν όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην § 7.4, φθορίζουν δηλώνοντας ότι ανεξάρτητα από τις συνθήκες ενθυλάκωσης και την φύση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν (πλασμολυμένα ή μη) η κουρκουμίνη ενθυλακώνεται στα κύτταρα.



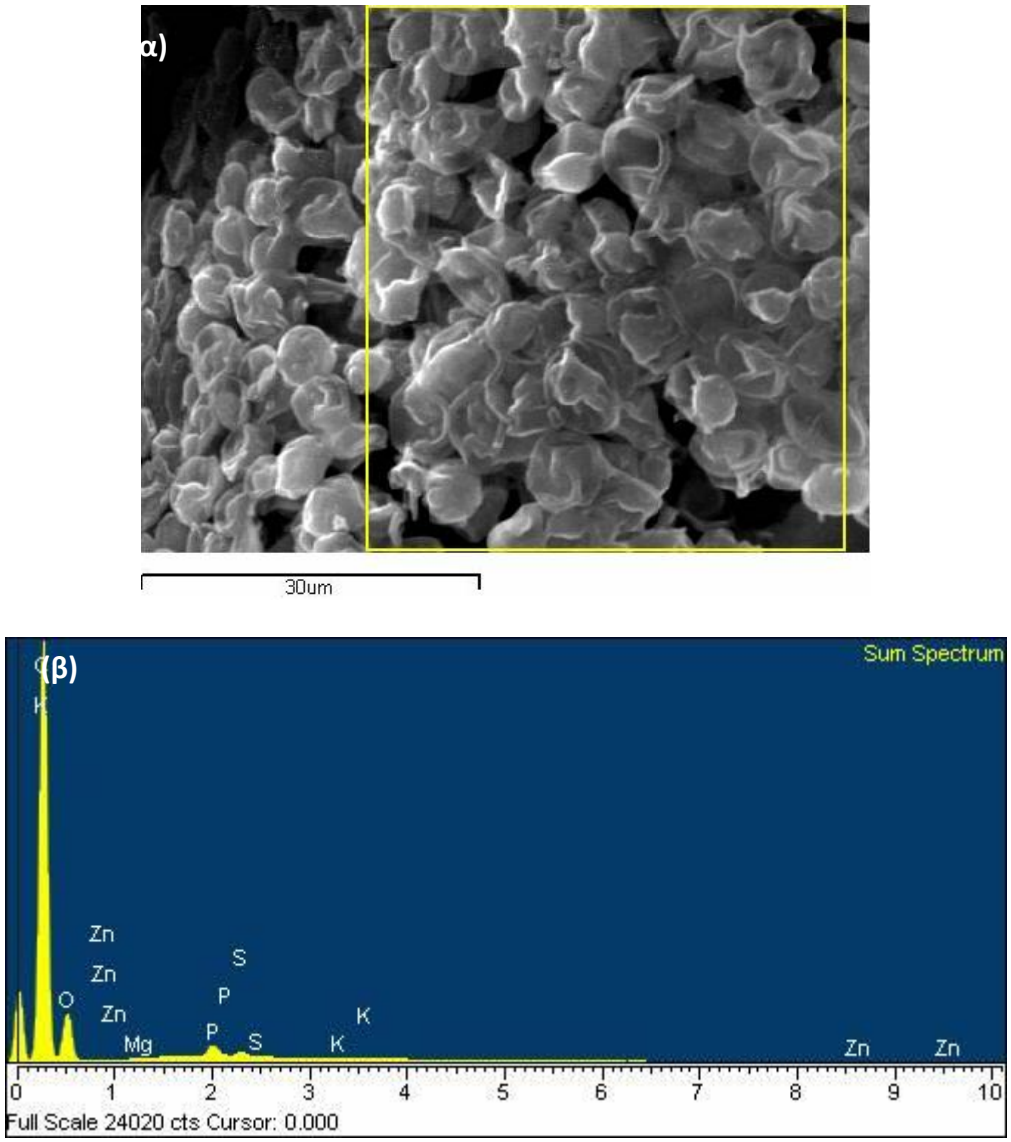
***Σχήμα 7.5**. Μικρογραφήματα φωτεινού πεδίου (Brightfield) και φθορισμού (Fluorescence) των άδειων κυττάρων (α, β) και των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν στους 55^{o}C με λόγο μάζας κουρκουμίνη: μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1.0 σε διάλυμα 50% v/v αιθανολικό (γ, δ).*

Οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης μελετήθηκαν επίσης και με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) (σχήμα 7.6). Οι εικόνες SEM των άδειων κυττάρων (σχήμα 7.6 α_1, α_2) δείχνουν ότι τα άδεια (λυοφιλιωμένα) κύτταρα έχουν ελλειψοειδές σχήμα (με εμφανές το μητρικό κύτταρο και το εκβλάστημα (bud)) με διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από 4 μm και ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα. Η μικροσκόπηση των μικροκαψουλών (σχήμα 7.6 γ_1, γ_2, γ_3) δείχνει ότι τα κύτταρα συρρικνωμένα, ενώ ο κυτταρικός τους φάκελος έχει διατηρήσει το δομή και το πάχος του. Στις εικόνες των μικροκαψουλών διακρίνονται επίσης τα ενθυλακωμένα μόρια της κουρκουμίνης: διακρίνονται μόρια ενσωματωμένα εντός των κυττάρων, αλλά και μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με την εξωτερική επιφάνεια τους.



Σχήμα 7.6*. Μικροσκόπηση Ηλεκτρονικής Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) των άδειων κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae (α1, α2), της κουρκουμίνης (β) και των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν στους 55°C με λόγο μάζας κουρκουμίνη: μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1.0 σε διάλυμα υδατικό (γ1, γ2, γ3).*

Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης είναι εφοδιασμένο με Φασματοφωτομετρικό Ανιχνευτή Διασποράς (EDS) οπότε πραγματοποιείται και στοιχειακή ανάλυση των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στο σχήμα 7.7 και στον πίνακα 7.2.



Σχήμα 7.7*. Εικόνα (α) και φάσμα στοιχειακής ανάλυσης (β) τα οποία ελήφθησαν με Μικροσκόπιο Ηλεκτρονικής Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) εφοδιασμένο με Φασματοφωτομετρικό Ανιχνευτή Διασποράς (EDS) από μικροκάψουλες κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα, στους 55°C, με λόγο μάζας κουρκουμίνη:μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1.0.*

Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.2 οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης με τα κύτταρα περιέχουν, όπως αναμένεται, σημαντική ποσότητα φωσφόρου και θείου, προερχόμενες από τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες του κυττάρου, αντίστοιχα, ενώ σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύονται ιόντα καλίου και μαγνησίου, προερχόμενες επίσης από τα κύτταρα.

Πίνακας 7.2*. Αποτελέσματα από την στοιχειακή ανάλυση των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης που πραγματοποιήθηκε με Μικροσκόπιο Ηλεκτρονικής Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) εφοδιασμένο με Φασματοφωτομετρικό Ανιχνευτή Διασποράς (EDS).*

Στοιχείο	**Ένταση**	**% Μάζα**	**Τύπος**	**Αριθμός ιόντων**
Mg	0.7190	2.94	MgO	0.28
P	1.3393	25.94	P_2O_5	1.97
S	0.7499	12.14	SO_3	0.89
K	0.9250	4.46	K_2O	0.27
Zn	0.7958	1.50	ZnO	0.33
O		53.02		8.00
Σύνολο		100.00		
			Σύνολο κατιόντων	**3.74**

Συνοπτικά, η Μικροσκόπηση Φθορισμού και η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης με τα κύτταρα του *S. cerevisiae* αλλά δεν μπορούν να δώσουν επιπλέον πληροφορίες για τον τρόπο κατανομής και αλληλεπίδρασης των μορίων της κουρκουμίνης στα κύτταρα (και ειδικότερα στο κυτταρικό τοίχωμα και την μεμβράνη). Γι’ αυτό είναι απαραίτητη περαιτέρω μελέτη των μικροκαψουλών με DSC και FT-IR.

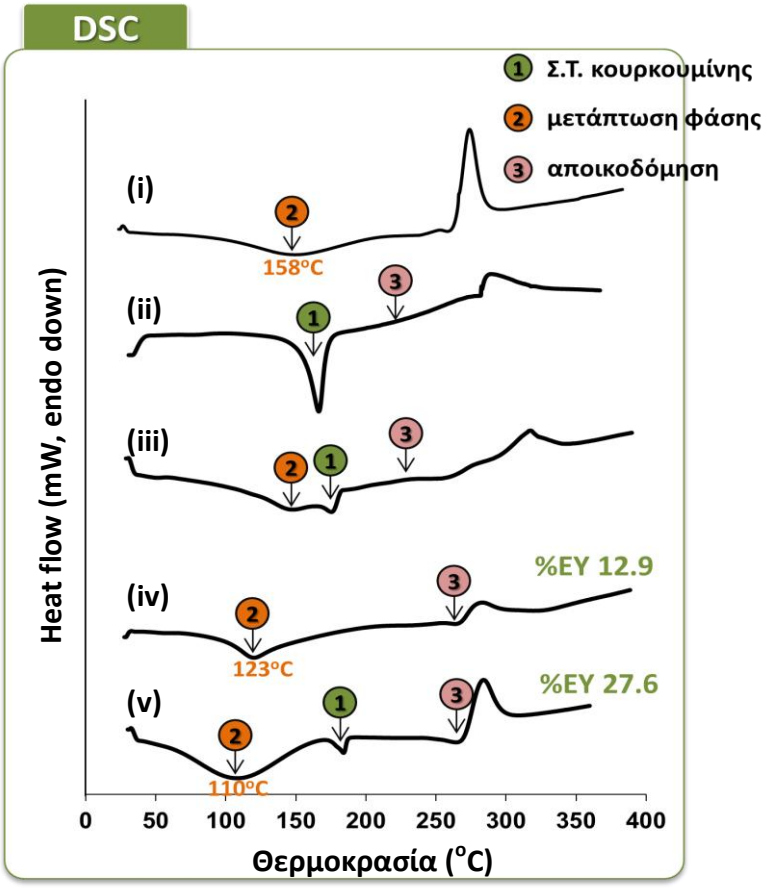
7.5.2. Μελέτη των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης στα κύτταρα με DSC και FT-IR

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) χρησιμοποιείται ευρέως για την επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης δραστικών συστατικών σε μέσα όπως οι κυκλοδεξτρίνες ή τα λιποσώματα. Στο σχήμα 7.8 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των i) μη-πλασμολυμένων κυττάρων, ii) της κουρκουμίνης, iii) του φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων καθώς και των μικροκαψουλών κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν στους 55^{o}C με λόγο μάζας κουρκουμίνη:μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1:1 σε: iv) 50% v/v αιθανόλη (ΕΥ 12.90±0.89%) και v) υδατικό διάλυμα (ΕΥ 27.60±1.98%).

Το θερμογράφημα των μη-πλασμολυμένων κυττάρων (σχήμα 7.8 i) περιγράφηκε αναλυτικά στην § 7.3. Στο θερμογράφημα της κουρκουμίνης (σχήμα 7.8 ii) διακρίνονται δυο κορυφές: η πρώτη με μέγιστο στους 183.0^{o}C αντιστοιχεί στο σημείο τήξης της, ενώ η δεύτερη που ξεκινά στους 204.0^{o}C με μέγιστο στους 296.0^{o}C, αποδίδεται στην σταδιακή αποικοδόμηση της. Το θερμογράφημα του φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων (σχήμα 7.8 iii) παρουσιάζει και τις δυο χαρακτηριστικές κορυφές των συστατικών του: το σημείο τήξης της κουρκουμίνης στους 183.0^{o}C και τη θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης (Tm) στους 152.0^{o}C. Η μικρή διαφορά στην Tm μεταξύ των άδειων κυττάρων (158.0^{o}C, σχήμα 7.8 i) και των κυττάρων στο φυσικό μίγμα (152.0^{o}C, σχήμα 7.8 iii) πιθανότατα οφείλεται στην ανάλυση του DSC, κατά την διάρκεια της οποίας, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, μια μικρή ποσότητα μορίων κουρκουμίνης του φυσικού μίγματος είναι πιθανό να εισέρχονται εντός της πλασματικής μεμβράνης, επηρεάζοντας την μετάπτωση φάσης της. Ωστόσο, η αυτούσια παρουσία των δυο ενδόθερμων κορυφών στο φυσικό μίγμα δείχνει ότι δεν υπάρχει καμία σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της κουρκουμίνης και των κυττάρων του ζυμομύκητα. Αντιθέτως στα θερμογραφήματα των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν σε 50% v/v αιθανόλη (σχήμα 7.8 iv) το σημείο τήξης της κουρκουμίνης (183^{o}C) δεν υπάρχει, ενώ μια νέα κορυφή εμφανίζεται με μέγιστο στους 123.0^{o}C, λόγω της μετάπτωσης φάσης (Tm) των λιπιδίων της μεμβράνης. Η εξαφάνιση του σημείου τήξης της κουρκουμίνης στο θερμογράφημα των μικροκαψουλών σε συνδυασμό με ικανότητα τους να φθορίζουν (σχήμα 7.8 δ) δείχνουν ότι η κουρκουμίνη έχει ενσωματωθεί εντός του κυττάρου. Αυτό επιβεβαιώνεται από την νέα κορυφή που εμφανίζεται στους 123.0^{o}C (σχήμα 7.8 iv), η οποία είναι σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη των άδειων κυττάρων (158.0^{o}C) (σχήμα

7.8 i). Η μετατόπιση της Tm από τους 158.0^{o}C (στα άδεια κύτταρα) στους 123.0^{o}C (στα κύτταρα που περιέχουν κουρκουμίνη) δείχνει ότι η ρευστότητα της μεμβράνης των κυττάρων αυξάνεται λόγω της ενσωμάτωσης σε αυτή μορίων κουρκουμίνης. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι αρωματικοί δακτύλιοι της κουρκουμίνης συμμετέχουν σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις άκυλο-αλυσίδες των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, ελαττώνοντας τις δυνάμεις van der Waals μεταξύ των λιπιδικών άκυλο-αλυσίδων. Επιπλέον τα φαινολικά –OH της κουρκουμίνης συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων, επηρεάζοντας την οργάνωση της διπλοστοιβάδας και συνεπώς τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων. Ως αποτέλεσμα, η μεμβράνη μεταβαίνει πιο εύκολα στην υγροκρυσταλλική φάση και αυξάνεται η ρευστότητα της, ερμηνεύοντας την χαμηλότερη Tm που παρατηρείται στα κύτταρα που έχουν ενθυλακώσει την κουρκουμίνη, σε σύγκριση με τα άδεια κύτταρα. Τα αποτελέσματα μας έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Normand et al., (2005), στην οποία αναφέρεται ότι η θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης των άδειων κυττάρων του *S. cerevisiae* (173^{o}C) μεταβαίνει σε χαμηλότερη θερμοκρασία (131^{o}C) όταν στα κύτταρα ενθυλακώνεται το λεμονένιο. Η διαφορά αυτή στην Tm ερμηνεύεται με την ενσωμάτωση του λεμονενίου εντός της φωσφολιπιδικής μεμβράνης των κυττάρων, από την οποία ελαττώθηκε η συνεκτικότητα της διπλοστοιβάδας.

Η ανάλυση του DSC δείχνει επίσης ότι οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης είναι σταθερές έως τους 262.0^{o}C, όπου εμφανίζεται μια εξώθερμη κορυφή λόγω της αποικοδόμησης τους. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη αρχίζει να αποικοδομείται στους 204.0^{o}C, η ενθυλάκωση της στα κύτταρα φαίνεται να αυξάνει τη σταθερότητά της στη θέρμανση. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα από την ανάλυση όλων των μικροκαψουλών κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν σε 50% v/v αιθανόλη, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία ή το λόγο μάζας κουρκουμίνης:κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τους.



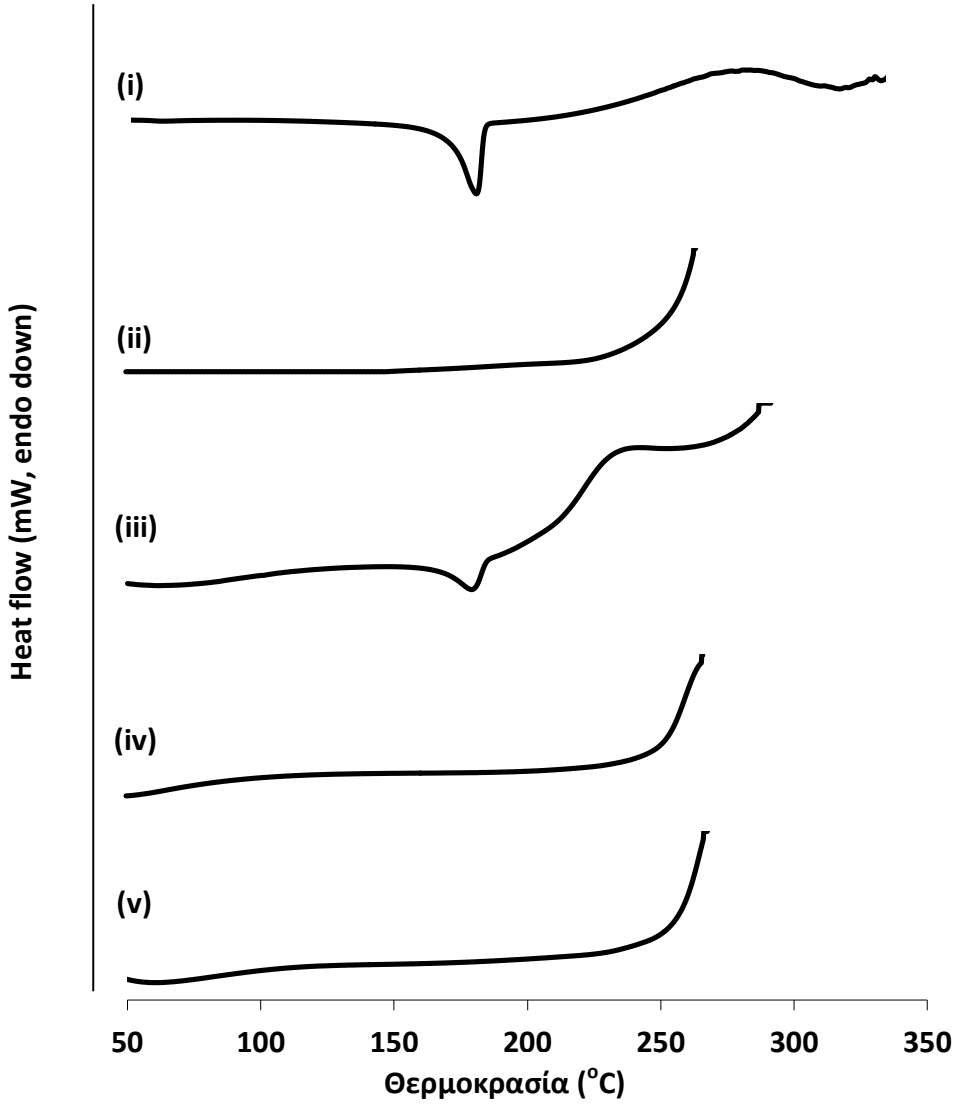
Σχήμα 7.8. *Θερμογραφήματα DSC (i) μη-πλασμολυμένων λυοφιλιωμένων κυττάρων του S. cerevisiae, (ii) κουρκουμίνης, (iii) φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων και των μικροκαψουλών κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν στους 55°C με λόγο μάζας κουρκουμίνη: μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1.0 σε διάλυμα (iv) 50% v/v αιθανολικό, είτε (v) υδατικό.*

Στο σχήμα 7.8 v παρουσιάζεται το θερμογράφημα των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης οι οποίες παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα, αντί για 50% v/v αιθανολικό και οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό ενθυλάκωσης (%ΕΥ 27.60±1.98). Σε αυτή την περίπτωση η ενδόθερμη κορυφή του σημείου τήξης της κουρκουμίνης στους 183.0°C δεν εξαφανίζεται, ενώ η Tm της μεμβράνης εμφανίζεται στους 110.0°C, δηλαδή σε σημαντικά χαμηλότερη θερμοκρασία από την αντίστοιχη των άδειων κυττάρων (158.0°C). Η εμφάνιση-μετατόπιση της κορυφής στους 110.0°C δείχνει ότι ένα μέρος των μορίων της κουρκουμίνης που προστίθενται αρχικά, ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη. Η 'παρουσία' του σημείου τήξης της κουρκουμίνης στους 183.0°C δεν μπορεί να οφείλεται σε μη-ενθυλακωμένα ('ελεύθερα') μόρια κουρκουμίνης, αφού κατά την προετοιμασία των μικροκαψουλών σε υδατικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν εκτεταμένες εκπλύσεις με αιθανόλη, συνεπώς η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη έχει απομακρυνθεί τελείως. Επομένως, η εμφάνιση του σημείου τήξης της

κουρκουμίνης σε αυτές τις μικροκάψουλες πιθανότατα να οφείλεται σε μόρια κουρκουμίνης τα οποία αλληλεπιδρούν ισχυρά με συστατικά της επιφάνειας των κυττάρων (π.χ. με τις μαννοπρωτεΐνες ή τις γλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος) κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου και/ή σε μόρια κουρκουμίνης τα οποία έχουν μερικώς ενσωματωθεί και σχηματίσει δεσμούς με το δίκτυο του κυτταρικού τοιχώματος ή τον περιπλασματικό χώρο. Εξάλλου, έχει αναφερθεί (Spencer et al., 1988) ότι οι πολυφαινόλες, όπως η κουρκουμίνη, μπορούν να δράσουν ως πολυσχιδείς υποκαταστάτες (*polydentate ligants*) ικανές να σχηματίσουν σταθερούς σταυροδεσμούς (*cross-linking*) με διαφορετικά (περισσότερα από ένα) μόρια πρωτεϊνών. Τα πολλά πιθανά σημεία δέσμευσης (*binding sites*) προέρχονται από τις φαινολικές και τις άρυλο-ομάδες τους. Επομένως, είναι πιθανόν η κουρκουμίνη να αλληλεπιδρά με σταυροειδείς δεσμούς (*cross-linking*) με την εξωτερική δομή του κυττάρου (πρωτεΐνες). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα από την ανάλυση όλων των μικροκαψουλών που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα, όπου και οι τιμές % ΕΥ ήταν υψηλές.

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης μπορεί να παρέχει επιπλέον πληροφορίες για τη σταθερότητα μιας ουσίας σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης, όταν η θέρμανση των δειγμάτων γίνεται με ταυτόχρονη παροχή οξυγόνου. Στο σχήμα 7.9 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα, σε συνθήκες οξείδωσης, της κουρκουμίνης (σχήμα 7.9 i), των άδειων κυττάρων (σχήμα 7.9 ii), του φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων (σχήμα 7.9 iii) και των μικροκαψουλών κουρκουμίνης οι οποίες παρασκευάστηκαν με λόγο μάζας κουρκουμίνη:μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1:1 σε διάλυμα 50% v/v αιθανολικό (σχήμα 7.9 iv) και υδατικό (σχήμα 7.9 v). Η κουρκουμίνη (σχήμα 7.9 i) αρχίζει να αποικοδομείται στους 204.0^{o}C, με μέγιστο στους 278^{o}C ενώ η πλήρης οξείδωσή της ολοκληρώνεται στους 316.0^{o}C. Αντίθετα, τα άδεια κύτταρα του ζυμομύκητα (σχήμα 7.9 ii) είναι σταθερά μέχρι τους 230^{o}C. Η εξώθερμη κορυφή της αποικοδόμησης της κουρκουμίνης απουσιάζει από το θερμογράφημα των μικροκαψουλών (σχήμα 7.9 iv), οπότε η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη προστατεύεται αποτελεσματικά από την οξείδωση όταν εκτίθεται σε θερμοκρασίες έως 230^{o}C, οπότε και αρχίζει η αποικοδόμηση των κυττάρων. Όλες οι μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε στην § 7.4 παρουσιάζουν πανομοιότυπα θερμογραφήματα. Σε αντίθεση με τις μικροκάψουλες, στο θερμογράφημα του φυσικού μίγματος κουρκουμίνης:κυττάρων (σχήμα 7.9 iii) φαίνεται να εμφανίζεται μια διπλή εξώθερμη κορυφή: μια στους 200.0^{o}C λόγω οξείδωσης της κουρκουμίνης και μια στους 230.0^{o}C λόγω οξείδωσης

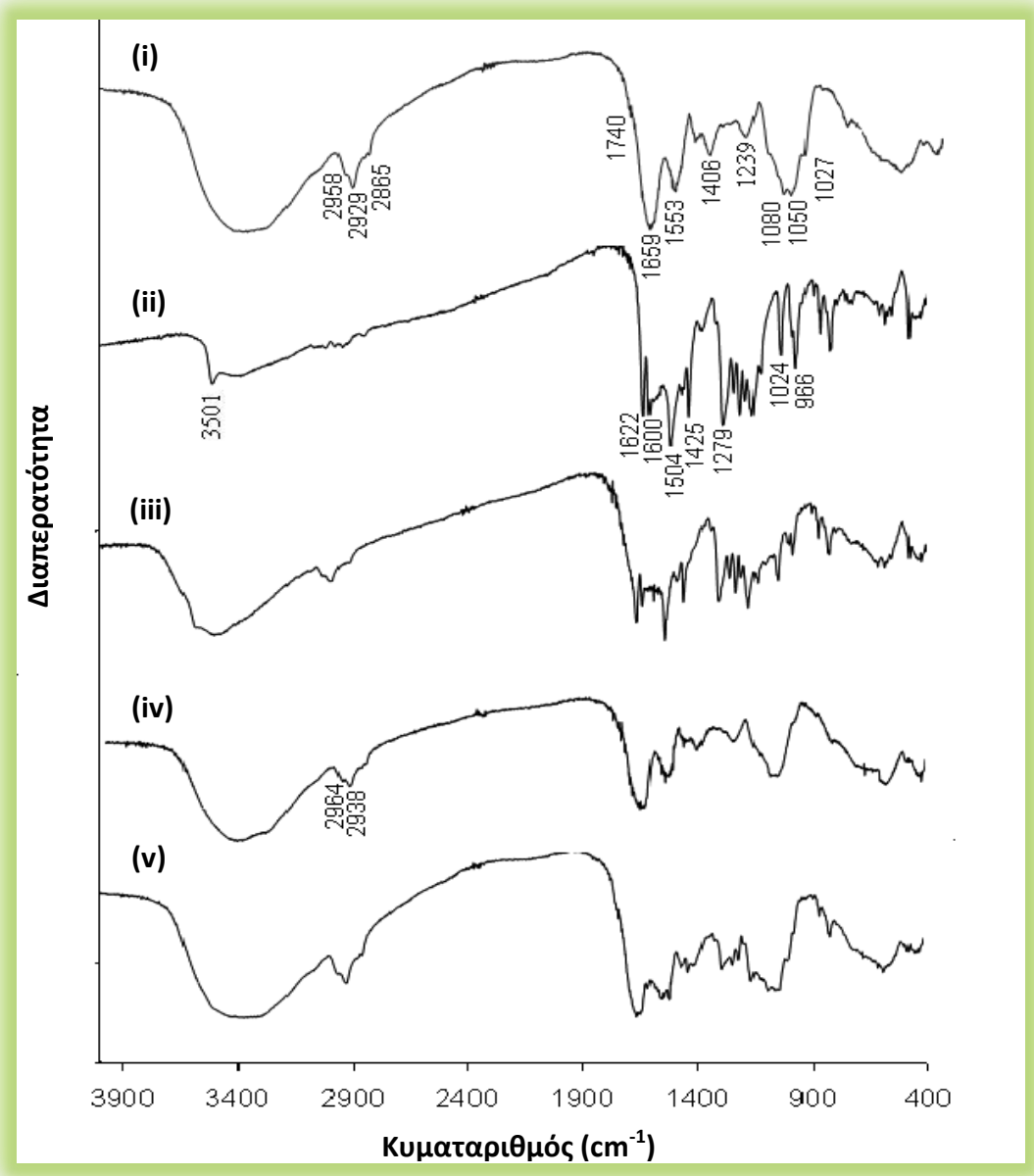
των κυττάρων, από το οποίο προκύπτει ότι το φυσικό μίγμα δεν μπορεί να προστατεύσει την κουρκουμίνη σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης.



Σχήμα 7.9*. Θερμογραφήματα DSC σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης (ροή οξυγόνου 20 ml/min) (i) κουρκουμίνης, (ii) μη-πλασμολυμένων λυοφιλιωμένων κυττάρων του S. cerevisiae, (iii) φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων και των μικροκαψουλών κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν στους 55°C με λόγο μάζας κουρκουμίνη: μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1.0 σε διάλυμα (iv) 50% v/v αιθανολικό και (v) υδατικό.*

Όλες οι μικροκάψουλες μελετούνται επιπλέον και με φασματοσκοπία FT-IR (σχήμα 7.10) για την περαιτέρω διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων κουρκουμίνης-κυττάρων.

FT-IR



Σχήμα 7.10*. Φάσματα FT-IR (i) μη-πλασμολυμένων λυοφιλιωμένων κυττάρων του S. cerevisiae, (ii) κουρκουμίνης, (iii) φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων και των μικροκαψουλών κουρκουμίνης που παρασκευάστηκαν στους 55°C με λόγο μάζας κουρκουμίνη: μη-πλασμολυμένα κύτταρα 1.0 σε διάλυμα (iv) 50% v/v αιθανολικό, είτε (v) υδατικό.*

Αν υπάρχει αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης με συστατικά του κυττάρου, οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (αλληλεπιδράσεις van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου) θα ελαττώσουν την ενέργεια των τμημάτων της κουρκουμίνης που θα συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις αυτές και συνεπώς θα ελαττώσουν την συχνότητα της απορρόφησης τους ή θα τροποποιήσουν την ένταση τους. Επίσης, πιθανές μετατοπίσεις των

χαρακτηριστικών κορυφών των κυττάρων μπορεί να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις κουρκουμίνης-κυττάρων.

Το φάσμα IR των μη-πλασμολυμένων κυττάρων (σχήμα 7.10 i) έχει περιγραφεί με λεπτομέρεια στην § 7.3. Στο σχήμα 7.10 ii φαίνεται το φάσμα της κουρκουμίνης. Οι κορυφές στα 3501 cm^{-1} και στα 1622 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσεως των φαινολικών O-H και των κετονικών C=O, αντίστοιχα. Η απορρόφηση στα 1600 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης του σκελετού του βενζολικού δακτυλίου, στα 1504 cm^{-1} στην μικτή C=O και C=C δόνηση και στα 1425 cm^{-1} στην δόνηση κάμψης των ολεφινικών C-H. Η φαινολική C-O δόνηση τάσης είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση στα 1279 cm^{-1}, οι μεθόξυ C-O ομάδες για την 1024 cm^{-1} κορυφή, ενώ η κορυφή στα 966 cm^{-1} οφείλεται στις αρωματικές C-H δονήσεις της κουρκουμίνης (Barik et al., 2005; Ni et al., 2008).

Το φάσμα του φυσικού μίγματος κουρκουμίνης-κυττάρων (σχήμα 7.10 iii) είναι σαφώς ένας συνδυασμός του φάσματος των κυττάρων (σχήμα 7.10 i) και της κουρκουμίνης (σχήμα 7.10 ii) και οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις της κουρκουμίνης εμφανίζονται σχεδόν πανομοιότυπες με της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης. Αντιθέτως, υπάρχουν σαφείς διαφορές ανάμεσα στο φάσμα IR των μικροκαψουλών που παρασκευάστηκαν σε 50% v/v αιθανόλη (σχήμα 7.10 iv) και στο φάσμα του φυσικού μίγματος (σχήμα 7.10 iii). Συγκεκριμένα το φάσμα των συγκεκριμένων μικροκαψουλών είναι σχεδόν πανομοιότυπο με το φάσμα των άδειων κυττάρων (σχήμα 7.10 i), ενώ οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις της κουρκουμίνης ελαττώνονται σημαντικά, σχεδόν εξαφανίζονται. Αυτό σημαίνει ότι οι βασικές ομάδες της κουρκουμίνης εξασθενούν όταν τα μόρια της αλληλεπιδρούν με συστατικά του κυττάρου και ότι τα μόρια της κουρκουμίνης βρίσκονται εντός του κυττάρου, γι' αυτό και η 'ταυτότητα' τους στο φάσμα 'κρύβεται'. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Shi et al., (2008) και Shi et al (2007), όπου μελέτησαν την ενθυλάκωση της ρεσβερατρόλης και του χλωρογενικού οξέος, αντίστοιχα, στα κύτταρα και την απέδειξαν με την εξαφάνιση των χαρακτηριστικών IR απορροφήσεων των ουσιών στα φάσματα των μικροκαψουλών. Στο φάσμα των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης η εξαφάνιση της 3501 cm^{-1} κορυφής της κουρκουμίνης ερμηνεύεται από την αλληλεπίδραση των φαινολικών –OH της με συστατικά του κυττάρου, πιθανότατα μέσω δεσμών υδρογόνου ενώ η εξαφάνιση των 1600 cm^{-1} και 966 cm^{-1} κορυφών της κουρκουμίνης υποδηλώνουν την αλληλεπίδραση των αρωματικών δακτυλίων της με κυτταρικά συστατικά. Επιπλέον οι απορροφήσεις στα 2958 cm^{-1} και στα

2929 cm^{-1} που εμφανίζουν τα άδεια κύτταρα (σχήμα 7.10 i) μετατοπίζονται στα 2964 cm^{-1} και 2938 cm^{-1}, αντίστοιχα, στις μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν σε 50% v/v αιθανόλη (σχήμα 7.10 iv) και η ένταση τους μειώνεται ελαφρώς, δηλώνοντας αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης με τις υδρογονανθρακικές ουρές των φωσφολιπιδίων των κυττάρων. Διαφορές στις απορροφήσεις στα 1659 cm^{-1} και στα 1553 cm^{-1} μεταξύ των άδειων κυττάρων και των μικροκαψουλών δείχνουν αλληλεπιδράσεις κουρκουμίνης-πρωτεϊνών, ενώ διαφορές στην περιοχή 1108-1000 $cm^{-1,}$ όπως η εξαφάνιση της 1027 cm^{-1} κορυφής των β-1,4 γλυκανών των κυττάρων, δείχνουν αλληλεπιδράσεις κουρκουμίνης-γλυκανών. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα του FT-IR για όλες τις μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν με πλασμολυμένα κύτταρα σε 50% v/v αιθανόλη όταν συγκρίνονται με άδεια πλασμολυμένα κύτταρα.

Το φάσμα IR των μικροκαψουλών που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα φαίνεται στο σχήμα 7.10 v. Σε αντίθεση με το φάσμα των μικροκαψουλών οι οποίες παρασκευάστηκαν σε αιθανόλη, εδώ εμφανίζονται πολλές χαρακτηριστικές κορυφές της κουρκουμίνης, αλλά η ένταση και η συχνότητα της απορρόφησης τους είναι διαφορετική σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη (σχήμα 7.10 ii). Επιπλέον τα φάσμα των συγκεκριμένων μικροκαψουλών διαφέρει σημαντικά από το φάσμα του φυσικού μίγματος (σχήμα 7.10 iii). Για παράδειγμα οι 3501 cm^{-1} και 1600 cm^{-1} απορροφήσεις της κουρκουμίνης εξαφανίζονται λόγω των αλληλεπιδράσεων της κουρκουμίνης με τα κύτταρα με δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, αντίστοιχα. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα για όλες τις μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα, συμπεριλαμβανομένων και των παρασκευασθέντων με πλασμολυμένα κύτταρα, όταν συγκρίνονται με άδεια πλασμολυμένα κύτταρα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του DSC και του FT-IR, συμπεραίνουμε ότι σε όλες τις μικροκάψουλες των κυττάρων, η κουρκουμίνη εισχωρεί εντός του κυττάρου και συμμετέχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις πακεταρισμένες υδρογονανθρακικές αλυσίδες των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Σύμφωνα με τον Bishop et al (1998) η παρουσία υδροξυλομάδας σε ένα μόριο, όπως η κουρκουμίνη, ενισχύει την διάχυση της κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης. Η υδροξυλική ή οποιαδήποτε αμφιφιλική ομάδα έλκεται και σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου με τις πολικές κεφαλές των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων με αποτέλεσμα να ενισχύεται η επαφή μεταξύ του υδρόφοβου τμήματος του μορίου και των άκυλο-αλυσίδων. Αρχικά η διαδικασία εισχώρησης της κουρκουμίνης στο

κύτταρο βοηθείται από την διαφορά στην συγκέντρωσης της μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του κυττάρου. Επιπλέον όταν η ενθυλάκωση λαμβάνει χώρα σε νερό αντί για 50% v/v αιθανόλη οι μικροκάψουλες χαρακτηρίζονται από υψηλότερες τιμές % ΕΥ και επομένως, περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό μορίων κουρκουμίνης τα οποία έχουν μερικώς εισχωρήσει και σχηματίσει δεσμούς με το δίκτυο του κυτταρικού τοιχώματος ή που έχουν αλληλεπιδράσει με την εξωτερική δομή του κυττάρου, σχηματίζοντας σταυροειδείς δεσμούς με την πρωτεϊνική επιφάνεια. Αντίθετα, όταν η ενθυλάκωση πραγματοποιείται σε διάλυμα 50% v/v αιθανολικό οι μικροκάψουλες που παρασκευάζονται περιέχουν λιγότερη % κ.β. κουρκουμίνη, και η πλειοψηφία των μορίων της κουρκουμίνης βρίσκεται εντός του κυττάρου (συγκεκριμένα στην πλασματική μεμβράνη) επιτρέποντας σε ένα μικρότερο αριθμό μορίων να συνδέονται στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων.

7.6. Συμπεράσματα

Στην χρησιμοποίηση των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσο ενθυλάκωσης καθοριστικό ρόλο παίζει αφενός το ίδιο το κύτταρο και αφετέρου οι συνθήκες κάτω από τις οποίες τα κύτταρα και η προς ενθυλάκωση ουσία αλληλεπιδρούν. Γι' αυτό η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* μελετήθηκε σε σχέση με τις εξής παραμέτρους: (α) την χρησιμοποίηση πλασμολυμένων ή μη κυττάρων, (β) το διάλυμα ενθυλάκωσης: υδατικό ή 50% v/v αλκοολικό, (γ) θερμοκρασία ενθυλάκωσης χαμηλότερη ή υψηλότερη από τους 35^{o}C και (δ) λόγος μάζας κουρκουμίνης:κυττάρων. Με μια απλή ανάμιξη των κυττάρων με την κουρκουμίνη σε υδατικό διάλυμα είναι εφικτή η παρασκευή μικροκαψουλών με % περιεχόμενο σε κουρκουμίνη που μπορεί να φτάσει έως 35% κ.β. Ζωντανά, μη–λυοφιλιωμένα κύτταρα του ζυμομύκητα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, ενώ η πλασμόλυση των κυττάρων δεν ενισχύει επιπλέον το ποσοστό ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης. Οι μικροκάψουλες που παρασκευάζονται σε υδατικό διάλυμα αντί για 50% v/v αλκοολικό χαρακτηρίζονται από υψηλότερες % ΕΕ και % ΕΥ τιμές, κατά τουλάχιστον 2 φορές. Θερμοκρασίες πάνω από 35^{o}C ενισχύουν επίσης την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης, ενώ ο λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για τις τιμές % ΕΥ και % ΕΕ. Συγκεκριμένα, όταν η ενθυλάκωση αποσκοπεί στην παρασκευή μικροκαψουλών με όσο τον δυνατόν περισσότερη κουρκουμίνη (δηλαδή υψηλές % ΕΥ τιμές) πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίσσεια κουρκουμίνης. Αντιθέτως, όταν σκοπός είναι η μέγιστη αξιοποίηση των διαθέσιμων

μορίων της κουρκουμίνης (υψηλές τιμές % ΕΕ) θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίσσεια κυττάρων και συνεπώς διαθέσιμων μέσων ενθυλάκωσης.

Στη διαδικασία της ενθυλάκωσης, η οποία περιλαμβάνει παθητική διάχυση της κουρκουμίνης κατά μήκος του κυτταρικού φακέλου, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν οι υδρόξυλομάδες της κουρκουμίνης, οι οποίες προσελκύονται από τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Έτσι, το μεγαλύτερο μέρος της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης, βρίσκεται ενσωματωμένο στην πλασματική μεμβράνη συμμετέχοντας σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ωστόσο υπάρχουν και μόρια κουρκουμίνης συνδεδεμένα μέσω δεσμών υδρογόνου με συστατικά του δικτύου του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες, γλυκάνες). Ειδικότερα, οι μικροκάψουλες που χαρακτηρίζονται από υψηλές % ΕΥ τιμές (π.χ. αυτές που παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα αντί για αιθανολικό) φαίνεται να περιέχουν και μεγαλύτερο ποσοστό από την ‘εξωτερικά συνδεδεμένη’ κουρκουμίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο

Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο

8.1. Εισαγωγή

Οι υδατάνθρακες και ειδικότερα οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) και το τροποποιημένο άμυλο (MS) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη τεχνολογία της ενθυλάκωσης, λόγω της ποικιλίας και του χαμηλού κόστους τους (Goubet et al., 1998). Οι β-κυκλοδεξτρίνες, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην § 1.3.1, είναι κυκλικά ολιγομερή της γλυκόζης που αποτελούνται από 7 μονάδες γλυκόζης συνδεδεμένες με α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με υδρόφοβα μόρια κατάλληλου μεγέθους και υδροφοβικότητας, τα οποία εισέρχονται στην σχετικά υδρόφοβη κοιλότητά τους αντικαθιστώντας ταυτόχρονα τα υψηλής ενέργειας μόρια νερού από το εσωτερικό τους (Ponce Cevallos et al., 2010). Βασικό πλεονέκτημα της ενθυλάκωσης σε β-κυκλοδεξτρίνη ενός μη-υδατοδιαλυτού συστατικού είναι ότι μπορεί να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητά του, αλλά μπορεί επιπλέον να προστατευτεί από τις καταστροφικές επιδράσεις της θέρμανσης, του οξυγόνου ή του φωτός (Szente & Szejtli, 2004).

Η κουρκουμίνη σχηματίζει σύμπλοκα εγκλεισμού με την β-CD με μοριακή αναλογία 1:2, όπου η κοιλότητα της β-CD ενθυλακώνει έναν από τους δύο φαινολικούς δακτυλίους της κουρκουμίνης (Tang et al., 2002). Ωστόσο μελέτες διαλυτότητας από την ομάδα των Tonnesen et al., (2002) έδειξαν σχηματισμό συμπλόκου κουρκουμίνης:β-CD με μοριακή αναλογία 1:1. Πρόσφατη μελέτη φθορισμού των Baglole et al., (2005) έδειξε επίσης τον σχηματισμό συμπλόκου κουρκουμίνης:β-CD μοριακής αναλογίας 1:2. Η στοιχειομετρία 1:1 φαίνεται να

κυριαρχεί όταν η συγκέντρωση της β-CD είναι λίγα mM, ενώ σε συγκέντρωση >10 mM είναι πιθανή 1:2 στοιχειομετρία (Ansari et al., 2005; Szente et al., 1998). Μια πιθανή εξήγηση για τις παραπάνω διαφορές που αφορούν την στοιχειομετρία του συμπλόκου κουρκουμίνης:β-CD, είναι ότι οι CDs έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού και 'μη-εγκλεισμού' ή δομές μικκυλίων (να αυτοδιοργανώνονται σε 'επιφανειοδραστικά' συσσωματώματα ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής τους), τα οποία ωστόσο έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη διαλυτότητα υδρόφοβων συστατικών. Επίσης, είναι πιθανό ένα σύμπλοκο μοριακής αναλογίας 1:2 να σχηματίζεται όταν το δεύτερο μόριο CD σχηματίζει σύμπλοκο με το υπάρχων 1:1 σύμπλοκο. Τόσο οι CDs όσο και τα σύμπλοκα CD μπορούν να αυτό-διοργανώνονται και να σχηματίζουν συσσωματώματα δύο ή περισσότερων μορίων κυκλοδεξτρίνης ή συμπλόκων, ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής τους (Loftsson et al., 2004). Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη αυξάνει την διαλυτότητά της κατά 10^4 φορές, καθώς και την υδρολυτική της σταθερότητα, αλλά ελαττώνει την φωτοχημική σταθερότητά της (Tonnesen et al., 2002).

Τα τροποποιημένα άμυλα (modified starch, MS) είναι χαμηλού-κόστους εξαιρετικοί γαλακτωματοποιητές ιδανικοί για την ενθυλάκωση υδρόφοβων δραστικών συστατικών κυρίως μέσω της τεχνικής της ξήρανσης με ψεκασμό (spray-drying). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται άμυλο το οποίο έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή υδρόφοβων οκτένυλοηλεκτρικών ομάδων, οι οποίες του προσδίδουν εκτός από γαλακτωματοποιητικές ικανότητες εξαιρετική συγκράτηση κατά την ξήρανση. Ωστόσο τα τροποποιημένα άμυλα χρησιμοποιούνται συνήθως σε συνδυασμό με άλλα μέσα ενθυλάκωσης (π.χ. μαλτοδεξτρίνες) διότι έχει αναφερθεί ότι προσφέρουν περιορισμένη προστασία απέναντι στην οξείδωση (Reineccius, 1991). Έχει αναφερθεί ότι η ενθυλάκωση στο τροποποιημένο άμυλο μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητα κατά την αποθήκευση αρωματικών συστατικών (Shaikh et al., 2006; Partanen et al., 2002) και ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης καθώς και η οξειδωτική σταθερότητα ενός ενθυλακωμένου συστατικού στο τροποποιημένο άμυλο εξαρτάται από την σχετική υγρασία (Relative Humidity, RH) του περιβάλλοντος (Soottitantawat et al., 2004). Πρόσφατα, η ομάδα των Yu & Huang (2010) απέδειξαν ενισχυμένη *in-vitro* αντικαρκινική δραστικότητα της ενθυλακωμένης σε οκτένυλο-τροποποιημένο άμυλο κουρκουμίνης, καθώς και ενισχυμένη υδατοδιαλυτότητα της κατά 1670 φορές.

Στην παρούσα μελέτη πέντε διαφορετικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-CD. Σχηματίζονται σύμπλοκα εγκλεισμού με μοριακή αναλογία κουρκουμίνη:β-CD 1:2, όπου ο καθένας φαινολικός δακτύλιος της κουρκουμίνης εγκλείεται στην κοιλότητα της β-CD, υπό την επίδραση των δυνάμεων van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ενώ η ταυτόχρονη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με τις υδροξυλομάδες της κουρκουμίνης αυξάνουν τη σταθερότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Παράλληλα η κουρκουμίνη ενθυλακώθηκε επίσης και σε τροποποποιημένο άμυλο με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό. Κατά την παρασκευή του γαλακτώματος έγινε και προαιρετικά χρήση του γαλακτωματοποιητή Tween 80. Οι ενθυλακωμένες μορφές της κουρκουμίνης στην β-CD και το MS που προκύπτουν μελετήθηκαν ως προς την % κ.β. περιεκτικότητα τους σε κουρκουμίνη (% ΕΥ) και την απόδοση της ενθυλάκωσης (% ΕΕ), ενώ η επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης πραγματοποιήθηκε με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), τόσο σε αδρανείς όσο και σε οξειδωτικές συνθήκες. Μελετάται επίσης η διαλυτότητα της κουρκουμίνης παρουσία της β-CD σε τρεις θερμοκρασίες, από την οποία υπολογίζονται οι αντίστοιχες σταθερές σχηματισμού του συμπλόκου, K_c, καθώς και οι τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων σχηματισμού του συμπλόκου.

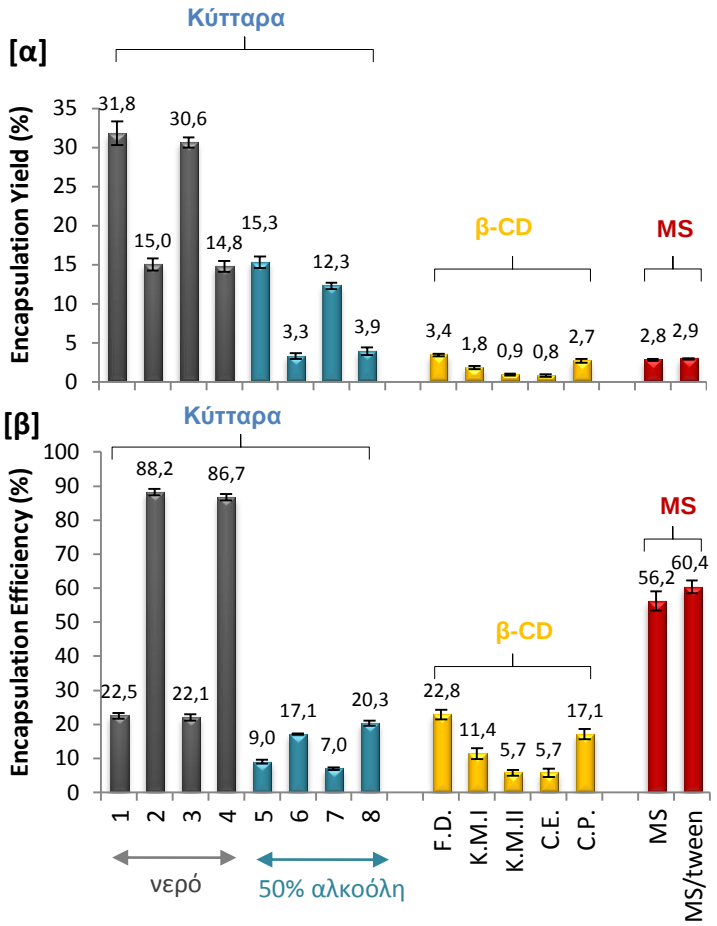
8.2. Ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-CD και MS

Στο σχήμα 8.1 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι τιμές % ΕΥ και % ΕΕ των συμπλόκων της κουρκουμίνης με την β-CD όπως παρασκευάστηκαν με τις πέντε μεθόδους: 1) ανάμιξη σε υδατικό διάλυμα και λυοφιλίωση, (F.D.), 2) ανάμιξη στερεού μίγματος σε νερό, Kneading method (K.M.I), 3) ανάμιξη στερεού μίγματος παρουσία οργανικού διαλύτη, (K.M.II), 4) μέθοδος συν-εξάτμισης, Co-evaporation (C.E.), 5) μέθοδος συν-καταβύθισης, Co-precipitation (C.P.), καθώς και με το MS (παρουσία ή απουσία Tween). Παρουσιάζονται επίσης ενδεικτικά οι τιμές % ΕΥ και % ΕΕ οχτώ μικροκαψουλών της κουρκουμίνης με κύτταρα οι οποίες παρασκευάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες, όπως αναφέρθηκαν στις § 6.A.7.B και 7.4.2 (σχήμα 7.4) και οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά για τη μελέτη της σταθερότητας και των ιδιοτήτων της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (βλ. κεφάλαια 8 και 9). Με βάση τις τιμές % ΕΥ οι μικροκάψουλες των κυττάρων μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες: i) δείγματα 1 και 3 (παρασκευασμένα σε νερό) με υψηλές τιμές % ΕΥ (περίπου 30%), ii) δείγματα 2, 4, 5, 7 με % ΕΥ από 12 έως 15% ($p<0.05$) και iii) δείγματα 6 και 8 (παρασκευασμένα σε 50% v/v αιθανόλη)

με μικρή %ΕΥ, περίπου 3.5%. Όσον αφορά τα σύμπλοκα κουρκουμίνης:β-CD οι τιμές % ΕΥ κυμαίνονται από 3.4% έως 0.8%, σημαντικά μικρότερες ($p<0.05$) σε σχέση με τις μικροκάψουλες των κυττάρων. Τα σύμπλοκα τα οποία παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους F.D και K.M.I, όπου το διάλυμα ενθυλάκωσης ήταν αποκλειστικά υδατικό, παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές % ΕΥ και % ΕΕ, σε αντίθεση με τα σύμπλοκα τα οποία παρασκευάστηκαν παρουσία οργανικού διαλύτη με τις μεθόδους K.M.II και C.E. όπου παρουσιάζουν την χαμηλότερη % ΕΥ (<1%). Προφανώς η παρουσία του οργανικού διαλύτη κατά την παρασκευή του συμπλόκου καθιστά πιο πιθανή την παραμονή της υδρόφοβης κουρκουμίνης στον οργανικό διαλύτη και λιγότερη πιθανή την ενσωμάτωση της στην κοιλότητα της β-CD. Επιπλέον, παρουσία του οργανικού διαλύτη η κουρκουμίνη διίσταται και αυξάνεται η πολικότητα της, οπότε είναι δύσκολο να εισέλθει την υδρόφοβη κοιλότητα της β-CD. Παρόλα αυτά, το σύμπλοκο που παρασκευάστηκε με την μέθοδο C.P. σε 50% v/v μεθανόλη περιέχει αξιοσημείωτο ποσοστό κουρκουμίνης (2.7±0.2% κ.β.) το οποίο πιθανότατα αποδίδεται στην παρατεταμένη θέρμανση της κουρκουμίνης και της β-CD στους 70^{o}C κατά την παρασκευή του συμπλόκου. Όσον αφορά την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στο τροποποιημένο άμυλο δεν παρατηρούνται διαφορές ($p>0.05$) στις % ΕΥ και % ΕΕ στις ενθυλακωμένες μορφές που παρασκευάστηκαν με ή χωρίς την παρουσία του γαλακτωματοποιητή Tween, επιβεβαιώνοντας τις καλές γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες που κατέχει από μόνο του το συγκεκριμένο τροποποιημένο άμυλο.

Από το διάγραμμα του σχήματος 8.1 είναι εμφανές ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις τιμές % ΕΥ και % ΕΕ μεταξύ των ενθυλακωμένων μορφών που παρασκευάστηκαν είτε με διαφορετικό μέσο ενθυλάκωσης είτε με το ίδιο μέσο ενθυλάκωσης, αλλά με διαφορετική μέθοδο/συνθήκες. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται στους διαφορετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται κατά την ενθυλάκωση. Γενικά, στα κύτταρα του S. cerevisiae (σχήματα 7.4 και 8.1) παρουσιάζονται υψηλότερα ποσοστά ενθυλάκωσης (τιμές % ΕΥ και % ΕΕ), με εξαίρεση τα δείγματα τα οποία παρασκευάστηκαν σε 50% v/v αιθανολικό διάλυμα με περίσσεια κυττάρων (δείγματα 6 και 8, σχήμα 8.1). Ο μηχανισμός της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα περιγράφηκε με λεπτομέρεια στο κεφάλαιο 7. Συγκεκριμένα η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης πραγματοποιείται κυρίως με παθητική διάχυση και ενισχύεται από την παρουσία των υδρόξυλομάδων της κουρκουμίνης οι οποίες παρουσιάζουν χημική συγγένεια με τις πολικές κεφαλές των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Έτσι η κουρκουμίνη ενσωματώνεται στην μεμβράνη του κυττάρου με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, αλλά παράλληλα συνδέεται και

εξωτερικά με δεσμούς υδρογόνου με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες, γλυκάνες) ιδιαίτερα στις μικροκάψουλες που χαρακτηρίζονται από υψηλές % ΕΥ τιμές. Ωστόσο, ανεξάρτητα από την μέθοδο παρασκευής που χρησιμοποιείται, κάθε κύτταρο είναι ικανό να ενθυλακώσει πολλά περισσότερα από ένα μόρια κουρκουμίνης, γι' αυτό και οι μικροκάψουλες των κυττάρων χαρακτηρίζονται από υψηλές % ΕΕ και % ΕΥ τιμές.



Σχήμα 8.1. *% ΕΥ (α) και % ΕΕ (β) των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης σε β-CD και MS οι οποίες παρασκευάστηκαν με διαφορετικές μεθόδους. Συγκριτικά παρουσιάζονται και οχτώ μικροκάψουλες της κουρκουμίνης στα κύτταρα του S. cerevisiae οι οποίες παρασκευάστηκαν στους 55^{o}C με κύτταρα μη-πλασμολυμένα (Μ-Π) ή πλασμολυμένα (Π) σε διάλυμα υδατικό (Υ) ή 50% v/v αλκοολικό (Α) με λόγο μάζας (ΛΜ) κουρκουμίνη:κύτταρα 2.0 ή 0.2. Συγκεκριμένα, δείγμα 1: Μ-Π/Υ/2.0, 2:Μ-Π/Υ/0.2, 3:Π/Υ/2.0, 4:Π/Υ/0.2, 5:Μ-Π/Α/2.0, 6:Μ-Π/Α/0.2, 7:Π/Α/2.0, 8:Π/Α/0.2. Όλα τα παραπάνω δείγματα μελετώνται συγκριτικά ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητες (κεφάλαιο 9) και την σταθερότητα τους (κεφάλαιο 10).*

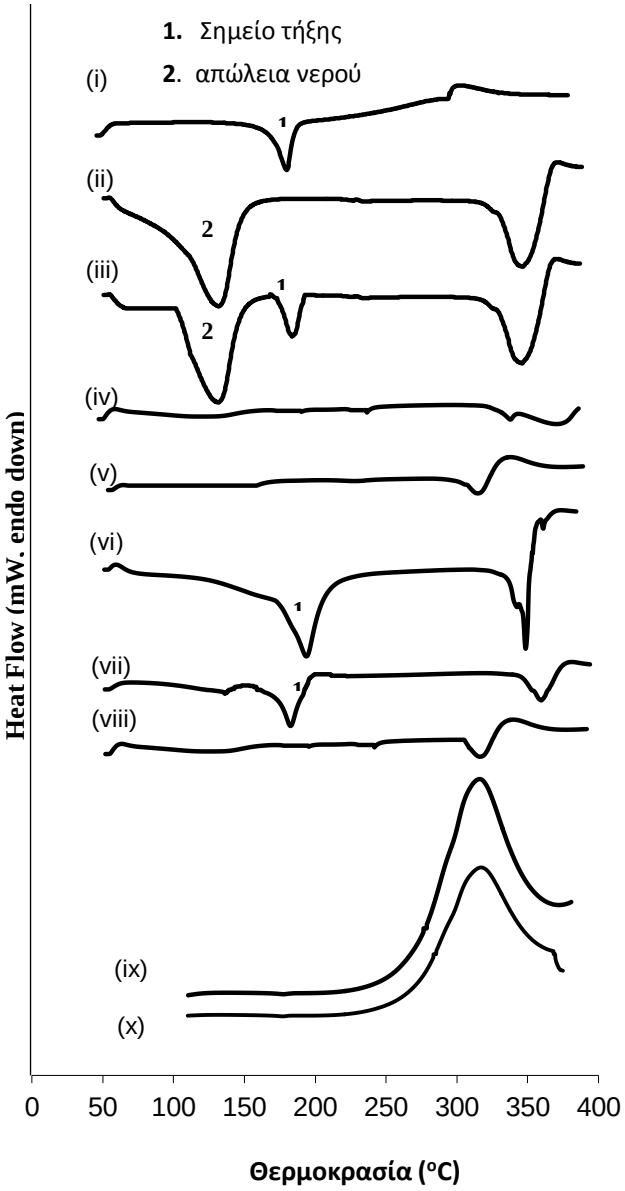
Αντιθέτως, στα σύμπλοκα της κουρκουμίνης με την β-CD δύο μόρια β-CD είναι απαραίτητα (ή τουλάχιστον ένα όταν χρησιμοποιείται μοριακή αναλογία 1:1) για να ενθυλακώσουν ένα μόνο μόριο κουρκουμίνης και για την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκαν 1.11 γρ. β-CD και μόλις 0.18 γρ. κουρκουμίνης. Εδώ η κινητήρια δύναμη για τον σχηματισμό του συμπλόκου είναι οι δυνάμεις van der Waals, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου με τις υδρόξυλομάδες της κουρκουμίνης, οι οποίες σταθεροποιούν το σύμπλοκο (Tang et al., 2002). Όσον αφορά το MS έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την κουρκουμίνη με δεσμούς υδρογόνου (Yu et al., 2010). Η μικρή ικανότητα ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης που παρουσιάζει το MS πιθανότατα να οφείλεται στον μικρό βαθμό υποκατάστασης (<3%) του αμύλου, όπως επιβάλλεται από τον κώδικα τροφίμων. Όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός υποκατάστασης του αμύλου τόσο πιο επιτυχημένη είναι η γαλακτωματοποίηση υδρόφοβων ουσιών. Είναι επίσης πιθανόν οι συνθήκες της ξήρανσης με ψεκασμό (*spray drying*) οι οποίες επικρατούν κατά την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στο MS, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής θερμοκρασίας, να επηρεάζουν την % ΕΕ (Wang et al., 2009).

Αξίζει να αναφερθεί ότι στις μικροκάψουλες της κουρκουμίνης με τα κύτταρα όσο και με την β-CD, υψηλά ποσοστά ενθυλάκωσης (% ΕΥ, % ΕΕ) παρατηρούνται όταν η προετοιμασία πραγματοποιείται σε νερό παρά σε αιθανόλη ή άλλον οργανικό διαλύτη. Στην τελευταία περίπτωση η μεγαλύτερη χημική συγγένεια της κουρκουμίνης για την αιθανόλη, καθώς και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις της αιθανόλης με τα συστατικά του κυττάρου ή με την κοιλότητα της β-CD, περιορίζουν την ενσωμάτωση των μορίων της κουρκουμίνης στο εκάστοτε μέσο ενθυλάκωσης.

8.3. Επιβεβαίωση της ενθυλάκωσης με DSC

Η μέθοδος DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσει τον σχηματισμό ενός συμπλόκου με τις κυκλοδεξτρίνες. Μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου το προς ενθυλάκωση συστατικό μπορεί να βρίσκεται στο τελικό προϊόν ελεύθερο, μερικώς ή πλήρως ενθυλακωμένο. Η ολοκληρωτική εξαφάνιση του σημείου τήξης του συστατικού, στην περίπτωση μας η κουρκουμίνη, αποτελεί απόδειξη του ολοκληρωτικού εγκλεισμού της εντός της κοιλότητας της β-CD. Αντιθέτως, η παρουσία της υποδηλώνει ότι βρίσκεται τόσο ως ενθυλακωμένη όσο και μη-ενθυλακωμένη ή βρίσκεται μερικώς ενθυλακωμένη (Ponce

Cenvallos et al., 2010; Williams et al., 1998; Pralhad et al., 2004). Στο σχήμα 8.2 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα της κουρκουμίνης (σχήμα 8.2 i), της β-CD (σχήμα 8.2 ii), του φυσικού μίγματος κουρκουμίνης/β-CD (σχήμα 8.2 iii) καθώς και των συμπλόκων εγκλεισμού κουρκουμίνης και β-CD (σχήμα 8.2 iv-viii).



Σχήμα 8.2. *Θερμογραφήματα DSC: (i) κουρκουμίνη, (ii) β-CD, (iii) φυσικό μίγμα κουρκουμίνης/β-CD και των συμπλόκων εγκλεισμού κουρκουμίνης:β-CD 1:2 τα οποία παρασκευάστηκαν με διαφορετικές μεθόδους (iv) F.D., (v) K.M.I, (vi) K.M.II, (vii) C.E., (viii) C.P., καθώς και της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης στο (ix) MS, (x) MS/Tween.*

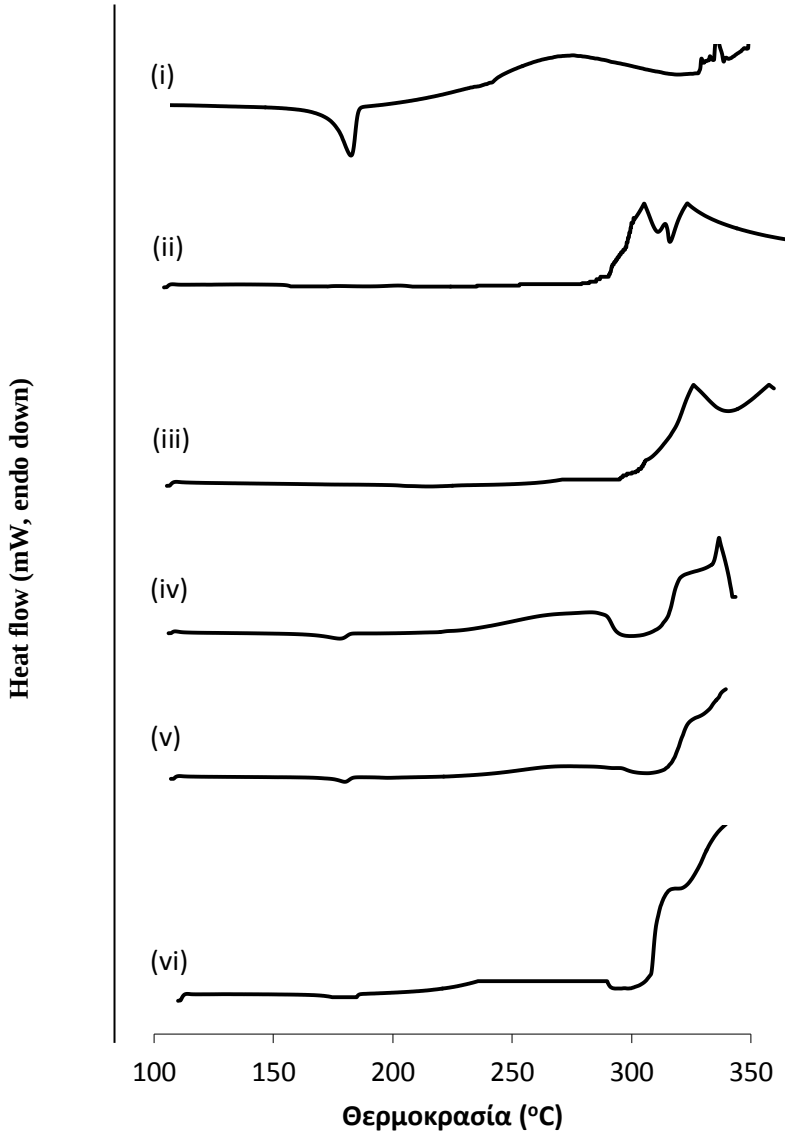
Το θερμογράφημα της κουρκουμίνης (σχήμα 8.2 i) παρουσιάζει μία ενδόθερμη απορρόφηση στους 183^{o}C, που αποτελεί το σημείο τήξεως της και μια εξώθερμη που ξεκινά στους 204^{o}C λόγω της θερμικής αποικοδόμησή της. Το θερμογράφημα της β-CD (σχήμα 8.2 ii) παρουσιάζει δυο ενδόθερμες απορροφήσεις: μια στους 130^{o}C που οφείλεται στην απομάκρυνση νερού από την κοιλότητα της β-CD και μια δεύτερη στους 339^{o}C που αντιστοιχεί στο σημείο τήξης της. Στο θερμογράφημα του φυσικού μίγματος των δύο συστατικών (σχήμα 8.2 iii), το οποίο παρασκευάστηκε με μοριακή αναλογία 1:2, εμφανίζονται αυτούσιες οι ενδόθερμες κορυφές τόσο της κουρκουμίνης όσο και της β-CD. Αυτό υποδεικνύει ότι στην περίπτωση του φυσικού μίγματος που προκύπτει με απλή ανάμιξη των συστατικών σε στερεή κατάσταση, δεν έχει λάβει χώρα σχηματισμός συμπλόκου. Αντίθετα στα θερμογραφήματα των συμπλόκων τα οποία παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους F.D., K.M.I και C.P. (σχήματα 8.2 iv, v και viii, αντίστοιχα) δεν εμφανίζεται η ενδόθερμη απορρόφηση της κουρκουμίνης στους 183^{o}C.

Η απουσία αυτής της ενδόθερμης απορρόφησης φανερώνει ότι έχει λάβει χώρα πλήρης εγκλεισμός της κουρκουμίνης στο εσωτερικό της κοιλότητας της β-CD και δεν πρόκειται για ένα απλό μίγμα των δύο ουσιών. Αντίθετα στα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους K.M.II (σχήμα 8.2 vi) και C.E. (σχήμα 8.2 vii) το σημείο τήξης της κουρκουμίνης είναι εμφανές, φανερώνοντας την παρουσία ‘ελεύθερων’ μορίων, δηλαδή μορίων κουρκουμίνης τα οποία δεν εισέρχονται στην κοιλότητα της β-CD.

Στο σχήμα 8.2 ix και x παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης με το τροποποιημένο άμυλο. Και στις δυο ενθυλακωμένες μορφές (με ή χωρίς την χρήση του γαλακτωματοποιητή Tween) δεν εμφανίζεται η ενδόθερμη κορυφή του σημείου τήξης της κουρκουμίνης ενώ στους 240^{o}C αρχίζει η αποικοδόμησή τους. Η χρήση του γαλακτωματοποιητή Tween δεν φαίνεται να ενισχύει επιπλέον τη θερμική σταθερότητα της κουρκουμίνης.

8.4. Μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης με DSC

Η μέθοδος DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε οξειδωτικές συνθήκες για τη μελέτη της σταθερότητας στην οξείδωση, ενθυλακωμένων μορίων. Στο Σχήμα 8.3 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα σε συνθήκες οξείδωσης της καθαρής κουρκουμίνης (σχήμα 8.3 i) και των συμπλόκων της με την β-CD, παρασκευασμένα με διαφορετικές μεθόδους. Στην περίπτωση της ελεύθερης κουρκουμίνης (σχήμα 8.3 i) παρατηρείται μία εξώθερμη κορυφή η οποία ξεκινά στους 204^{o}C με μέγιστο στους 278^{o}C ενώ η πλήρης οξείδωση της ολοκληρώνεται στους 316^{o}C.

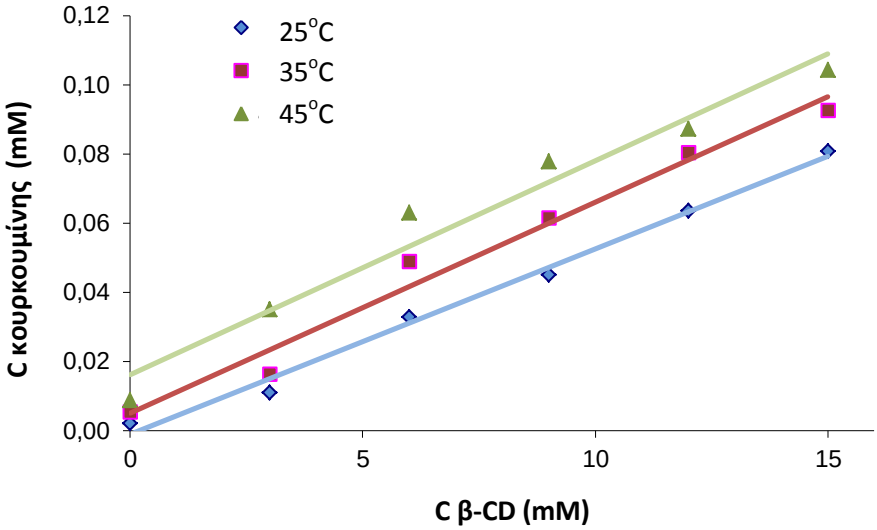


Σχήμα 8.3. *Θερμογραφήματα DSC σε συνθήκες οξείδωσης: (i) κουρκουμίνη και των συμπλόκων εγκλεισμού κουρκουμίνης:β-CD 1:2 τα οποία παρασκευάστηκαν με διαφορετικές μεθόδους (ii) F.D., (iii) K.M.I, (iv) K.M.II, (v) C.E και (vi) C.P.*

Η εξώθερμη καμπύλη που δηλώνει την αποικοδόμηση της κουρκουμίνης, δεν εμφανίζεται στα θερμογραφήματα των συμπλόκων τα οποία παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους F.D., K.M.I και C.P. (σχήματα 8.3 ii, iii και vi, αντίστοιχα), το οποίο φανερώνει ότι η κουρκουμίνη, που βρίσκεται στο εσωτερικό της β-CD, προστατεύεται από την οξείδωση έως τους περίπου 300^{o}C. Στα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους K.M.II (σχήμα 8.3 iv) και C.E. (σχήμα 8.3 v) υπάρχει μια μικρή εξώθερμη κορυφή της οξείδωσης της κουρκουμίνης, σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα (§ 8.3), φανερώνοντας την παρουσία 'ελεύθερων' μορίων κουρκουμίνης. Η εξώθερμη κορυφή όλων των συμπλόκων της β-CD στους 300^{o}C οφείλεται στην αποικοδόμησή τους. Η ανάλυση με DSC των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης σε MS έδωσε όμοια διαγράμματα με αυτά σε αδρανείς συνθήκες (σχήμα 8.2 x και xi), φανερώνοντας ότι η ενθυλάκωση σε MS προστατεύει την κουρκουμίνη από τη θερμική αποικοδόμηση έως τους 240^{o}C.

8.5. Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης παρουσία β-CD

Για την μελέτη της αύξησης της διαλυτότητας της κουρκουμίνης παρουσία της β-CD, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές διαλυτότητας σε τρεις θερμοκρασίες και υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες σταθερές σχηματισμού του συμπλόκου, *K*c, καθώς και οι τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων σχηματισμού του συμπλόκου. Το διάγραμμα μεταβολής της διαλυτότητας της κουρκουμίνης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της β-CD σε υδατικό διάλυμα, σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 35 και 45^{o}C), παρουσιάζεται στο σχήμα 8.4. Η μεταβολή της διαλυτότητας της κουρκουμίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση της β-CD, σε κάθε θερμοκρασία, είναι γραμμική και τα διαγράμματα αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως διαγράμματα μορφής A_L (Higuchi & Connors, 1965).



Σχήμα 8.4. *Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης παρουσία β-CD στους 25, 35 και 45°C.*

Οι σταθερές σχηματισμού του συμπλόκου (*Kc*) της κουρκουμίνης με την β-κυκλοδεξτρίνη στις τρεις θερμοκρασίες υπολογίζονται με βάση την εξίσωση:

$$K_C = \frac{\text{κλίση}}{So(1 - \text{κλίση})}$$

και δίνονται στον πίνακα 8.1. Οι τιμές της τεταγμένης επί την αρχή (intercept, S_0) των διαγραμμάτων, δείχνουν ότι η διαλυτότητα της κουρκουμίνης στο νερό αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι τιμές των σταθερών σχηματισμού του συμπλόκου (*Kc*) μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως αναμένεται για τις εξώθερμες διαδικασίες.

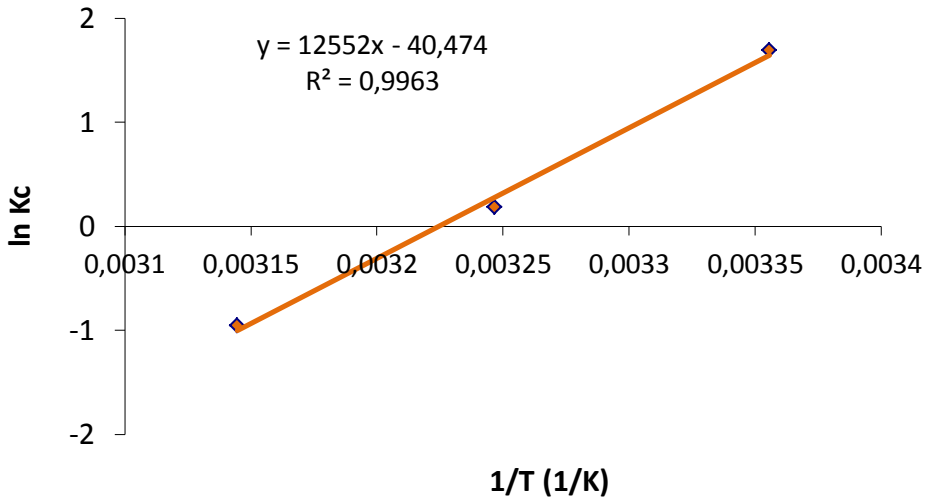
Πίνακας 8.1. *Σταθερές σχηματισμού του συμπλόκου (Kc) κουρκουμίνη/β-CD σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 35 και 45°C).*

Θερμοκρασία (°C)	Αποτέμνουσα	Κλίση	R^2	K_C (M^{-1})
25	0.001	0.0054	0.992	5.4
35	0.005	0.0061	0.979	1.2
45	0.016	0.0062	0.966	0.4

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές θερμοδυναμικών παραμέτρων. Από την εξίσωση του van't Hoff :

$$\ln K_C = \frac{\Delta H^{\neq}}{RT} + \frac{\Delta S^{\neq}}{R}$$

μπορούν να υπολογιστούν οι μεταβολές της ενθαλπίας και της εντροπίας (Tommasini et al., 2004). Στο σχήμα 8.5 παρουσιάζεται το διάγραμμα van't Hoff όπου η τιμή του λογαρίθμου της K_c είναι γραμμική συνάρτηση του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας. Οι υπολογιζόμενες τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων παρουσιάζονται στον πίνακα 8.2.



Σχήμα 8.5. *Διάγραμμα van't Hoff σχηματισμού του συμπλόκου μεταξύ κουρκουμίνης και β-CD.*

Οι αρνητικές τιμές της μεταβολής της ενθαλπίας δείχνουν ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου είναι εξώθερμο φαινόμενο. Η τιμή (ΔH) είναι -104 kJ $mole^{-1}$ είναι τυπική για μόρια που περιλαμβάνουν αρωματικές υδρόξυ-ομάδες και η συμπλοκοποίηση με την β-CD γίνεται με τη συμμετοχή ισχυρών δεσμών υδρογόνου. Η μεταβολή της εντροπίας είναι επίσης αρνητική γεγονός που οφείλεται στο ότι η συμπλοκοποίηση οδηγεί σε ένα πιο οργανωμένο δομικά σύστημα με μειωμένη ικανότητα περιστροφής του συμπλοκοποιημένου μορίου σε σχέση με το ελεύθερο.

Πίνακας 8.2. *Θερμοδυναμικές παράμετροι σχηματισμού του συμπλόκου κουρκουμίνης/β-CD.*

Θερμοδυναμική Παράμετρος	*Τιμή*
ΔH (kJ mol^{-1})	**-104**
ΔS (J $mol^{-1}K^{-1}$)	**-336**
ΔG_{25} (kJ mol^{-1})	**-4.2**

Οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs για τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν κατά τον εγκλεισμό της κουρκουμίνης μπορούν να υπολογιστούν με τη βοήθεια της εξίσωσης ΔG_{25} = ΔH - T·ΔS. Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs στους 298 K υπολογίστηκε ότι είναι ΔG_{25} = -4.2 kJ·mol^{-1} (πίνακας 8.2) και φανερώνει ότι η διαδικασία του εγκλεισμού είναι αυθόρμητο φαινόμενο.

8.6. Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από την ανάλυση του DSC και τις % EY και % EE τιμές των συμπλόκων κουρκουμίνης/β-CD φαίνεται ότι οι μέθοδοι F.D., K.M.I και C.P. είναι οι πιο αποτελεσματικές για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης. Φαίνεται ότι η παρουσία του οργανικού διαλύτη κατά την παρασκευή των συμπλόκων με τις μεθόδους K.M.II και C.E. εμποδίζουν την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης. Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε MS αντί για β-CD ενίσχυσε την απόδοση της ενθυλάκωσης (% EE 56.0, αντί για 22.8% που είναι η μέγιστη τιμή που παρατηρείται για την β-CD). Ωστόσο τόσο η β-CD όσο και το MS έχουν μικρή ικανότητα ενθυλάκωσης σε σχέση με τα κύτταρα του *S. cerevisiae*. Η ενθυλάκωση στην β-CD προστατεύει την κουρκουμίνη από την θερμική οξείδωση έως τους 300°C ενώ στο MS έως τους 240°C. Επιπλέον η παρουσία περίσσειας β-CD σε ένα υδατικό διάλυμα (15 mM) μπορεί να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης κατά 38.4 φορές στους 25°C, 17.1 φορές στους 35°C και 12.0 φορές στους 45°C. Όσον αφορά την ενθυλάκωση στο MS έχει αναφερθεί ότι επίσης αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης κατά 1670 φορές (Yu et al., 2010). Η διαλυτότητα της ενθυλακωμένης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* κουρκουμίνης περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 9.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9ο

Φυσικοχημικές ιδιότητες ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

9.1. Εισαγωγή

Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο 4 η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται κυρίως στην βιομηχανία τροφίμων ως χρωστική αλλά επιπλέον μελετάται η δραστικότητά της ενάντια σε μια πληθώρα ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η μόλυνση με HIV καθώς και διάφορες νευρολογικές, καρδιαγγειακές ή δερματικές ασθένειες. Ωστόσο η δραστικότητα της είναι περιορισμένη λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της: μικρή διαλυτότητα στο νερό, αστάθεια στο αλκαλικό περιβάλλον, στην οξείδωση, στη θέρμανση, στο φώς, στην παρουσία μεταλλικών ιόντων, ενζύμων και ασκορβικού οξέος (Sharma et al., 2005). Επιπλέον, μελέτες βιοδιαθεσιμότητας με μέτρηση των επιπέδων της στο πλάσμα και τους ιστούς έδειξαν ότι η κουρκουμίνη απορροφάται ελάχιστα στο έντερο, ανεξάρτητα από τον τρόπο πρόσληψης, επειδή μετά τον μεταβολισμό της στο έντερο και το ήπαρ αποβάλλεται άμεσα (Anand et al., 2007). Η ενθυλάκωση είναι μια από τις μεθόδους που αποσκοπούν στην τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων δραστικών ουσιών, προκειμένου να ενισχυθεί η δραστικότητα τους.

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η επίδραση της ενθυλάκωσης στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της κουρκουμίνης. Αρχικά μελετάται εάν η παρουσία κυττάρων του *S. cerevisiae* (πλασμολυμένων και μη) ενισχύει την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης με ένα πείραμα ανάλογο αυτό που εφαρμόστηκε για την β-CD. Στην συνέχεια επιλέγονται οκτώ μικροκάψουλες της κουρκουμίνης με κύτταρα, οι οποίες παρασκευάστηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες και οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς το περιεχόμενό τους σε

κουρκουμίνη (§ 7.4.2). Στις μικροκάψουλες αυτές καθώς και σε αυτές της β-CD που παρασκευάστηκαν με τις πέντε μεθόδους και σε εκείνες με το MS (με ή χωρίς tween) προσδιορίστηκαν τα εξής:

- ✓ Ο συντελεστής κατανομής (Kc) της κουρκουμίνης σε σύστημα ελαιόλαδο/νερό καθώς και οκτανόλη/ρυθμιστικό διάλυμα διαφορετικών τιμών pH
- ✓ Το προφίλ της απελευθέρωσης της κουρκουμίνης σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό
- ✓ Η χρωστική ικανότητα της κουρκουμίνης
- ✓ Η αντιοξειδωτική δραστικότητα της κουρκουμίνης

Η σύσταση των οκτώ μικροκαψουλών της κουρκουμίνης με τα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παραπάνω πειραμάτων και οι % ΕΕ και % ΕΥ τιμές τους, μαζί με των μικροκαψουλών σε β-CD και MS, παρουσιάστηκαν στο σχήμα 8.1. Με βάση μόνο τις % ΕΥ τιμές οι εξεταζόμενες μικροκάψουλες των κυττάρων μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες:

α) δείγματα 1 και 3 (παρασκευασμένα σε υδατικό διάλυμα) με % ΕΥ περίπου 30%,

β) δείγματα 2, 4, 5 και 7 με % ΕΥ από 12% έως 15% ($p<0.05$) και

γ) δείγματα 6 και 8 (παρασκευασμένα σε 50% v/v αιθανόλη) με % ΕΥ περίπου 3.5 %.

Όπως αναφέρθηκε στην § 7.4 αν και η πλασμόλυση των κυττάρων επιδρά στη δομή και τη σύσταση των κυττάρων, η χρησιμοποίηση πλασμολυμένων κυττάρων αντί για μη-πλασμολυμένων κάτω υπό τις ίδιες συνθήκες παρασκευής, (σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων 1 και 3, 2 και 4, 5 και 7, 6 και 8), δεν ενισχύει αλλά ούτε και ελαττώνει το ποσοστό της κουρκουμίνης που ενθυλακώνεται. Αντίθετα, μικροκάψουλες οι οποίες παρασκευάστηκαν με διαφορετικό λόγο μάζας (ΛΜ) κουρκουμίνη:κύτταρα (σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων 1 και 2, 3 και 4, 5 και 6, 7 και 8) ή σε διαφορετικό διάλυμα ενθυλάκωσης (υδατικό ή 50 % v/v αλκοολικό: σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων 1 και 5, 2 και 6, 3 και 7, 4 και 8) χαρακτηρίζονται από διαφορετική % κ.β. περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη.

9.2. Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης παρουσία κυττάρων του *S. cerevisiae*

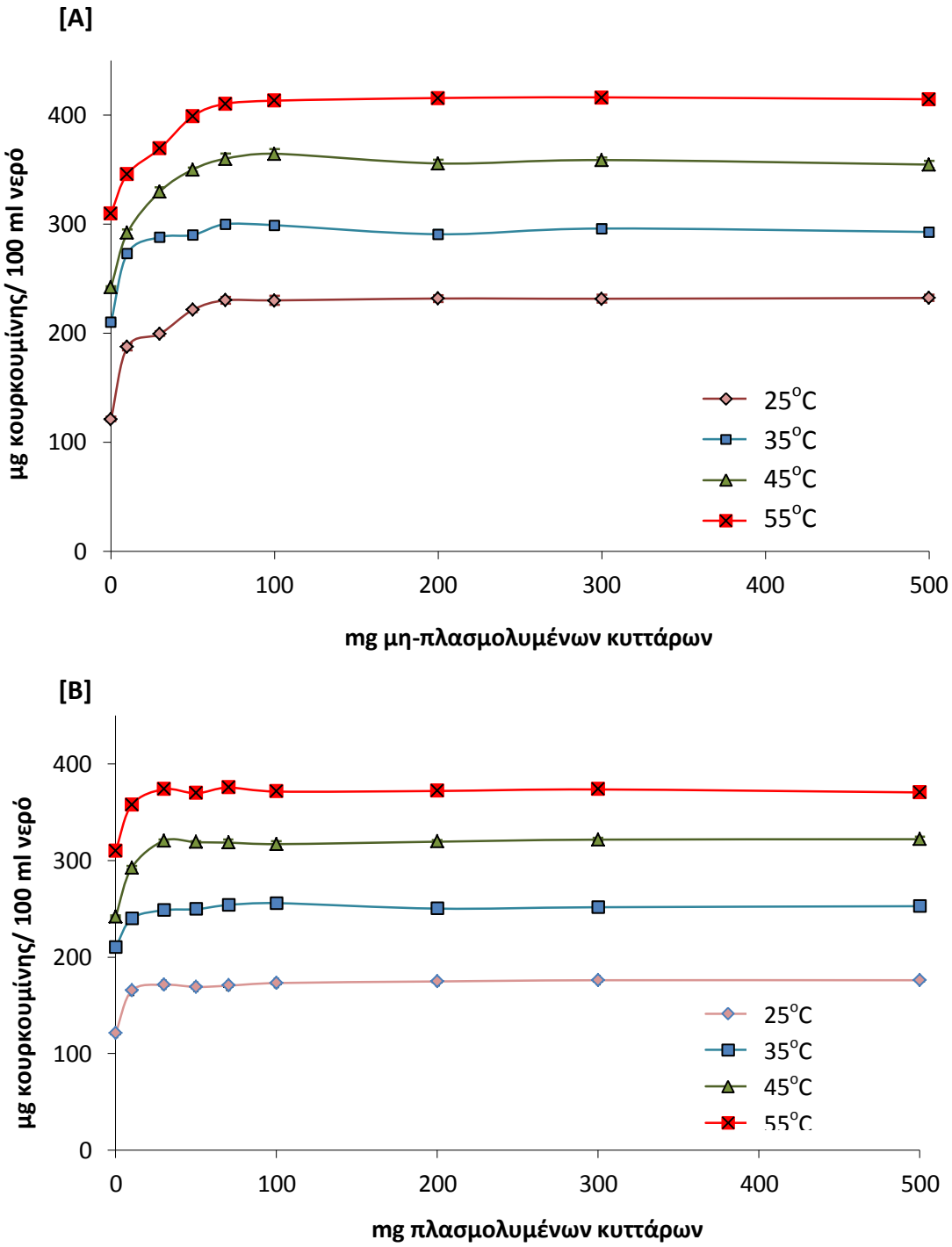
Η μικροενθυλάκωση στα κύτταρα των ζυμομυκήτων έχει βρεθεί ότι μπορεί να ενισχύσει την υδατοδιαλυτότητα μη-υδατοδιαλυτών συστατικών, όπως η ρεσβερατρόλη (2-3 φορές) (Shi et

al., 2008). Στην παρούσα μελέτη με ένα διπλό πείραμα μελετάται εάν η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη μπορεί να παρουσιάσει μεγαλύτερη διαλυτότητα σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη.

Αρχικά, στο πρώτο πείραμα, εφαρμόζεται η μέθοδος των Higuchi et al., (1965), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη διαλυτότητας παρουσία της β-CD (§ 8.5), προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η παρουσία αυξανόμενης ποσότητας κυττάρων (πλασμολυμένων με 10 % κ.β. NaCl ή μη) ενδέχεται να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης στους 25, 35, 45 και 55^{o}C. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο σχήμα 9.1.

Η υδατοδιαλυτότητα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης είναι 121±2.09, 210±1.25, 242± 1.02 και 310±0.96 μg/100 ml νερό στους 25, 35, 45 και 55^{o}C, αντίστοιχα και, όπως αναμένεται, αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η παρουσία μη-πλασμολυμένων κυττάρων (σχήμα 9.1 Α) φαίνεται να ενισχύει ($p<0.05$) την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης σε όλες τις θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα όταν η ποσότητα των κυττάρων είναι μικρότερη σε σχέση με την ποσότητα της κουρκουμίνης (μικρότερη από 100 mg) η διαλυτότητα της κουρκουμίνης αυξάνεται συνεχώς και σχεδόν λογαριθμικά. Όταν 100 mg κυττάρων είναι παρών (λόγος μάζας κουρκουμίνης:κυττάρων 1) η διαλυτότητα της κουρκουμίνης αυξάνεται από 121±2.09 σε 230±3.19 μg/100 ml (90.1% ή 1.9-φορές αύξηση) στους 25^{o}C, από 210±1.25 σε 299±2.70 μg/100 ml (42.4% ή 1.4-φορές αύξηση) στους 35^{o}C, από 242±1.02 σε 365±3.90 μg/100 ml (50.8% ή 1.5-φορές αύξηση) στους 45^{o}C και από 310±0.96 σε 413±4.25 μg/100 ml (32.2% ή 1.3-φορές αύξηση) στους 55^{o}C.

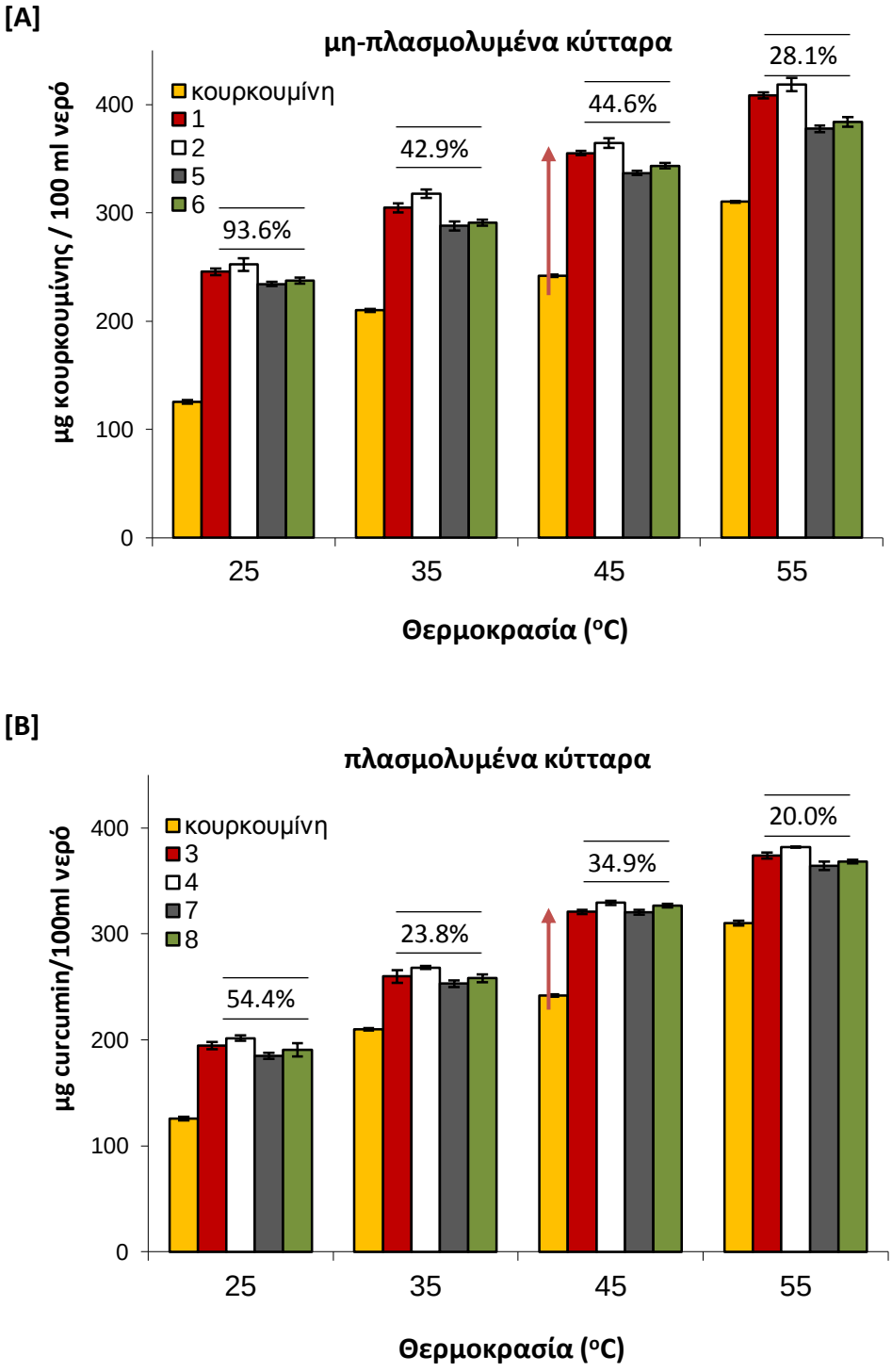
Είναι αξιοσημείωτο ότι, σε όλες τις θερμοκρασίες, όταν 100 mg κυττάρων είναι παρόντα (λόγος μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα 1) η διαλυτότητα της κουρκουμίνης φτάνει σε ένα πλατώ και η παρουσία περίσσειας κυττάρων (ποσότητα μεγαλύτερη από 100 mg) δεν προκαλεί περαιτέρω αύξηση της διαλυτότητας. Πιθανότατα όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε περίσσεια σε υδατικό διάλυμα και ιδιαίτερα στις υψηλές θερμοκρασίες, όπου η ενίσχυση της υδατοδιαλυτότητας της κουρκουμίνης είναι μικρότερη, τα κύτταρα τείνουν να συσσωρεύονται και να σχηματίζουν συσσωματώματα με τα μόρια της κουρκουμίνης ή τα ενθυλακώνουν, οπότε και καταβυθίζονται, παρά διασπείρονται στην υδατική φάση.



Σχήμα 9.1. *Επίδραση αυξανόμενης ποσότητας κύτταρων α) μη-πλασμολυμένων και β) πλασμολυμένων σε διάλυμα 10% κ.β. χλωριούχου νατρίου, στην υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης (μg/100ml νερό) στους 25, 35, 45 και 55°C όπως προέκυψε μετά την προσθήκη 100 mg κουρκουμίνης σε υδατικά αιωρήματα κυττάρων.*

Παρόμοια τάση παρατηρείται όταν πλασμολυμένα κύτταρα, αντί για μη-πλασμολυμένα, προστίθενται σε υδατικό διάλυμα κουρκουμίνης (σχήμα 9.1β). Όταν 100 mg είναι παρόντα, (λόγος μάζας κουρκουμίνης:κυττάρων 1), η υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης, και στις 4 θερμοκρασίες αυξάνεται και φτάνει στο 173±1.42, 256±4.02, 317±2.98 και 372±1.52 μg/100 ml στους 25, 35, 45 και 55^{o}C, αντίστοιχα. Έτσι μια αύξηση κατά 43.0% ή 1.4-φορές στην υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης παρατηρείται στους 25^{o}C και κατά 21.9% (1.2-φορές), 30.9% (1.3-φορές) και 20.0% (1.2-φορές) στους 35, 45 και 55^{o}C, αντίστοιχα. Είναι προφανές ότι, σε σχέση με τα μη-πλασμολυμένα κύτταρα, η παρουσία των πλασμολυμένων κυττάρων ενίσχυσε την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης σε μικρότερο βαθμό ($p<0.05$). Όπως αναλυτικά στο κεφάλαιο 8, οι αναλύσεις DSC και FT-IR των πλασμολυμένων κυττάρων έδειξαν ότι η πλασμόλυση επηρεάζει την οργάνωση και τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες, γλυκάνες) και της μεμβράνης. Η ενισχυμένη υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης παρουσία των κυττάρων πιθανότατα αποδίδεται σε αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβοι δεσμοί) της κουρκουμίνης με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες) (Shi et al., 2008), και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων της διπλοστοιβάδας (Maiti et al., 2007). Επομένως, οι τροποποιήσεις που προκάλεσε η πλασμόλυση των κυττάρων με το χλωριούχο νάτριο, περιόρισε την ικανότητα των κυττάρων να ενισχύουν την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης. Αν και τα κύτταρα είναι αδιάλυτα στο νερό, αλλά υδατοδιαλυτά εντός των υδρόφιλων τμημάτων τους, υπό την παρουσία νερού είναι πιθανό τα λιπίδια τους να επαναδιοργανώνονται στην διαχωριστική επιφάνεια νερού-λιπιδίου, προσδίδοντας επιφανειοδραστικές (surfactant) ιδιότητες. Εφόσον τα μεμβρανικά λιπίδια των κυττάρων έχουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες είναι πιθανό να αυξάνουν το ποσοστό της κουρκουμίνης στην υδατική φάση.

Η επίδραση της ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae,* στην υδατοδιαλυτότητα της, προσδιορίστηκε επίσης με ένα δεύτερο πείραμα όπου υπολογίζεται η διαλυτότητα στο νερό των οκτώ μικροκαψουλών στους 25, 35, 45 και 55^{o}C και συγκρίνεται με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Οι μικροκάψουλες που παρουσιάζονται στο σχήμα 9.2 α είναι αυτές που παρασκευάστηκαν με μη-πλασμολυμένα κύτταρα (δείγμα 1, 2, 5, 6) ενώ αυτές του σχήματος 9.2.β με πλασμολυμένα (δείγμα 3, 4, 7, 8).



Σχήμα 9.2. *Υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης (μg/100ml νερό) στους 25, 35, 45 και 55°C και των ενθυλακωμένων μορφών της στα κύτταρα του S. cerevisiae οι οποίες παρασκευάστηκαν στους 55°C με κύτταρα α) μη-πλασμολυμένα (Μ-Π) και β) πλασμολυμένα (Π) σε διάλυμα υδατικό (Υ) ή 50% v/v αλκοολικό (Α) με λόγο μάζας (ΛΜ) κουρκουμίνη:κύτταρα 2.0 ή 0.2. Συγκεκριμένα δείγμα 1: Μ-Π/Υ/2.0, 2:Μ-Π/Υ/0.2, 3:Π/Υ/2.0, 4:Π/Υ/0.2, 5:Μ-Π/Α/2.0, 6:Μ-Π/Α/0.2, 7:Π/Α/2.0, 8:Π/Α/0.2.*

Στο σχήμα 9.2.α φαίνεται ότι όλες οι μικροκάψουλες των κυττάρων ενισχύουν την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης ($p<0.05$), ανεξαρτήτως από τις συνθήκες παρασκευής των μικροκαψουλών (παρουσία αιθανόλης, λόγος μάζας κουρκουμίνης:κύτταρα), οι οποίες, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 8, επηρεάζουν την τιμή %ΕΥ (το % κ.β. περιεχόμενο τους σε κουρκουμίνη). Στα δείγματα 1, 2, 5 και 6, τα οποία παρασκευάστηκαν με μη-πλασμολυμένα κύτταρα, παρουσιάζεται ελαφρώς αυξημένη υδατοδιαλυτότητα, σε σχέση με τα δείγματα 3, 4, 7 και 8, τα οποία παρασκευάστηκαν με πλασμολυμένα κύτταρα. Έτσι, η μέση τιμή διαλυτότητας της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες των μη-πλασμολυμένων κυττάρων είναι 242±3.46, 300±3.74, 350±2.73 και 397±4.10 μg/100 ml στους 25, 35, 45 και 55^{o}C, αντίστοιχα, αυξημένη κατά 93.6 %, 42.9 %, 44.6 % και 28.1 % σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Αντιθέτως, σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος, οι μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν με πλασμολυμένα κύτταρα (σχήμα 9.2.β) ενίσχυσαν την διαλυτότητα της κουρκουμίνης σε μικρότερο βαθμό: μέση τιμή 193±3.83, 260±3.58, 324±1.95 και 372±2.31 μg/100 ml στους 25, 35, 45 και 55^{o}C, αντίστοιχα, αυξημένη κατά 54.4 %, 23.8 %, 34.9 % και 20.0 %, αντίστοιχα.

Συνοψίζοντας, η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* φαίνεται να ενισχύει την υδατοδιαλυτότητα της. Αν και τα κύτταρα είναι αδιάλυτα στο νερό, τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες, γλυκάνες) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μόρια νερού. Επιπλέον παρουσία του νερού τα λιπίδια του κυττάρου, που έχουν υδρόφιλες περιοχές, μπορεί να επαναδιοργανώνονται στην μεσεπιφάνεια νερού-λιπιδίου, προσδίδοντας επιφανειοδραστικές ιδιότητες, αυξάνοντας το ποσοστό της κουρκουμίνης στην υδατική φάση. Η παρουσία μη-πλασμολυμένων κυττάρων μπορεί να ενισχύσει την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης το μέγιστο κατά 91.7% στους 25^{o}C, και κατά 42.8%, 50.4% και 34.2% στους 35, 45 και 55^{o}C, ενώ η παρουσία πλασμολυμένων κατά 45.4%, 21.9%, 33.1% και 20.6%, αντίστοιχα. Η παρουσία κυττάρων σε περίσσεια δεν ενισχύει περαιτέρω την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης. Όταν μικροκάψουλες που είχαν την ίδια περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη αξιολογήθηκαν ως προς την υδατοδιαλυτότητα τους, το υδατικό διάλυμα που προέκυψε περιείχε περισσότερη κουρκουμίνη διαλυμένη στο νερό, απ' ότι η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη, ιδιαίτερα σε εκείνες τις μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν με μη-πλασμολυμένα κύτταρα.

Σε σχέση με άλλα μέσα ενθυλάκωσης τα κύτταρα αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης σε μικρότερο βαθμό. Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-CD και MS, η οποία μελετήθηκε από τους Tonnesen et al., (2002) και Yu et al., 2010, αντίστοιχα, μπορεί να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα της κατά τουλάχιστον 10^4 και 1670-φορές, αντίστοιχα.

9.3. Προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής (Kc) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε σύστημα οκτανόλης/νερό

'*Partition (P)*' ή '*Distribution coefficient (D)*' είναι ο λόγος της συγκέντρωσης ενός συστατικού στις δύο φάσεις ενός μίγματος μη αναμιγνυόμενων διαλυτών, αφού αυτοί βρεθούν σε ισορροπία. Ουσιαστικά αποτελεί το μέτρο της διαλυτότητας της ουσίας στους δύο διαλύτες. Από τον IUPAC έχουν δοθεί πιο αποτελεσματικοί ορισμοί: '*partition constant*', '*partition ratio*' ή '*distribution ratio*'. Συνήθως ο ένας διαλύτης του μίγματος είναι το νερό, ενώ ο άλλος (υδρόφοβος) η οκτανόλη. Ο συντελεστής κατανομής αποτελεί μέτρο του πόσο υδρόφιλη ή υδρόφοβη είναι μια χημική ουσία. Ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής είναι σημαντικός για την εκτίμηση της κατανομής φαρμακευτικών ουσιών στο σώμα. Υδρόφοβες ουσίες με μεγάλους συντελεστές κατανομής κατανέμονται καλύτερα σε υδρόφοβα τμήματα, όπως οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες των κυττάρων, ενώ υδρόφιλες ουσίες με μικρούς συντελεστές κατανομής βρίσκονται κυρίως σε υδρόφιλα τμήματα, όπως στον ορό του αίματος.

Για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής μιας δραστικής ουσία χρησιμοποιείται η τιμή *log P* ή η *log D*. Η τιμή του *log P* περιγράφει τον συντελεστή κατανομής ουδέτερων (μη-ιονιζόμενων συστατικών). Για ιονιζόμενες ουσίες, όπως η κουρκουμίνη, η τιμή του *log D* είναι πιο κατάλληλη για την περιγραφή του συντελεστή κατανομής:

- ***Partition coefficient & log P***

Το pH του υδατικού διαλύματος ρυθμίζεται ώστε η κυρίαρχη μορφή της ουσίας είναι η μη-ιονιζόμενη (στην περίπτωση της κουρκουμίνης pH < 7).

$$\log P_{οκτανόλη/νερό} = \log \frac{Cοκταν}{Cμη-ιονισμένη\ στο\ νερό}$$

- ***Distribution coefficient & log D***

Είναι ο λόγος της συγκέντρωσης όλων των μορφών της ουσίας (ιονιζόμενης και μη-ιονιζόμενης) σε καθεμία από τις δύο φάσεις. Για το υπολογισμό του το pH της υδατικής φάσης ρυθμίζεται έτσι ώστε η προσθήκη της ουσίας να μην επηρεάζει την τιμή του pH. Ισχύει :

$$\log D_{οκτανόλη/νερό} = \log \frac{Cοκταν}{Cιονισμ\ νερό + C\ ουδέτερ\ νερό}$$

Η τιμή του *log D* εξαρτάται από το pH. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η τιμή του *log D* σε pH 7.4 (το φυσιολογικό pH στον ορό του αίματος). Για μη-ιονιζόμενες ουσίες ισχύει *log P= log D*, σε κάθε τιμή pH.

Ο προσδιορισμός του *log D* έχει μεγάλη σημασία στην φαρμακολογία καθώς μπορεί να προβλέψει την Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμό και Απέκκριση του φαρμάκου (*AMDE, Absorption, Distribution, Metabolism, Excetion*). Προκειμένου να απορροφηθεί μια φαρμακευτική ουσία πρέπει πρώτα να διαπεράσει τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες στο επιθήλιο του εντέρου. Προκειμένου η μεταφορά να είναι αποτελεσματική η ουσία πρέπει να είναι αρκετά υδρόφοβη ώστε να κατανέμεται στην λιπιδική διπλοστοιβάδα, αλλά όχι τόσο ώστε να μην μπορεί να αποσπαστεί από αυτή και να επιστρέψει στο επιθήλιο του εντέρου. Η ιδανική τιμή *log D* για μια φαρμακευτική ουσία είναι ενδιάμεση (όχι πολύ υδρόφοβη, ούτε πολύ υδρόφιλη). Ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην παρασκευή καλλυντικών, βαφών μαλλιών, χρωστικών κ.α. Ο προσδιορισμός της υδροφοβικότητας ενός συστατικού μπορεί επίσης να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για το πόσο εύκολα μπορεί μια ουσία να μολύνει τον υδροφόρο ορίζοντα, καθώς και για την τοξικότητά της σε φυτά και ζώα. Ο συντελεστής κατανομής σε νερό – οκτανόλη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της διανομής ενός υδρόφοβου συστατικού στο χώμα και τα υπόγεια ύδατα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η πιο κλασσική και αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής της κουρκουμίνης η οποία περιλαμβάνει την διάλυση της κουρκουμίνης σε έναν όγκο νερού/οκτανόλης ακολουθούμενη από μέτρηση της συγκέντρωσης της στους δυο διαλύτες (νερό και οκτανόλη) με μέτρηση της απορρόφησης της στο UV-VIS, αφού προηγηθεί λήψη του φάσματος απορρόφησής της. Δεδομένου ότι η κουρκουμίνη αποτελεί μια ιονιζόμενη ουσία με τιμές pKa 7.80, 8.55 και 9.05 (Tonnesen et al.,

1985) το pH του υδατικού διαλύματος ρυθμίζεται από 4 έως 10 (4, 7.4, 8, 9 και 10) και προσδιορίζεται η τιμή του *log D* συναρτήσει του pH.

Στον πίνακα 9.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής (D_{obs}) σε διάφορες τιμές pH των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης (σε κύτταρα, β-cd και MS) καθώς και της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης. Τα αποτελέσματα από την μελέτη όλων των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης έδειξαν ότι δεν υπάρχουν διαφορές ($p>0.05$) στο προφίλ των πέντε β-CD συμπλόκων, καθώς και ούτε μεταξύ των δύο καψουλών με το MS (με ή χωρίς tween). Επίσης όσον αφορά τις μικροκάψουλες των κυττάρων δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ($p>0.05$) μεταξύ των δειγμάτων. Ωστόσο στον πίνακα 9.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι τιμές των δειγμάτων 6 (%EY 3.3) και 1 (%EY 31.8). Αυτό σημαίνει ότι η φυσική κατάσταση των κυττάρων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των μικροκαψουλών (πλασμόλυση, παρουσία αιθανόλης) καθώς και η τιμή %EY κάθε δείγματος δεν διαφοροποιούν ποσοτικά την κατανομή της κουρκουμίνης στο σύστημα οκτανόλης/νερό. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται και η τιμή του συντελεστή κατανομής κάθε δείγματος σε μίγμα ελαίου/νερού.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 9.1 φαίνεται ότι για κάθε δείγμα μεμονωμένα σε υψηλή τιμή pH αυξάνεται η συγγένεια της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης και μη) για την υδατική φάση, οπότε η τιμή του συντελεστή κατανομής μειώνεται. Οι τιμές pKa που αναφέρονται στην διάσταση των τριών όξινων πρωτονίων (-O-H) της κουρκουμίνης έχουν υπολογιστεί στο 7.80, 8.55 και 9.05 (Tonnesen et al., 1985). Η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη παρουσιάζει σχεδόν μηδαμινή διαλυτότητα στο νερό σε χαμηλό pH ($pH<8$), η οποία, όμως, ενισχύεται σημαντικά ($p<0.05$) μετά την ενθυλάκωσή της με την σειρά σε: κύτταρα>MS>β-cd. Πιθανότατα οι αλληλεπιδράσεις της κουρκουμίνης με το μέσο ενθυλάκωσης (κύτταρα, β-cd, MS) προσδίδουν διαλυτοποιητικές ικανότητες, αυξάνοντας την διασπορά της κουρκουμίνης και περιορίζουν την συσσωμάτωσή της στην υδατική φάση. Ομοίως, η αύξηση στην υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης μετά την ενθυλάκωση της σε β-cd και MS, έχει, επίσης, αναφερθεί από τους Tonnesen et al., (2002) και Yu et al., 2010, αντίστοιχα. Αντίστοιχα, στις μικροκάψουλες των κυττάρων, η αυξημένη συγγένεια της κουρκουμίνης για την υδατική φάση μπορεί να αποδοθεί στις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβοι δεσμοί) της κουρκουμίνης με υδρόφιλα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. γλυκάνες, μαννοπρωτεΐνες) (Shi et al., 2008), και με τις πολικές

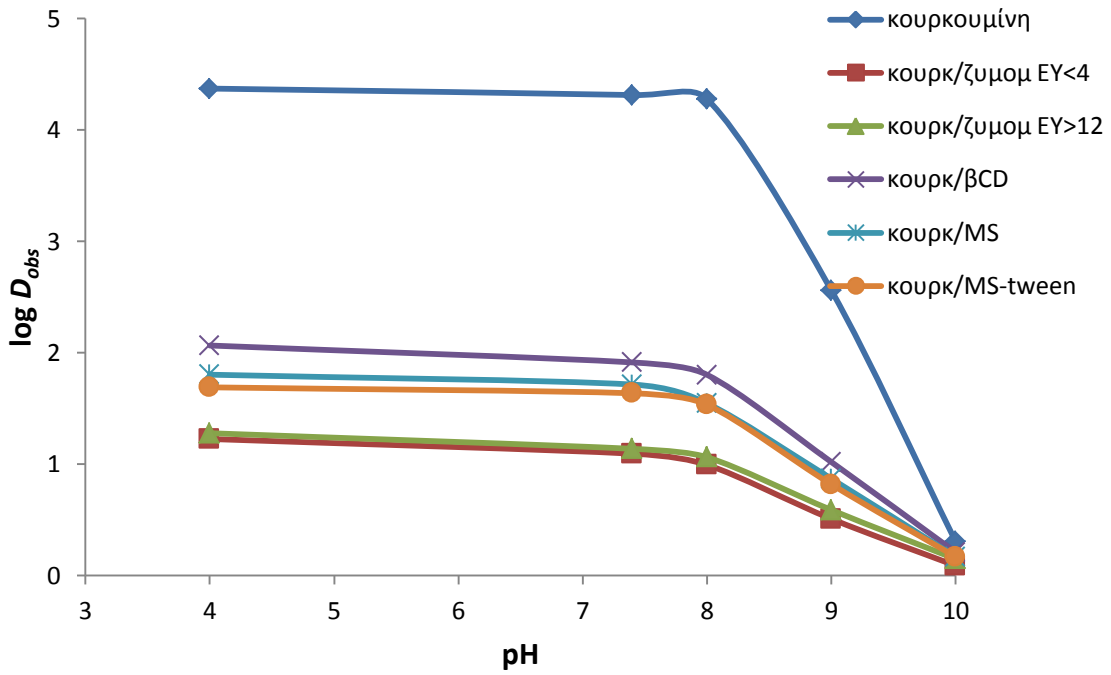
κεφαλές των φωσφολιπιδίων της διπλοστοιβάδας (Maiti et al., 2007). Αν και τα κύτταρα είναι αδιάλυτα στο νερό, αλλά υδατοδιαλυτά εντός των υδρόφιλων τμημάτων τους, υπό την παρουσία νερού είναι πιθανό τα λιπίδια τους να επαναδιοργανώνονται στην διαχωριστική επιφάνεια νερού-λιπιδίου, δρώντας ως επιφανειοδραστικά (surfactant). Εφόσον τα μεμβρανικά λιπίδια των κυττάρων έχουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες, είναι πιθανό να αυξάνουν το ποσοστό της κουρκουμίνης στην υδατική φάση.

Σε αλκαλικές συνθήκες τα μόρια της κουρκουμίνης είναι ασταθή και, αν και αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητά τους, ταυτόχρονα αυξάνεται και η αποικοδόμησή τους σε φερουλικό οξύ και φερουλόυλ-μεθάνιο (Tonnesen et al., 1985). Έτσι, σε αυτές τις συνθήκες παρατηρείται μια αύξηση για την συγγένεια της κουρκουμίνης για την υδατική φάση, το οποίο ερμηνεύει τις χαμηλές τιμές D_{obs} , κυρίως σε pH 10, ακόμα και για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη (τιμή D_{obs} 2.04). Ο συντελεστής κατανομής των δειγμάτων προσδιορίστηκε επίσης σε μίγμα ελαίου/νερού και τα αποτελέσματα είναι όμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν για το σύστημα οκτανόλη/pH 7.4.. Η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη παρουσιάζει μια σχετικά υψηλή τιμή D_{obs} η οποία ελαττώνεται κατά περίπου, 803, 346 και 228-φορές μετά την ενθυλάκωση της στα κύτταρα, το MS και την β-CD, αντίστοιχα.

Πίνακας 9.1. *Ο συντελεστή κατανομής (D_{obs}) των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης στα κύτταρα (δείγμα 6 με ΕΥ 3.3 %, δείγμα 1 με ΕΥ 31.8 %), στην β-CD (F.D.) και το MS σε μίγμα οκτανόλης/νερό. Τα σύμπλοκα κουρκουμίνης/β-CD (K.M.I, K.M.II, C.E., C.P.) παρουσιάζουν το ίδιο προφίλ με το F.D.*

		Ενθυλακωμένη κουρκουμίνη				
pH	κουρκουμίνη	κύτταρα (ΕΥ 3.3%)	κύτταρα (ΕΥ 31.8%)	β-CD	MS	MS/tween
4	23519	16.86	19.01	116.42	63.70	49.04
7.4	20584	12.45	13.77	82.05	51.94	43.34
8	18928	9.89	11.57	63.55	35.19	34.19
9	363.08	3.24	3.89	10.47	7.41	6.61
10	2.04	1.23	1.41	1.62	1.48	1.48
έλαιο	16067.4	19.43	21.33	70.54	48.56	45.35

Στο σχήμα 9.3 παρουσιάζονται οι τιμές *log* D_{obs} των δειγμάτων συναρτήσει του pH. Από το διάγραμμα είναι εμφανή η διαφορά που παρουσιάζει η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη σε σχέση με τις ενθυλακωμένες μορφές της, των οποίων οι τιμές του συντελεστή κατανομής είναι μικρότερες, καθώς αυξάνεται η συγγένεια τους για την υδατική φάση και είναι περισσότερο υδρόφιλες. Η διαφορά ενθυλακωμένης και μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σχεδόν εκμηδενίζεται σε pH 10, ενώ σε χαμηλότερες τιμές pH οι τιμές του συντελεστή είναι λίγο χαμηλότερες για την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη, σε σχέση με την ενθυλακωμένη στην β-CD ή το MS. Η κουρκουμίνη σε όλες τις μορφές της (ενθυλακωμένη και μη) φαίνεται να μην ιονίζεται έως pH περίπου 8, όπου αρχίζει ο ιονισμός της και η τιμή D_{obs} ελαττώνεται.



Σχήμα 9.3. *Τιμές log D των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης στα κύτταρα (δείγμα 6 με %ΕΥ 3.3, δείγμα 1 με %ΕΥ 31.8), στην β-CD (F.D.) και το MS συναρτήσει του pH.*

Συνοψίζοντας, ο συντελεστής κατανομής της κουρκουμίνης, όπως αναμένεται, είναι άμεσα εξαρτημένος από το pH και η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα τρία μέσα ενθυλάκωσης (κύτταρα, β-CD και MS), μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ποσότητα της κουρκουμίνης στην υδατική φάση ενός τροφίμου.

9.4. *In vitro* προφίλ της διαλυτοποίησης-απελευθέρωσης (*dissolution profile*) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό

Οι οκτώ μικροκάψουλες της κουρκουμίνης με τα κύτταρα, οι πέντε με την β-CD και οι δυο με το MS υποβάλλονται σε *in vitro* έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό (SGF) και συνθετικό παγκρεατικό υγρό (SPF), προκειμένου να εκτιμηθεί το προφίλ διαλυτοποίησης (απελευθέρωσης) της κουρκουμίνης. Η συγκέντρωση της απελευθερωμένης κουρκουμίνης εκφράζεται σε μg/ml. Γενικά, όταν μια μικροκάψουλα προστίθεται σε ένα διάλυμα, η απελευθέρωση του περιεχόμενου της είναι το αποτέλεσμα δύο διαδικασιών: της 'αποσάρθρωσης (disintegration)' και της 'διαλυτοποίησης (dissolution)'. Η αποσάρθρωση αναφέρεται στην γρήγορη διάσπαση της κάψουλας σε μικρά κομμάτια. Τα μόρια τα οποία απελευθερώνεται με την αποσάρθρωση, διαλυτοποιούνται. Αυτές οι δυο διαδικασίες φαίνεται ότι συμβαίνουν διαδοχικά, αλλά στην πραγματικότητα συμβαίνουν ταυτόχρονα. Η διαλυτοποίηση είναι μια πολύ πιο αργή διαδικασία απ' ότι η αποσάρθρωση και εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων της βιοδραστικής ουσίας, από το προφίλ της διαλυτότητας σε σχέση με το pH, από τη χημική συγγένεια για το περιβάλλον μέσο καθώς και από την υδροφιλικότητα-υδροφοβικότητα του μέσου ενθυλάκωσης. Συνήθως ουσίες με μικρή διαλυτότητα, όπως η κουρκουμίνη, χαρακτηρίζονται από αργό ρυθμό διαλυτοποίησης (Melia & Davis, 1989a, b).

Οι μελέτες διαλυτότητας *in vitro* χρησιμοποιούνται ευρέως κυρίως σε φαρμακευτικά προϊόντα (ταμπλέτες), αφού είναι γνωστό ότι για να μπορέσει μια βιοδραστική ουσία να είναι διαθέσιμη για απορρόφηση, πρέπει να απελευθερωθεί από το προϊόν και να διαλυθεί στα γαστρεντερικά υγρά. Για τις μελέτες αυτές γίνεται απομίμηση του φυσιολογικού περιβάλλοντος του γαστρεντερικού συστήματος και συνήθως συσχετίζονται με μελέτες *in vivo* στις οποίες μελετάται το προφίλ στο αίμα (in-vivo-in-vitro correlation, IVIVC). Εξαιτίας της IVIVC συσχέτισης, οι μελέτες διαλυτότητας (dissolution studies) θεωρούνται ως υποκατάστατες για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας μιας βιοδραστικής ουσίας στον ανθρώπινο οργανισμό: *Εάν το προφίλ διαλυτοποίησης μιας ουσίας είναι διαφορετικό από μιας ουσίας αναφοράς, τότε είναι πιθανό η εξεταζόμενη ουσία να συμπεριφέρεται διαφορετικά και στον ανθρώπινο οργανισμό'* (Levy, 1967; Qureshi, 2006). Αυτός είναι και ο λόγος όπου SGF και SPF χρησιμοποιούνται σε μια πληθώρα μελετών για τη διαλυτοποίηση και την απελευθέρωση

πολλών βιοδραστικών ουσιών (Kaewnopparat et al., 2009; Danckwerts et al., 1998; Vertzoni et al., 2005; Kim et al., 2003; Stippler et al., 2004).

Αρχικά τα αποτελέσματα στο SGF, δείχνουν ότι κατά την 72 h έκθεση δεν υπάρχουν διαφορές ($p>0.05$) στο προφίλ των πέντε β-CD συμπλόκων, καθώς και ούτε μεταξύ των δυο καψουλών με το MS (με ή χωρίς tween). Όσον αφορά τις μικροκάψουλες των κυττάρων δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων 6 και 8 με % ΕΥ <4.0, ούτε μεταξύ των δειγμάτων 1, 2, 3, 4, 5, 7 με % ΕΥ >12.0 έως 30.0%. Αυτό σημαίνει ότι η τιμή % ΕΥ κάθε δείγματος, η οποία συνδέεται άμεσα με την ποσότητα και την θέση των ενθυλακωμένων μορίων κουρκουμίνης στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα, επηρεάζει την ποσότητα της κουρκουμίνης που απελευθερώνεται, αλλά δεν υπάρχει μεταξύ τους γραμμική συσχέτιση. Αντίθετα, η φυσική κατάσταση των κυττάρων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των μικροκαψουλών (πλασμόλυση, παρουσία αιθανόλης) δε φαίνεται να επηρεάζει τις ιδιότητες απελευθέρωσης της κουρκουμίνης.

Στο σχήμα 9.4 παρουσιάζεται το προφίλ της απελευθέρωσης στο SGF της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης καθώς και της ενθυλακωμένης στην β-CD (δείγμα F.D.), το MS/Tween και στα κύτταρα (δείγματα 4 και 6). Αμέσως μετά την προσθήκη των δειγμάτων στο SGF, η συγκέντρωση της κουρκουμίνης είναι: 4.23 μg/ml (μη-ενθυλακωμένη)< 8.00 μg/ml (ενθυλακωμένη σε κύτταρα, δείγμα 4 με ΕΥ> 12%)< 11.05 μg/ml (ενθυλακωμένη σε κύτταρα, δείγμα 6 με ΕΥ < 4%)< 13.54 μg/ml (ενθυλακωμένης στο MS) < 21.92 μg/ml (ενθυλακωμένη σε β-CD). Μετά από 30 min, όπου συνήθως αρχίζει η γαστρική εκκένωση και είναι ο ελάχιστος χρόνος παραμονής μιας κάψουλας στο στομάχι (Kong & Singh, 2008), η σειρά είναι πανομοιότυπη: 5.95 μg/ml (μη-ενθυλακωμένη)< 12.66 μg/ml (ενθυλακωμένη σε κύτταρα, δείγμα 4 με ΕΥ> 12%)< 13.78 μg/ml (ενθυλακωμένη σε κύτταρα, δείγμα 6 με ΕΥ < 4%)< 25.54 μg/ml (ενθυλακωμένης στο MS) < 29.43 μg/ml (ενθυλακωμένη σε β-CD). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ακόμα από τα πρώτα στάδια της έκθεσης στο SGF, η συγκέντρωση της κουρκουμίνης είναι μεγαλύτερη στην ενθυλακωμένη απ΄ ότι στη μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται μετά από σχεδόν 3 ώρες για τις κάψουλες των β-CD και MS, μετά από 12 h για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη και μετά από 48 h για τι μικροκάψουλες των κυττάρων, είναι προφανές ότι η απελευθέρωση-διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης από την β-CD και το MS γίνεται γρήγορα, σε αντίθεση με τις μικροκάψουλες των κυττάρων, όπου η απελευθέρωση γίνεται αργά και

σταδιακά και διαρκεί αρκετές ώρες, πιθανότατα λόγω της παρουσίας της κυτταρικής μεμβράνης και του εξωτερικής πρωτεϊνικής στοιβάδας του τοιχώματος.

Η διάρκεια της γαστρικής εκκένωσης εξαρτάται από τη θερμιδική αξία του γεύματος, τη σύσταση και το μέγεθος του τροφίμου. Οι Kong et al., (2008) αναφέρουν ότι ο μέσος χρόνος όπου το 50 % του προς πέψη φαγητού εκκενώνεται ($t_{1/2}$) κυμαίνεται από 10 έως 60 min για τα υγρά γεύματα, ενώ τα στερεά αποβάλλονται από το στομάχι τελείως μετά από περίπου 3 με 4 h. Έχει βρεθεί τιμή $t_{1/2}$ 277min για την γαστρική εκκένωση 1692 γρ. γεύματος κρέατος. Από τα αποτελέσματα του σχήματος 9.4, φαίνεται ότι μετά από επώαση 3 h η συγκέντρωση της μη ενθυλακωμένης κουρκουμίνης στο SGF είναι 22.31 μg/ml, ενώ μετά την ενθυλάκωση η συγκέντρωση της αυξάνεται κατά 8.5% (κύτταρα, δείγμα 6 με EY<4.0%), κατά 27.2 % (κύτταρα, δείγμα 4 με EY> 12%), κατά 64.6 % (MS) και κατά 150% (β-CD). Αυτό φανερώνει αφενός ότι η διαλυτότητα της κουρκουμίνης στο SGF αυξάνεται δραματικά μετά την ενθυλάκωση της στην β-CD και το MS και αφετέρου ότι η κουρκουμίνη απελευθερώνεται αργά από τις μικροκάψουλες των κυττάρων, κυρίως από εκείνες με % EY < 4.0, στις οποίες η κουρκουμίνη βρίσκεται ενσωματωμένη εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Περαιτέρω έκθεση στο SGF, φαίνεται να ενισχύει την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες των κυττάρων, σε αντίθεση με τις ενθυλακωμένες μορφές με το MS και την β-CD: μετά από επώαση 72 h, η συγκέντρωση της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης στο SGF είναι 29.60 μg/ml, μικρότερη κατά 30.95%, 70.68%, 77.50% και 95.94% απ' ότι στο MS, στο δείγμα 6 κυττάρων, στο δείγμα 4 κυττάρων και στην β-CD, αντίστοιχα. Είναι εμφανές ότι η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης ενισχύει την διαλυτότητα της στο SGF. Αυτό αποδίδεται στην αλληλεπίδραση των μορίων της κουρκουμίνης με το μέσο ενθυλάκωσης (κύτταρο ζυμομύκητα, β-CD ή MS) καθώς και στις πιθανές αλληλεπιδράσεις της κουρκουμίνης με συστατικά του SGF, όπως επίσης και στην απουσία συσσωμάτωσης (aggregation- agglomeration) και αυξημένης διασποράς (dispersion) των μορίων της όταν αυτή βρίσκεται στην ενθυλακωμένη μορφή. Άλλωστε έχει αναφερθεί ότι ένα υδρόφιλο μέσο ενθυλάκωσης μπορεί να ελαττώσει την επιφανειακή τάση μεταξύ μιας υδρόφοβης ουσίας και του μέσου διάλυσης, αυξάνοντας την διαλυτότητα (Li et al., 2005). Όπως έχει αναφερθεί στους Tonnesen et al., (2002) και Yu et al., (2010) η διαλυτότητα της κουρκουμίνης στο νερό αυξάνεται κατά 10^4 και 1670 φορές παρουσία β-CD και MS, αντίστοιχα. Στην περίπτωση της ενθυλάκωσης στα κύτταρα η σημαντική αύξηση που παρατηρείται στην διαλυτότητα της κουρκουμίνης στο SGF μπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδρασή της με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες

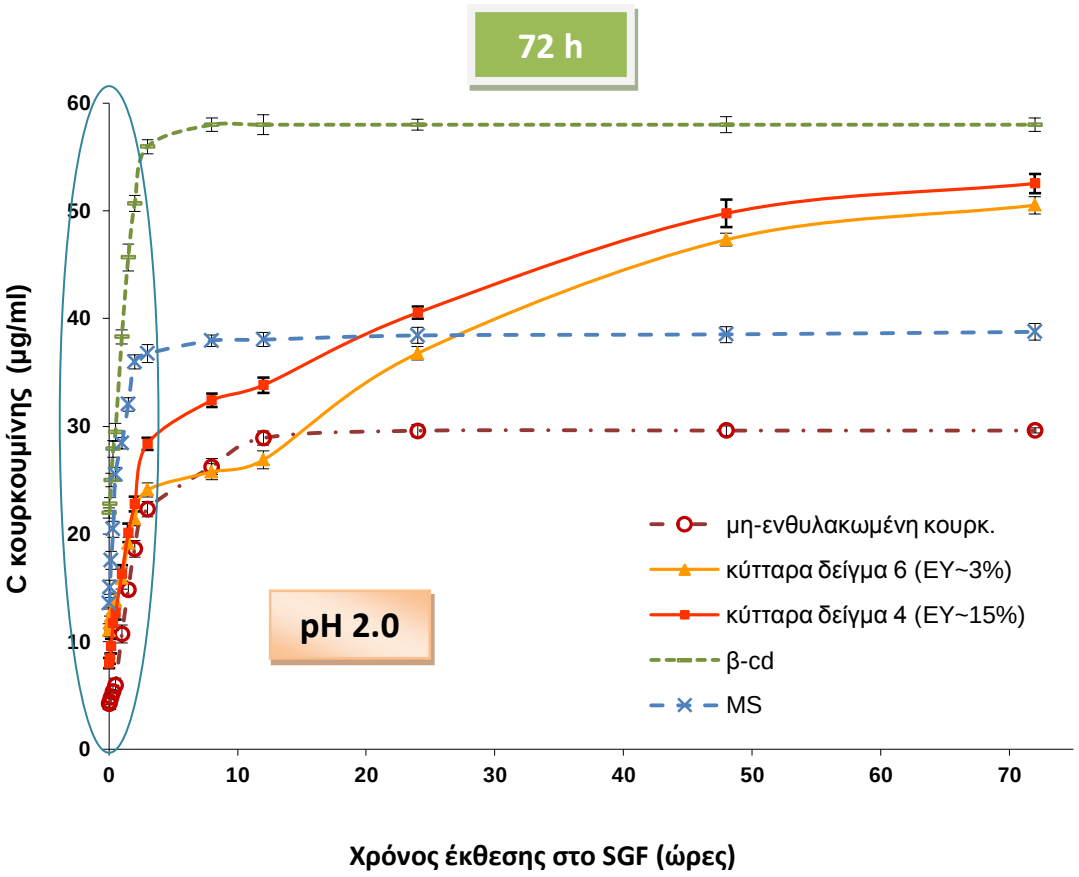
και γλυκάνες) (Shi et al., 2008) ή με την φωσφολιπιδική μεμβράνη (Maiti et al., 2007), ενώ το όξινο pH του γαστρικού υγρού, το οποίο πιθανότατα αποδιοργανώνει σταδιακά το κυτταρικό τοίχωμα, προκαλεί την σταδιακή, αργή απελευθέρωσή της. Αργή απελευθέρωση και αυξημένη υδατοδιαλυτότητα κατά 3-φορές έχει αναφερθεί επίσης για την ενθυλακωμένη στα κύτταρα ρεσβερατρόλη (Shi et al, 2008) η οποία μπορεί να βοηθήσει τον χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα και συνεπώς την βιοδιαθεσιμότητα της, καθώς και για την ενθυλακωμένη κουρκουμίνη σε νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης-πλουρονικού (Das et al., 2010). Στην τελευταία μελέτη βρέθηκε αργή και σταδιακή απελευθέρωση της κουρκουμίνης μέχρι 72 h *in vitro* σε PBS (pH 7.4) και αναφέρεται ότι η αργή απελευθέρωση μπορεί να βοηθήσει την αποτελεσματικότητα της παθητικής στόχευσης καρκινικών ιστών (*effective passive targeting*), αφού το ενθυλακωμένο συστατικό παραμένει για παρατεταμένο χρόνο σε 'κυκλοφορία (*in circulation*)'. Επιπλέον ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει η ανάπτυξη ενθυλακωμένων μορφών δραστικών ουσιών οι οποίες να παρατείνουν τον χρόνο παραμονής στο γαστρικό υγρό (*gastric residence time, GRT*), δηλαδή αποσκοπούν στην λεγόμενη 'γάστρο-συγκράτηση' (*gastro-retention*). Αυτές οι 'ελεγχόμενης-απελευθέρωσης γαστροσυγκρατητικές μορφές' (*controlled release gastroretentive forms, CR-GRDF*) επιτυγχάνουν παρατεταμένη και συνεχή ροή της δραστικής ουσίας στο άνω τμήμα του γαστρεντερικού συστήματος και βελτιώνουν την βιοδιαθεσιμότητα συστατικών τα οποία έχουν μικρή απορρόφηση (*narrow absorption window*) (Hoffman et al., 2004; Whitehead et al., 1998; Chavanpatil et al.,2006). Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων ως μέσο ενθυλάκωσης φαίνεται να διαθέτουν κάποια από τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

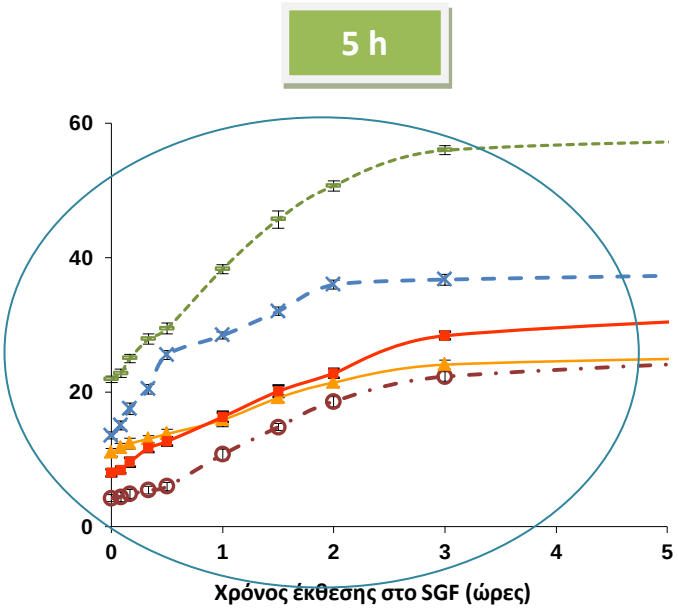
Σε αντίθεση με τις μικροκάψουλες των κυττάρων, οι κάψουλες της β-CD και του MS φαίνεται ότι αποσαρθρώνονται (disintegrate) γρήγορα, άμεσα μετά την προσθήκη τους στο γαστρικό υγρό, αφού είναι υδατοδιαλυτά συστήματα, αλλά ακόμα και σε αυτές η διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης δεν συμβαίνει άμεσα, αλλά διαρκεί κάποιο χρόνο. Σε μια μελέτη των Dukic-Ott et al., (2007) έχει επίσης βρεθεί ότι >80% των ενθυλακωμένων σε MS υδρόφοβων υδροχλωροθειαζίνης και πιροξικάμης απελευθερώνονται (σταδιακά) σε διάστημα 30 min. Έχει επίσης αναφερθεί (Mourtzinos et al., 2008) ότι η απελευθέρωση στο νερό ενός ενθυλακωμένου συστατικού στο MS είναι πιθανό να καθυστερεί λόγω της χημικής συγγένειας του συστατικού με το MS. Σε αυτή την μελέτη βρέθηκε ότι μετά από 5 min διασπορά σε νερό, περίπου το 80% της ενθυλακωμένης στο MS γερανιόλης απελευθερώνεται, σε αντίθεση με την θυμόλη, όπου μόνο το 26% της ενθυλακωμένης στο MS απελευθερώνεται, το οποίο αυξάνεται

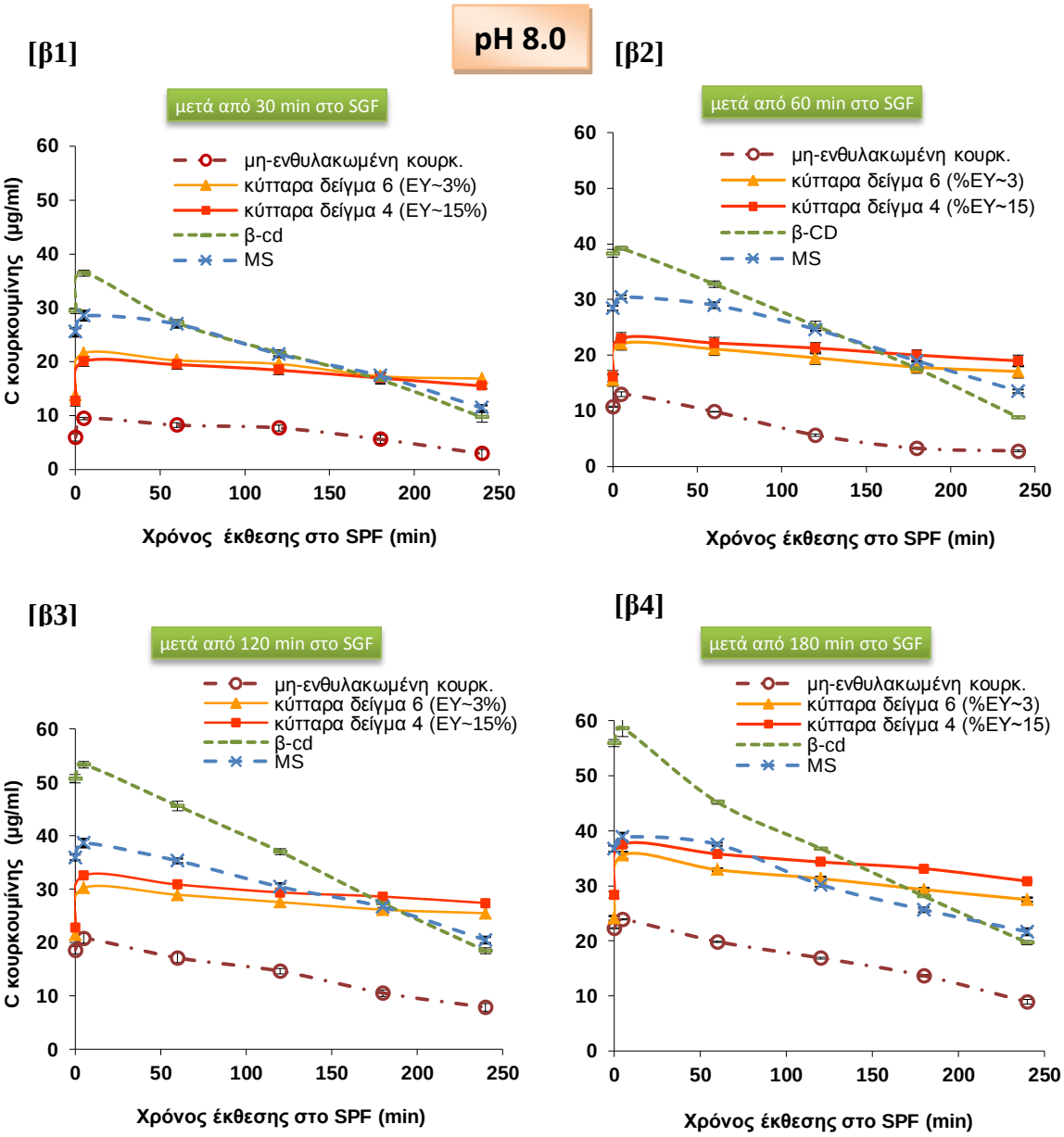
ελάχιστα (30%) ακόμα και μετά από 10 h επώασης. Έχει επίσης βρεθεί (Onofre et al., 2009) ότι οι ιδιότητες απελευθέρωσης μιας ουσίας από το MS μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με την σύσταση και την προέλευσή του. Άλλωστε ακόμα και η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη διαλύεται σταδιακά και όχι άμεσα (σε χρόνο μηδέν), όπως φαίνεται στο σχήμα 9.4, πιθανότατα λόγω της υδροφοβικότητας και της συσσωμάτωση των μορίων της τα οποία περιορίζουν την επαφή τους με τα μόρια νερού. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στην μελέτη των Esposito et al., (2002) για την απελευθέρωση της βιταμίνης C από μικροσωματίδια μεθακρυλίου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0, όπου ακόμα και για την μη-ενθυλακωμένη βιταμίνη η διαλυτότητα της έφτασε σε πλατώ μετά από 4-5 h. Ομοίως οι Manolikar et al., (2003) έδειξαν ότι η ελεύθερη ισοπροτουρόνη διαλυτοποιείται μόλις σε ποσοστό 17% μετά από 2 h σε νερό, σε αντίθεση με το σύμπλοκο της με β-CD (παρασκευασμένα με τις μεθόδους της συνεξάτμισης και συνκαταβύθισης) το οποίο διαλύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό και πιο γρήγορα. Καλύτερη διαλυτοποίηση έχει επίσης αναφερθεί και για το κετοπρόφεν μετά την ενθυλάκωση του σε CDs (Mura et al., 1999).

Γενικά, η απελευθέρωση μιας βιοδραστικής ουσίας από μια μήτρα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες: από την διαλυτότητα και το μέγεθος μορίων του συστατικού, από την διάχυση του διαμέσου της μήτρας καθώς και από την ικανότητα διόγκωσης (swelling) και βιοαποικοδόμησης της μήτρας (Lidner et al., 1996; Singh et al., 2009). Στην μελέτη των Zhao et al., (2007) αναφέρεται ότι το ενθυλακωμένο συστατικό μπορεί να απελευθερωθεί από την μήτρα μέσω διάχυσης διαμέσου των πόρων της ή να μετακινηθεί μεταξύ των πόρων – κοιλοτήτων εξαιτίας κινήσεων των αλυσίδων της μήτρας. Παρόλα αυτά όταν μια κάψουλα έρχεται σε επαφή με το νερό εισέρχεται εντός της μήτρας και αυξάνεται η εσωτερική πίεση της κάψουλας, με αποτέλεσμα να διογκώνεται και να καταστρέφεται (Melia et al., 1989). Η τελευταία παρατήρηση έχει, επίσης, αναφερθεί για τα κύτταρα των ζυμομυκήτων (Dardelle et al., 2007) στα οποία οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες του κυτταρικού τοιχώματος είναι ικανά να προσελκύουν και να σταθεροποιούν μόρια νερού. Ως αποτέλεσμα της πρόσληψης νερού το κυτταρικό τοίχωμα διογκώνεται, δημιουργώντας τρύπες στην πρωτεϊνική στοιβάδα, επιτρέποντας την διάχυση των ενθυλακωμένων μορίων στο εξωτερικό περιβάλλον.

[α]


72 h
C κουρκουμίνης (μg/ml)
pH 2.0
μη-ενθυλακωμένη κουρκ.
κύτταρα δείγμα 6 (EY~3%)
κύτταρα δείγμα 4 (EY~15%)
β-cd
MS
Χρόνος έκθεσης στο SGF (ώρες)


5 h
Χρόνος έκθεσης στο SGF (ώρες)



Σχήμα 9.4. *Συγκέντρωση (μg/ml) της κουρκουμίνης που απελευθερώνεται και διαλύεται (dissolution profile) από τις μικροκάψουλες των κυττάρων (δείγμα 6 με ΕΥ 3.3 %, δείγμα 4 με ΕΥ 14.8 %), από το σύμπλοκο της β-CD (που παρασκευάστηκε με την μέθοδο F.D.) και την ενθυλακωμένη μορφή της κουρκουμίνης στο MS/tween σε: α) συνθετικό γαστρικό υγρό (SGF) και β) συνθετικό παγκρεατικό υγρό (SPF) αφού έχει προηγηθεί 30 min (β1), 60 min (β2), 120 min (β3) και 180 min (β4) έκθεση στο SGF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=3). Το δείγμα 8 των κυττάρων παρουσιάζει το ίδιο προφίλ με το δείγμα 6, ενώ τα δείγματα 1, 2, 3, 5, 7 ίδιο με το δείγμα 4 (p>0.05). Όμοια τα σύμπλοκα κουρκουμίνης/β-CD (K.M.I, K.M.II, C.E., C.P.) παρουσιάζουν το ίδιο προφίλ με το F.D., ενώ η κουρκουμίνη/MS/tween με την κουρκουμίνη/MS.*

Προκειμένου να γίνει μίμηση της περιοδικής γαστρικής εκκένωσης προς το λεπτό έντερο, διαλύματα των δειγμάτων στο SGF, μετά από επώαση από 30 min έως 3 h, εκτίθενται σε συνθετικό παγκρεατικό υγρό (pH 8.0) (SPF) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.4.β. Η συγκέντρωση της κουρκουμίνης σε όλα τα δείγματα αυξάνεται κατά τα πρώτα 5 min της έκθεσης στο SPF, πιθανότατα λόγω της υψηλής τιμή του pH, όπου η κουρκουμίνη διίσταται και έχει μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα. Ωστόσο, περαιτέρω έκθεση στο SPF ελαττώνει την συγκέντρωση της κουρκουμίνης, πιθανότατα λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει στο αλκαλικό pH. Ο υψηλότερος ρυθμός αποικοδόμησης παρατηρείται για την μη-ενθυλακωμένη και για την ενθυλακωμένη στην β-CD κουρκουμίνη. Λαμβάνοντας ως σημείο αναφοράς τη συγκέντρωση της κουρκουμίνης μετά από 5 min από την προσθήκη κάθε δείγματος στο SPF, η ελάττωση που παρατηρείται στην συγκέντρωση της μετά από 30 min στο SGF ακολουθούμενη από 240 min στο SPF (σχήμα 9.4β1) είναι 68.74%, 73.24% και 59.97% για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη και για τις ενθυλακωμένες μορφές της στην β-CD και το MS, αντίστοιχα. Αντίθετα, η συγκέντρωση της κουρκουμίνης στις μικροκάψουλες των κυττάρων ελαττώνεται κατά 22.53 % (δείγμα 4, EY> 12.0%) και κατά 21.75 % (δείγμα 6, EY<4.0%). Παρόμοια είναι η τάση που παρατηρείται μετά από έκθεση των δειγμάτων στο SGF για 60 min (σχήμα 9.4, β2), 120 min (σχήμα 9.4, β3) και 180 min (σχήμα 9.4, β4). Η αυξημένη σταθερότητα στο SPF που παρατηρείται για την κουρκουμίνη που απελευθερώνεται από τις μικροκάψουλες των κυττάρων είναι σημαντική για την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της, δεδομένου ότι η απορρόφηση της γίνεται στο λεπτό έντερο.

Συνοπτικά, η γαστρική έκθεση των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης αποδεικνύει ότι: 1) όλες οι μικροκάψουλες, ακόμα και οι μικροκάψουλες των κυττάρων για τις οποίες τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι περιορισμένα, είναι ικανές να απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους σε συνθετικά γαστρεντερικά υγρά. 2) η ενθυλάκωση σε διαφορετικά μέσα επηρεάζει/διαφοροποιεί ή ακόμα ενισχύει το προφίλ διαλυτοποίησης (*dissolution profile*) και την διαλυτότητα της κουρκουμίνης, η οποία ενισχύεται, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ενθυλάκωσης στην β-CD και το MS. Η ενθυλάκωση στα κύτταρα επιβραδύνει την απελευθέρωση και την διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης και περιορίζει την αλκαλική αποικοδόμηση της στο SPF.

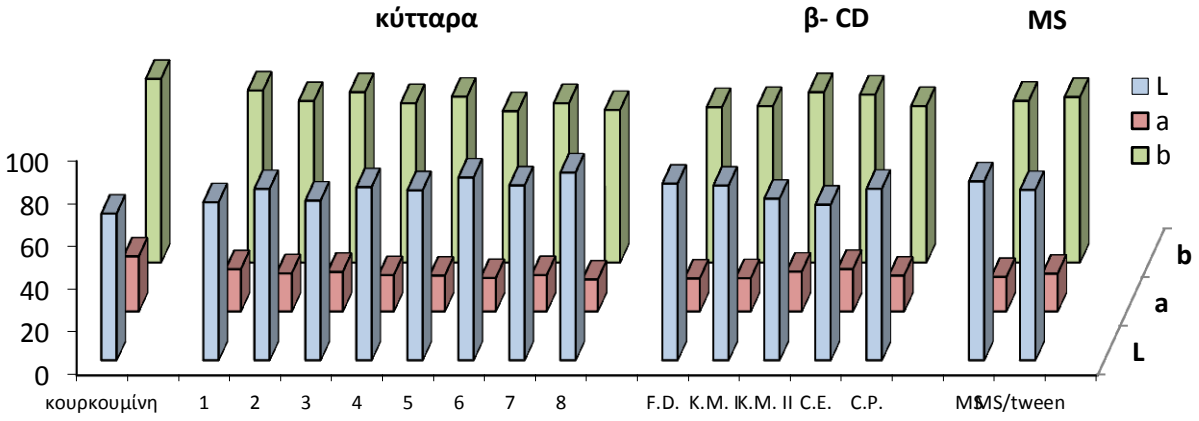
9.5. Χρωστική ικανότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Στον πίνακα 9.2 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά χρώματος (τιμές L^*, a^*, b^*) της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης καθώς και των μικροκαψουλών της με τα κύτταρα του *S. cerevisiae*, την β-CD και το MS, τα οποία παρασκευάστηκαν με τις διάφορες μεθόδους. Η τιμή L^* αποτελεί μέτρο της φωτεινότητας ενός δείγματος, η τιμή του a^* κυμαίνεται από -100 (πράσινο) έως +100 (κόκκινο) και η τιμή του b^* από -100 (μπλε) έως +100 (κίτρινο),

Όλες οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερες τιμές στην φωτεινότητα (L^*), και μικρότερες τιμές a^* και b^* σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη, υποδηλώνοντας ότι στις μικροκάψουλες ελαττώνεται η ένταση του κίτρινου χρώματος της κουρκουμίνης και αυξάνεται η φωτεινότητά τους. Η μεγαλύτερη τιμή στην φωτεινότητα (L^*) και η μικρότερη στις τιμές a^* (κοκκινότητα) και b^* (κιτρινότητα) παρατηρείται στις μικροκάψουλες που χαρακτηρίζονται από χαμηλές τιμές %ΕΥ, στις οποίες υπάρχει περίσσεια του μέσου ενθυλάκωσης (δείγματα κυττάρων 6 και 8, MS και β-CD εκτός των KMII και CE). Από τις μικροκάψουλες των κυττάρων τα δείγματα 1 και 3 (με %ΕΥ περίπου 30) χαρακτηρίζονται από την μεγαλύτερη τιμή της έντασης του κίτρινου χρώματος (b^*). Στα σύμπλοκα κουρκουμίνης/β-CD η μεγαλύτερη διαφοροποίηση στις L^*, a^*, b^* τιμές παρατηρείται για σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους F.D., K.M.I και C.P. Τα χαρακτηριστικά χρώματος των ενθυλακωμένων μορφών της κουρκουμίνης στο MS δεν διαφέρουν μεταξύ τους ($p>0.05$). Συνοπτικά, η ενθυλάκωση τροποποιεί τα χαρακτηριστικά χρώματος της κουρκουμίνης, αυξάνοντας τη φωτεινότητα και ελαττώνοντας την ένταση του κίτρινου χρώματος, καθιστώντας πιθανή την εφαρμογή της σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα, όπου η έντονη χρωστική της ικανότητα είναι, εν μέρει, ανεπιθύμητη.

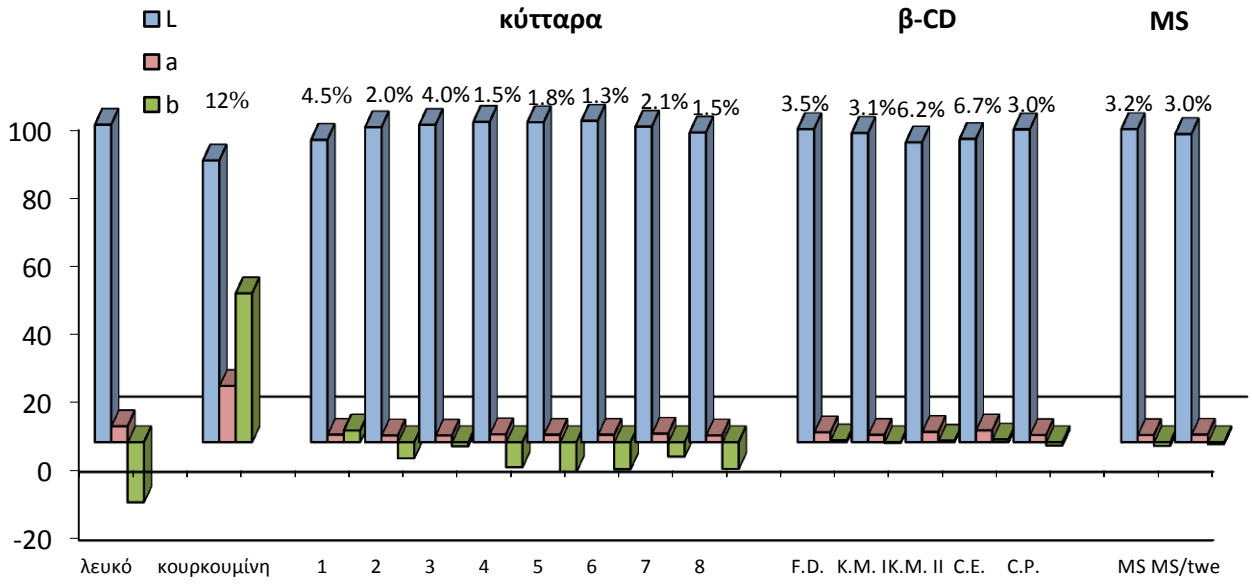
Πίνακας 9.2. *Χαρακτηριστικά χρώματος (L^*, a^*, b^*) των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης σε κύτταρα, β-CD και MS (n=3).*

	ΔE	L^*	α^*	b^*
Κουρκουμίνη	113	68.4±0.22	25.7±0.32	85.8±0.27
Μικροκάψουλες:				
Κύτταρα				
1	110	73.8±0.95	19.7±0.62	80.3±0.55
2	111	80.0±0.77	17.8±0.84	75.4±0.72
3	110	74.6±0.76	18.4±0.71	79.6±0.59
4	111	80.8±0.65	16.9±0.85	74.4±0.66
5	112	79.3±0.65	16.6±0.80	77.5±0.41
6	110	85.3±0.72	15.5±0.61	70.7±0.68
7	111	81.7±0.99	16.9±0.59	74.4±0.57
8	111	87.7±0.81	14.9±0.78	71.2±0.69
β-CD				
Freeze-dried	111	82.4±0.79	15.3±0.43	72.6±0.43
K.M.I	110	81.5±0.42	15.4±0.38	73.1±0.52
K.M.II	111	75.4±0.64	18.5±0.69	79.6±0.61
Co-Evaporation	110	72.7±0.60	19.8±0.51	78.4±0.49
Co-Precipitation	110	80.1±0.54	16.7±0.47	73.1±0.54
MS				
χωρίς tween 80	112	83.5±0.95	16.1±0.53	75.5±0.34
με tween 80	111	81.5±0.85	17.6±0.69	77.3±0.43



Πολλές εφαρμογές της κουρκουμίνης περιορίζονται από την κίτρινη χροιά της, η οποία βάφει το δέρμα, το τρόφιμο ή το ύφασμα. Προκειμένου να εκτιμηθεί η ικανότητα της κουρκουμίνης να προσκολλάται, τα δείγματα της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένα και μη) διασπείρονται σε λευκό χαρτί και μετά από την αποβολή τους μετρήθηκε η χρώση (staining) στο λευκό χαρτί. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.5. Το χαρτί στο οποίο προσκολλήθηκε η μη-

ενθυλακωμένη κουρκουμίνη έχει υψηλές L^*, a^*, b^* τιμές, σε αντίθεση με αυτό στο οποίο προσκολλήθηκε η ενθυλακωμένη (σε κύτταρα, β-CD, MS) στα οποία η τιμή του L^* αυξάνεται σημαντικά, ενώ οι τιμή του a^* και ιδιαίτερα του b^* ελαττώνεται. Η μεγαλύτερη ελάττωση στην τιμή του b^* παρατηρείται για τις μικροκάψουλες των κυττάρων. Η μέση τιμή του L^* στο λευκό χαρτί που προσκολλήθηκε η ενθυλακωμένη κουρκουμίνη είναι 96.9±0.95 και 2.13±0.28 καθώς και -2.42±0.43 για τις a^*και b^* τιμές, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα μετρήθηκε σταθμικά και η % κ.β. συγκράτηση της κουρκουμίνης στο λευκό χαρτί και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.5. Η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη συγκρατείται σε ποσοστό 12±0.9%, ενώ η ενθυλακωμένη στα κύτταρα, την β-CD και το MS σε ποσοστό κατά μέσο όρο 2.3%, 4.5% και 3.1%, αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι η ενθυλακωμένη κουρκουμίνη έχει μικρότερη ικανότητα συγκράτησης στο λευκό χαρτί σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη, η οποία έχει την τάση να σχηματίζει συσσωματώματα και να προσκολλάται. Η μεγαλύτερη συγκράτηση στο χαρτί από τα ενθυλακωμένα δείγματα παρατηρείται για τα σύμπλοκα με την β-CD (K.M.II και C.E. με συγκράτηση 6.2±0.5% και 6.7±0.6%, αντίστοιχα), πιθανότατα λόγω της παρουσίας σε αυτά μικρής ποσότητας μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης, καθώς και για τα δείγματα 1 και 3 των μικροκαψουλών των κυττάρων (με συγκράτηση 4.5±0.4% και 4.0±0.5%, αντίστοιχα) λόγω της υψηλής % κ.β. περιεκτικότητα τους σε κουρκουμίνη. Οι υπόλοιπες μικροκάψουλες των κυττάρων παρουσιάζουν παρόμοια συγκράτηση ($p>0.05$) με μέση τιμή 1.7%.



Σχήμα 9.5. *Χαρακτηριστικά χρώματος (τιμές L^*, a^*, b^*) λευκού χαρτιού μετά την προσκόλληση κουρκουμίνης μη-ενθυλακωμένης και ενθυλακωμένης σε κύτταρα, β-CD και MS. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται και οι τιμές της % κ.β. συγκράτησης της κουρκουμίνης.*

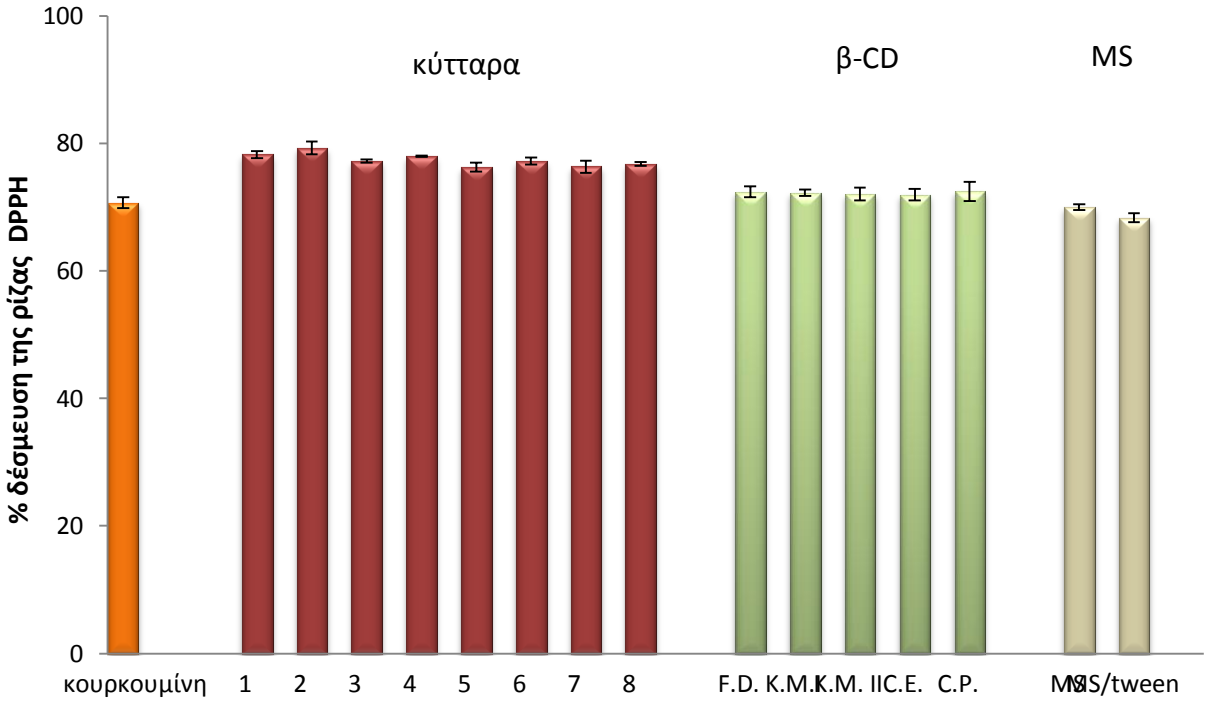
Συνοπτικά, η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη προσκολλάται στο λευκό χαρτί και αφήνει έντονη κίτρινη χροιά, σε αντίθεση με τις ενθυλακωμένες μορφές της, οι οποίες έχουν μικρότερη προσκολλητική ικανότητα και αφήνουν πιο ήπια χρώση στο λευκό χαρτί. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη των Aziz et al., (2007), όπου βρέθηκε ότι η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε ζελατίνη με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό, ελάττωσε την προσκολλητική της ικανότητα.

9.6. Αντιοξειδωτική δραστικότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Η αντιοξειδωτική δραστικότητα της κουρκουμίνης έχει βρεθεί ακόμα και 10 φορές μεγαλύτερη από της βιταμίνης Ε. Υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική της δραστικότητα είναι η φαινολική και η μεθόξυ-ομάδα του φαινολικού δακτυλίου και το 1,3-δικετονικό τμήμα της (η κετονική-ενολική δομή) με τον ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου ενισχύει την αντιοξειδωτική της δραστικότητα. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η παρουσία της φαινολικής ομάδας σε *para* θέση (Pari et al., 2008). Χρησιμοποιώντας BHA, BHT, α-τοκοφερόλη και Trolox ως πρότυπα αντιοξειδωτικά, συγκέντρωση κουρκουμίνης 45 μg/ml έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την υπεροξείδωση του λινολενικού οξέος κατά 95.4, 99.7, 84.6 και 95.6 %, αντίστοιχα (Tuba et al., 2008).

Στο σχήμα 9.6 παρουσιάζεται η % ικανότητα δέσμευσης της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης στα κύτταρα, την β-CD και το MS, μετά από εκχύλιση της με διάλυμα αιθανόλη:νερό 4:1 v:v. Όλα τα διαλύματα περιέχουν 60 μg/ml κουρκουμίνη. Η αντιοξειδωτική δραστικότητα όλων των διαλυμάτων που προέρχονται από την εκχύλιση των β-CD συμπλόκων (ανεξάρτητα από την μέθοδο με την οποία παρασκευάστηκαν) είναι σχεδόν πανομοιότυπη με της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης ($p>0.05$). Ομοίως, η αντιοξειδωτική δραστικότητα των διαλυμάτων που προέρχονται από τις ενθυλακωμένες μορφές της κουρκουμίνης στο MS, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης ($p>0.05$). Αντίθετα, η αντιοξειδωτική δραστικότητα της κουρκουμίνης φαίνεται να ενισχύεται σημαντικά ($p<0.05$) από την ενθυλάκωση της στα κύτταρα. Έτσι όλα τα διαλύματα κουρκουμίνης τα οποία εκχυλίστηκαν από τις μικροκάψουλες των κυττάρων, ανεξάρτητα από τον τρόπο που αυτές παρασκευάστηκαν (είδος κυττάρων, παρουσία αιθανόλης) παρουσιάζουν

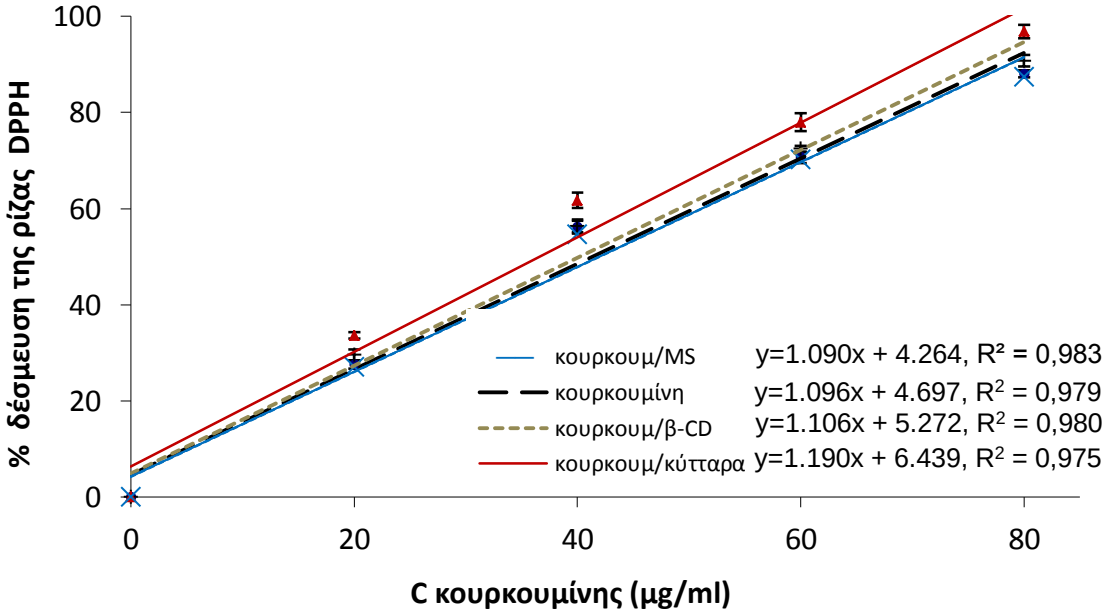
μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα (μέση τιμή 77.4±0.55) σε σχέση με το διάλυμα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (70.7±0.86), της β-CD (μέση τιμή 72.2±0.94) και του MS (μέση τιμή 69.2±0.60). Μεταξύ των δειγμάτων των κυττάρων η μεγαλύτερη τιμή της αντιοξειδωτικής δραστικότητας παρατηρείται για το δείγμα 2 το οποίο παρασκευάστηκε σε υδατικό διάλυμα, και ακολουθούν τα δείγματα 1, 4, 3, 6 και 8, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



Σχήμα 9.6. *% Δέσμευση της ρίζας DPPH• διαλυμάτων τα οποία περιέχουν 60 μg/ml κουρκουμίνης ενθυλακωμένης σε κύτταρα, β-CD και MS. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει μέση τιμή ± S.D (n=3).*

Στο σχήμα 9.7 παρουσιάζονται οι τιμές της % δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH προτύπων αιθανολικών διαλυμάτων κουρκουμίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, σε σύγκριση με αιθανολικά διαλύματα που προέρχονται από τις ενθυλακωμένες μορφές της κουρκουμίνης στα κύτταρα (δείγμα 4), στην β-CD (F.D.) και στο MS. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων επιβεβαιώθηκε με μέτρηση με HPLC. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0.001$) μεταξύ των μικροκαψουλών των κυττάρων, ούτε και μεταξύ των β-CD συμπλόκων. Τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα δείχνουν ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δραστικότητας και της συγκέντρωσης της κουρκουμίνης. Η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH για τα διαλύματα που προέρχονται από την

ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη είναι 33.7±0.66, 61.7±1.62, 77.9±1.87 και 96.8±1.43 για συγκέντρωση κουρκουμίνης 20, 40, 60 και 80 μg/ml, αντίστοιχα, μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης: 27.7±0.87, 56.3±1.22, 70.7±1.20 και 88.1±0.78. Αντίθετα η αντιοξειδωτική ικανότητα των διαλυμάτων που προέρχονται από την ενθυλακωμένη στο MS ή την β-CD κουρκουμίνη δεν διαφέρουν ($p>0.05$) από την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη: μέση τιμή για την β-CD 29.7±1.14, 56.3±1.47, 72.4±0.72 και 90.8±1.19. Από τις εξισώσεις του διαγράμματος μπορεί να υπολογιστεί για κάθε δείγμα και η τιμή $EC_{50,}$ δηλαδή η συγκέντρωση εκείνη για να επιτευχθεί 50% δέσμευση της ρίζας DPPH: 41.33 μg/ml για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη και 41.95, 40.43 και 36.6 μg/ml για την ενθυλακωμένη στο MS, την β-CD και τα κύτταρα, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη των Shi et al., (2008), όπου βρέθηκε ότι η ικανότητα δέσμευσης του DPPH της ρεσβερατρόλης ήταν μεγαλύτερη στην ενθυλακωμένη στα κύτταρα, απ' ότι στην μη-ενθυλακωμένη. Η αντιοξειδωτική δραστικότητα περίσσειας άδειων κυττάρων στο παρών πείραμα υπολογίστηκε σε περίπου 5.6%, ενώ η β-CD και το MS δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δραστικότητα.



Σχήμα 9.7. *% Δέσμευση της ρίζας DPPH• διαλυμάτων αυξανόμενων συγκεντρώσεων κουρκουμίνης, μη-ενθυλακωμένης, καθώς και ενθυλακωμένης σε κύτταρα (δείγμα 4) , β-CD (F.D.) και MS. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει μέση τιμή ± S.D (n=4).*

Στα παραπάνω πειράματα όπου μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα της κουρκουμίνης, στην περίπτωση της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης προηγήθηκε απεγκλωβισμός της οπότε και

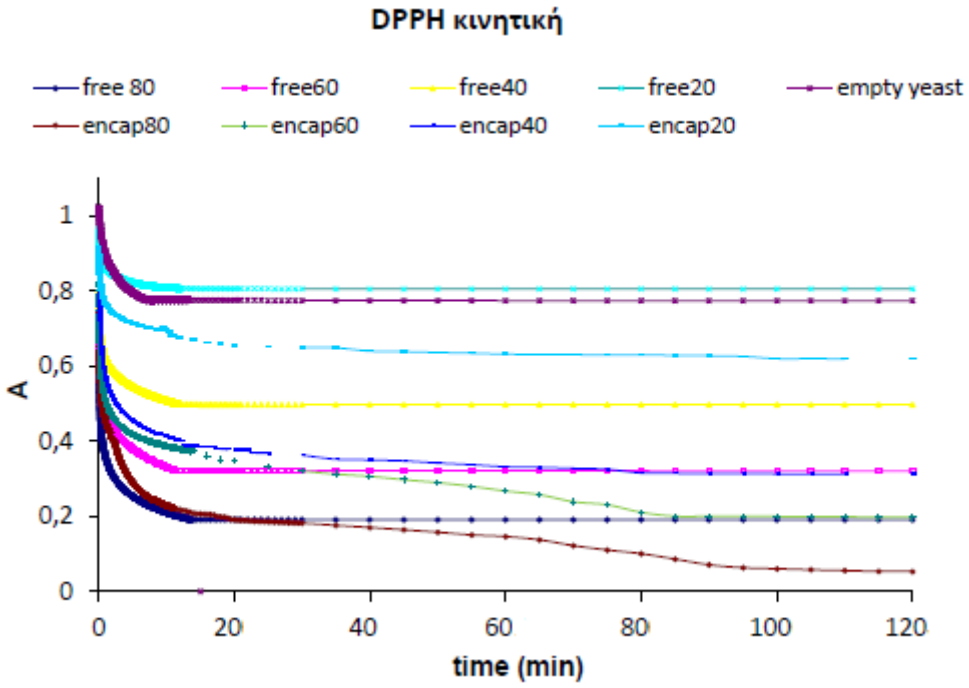
υπολογίστηκε η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης να δρα ως αντιοξειδωτικό με την πάροδο του χρόνου εξετάζεται η κινητική συμπεριφορά της κουρκουμίνης ως δεσμευτής των ελευθέρων ριζών του DPPH χωρίς να προηγηθεί απεγκλωβισμός της. Σε αυτή την περίπτωση κυρίαρχο ρόλο παίζει ο ρυθμός απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες.

Μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων ενθυλακωμένης ή μη κουρκουμίνης (20, 40, 60 και 80 μg/ml) μετράται η απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 515 nm σε συνάρτηση με το χρόνο. Από την αναπαράσταση του διαγράμματος της % εναπομείνουσας ποσότητας DPPH σε συνάρτηση με την συγκέντρωση της κουρκουμίνης μπορεί να υπολογιστεί η τιμή EC_{50}, δηλαδή η ποσότητα της ουσίας που είναι απαραίτητη για να ελαττωθεί η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος DPPH κατά 50%. Ωστόσο στην τιμή αυτή δεν συνυπολογίζεται η επίδραση του χρόνου. Από την αναπαράσταση του χρόνου που απαιτείται για να αποκατασταθεί η κατάσταση ισορροπίας σε σχέση με την συγκέντρωση της κουρκουμίνης, υπολογίζεται η τιμή TEC_{50}, η οποία δηλώνει τον χρόνο που απαιτείται για να φτάσει σε ισορροπία συγκέντρωση του δείγματος ίση με EC_{50}. Η Αντιοξειδωτική Δραστικότητα (*Antiradical efficiency, AE*), η οποία, σε αντίθεση με την EC_{50}, λαμβάνει υπόψη και την παράμετρο του χρόνου αντίδρασης, υπολογίζεται ως εξής:

$$AE= 1/(EC_{50}*TEC_{50})$$

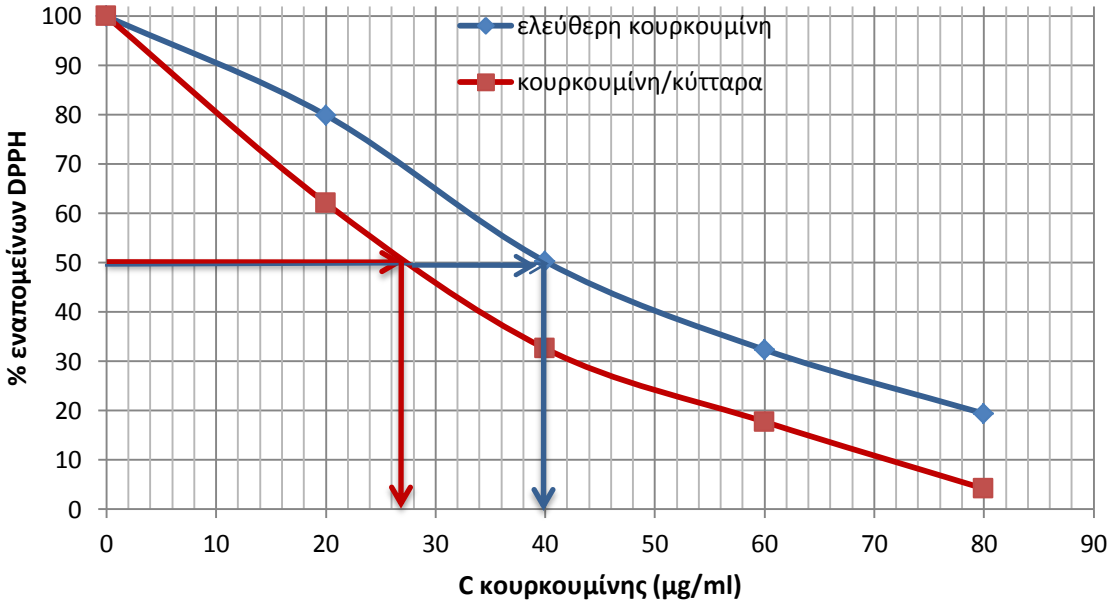
Στο σχήμα 9.8 παρουσιάζονται οι καμπύλες που αφορούν την δέσμευση του DPPH διαφόρων συγκεντρώσεων κουρκουμίνης σε σχέση με τον χρόνο. Τα δείγματα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης, της ενθυλακωμένης στην β-CD (και τα πέντε σύμπλοκα) και το MS δεν διαφέρουν μεταξύ τους, γι' αυτό παραλείπονται από τα διαγράμματα, σε αντίθεση με τα δείγματα της ενθυλακωμένης στα κύτταρα κουρκουμίνης, τα οποία μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά. Σε όλα τα δείγματα είναι εμφανές ότι η δέσμευση του DPPH μπορεί να χωριστεί σε δυο στάδια: στο πρώτο παρατηρείται μια γρήγορη δέσμευση της ρίζας ακολουθούμενη από έναν αργό ρυθμό ιδιαίτερα για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης. Η διάρκεια της γρήγορης δέσμευσης είναι μικρότερη από 5 min για όλα τα δείγματα. Η ύπαρξη ενός αργού και ενός γρήγορου σταδίου μπορεί να ερμηνεύσουν την συνεισφορά των δραστικών ομάδων της κουρκουμίνης στην αντιοξειδωτική της δραστικότητα: το γρήγορο στάδιο πιθανότατα αποδίδεται στα πολύ δραστικά φαινολικά υδροξύλια της κουρκουμίνης τα οποία αντιδρούν με την ρίζα DPPH παράγοντας ένα πολύ λιγότερο δραστικό

προϊόν. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι μικροκάψουλες των κυττάρων παρουσιάζουν παρατεταμένη (μεγαλύτερης διάρκειας) αντιοξειδωτική δράση και ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει η δράση τους σε κατάσταση ισορροπίας (steady state) είναι μεγαλύτερος σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη ή την ενθυλακωμένη στην β-CD ή το MS, εξαιτίας πιθανότατα της αργής απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες των κυττάρων.



Σχήμα 9.8. *Κινητικές καμπύλες της δέσμευσης της ρίζας DPPH διαλυμάτων κουρκουμίνης (μη-ενθυλακωμένης ή ενθυλακωμένης σε κύτταρα, δείγμα 4) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι μικροκάψουλες στην β-CD και το MS δεν διαφέρουν από την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη.*

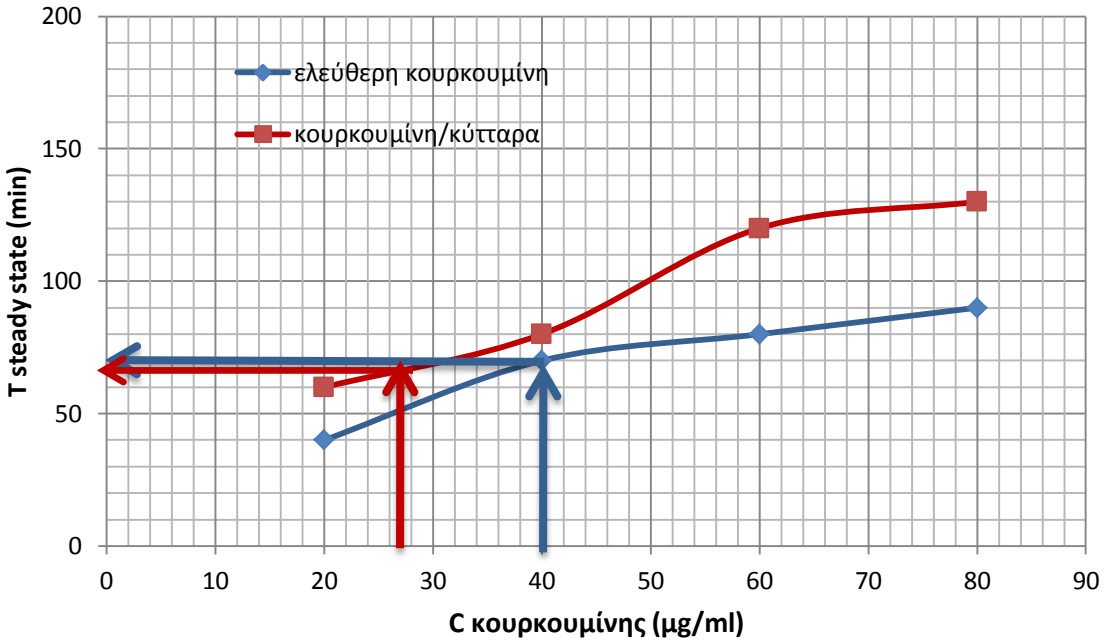
Στο σχήμα 9.9 παρουσιάζεται ο προσδιορισμός της EC_{50}, για το δείγμα των μικροκαψουλών των κυττάρων και για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Όσο μικρότερη είναι η τιμή EC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δραστικότητα του δείγματος. Την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του σχήματος 9.6 και 9.7, παρουσιάζει η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη (EC_{50} 27μg/ml) συγκριτικά με την μη-ενθυλακωμένη και την ενθυλακωμένη στην β-CD και το MS κουρκουμίνη (EC_{50} 40, 37.5 και 40.21 μg/ml, αντίστοιχα).



Σχήμα 9.9. *Προσδιορισμός της EC_{50} των μικροκαψουλών των κυττάρων και της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης.*

Στο σχήμα 9.10 παρουσιάζεται ο προσδιορισμός της TEC_{50} για το δείγμα των μικροκαψουλών των κυττάρων και για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη, δηλαδή του χρόνου που απαιτείται για να φτάσει το δείγμα με συγκέντρωση EC_{50} στην κατάσταση ισορροπίας. Η τιμή για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη είναι 70 min, για την ενθυλακωμένη στην β-CD και το MS λίγο μεγαλύτερες (μέση τιμή 78.54 και 74.21 min, αντίστοιχα), και για την ενθυλακωμένη στα κύτταρα σχεδόν η ίδια (65 min). Από το διάγραμμα του σχήματος 9.10, ωστόσο, είναι εμφανές ότι για συγκεκριμένη συγκέντρωση κουρκουμίνης η ενθυλακωμένη στα κύτταρα προσφέρει μεγαλύτερης διάρκειας αντιοξειδωτική δραστικότητα, ανάλογη με το προφίλ της απελευθέρωσης της.

Από τις τιμές EC_{50} και TEC_{50} μπορεί να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενθυλάκωση στα κύτταρα την ενισχύει κατά 1.58 φορές (ΑΕ 0.57×10^{-3}) σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη (ΑΕ 0.36×10^{-3}), και με την ενθυλακωμένη στην β-CD (ΑΕ 0.34×10^{-3}) και το MS (ΑΕ 0.34×10^{-3}).



Σχήμα 9.10. *Προσδιορισμός της TEC_{50} των μικροκαψουλών των κυττάρων και της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης.*

Από όλα τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνουμε ότι η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα (ανεξάρτητα από τις συνθήκες παρασκευής) ενισχύει την αντιοξειδωτική δραστικότητα της κουρκουμίνης, σε αντίθεση με την ενθυλάκωση στην β-CD (ανεξάρτητα από τις συνθήκες παρασκευής του συμπλόκου) και το MS (με ή χωρίς tween). Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Shi et al., (2008), όπου αναφέρεται ότι η ενθυλάκωση της ρεσβερατρόλης στα κύτταρα ενίσχυσε την ικανότητά της να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH.

9.7. Συμπεράσματα

Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης είναι ικανή να τροποποιήσει κάποιες φυσικοχημικές ιδιότητές της, οι οποίες θα επηρεάσουν την εφαρμογή της. Η τροποποίηση εξαρτάται καταρχήν από το μέσο ενθυλάκωσης που θα χρησιμοποιηθεί. Έτσι, η β-CD και το MS είναι ιδανικά μέσα για να αυξήσουν την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης καθώς και την διαλυτότητα της σε γαστρικό υγρό. Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* μπορούν επίσης να ενισχύσουν την διαλυτότητα της κουρκουμίνης, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό, και να

προσφέρουν αργή, σταδιακή απελευθέρωση ακόμα και στο όξινο pH του γαστρικού υγρού. Η ενθυλάκωση ελαττώνει την προσκολλητική ικανότητα και τα χαρακτηριστικά χρώματος (τιμές a, b) της κουρκουμίνης, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την αντιοξειδωτική δραστικότητα της, η οποία, ενισχύεται σε μικρό βαθμό από την παρουσία των κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10ο

Επίδραση της ενθυλάκωσης στην σταθερότητα της κουρκουμίνης

10.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 9 η δραστικότητα της κουρκουμίνης είναι περιορισμένη λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει στο αλκαλικό περιβάλλον, στην οξείδωση, στις υψηλές θερμοκρασίες και στο φώς. Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.2) έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον το 90% της κουρκουμίνης διασπάται εντός 12 h (σε trans-6-(4-υδρόξυ-3-μεθοξυφαινυλ-)-2,4-διόξο-5-εξενάλη, βανιλλίνη, φερουλικό οξύ, φερουλόυλ-μεθάνιο και άλλα προϊόντα), ενώ αντίθετα στο αίμα παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα (Pfeiffer et al., 2003). Η υδρολυτική σταθερότητά της αυξάνεται υπό την παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών ή κυκλοδεξτρινών (Wang et al., 1997; Tonnesen et al., 1985; Oetari et al., 1996). Κατά την έκθεση της κουρκουμίνης (ως στερεή σκόνη ή διαλυμένη) σε UV/VIS ακτινοβολία σχηματίζεται ένα κυκλικό προϊόν από την απώλεια δύο ατόμων υδρογόνου από το μόριο της, καθώς και βανιλλίνη, βανιλλικό οξύ, φερουλικό οξύ και φερουλόυλ-μεθάνιο ως δευτερεύοντα προϊόντα (Tonnesen et al., 1986). Κατά την έκθεσή της στο ηλιακό φως παράγονται περισσότερα προϊόντα αποικοδόμησης, ενώ η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών ή κυκλοδεξτρινών ενισχύει την φωτοευαισθησία της σε οργανικούς διαλύτες (Tonnesen et al., 2002; Tomren et al., 2007).

Στην βιβλιογραφία υπάρχει μια πληθώρα μελετών οι οποίες αφορούν την σταθερότητα της ενθυλακωμένης σε διάφορα μέσα κουρκουμίνης. Για παράδειγμα η ενθυλάκωση της

ολεορητίνης του τουρμέρικ σε κυκλοδεξτρίνες (Haiyee et al., 2009) ή σε μίγμα αραβικού κόμμεος-μαλτοδεξτρίνης με την προσθήκη pullulan (μια υδατοδιαλυτή γλυκάνη που παράγεται από τον *Aureobasidium pullulans*) (Kshirsagar et al., 2009) ενισχύει την σταθερότητα της κατά την αποθήκευση. Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε ζελατίνη ή μίγμα πορώδους αμύλου-ζελατίνης περιορίζει την φωτοχημική και θερμική αστάθεια της και ελαττώνει την προσκολλητική-χρωστική (colour staining) ικανότητα της (Wang et al., 2009; Aziz et al., 2007). Μικκύλια καζεΐνης έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως φορέας για να αυξήσουν την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης και την σταθερότητα της ενάντια στην αλκαλική υδρόλυση σε pH 13 (Leung et al., 2008). Η κουρκουμίνη έχει επίσης ενθυλακωθεί σε νανοσωματίδια από μεθόξυ-πολυαιθυλενική γλυκόλη (mPEG) και παλμιτικό οξύ τα οποία ενισχύουν την υδατοδιαλυτότητα της και την σταθερότητα της σε pH 7.4 (Sahu et al., 2008) καθώς και σε λιποσώματα τα οποία χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον ισοδύναμη δραστικότητα ενάντια σε καρκινικές σειρές παγκρεατικών κυττάρων σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη (Li et al., 2005). Επιπλέον, ενθυλάκωση της κουρκουμίνης με PVC έχει βελτιώσει την διαλυτότητα της σε όξινο pH (Paradkar et al., 2004), ενώ η συμπλοκοποίηση της με φωσφολιπίδια (Maiti et al., 2007) αυξάνει την δραστικότητα της ενάντια στην ηπατική βλάβη που προκαλείται σε αρουραίους που εκτίθενται σε τετραχλωράνθρακα. Πρόσφατα, μικρογαλακτώματα της κουρκουμίνης με λεκιθίνη/tween 80 μελετήθηκαν ως προς την σταθερότητα και την διεισδυτική τους ικανότητα στο δέρμα αρουραίων (Lin et al., 2009).

Στο παρόν κεφάλαιο μελετάται εάν η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα του *S. cerevisiae* (πλασμολυμένα και μη), β-CD και MS μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητά της στην θέρμανση, το φώς και την οξείδωση υπό την ταυτόχρονη επίδραση της υγρασίας. Επιπλέον μελετάται η επίδραση του pH στην υδρολυτική σταθερότητα-διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης. Η μελέτη πραγματοποιείται με ίδια δείγματα που αναφέρονται στο κεφάλαιο 9 (§ 9.1): με οκτώ μικροκάψουλες της κουρκουμίνης στα κύτταρα, οι οποίες παρασκευάστηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες και οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς το περιεχόμενο τους σε κουρκουμίνη, με τις μικροκάψουλες της β-CD που παρασκευάστηκαν με τις πέντε μεθόδους και σε εκείνες με το MS (με ή χωρίς tween). Οι % ΕΕ και % ΕΥ τιμές όλων των μικροκαψουλών παρουσιάστηκαν στο σχήμα 8.1.

10.2. Φωτοχημική σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη αποτελεί μια φωτοευαίσθητη ουσία η οποία αποικοδομείται όταν εκτίθεται σε ακτινοβολία UV/VIS όταν βρίσκεται είτε στην στερεή μορφή ή διαλυμένη. Ο μηχανισμός της αποικοδόμησης της δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως: τα φαινολικά –OH της δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε αντίθεση με β-δικετονική της γέφυρα, της οποίας η αποικοδόμηση οδηγεί στον σχηματισμό μικρών φαινολικών συστατικών (βανιλλίνη, βανιλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, φερουλόυλμεθάνιο, φερουλική αλδεΰδη), ενώ το βασικό προϊόν είναι ένα κυκλικό μόριο που σχηματίζεται από την αποβολή δυο ατόμων υδρογόνου (Tonnesen et al., 1986). Η φωτόαποικοδόμηση της κουρκουμίνης επηρεάζεται από την παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών, σιδήρου, αλάτων αλουμινίου, χρυσού και ψευδαργύρου, μπλε του μεθυλενίου, ενώ καθυστερείται από την παρουσία β-καροτενίου (Priyadarsini, 2009).

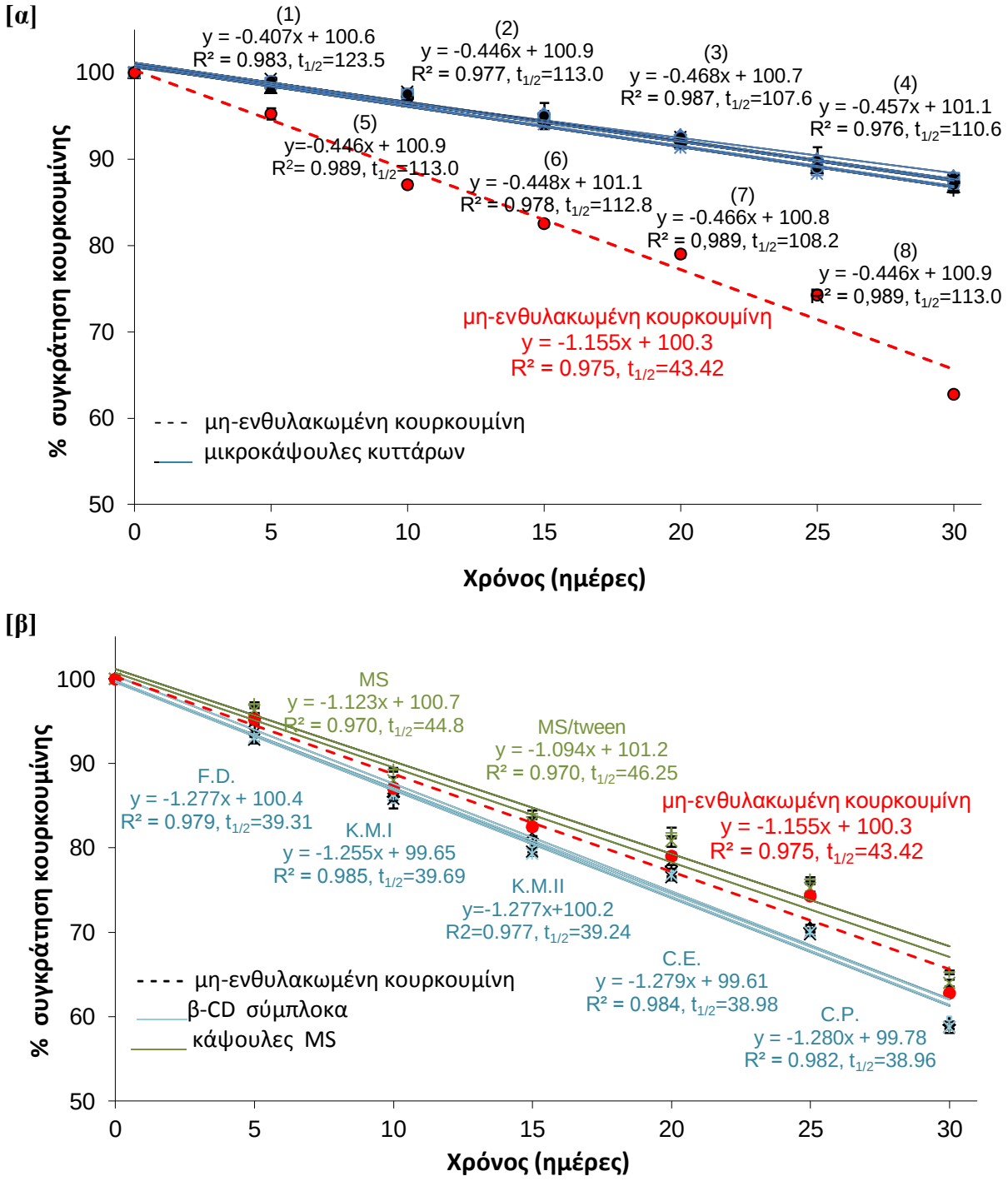
Η μικροενθυλάκωση έχει χρησιμοποιηθεί για την προστασία φωτοευαίσθητων συστατικών, όπως η κουρκουμίνη. Η αποικοδόμηση της κουρκουμίνης στο φώς σε μια μελέτη των Price et al., (1996) βρέθηκε ότι ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Οι Wang et al., (2009) μελέτησαν την φωτοχημική σταθερότητα ενός υδατικού διαλύματος κουρκουμίνης ενθυλακωμένης σε μίγμα αμύλου-ζελατίνης μετά από έκθεση στο ηλιακό φως για 30 ημέρες, όπου βρέθηκε μεγαλύτερη σταθερότητα για την ενθυλακωμένη κουρκουμίνη (μείωση 0.9%) σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη (μείωση 17.4%). Ο ρυθμός αποικοδόμησης της ενθυλακωμένης σε ζελατίνη κουρκουμίνης όταν εκτίθεται σε ηλιακό φως προσδιορίστηκε σε 0.08%/ημέρα, σημαντικά μικρότερος από της μη-ενθυλακωμένης (0.95%/ημέρα) (Aziz et al., 2008). Οι Tonnesen et al., (1986) μελέτησαν την φωτοευαισθησία της κουρκουμίνης σε διάφορους οργανικούς διαλύτες όπου βρέθηκε ότι η αποικοδόμησή της ακολουθεί επίσης κινητική πρώτης τάξης ενώ η σταθερότητά της αυξάνεται με την ακόλουθη σειρά: ακετονιτρίλιο, χλωροφόρμιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη. Πιθανότατα η ικανότητα της κουρκουμίνης να σχηματίζει ένδο- και δια-μοριακούς δεσμούς με τον εκάστοτε οργανικό διαλύτη επιδρά στην σταθερότητά της.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η φωτοχημική σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης στα κύτταρα (οχτώ δείγματα), στην β-CD (πέντε δείγματα) και το MS (δυο δείγματα) σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη μετά από έκθεση όλων των δειγμάτων στο ηλιακό φώς για 30 ημέρες. Η αποικοδόμηση της κουρκουμίνης απεικονίζεται

διαγραμματικά στο σχήμα 10.1, ως % συγκράτηση σε σχέση με τον χρόνο έκθεσης (ημέρες). Μεταξύ των μικροκαψουλών των κυττάρων δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0.05$), ούτε και μεταξύ των β-CD ή των MS καψουλών. Συνεπώς σημαντικό ρόλο στην φωτοσταθερότητά της φαίνεται να παίζει κατ' αρχήν το μέσο ενθυλάκωσης (κύτταρα, β-CD ή MS) και λιγότερο οι συνθήκες παρασκευής των μικροκαψουλών ή η κατανομή/θέση των μορίων της κουρκουμίνης στο μέσο ενθυλάκωσης.

Διαγραμματική αναπαράσταση της % συγκράτησης της κουρκουμίνης σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες) (σχήμα 10.1) δείχνει ότι η αποικοδόμηση της κουρκουμίνης, σε όλα τα δείγματα, ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξεως. Η σταθερά ταχύτητας (k), που αντιστοιχεί στον ρυθμό αποικοδόμησης, προσδιορίζεται από την κλίση των διαγραμμάτων, ενώ ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$) της κουρκουμίνης σε κάθε δείγμα, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται γα να μειωθεί η συγκέντρωση της στο δείγμα κατά 50%, ισούται με $t_{½}=[A_0]/2k$.

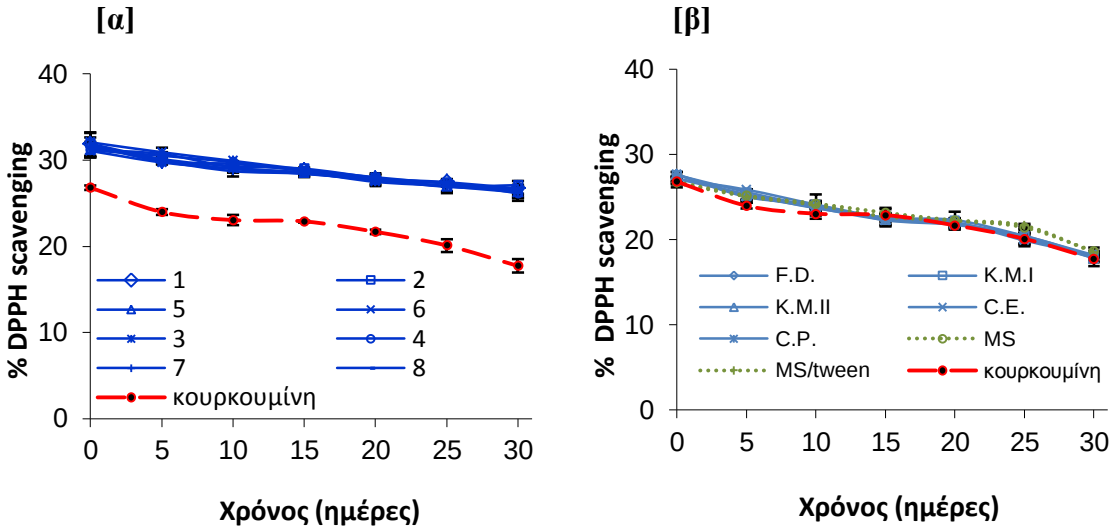
Οι τιμές k και $t_{½}$ των δειγμάτων φανερώνουν ότι η μεγαλύτερη σταθερότητα της κουρκουμίνης παρατηρείται για τις μικροκάψουλες των κυττάρων. Μετά από έκθεση 30 ημερών (ή καλύτερα 360 h) στο ηλιακό φώς η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη συγκρατείται σε ποσοστό 62.8±0.21%, μικρότερο ποσοστό ($p>0.05$) σε σχέση με την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη (87.2±0.34%) (σχήμα 10.1). Ο ρυθμός αποικοδόμησης της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (τιμή k) είναι 1.16%/ημέρα και ο χρόνος ημιζωής $t_{½}$ 43.4 ημέρες, ενώ μετά την ενθυλάκωση στα κύτταρα η φώτοσταθερότητά της ενισχύεται περίπου 2.6 φορές (μέση τιμή $t_{½}$ 113 ημέρες) (σχήμα 10.1). Φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες, δίκτυο γλυκανών) και με την λιπιδική διπλοστοιβάδα προστατεύει την κουρκουμίνη από την αρνητική επίδραση του φωτός, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Shi et al., (2008), όπου αναφέρεται η φωτοπροστασία της ρεσβερατρόλης μετά την ενθυλάκωσή της στα κύτταρα.



Σχήμα 10.1. *Φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε (α) κύτταρα S. cerevisiae και (β) β-CD και MS μετά από έκθεση τους στο ηλιακό φως για 30 ημέρες. Η γραμμική φύση των διαγραμμάτων δείχνει ότι η αποικοδόμηση ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξεως, με σταθερά ταχύτητας (k) που προσδιορίζεται από την κλίση των διαγραμμάτων και χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}=[A_0]/2k$). Η σύσταση των μικροκαψουλών των κυττάρων είναι η ακόλουθη: δείγμα 1: Μ-Π/Υ/2.0, 2:Μ-Π/Υ/0.2, 3:Π/Υ/2.0, 4:Π/Υ/0.2, 5:Μ-Π/Α/2.0, 6:Μ-Π/Α/0.2, 7:Π/Α/2.0, 8:Π/Α/0.2.*

Σε αντίθεση με την ενθυλάκωση στα κύτταρα η συμπλοκοποίηση με την β-CD δεν προστατεύει την κουρκουμίνη από την φωτόαποικοδόμηση και μάλιστα έχει την τάση να αυξήσει την αστάθεια της (μέσος ρυθμός αποικοδόμησης 1.27%/ημέρα, μέσος $t_{½}$ 39.2 ημέρες), σε συμφωνία με την μελέτη των Tonnesen et al., (2002), όπου βρέθηκε ότι η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-CD αυξάνει την φωτόαποικοδόμηση της σε οργανικούς διαλύτες. Αντίθετα, οι ενθυλακωμένες μορφές της κουρκουμίνης στο MS έχουν την τάση να ενισχύσουν την σταθερότητα της κουρκουμίνης (μέση τιμή $t_{½}$ 45.5 ημέρες) και μετά από έκθεση 30 ημερών παρατηρείται συγκράτηση της σε ποσοστό 64.6±0.31%, η οποία όμως δεν διαφέρει σημαντικά από την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη ($p>0.05$).

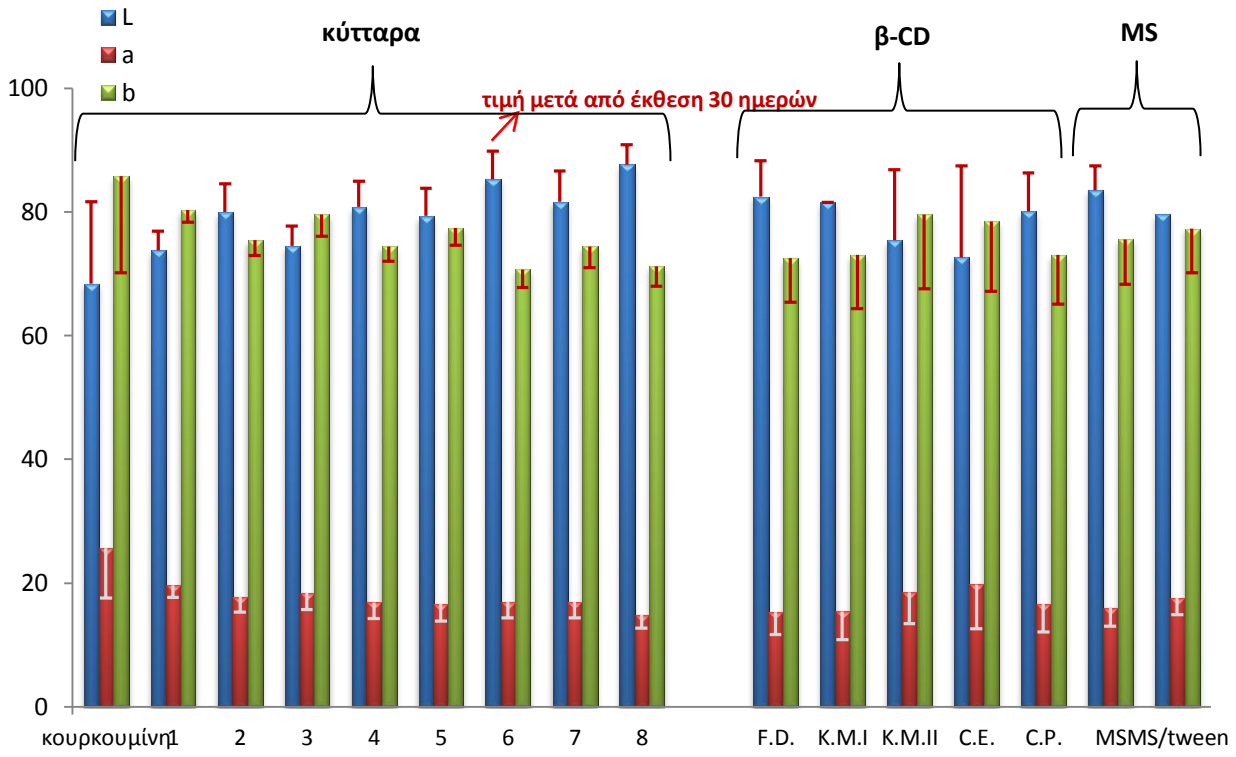
Ταυτόχρονα με την % συγκράτηση της κουρκουμίνης μετρήθηκε και η αντιοξειδωτική δραστικότητα (% ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) των διαλυμάτων της εκχυλισμένης από τις μικροκάψουλες κουρκουμίνης (σχήμα 10.2). Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δραστικότητας συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της % συγκράτησης της κουρκουμίνης. Συγκεκριμένα η αντιοξειδωτική δραστικότητα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης, μετά την πάροδο της έκθεσης των 30 ημερών, ελαττώνεται από 26.8±0.28% σε 17.7±0.80%, ενώ της ενθυλακωμένης στα κύτταρα ελαττώνεται με μικρότερο ρυθμό: από 31.5±1.14% μειώνεται σε 26.5±0.28% την 30η ημέρα και μεταξύ των οχτώ δειγμάτων δεν παρατηρούνται διαφορές. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της σταθερότητας της κουρκουμίνης, τα σύμπλοκα της β-CD και του MS παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δραστικότητα παραπλήσια με της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης: από 27.4±0.26% και 26.7±0.39% μειώνονται σε 18.0±0.28% και 18.6±0.32% αντίστοιχα μετά από 30 ημέρες. Πιθανότατα πολλά προϊόντα φωτοαποικοδόμησής της κουρκουμίνης, όπως η βανιλλίνη και το βανιλλικό οξύ, έχουν αντιοξειδωτική δραστικότητα οπότε είναι πιθανό το % περιεχόμενο των μικροκαψουλών σε κουρκουμίνη να ελαττώνεται κατά την έκθεση στον ήλιο, αλλά η αντιοξειδωτική δραστικότητα δεν ακολουθεί τον ίδιο ακριβώς ρυθμό ελάττωσης.



Σχήμα 10.2. *% ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε (α) κύτταρα S. cerevisiae και (β) β-CD και MS κατά την έκθεση τους στο ηλιακό φως για 30 ημέρες.*

Τα χαρακτηριστικά χρώματος (L^*, a^*, b^*) όλων των δειγμάτων μετρήθηκαν κατά την διάρκεια της έκθεσης στο φως και οι τιμές τους μετά από 30 ημέρες παρουσιάζονται στο σχήμα 10.3. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της % σταθερότητας κατά την έκθεση της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης παρατηρείται μια συνεχή αύξηση στην τιμή της φωτεινότητας L^* και μείωση στις τιμές a^* και b^*, που συμφωνεί με την αποικοδόμηση της κουρκουμίνης σε άχρωμα συστατικά (βανιλλίνη, βανιλλικό οξύ). Μετά από 30 ημέρες η τιμή της φωτεινότητας αυξάνεται κατά 19.3%, ενώ οι τιμές a^* και b^* ελαττώνονται κατά 31.6% και 18.2%, αντίστοιχα. Οι μεταβολές στα χαρακτηριστικά χρώματος είναι μικρότερες για την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη: μέση αύξηση της τιμής L^* κατά 7.9% και μείωση στις τιμές a^* και b^* κατά 15.6%, 5.4%, αντίστοιχα. Τα β-CD σύμπλοκα όπως αναμένεται από τα αποτελέσματα της σταθερότητας παρουσιάζουν μεγαλύτερες μεταβολές στα χαρακτηριστικά χρώματος τους: μέση αύξηση της τιμής L^* κατά 12.5% και μείωση στις τιμές a^* και b^* κατά 28.9%, 12.4%, αντίστοιχα. Λιγότερο έντονες μεταβολές παρατηρούνται για τις ενθυλακωμένες μορφές στο MS: μέση αύξηση της τιμής L^* 7.2% και μείωση στις τιμές a^* και b^* κατά 17.1%, 9.4%, αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι μετά την 30-ημερών έκθεση των δειγμάτων αυξάνεται η φωτεινότητα τους και παρατηρείται μια σημαντική ελάττωση στην τιμή b^* λόγω της ελάττωσης της συγκράτησης της κουρκουμίνης. Ωστόσο, οι μεταβολές των χρωματικών χαραξτηριστικών για τις μικροκάψουλες των κυττάρων είναι μικρότερες σε σχέση

με τις β-CD και MS κάψουλες, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα για την συγκράτηση της κουρκουμίνης.



Σχήμα 10.3. *Χαρακτηριστικά χρώματος (L^*, a^*, b^*) της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε κύτταρα S. cerevisiae, β-CD και MS και μεταβολή τους μετά από έκθεση στο ηλιακό φώς για 30 ημέρες.*

10.3. Επίδραση της σχετικής υγρασίας στην οξειδωτική σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Το πιο κοινό πρόβλημα κατά την αποθήκευση των αρωματικών συστατικών είναι η οξείδωση τους, η οποία επηρεάζεται σημαντικά από την σχετική υγρασία (% RH). Λαμβάνοντας υπόψη τα υγροσκοπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και την ευαισθησία της κουρκουμίνης στην οξείδωση, μελετάται η οξειδωτική σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης. Εκτός από τη σταθερότητα, η ενεργότητα νερού (aw) παίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό διάχυσης/απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από το μέσο ενθυλάκωσης. Για παράδειγμα σύμφωνα με την μελέτη των Normand et al., (2005), ενώ τα αποξηραμένα κύτταρα του *S.*

cerevisiae είναι σχεδόν αδιαπέραστα σε μόρια, σε aw >0.7 μπορεί να συμβούν αναστρέψιμα φαινόμενα διάχυσης μεταξύ του ενθυλακωμένου μορίου και του εξωτερικού μέσου.

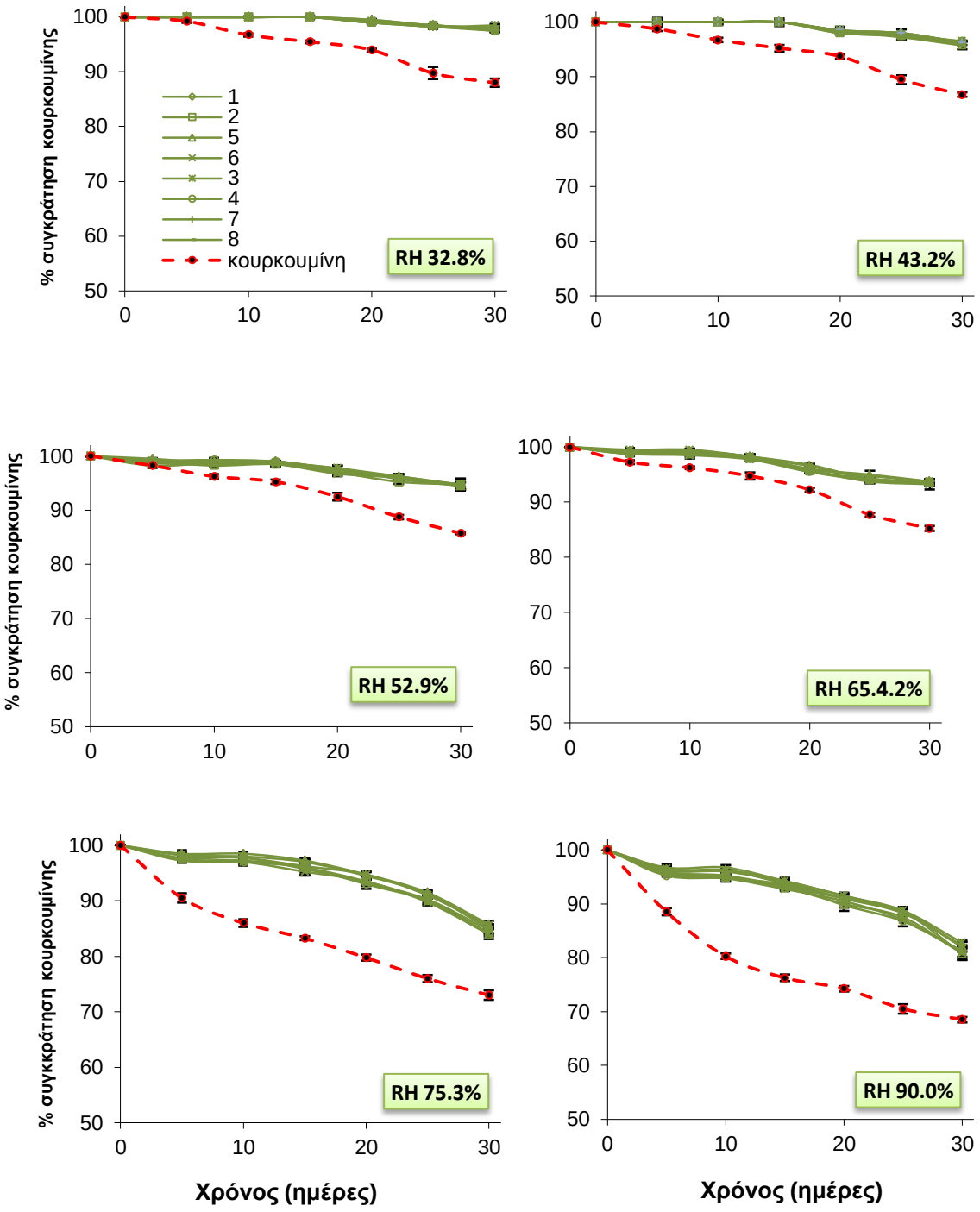
Οι Shi et al., (2007; 2008) απέδειξαν ότι η σταθερότητα του χλωρογενικού οξέος και της ρεσβερατρόλης αντίστοιχα, κατά την αποθήκευσή τους ενισχύεται με την ενθυλάκωσή τους σε κύτταρα. Οι Yoshi et al, (2001) βρήκαν ότι η απελευθέρωση του ενθυλακωμένου σε μαλτοδεξτρίνη/αραβικό κόμμι βουτυλεστέρα εξαρτάται τόσο από την τιμή RH όσο και από το είδος του γαλακτωματοποιητή. Ο ρυθμός αποικοδόμησης της ενθυλακωμένης μενθόλης βρέθηκε να αυξάνεται σε αυξημένη RH και θερμοκρασία (Soottitantawat et al., 2005). Οι Kshirsagar et al., (2009) μελέτησαν την οξειδωτική σταθερότητα της κουρκουμίνης για 6 εβδομάδες όπου υπολογίστηκε ο χρόνος ημιζωής σε 16.38 εβδομάδες, ενώ μετά την ενθυλάκωση της σε αραβικό κόμμι-pullulan η τιμή αυξήθηκε σε 38.08 εβδομάδες.

Τα δείγματα αποθηκεύονται για 30 ημέρες σε ατμόσφαιρα σχετικής υγρασίας από 32.8 έως 90.0, στους 25^{o}C, υπό την προστασία από το φώς. Η σταθερότητα της κουρκουμίνης αρχικά εκφράζεται ως % συγκράτηση σε συνάρτηση με τον χρόνο (σχήμα 10.4). Η απεικόνιση του φυσικού λογαρίθμου (ln) της % συγκράτησης της κουρκουμίνης σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης, δίνει κινητική αποικοδόμησης πρώτης-τάξης. Οι τιμές k και $t_{1/2}$ όλων των δειγμάτων παρουσιάζονται διαγραμματικά στο σχήμα 10.5 α και β, αντίστοιχα. Όπως και στην μελέτη της φωτοχημικής σταθερότητας της κουρκουμίνης, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0.05$) μεταξύ των μικροκαψουλών των κυττάρων, ούτε και μεταξύ των β-CD συμπλόκων ή MS καψουλών.

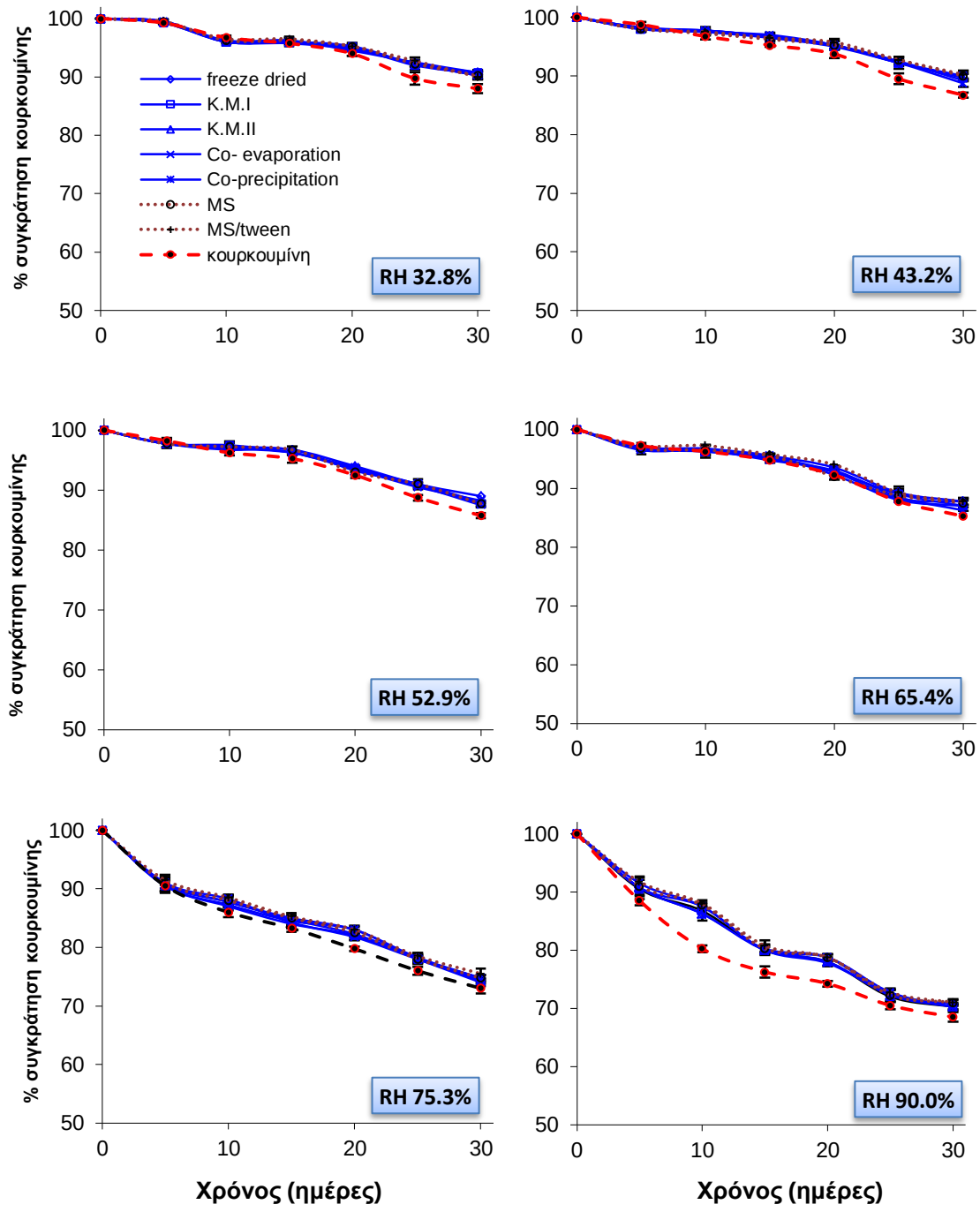
Τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στα σχήματα 10.4 και 10.5 δείχνουν ότι η σταθερότητα και/ο μηχανισμός απελευθέρωσης της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης εξαρτάται τόσο από την % RH όσο και από το μέσο ενθυλάκωσης. Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης σε δεδομένη % RH η συγκράτηση της κουρκουμίνης, τόσο της ενθυλακωμένης όσο και της μη-ενθυλακωμένης, ελαττώνεται. Επιπλέον η υγρασία ενισχύει την οξειδωτική αστάθεια της κουρκουμίνης ή την απελευθέρωση/διάχυσή της από την μήτρα του μέσου ενθυλάκωσης στην επιφάνεια της κάψουλας, όπου είναι πιο ευάλωτη στην οξείδωση. Όσον αφορά τις μικροκάψουλες των κυττάρων, αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Normand et al., (2005) όπου αναφέρεται ότι σε περιβάλλον υψηλής aw η στοιβάδα του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος (και ιδιαίτερα η πρωτεϊνική στοιβάδα) προσελκύει μόρια νερού και

διογκώνεται, οπότε εμφανίζονται πόροι και η διάχυση των μορίων ενισχύεται. Επιπλέον στην μελέτη των Ponce Cevallos et al., (2010) μελετάται η επίδραση της προσρόφησης νερού στην σταθερότητα και την απελευθέρωση της ενθυλακωμένης στην β-CD θυμόλης και κινναμαλδεΰδης.

(A)

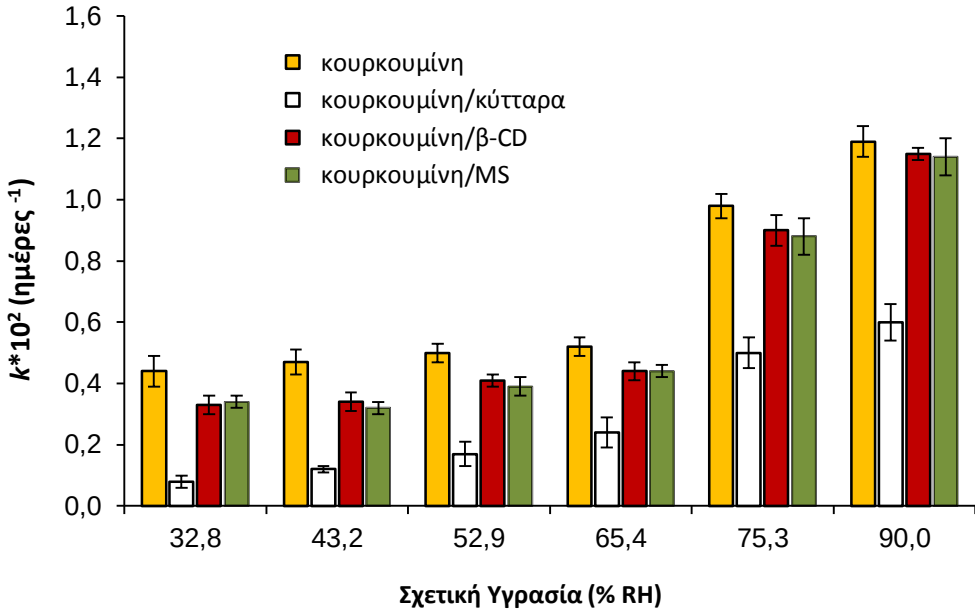


(B)

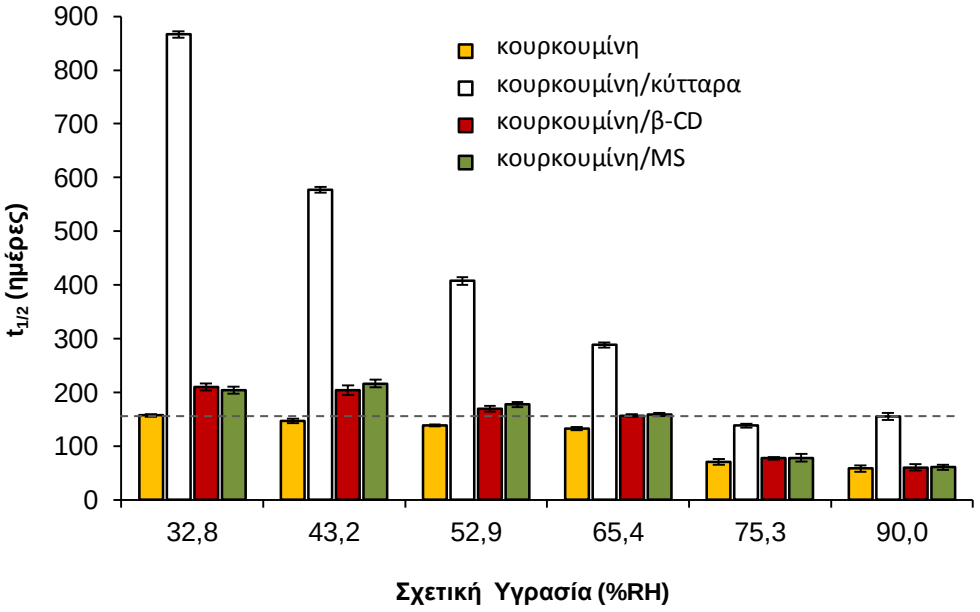


Σχήμα 10.4. *Αποικοδόμηση της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε (α) κύτταρα S. cerevisiae και (β) β-CD και MS μετά από αποθήκευση τους για 30 ημέρες σε ατμόσφαιρα ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας (32.8, 43.2, 52.9, 65.4, 75.3 και 90%) στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει μέση τιμή±S.D (n=4).*

[α]



[β]



Σχήμα 10.5. *α) Τιμές σταθεράς ταχύτητας (k, ημέρες^{-1}) και β) χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$, ημέρες) της αποικοδόμησης της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε κύτταρα S. cerevisiae, β-CD και MS μετά από αποθήκευση τους για 30 ημέρες σε ατμόσφαιρες ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας (32.8, 43.2, 52.9, 65.4, 75.3 και 90%) στους 25^{o}C. Η αποικοδόμηση όλων των δειγμάτων ακολουθεί κινητική πρώτης τάξεως.*

Η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη παρουσιάζει αυξημένη σταθερότητα σε RH από 32.8 έως 65.4%: παρατηρείται τουλάχιστον 85% συγκράτηση της ακόμα και μετά από 30 ημέρες, με $t_{½}$ 158 ημέρες (σε RH 32.8%) ο οποίος ελαττώνεται ελαφρώς σε 133 ημέρες (σε RH 65.4%) (σχήμα 10.5.α). Σε RH 75.3 και 90.0% ο $t_{½}$ 39.2 της κουρκουμίνης ελαττώνεται, περίπου δυο φορές, επιβεβαιώνοντας την αρνητική επίδραση της υγρασίας στην οξειδωτική σταθερότητα της κουρκουμίνης.

Όλες οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης στα κύτταρα αυξάνουν την σταθερότητα της κουρκουμίνης ανεξάρτητα από την τιμή της σχετικής υγρασίας. Έτσι, ανεξάρτητα από την θέση τους στα κύτταρα, τα μόρια της κουρκουμίνης είτε βρίσκονται ενσωματωμένα εντός της μεμβράνης ή συνδεδεμένα στην επιφάνεια του κυττάρου (π.χ. συνδεδεμένα με σταυροειδείς δεσμούς με τις πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος) προστατεύονται αποτελεσματικά από την οξείδωση. Το ίδιο αποτέλεσμα κατά την αποθήκευση προέκυψε όταν η ρεσβερατρόλη ενθυλακώθηκε στα κύτταρα του *S. cerevisiae (*Shi et al, 2008*)*.

Ειδικότερα η % συγκράτηση της ενθυλακωμένης στα κύτταρα κουρκουμίνης είναι τουλάχιστον 93% μετά από 30 ημέρες σε RH από 32.8 έως 65.4% (σχήμα 10.4) ενώ σε υγρασία 75.3 και 90.0% η συγκράτηση ελαττώνεται ($p<0.05$) σε 84.9±0.67% και 81.6±0.83%, αντίστοιχα, πιθανότατα λόγω διάχυσης μορίων κουρκουμίνης στο εξωτερικό τμήμα του κυττάρου. Τα αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 10.5, δείχνουν ότι η ενθυλάκωση στα κύτταρα ενισχύει την σταθερότητα της κουρκουμίνης κατά 5.5 φορές σε RH 32.8%, κατά 3.9 και κατά 2.9 φορές σε RH 43.2 και 52.9%, αντίστοιχα, ενώ σε RH μεταξύ 65.4% και 90.0% παρατηρείται αύξηση στη σταθερότητα κατά δύο φορές.

Η ενθυλάκωση στην β-CD και το MS ενισχύει, επίσης, την οξειδωτική σταθερότητα της κουρκουμίνης, κυρίως σε ατμόσφαιρες χαμηλής RH, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό σε σχέση με την ενθυλάκωση στα κύτταρα ($p<0.05$). Αναλυτικότερα, η ενθυλάκωση στην β-CD και το MS ενισχύει τη σταθερότητα της κουρκουμίνης περίπου 1.4 φορές σε RH από 32.8% έως 43.2% και περίπου 1.2 φορές σε RH από 52.9 έως 65.4%, ενώ σε περιβάλλον μεγαλύτερης υγρασίας η ενίσχυση δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p>0.05$).

Παράλληλα με την συγκράτηση, μετρήθηκε και η αντιοξειδωτική δραστικότητα όλων των δειγμάτων και τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τις παραπάνω παρατηρήσεις.

Συγκεκριμένα, σε όλα τα δείγματα η αντιοξειδωτική δραστικότητα τους ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου, σε δεδομένη %RH. Η αντιοξειδωτική δραστικότητα των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη, ή με τις κάψουλες β-cd και MS και μάλιστα καθώς αυξάνεται η %RH και το ποσοστό συγκράτησης της κουρκουμίνης ελαττώνεται, η αντιοξειδωτική τους δραστικότητα δεν ακολουθεί, τον ίδιο ρυθμό μείωσης. Πιθανότατα, η υγρασία, η οποία ενισχύει την οξειδωτική αποικοδόμηση της κουρκουμίνης, οδηγεί στον σχηματισμό προϊόντων με αντιοξειδωτική δραστικότητα, οπότε και η μετρούμενη αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων των δειγμάτων ενισχύεται.

Συνοπτικά, κατά την αποθήκευση της η κουρκουμίνη αποικοδομείται λόγω φαινομένων οξείδωσης. Η μεγαλύτερη απώλεια (οξείδωση) της κουρκουμίνης συμβαίνει σε RH >75%. Είναι επίσης πιθανό, σε περιβάλλον μεγαλύτερης σχετικής υγρασίας, η παρουσία νερού να ενισχύει την κινητικότητα (διάχυση) των μορίων της κουρκουμίνης διαμέσου της μήτρας του μέσου ενθυλάκωσης προς την επιφάνεια της κάψουλας, όπου τα μόρια θα είναι πιο ευάλωτα στην οξείδωση. Ωστόσο, η ενθυλάκωση, ιδιαίτερα στα κύτταρα, μπορεί να περιορίσει την οξειδωτική αποικοδόμηση της σε υψηλή aw. Φαίνεται ότι το δίκτυο του κυτταρικού τοιχώματος, σε συνδυασμό με την πλασματική μεμβράνη μπορούν να σχηματίζουν ένα ημιπερατό-φράγμα για το οξυγόνο, προστατεύοντας εν μέρει την κουρκουμίνη από τις καταστροφική επίδραση της υγρασίας ή του φωτός.

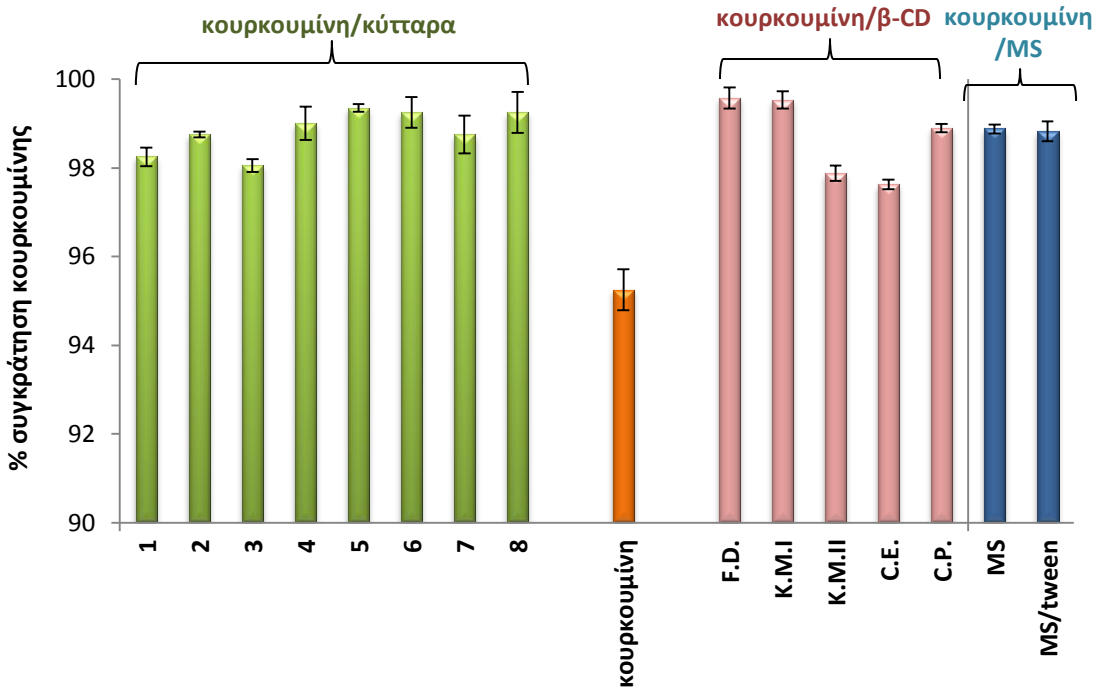
10.4. Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου θέρμανσης στη σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Κατά την θέρμανση της κουρκουμίνης μπορεί να συμβούν οι ακόλουθες μεταβολές: τροποποίηση στους διπλούς δεσμούς, πολυμερισμός ή αποικοδόμηση σε μικρού MB συστατικά, όπως φερουλικό οξύ, βανιλλίνη, βανιλλικό οξύ, φανερώνοντας ότι η ‘δικετονική γέφυρα’ της κουρκουμίνης παρουσιάζει ευαισθησία στην θέρμανση (Suresh et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη μελετάται η επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας στις ιδιότητες απελευθέρωσης και στη σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης στα κύτταρα, την β-CD και το MS.

Όπως αναφέρθηκε στην § 7.5.2 η ανάλυση DSC τόσο των κυττάρων του *S. cerevisiae* όσο και των μικροκαψουλών της κουρκουμίνης έδειξε ότι παραμένουν σταθερά έως τους περίπου 265^{o}C, όπου το κυτταρικό τοίχωμα αρχίζει να αποικοδομείται, αποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα του *S. cerevisiae* αποτελούν ένα πολύ σταθερό ενάντια στην θέρμανση σύστημα ενθυλάκωσης. Όμοια οι μικροκάψουλες της κουρκουμίνης στην β-CD και το MS, όπως περιγράφεται στην § 8.3 αρχίζουν να αποικοδομούνται στους 310^{o}C και 240^{o}C, αντίστοιχα, φανερώνοντας ότι η β-CD και το MS αποτελούν επίσης πολύ σταθερά μέσα ενθυλάκωσης, σε αντίθεση με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη η οποία αρχίζει να αποικοδομείται στους 204^{o}C. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά αφορούν μόνο τη θερμοκρασία στην οποία οι μικροκάψουλες αποικοδομούνται πλήρως, οπότε και λαμβάνει χώρα πλήρη απελευθέρωση της κουρκουμίνης που έχει απομείνει. Έτσι η επίδραση της μη-ισόθερμης (σταδιακής) ή της ισόθερμης θέρμανσης, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, στη σταθερότητα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης χρειάζεται περισσότερη μελέτη.

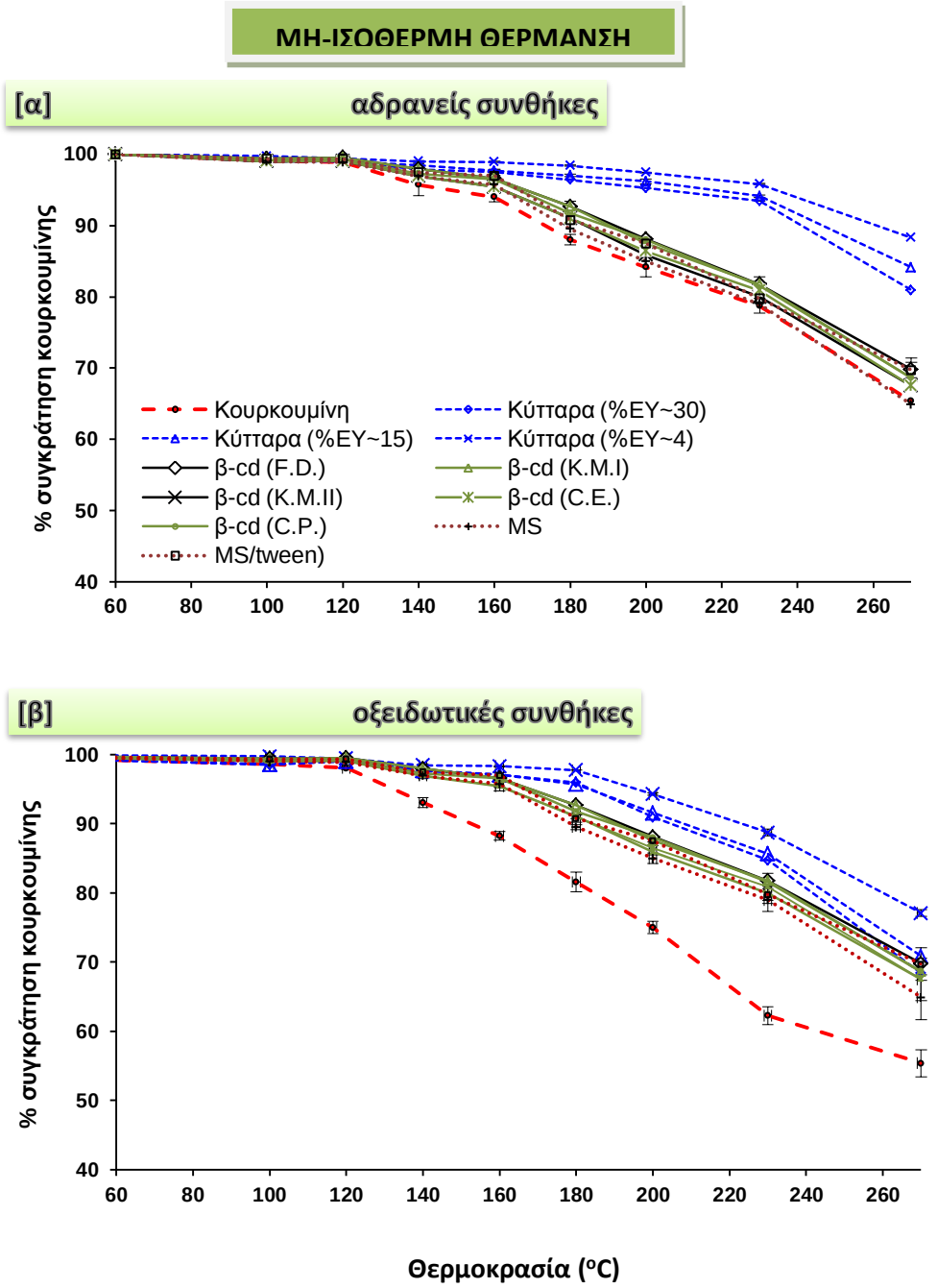
Καταρχήν μελετάται η σταθερότητα της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (στα κύτταρα, την β-CD και το MS) αφού προηγηθεί θέρμανση όλων των δειγμάτων στους 60^{o}C για 10 ημέρες, με ταυτόχρονη προστασία από το φώς. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο σχήμα 10.6. Η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη παρουσιάζει καλή σταθερότητα (συγκράτηση 95.2±0.46%) η οποία ενισχύεται ακόμα περισσότερο μετά την ενθυλάκωσή της στα κύτταρα, αλλά και την β-CD ή το MS. Η μέση συγκράτηση της ενθυλακωμένης στα κύτταρα κουρκουμίνης είναι 98.8±0.27% και τη μέγιστη σταθερότητα εμφανίζουν τα δείγματα 6 και 8, τα οποία χαρακτηρίζονται από την χαμηλότερες % ΕΥ τιμές, όπου υπάρχει περίσσεια κυττάρων που προστατεύουν τα ενθυλακωμένα μόρια κουρκουμίνης. Τα σύμπλοκα με την β-CD παρουσιάζουν μέση συγκράτηση 98.7±0.16 %, με τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους F.D., K.M.I , C.P. να έχουν την μέγιστη τιμή, ενώ αυτά που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους K.M.II και C.E. έχουν μικρότερη συγκράτηση, πιθανότατα λόγω της παρουσίας σε αυτά μη-ενθυλακωμένων μορίων κουρκουμίνης. Η ενθυλάκωση στο MS συμβάλλει επίσης στην θερμική σταθερότητα της κουρκουμίνης και μετά από αποθήκευση τους στους 60^{o}C για 10 ημέρες η κουρκουμίνη συγκρατείται σε ποσοστό 98.8±0.16 %, ενώ η παρουσία του γαλακτωματοποιητή tween δεν επιδρά στη σταθερότητα της κουρκουμίνης. Επιπλέον, η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δραστικότητας των δειγμάτων αποδεικνύει ότι η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα ενισχύει σημαντικά ($p<0.001$) την ικανότητα της να δεσμεύει

την ρίζα DPPH σε σχέση με την β-CD, το MS ή την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Επιπλέον, τα β-CD και τα MS σύμπλοκα της κουρκουμίνης παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική δραστικότητα, πιθανότατα λόγω προϊόντων με αντιοξειδωτική δραστικότητα τα οποία σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση της κουρκουμίνης.



Σχήμα 10.6. *% Ποσοστό συγκράτησης της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε κύτταρα S. cerevisiae, β-CD και MS μετά από έκθεσή τους στους 60°C για 10 ημέρες. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει μέση τιμή±S.D (n=4).*

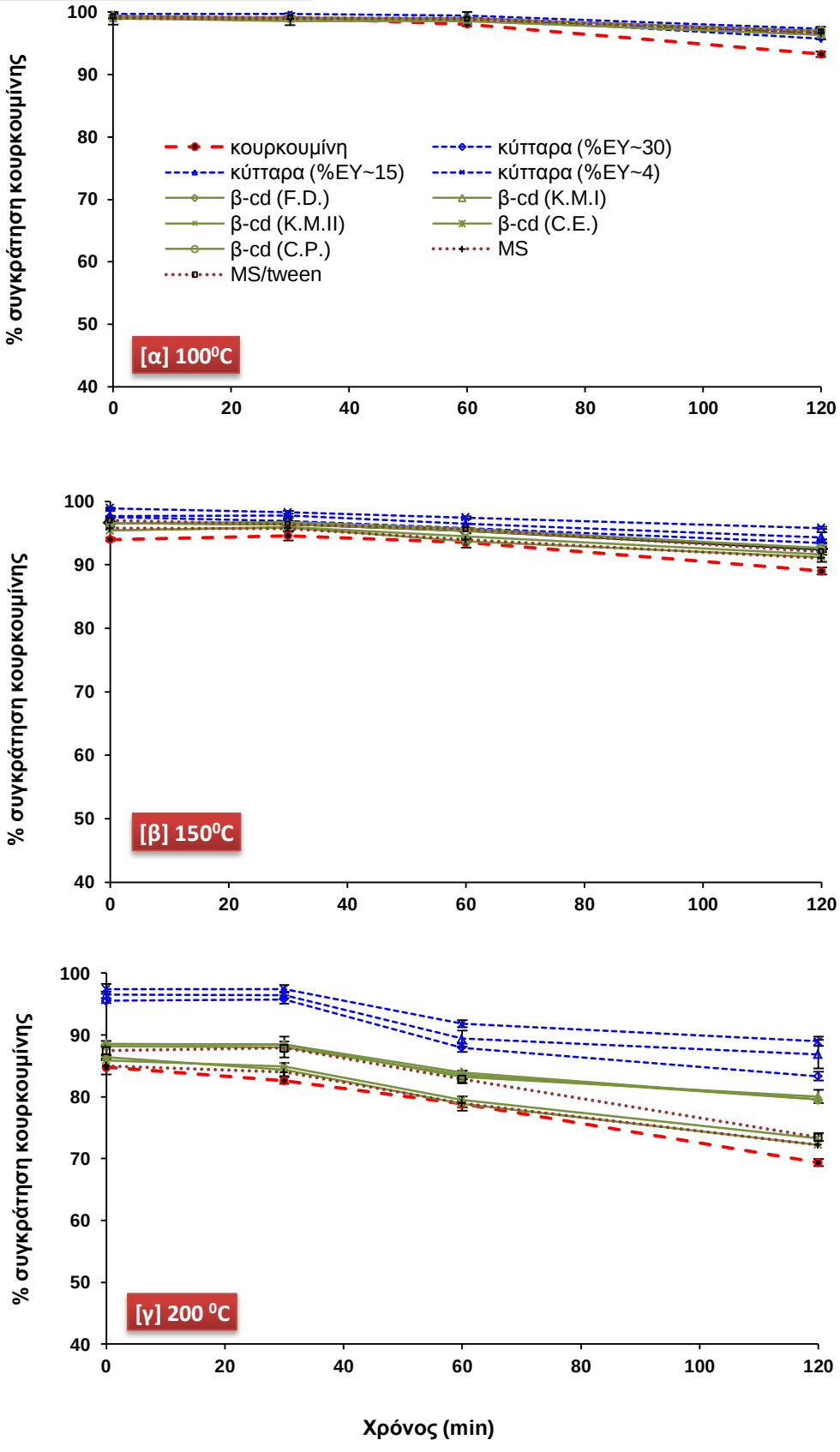
Η θερμική σταθερότητα των δειγμάτων της κουρκουμίνης μελετήθηκε επίσης σε διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας-χρόνου. Για την ελεγχόμενη θέρμανση, ως αγωγός θερμότητας, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη του DSC, σε αδρανείς και οξειδωτικές συνθήκες. Πραγματοποιήθηκε ελεγχόμενη μη-ισόθερμη θέρμανση των δειγμάτων της κουρκουμίνης, από την θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 260°C με ρυθμό 10°C/min (σχήμα 10.7) και ισόθερμη θέρμανση (σχήμα 10.8) στους 100°C,150°C και 200°C για μέγιστο διάστημα 2 h.

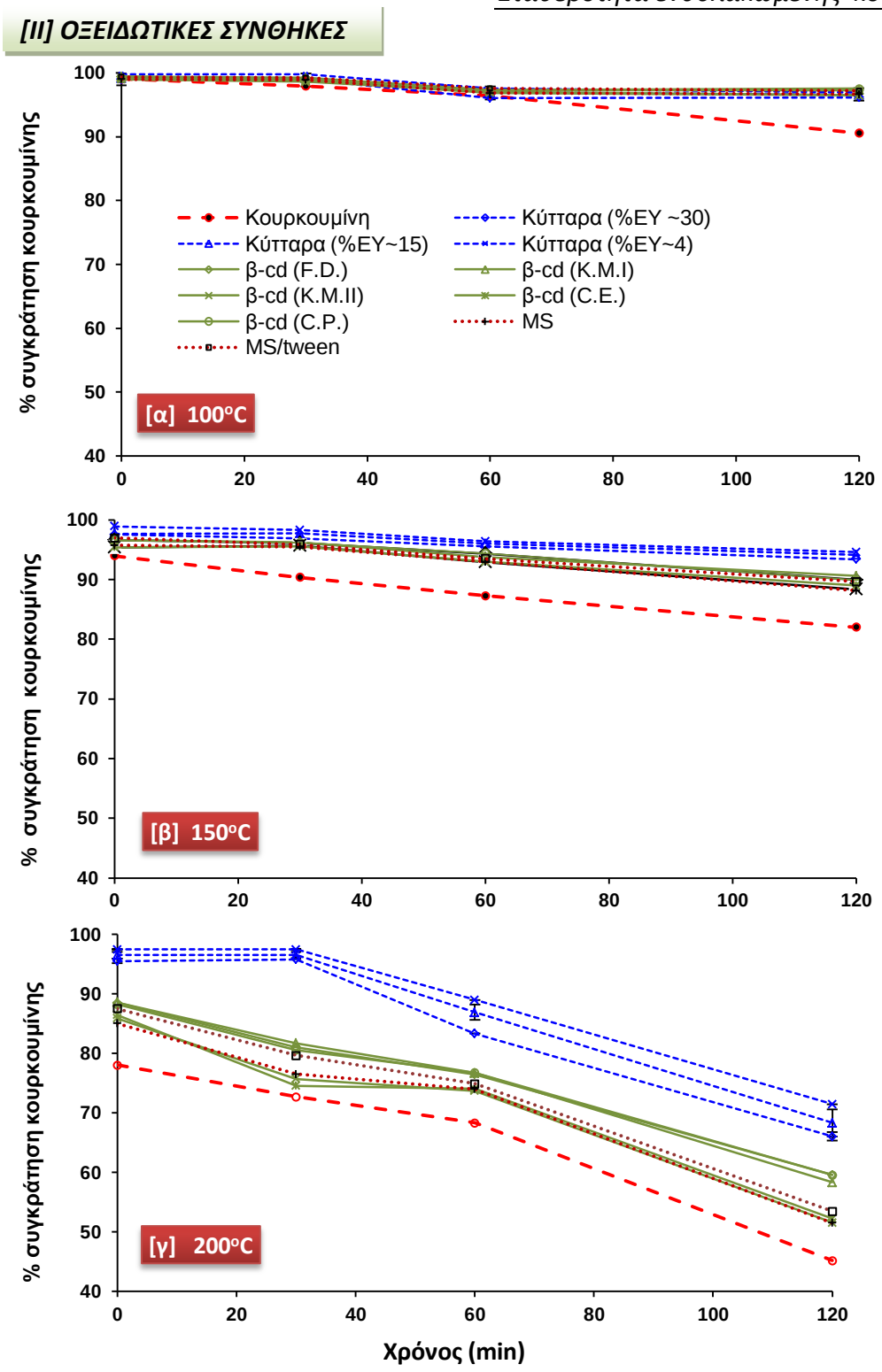


Σχήμα 10.7. *Επίδραση της θερμοκρασίας θέρμανσης σε συνθήκες (α) αδρανείς και (β) οξειδωτικές, στο % ποσοστό συγκράτησης της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε κύτταρα S. cerevisiae (δείγμα 2 με ΕΥ ~15%, δείγμα 3 με ΕΥ~30% και δείγμα 8 με ΕΥ~4%), την β-CD (παρασκευασμένα με 5 μεθόδους) και το MS. Ο ρυθμός θέρμανσης είναι 10°C/min. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει μέση τιμή±S.D (n=3).*

ΙΣΟΘΕΡΜΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ

[Ι] ΑΔΡΑΝΕΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ





Σχήμα 10.8. *Επίδραση της χρόνου θέρμανσης στους (α) 100°C, (β) 150°C και (γ) 200°C σε [I] αδρανείς και [II] οξειδωτικές συνθήκες στο % ποσοστό συγκράτησης της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της σε κύτταρα S. cerevisiae (δείγμα 2 με ΕΥ ~15%, δείγμα 3 με ΕΥ~30% και δείγμα 8 με ΕΥ~4%), την β-CD (παρασκευασμένα με 5 μεθόδους) και το MS. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει μέση τιμή±S.D (n=3).*

Η μη-ισόθερμη θέρμανση κάτω από αδρανείς (σχήμα 10.7.α) ή οξειδωτικές συνθήκες (σχήμα 10.7.β) δεν φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητα της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης ή μη), όταν υπάρχει στιγμιαία έκθεση της, σε θερμοκρασίες έως 120^{o}C, ενώ όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από 140^{o}C έως 270^{o}C, η σταθερότητα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης μειώνεται σημαντικά. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Wang et al., (2009) όπου αναφέρεται ότι η διαλυμένη σε νερό κουρκουμίνη παραμένει σταθερή κατά την θέρμανση της έως τους 70^{o}C για 10 min.

Στην μη-ισόθερμη θέρμανση σε αδρανείς συνθήκες (σχήμα 10.7.α) είναι εμφανές ότι η ενθυλάκωση στα κύτταρα του *S. cerevisiae* ενισχύει περισσότερο ($p<0.05$) από τα υπόλοιπα μέσα (β-CD, MS) τη σταθερότητα της κουρκουμίνης. Συγκεκριμένα, όταν η θερμοκρασία φτάνει τους 270^{o}C, 34.6±1.1% της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης αποικοδομείται, ενώ η απώλεια της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες των κυττάρων είναι περίπου 12% για τα δείγματα 6 και 8 (με %ΕΥ ~4), 16% για τα δείγματα 2,4,5,7 (με %ΕΥ~15) και 19% για τα δείγματα 1 και 3 (με % ΕΥ~30). Η μικρή αυτή διαφορά μεταξύ των μικροκαψουλών των κυττάρων μπορεί να αποδοθεί στη θέση των ενθυλακωμένων μορίων της κουρκουμίνης εντός των κυττάρων. Στις μικροκάψουλες με χαμηλές %ΕΥ τιμές (~4) η πλειοψηφία των ενθυλακωμένων μορίων της κουρκουμίνης βρίσκεται εντός της πλασματικής μεμβράνης, ενώ στα δείγματα με υψηλές % ΕΥ τιμές (15 ή 30%) υπάρχουν μόρια συνδεδεμένα με την εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων, όπου είναι πιο ευάλωτα στην θέρμανση και συνεπώς αποικοδομούνται ή απελευθερώνονται πιο γρήγορα.

Η μη-ισόθερμη θέρμανση των δειγμάτων σε συνθήκες οξείδωσης (σχήμα 10.7.β) φανερώνει ότι η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη είναι η πιο ευάλωτη μορφή της κουρκουμίνης ($p<0.05$). Σε αντίθεση με τη θέρμανση στις αδρανείς συνθήκες, όλες οι ενθυλακωμένες μορφές της κουρκουμίνης (συμπεριλαμβανόμενων της β-CD και του MS) φαίνεται να αυξάνουν τη σταθερότητα της κουρκουμίνης στην οξειδωτική θέρμανση. Η μέγιστη σταθερότητα παρατηρείται για τις μικροκάψουλες των κυττάρων και ακολουθούν οι μικροκάψουλες με την β-CD (κυρίως αυτές που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους F.D., K.M.I, C.P.) και το MS. Όπως περιγράφηκε αναλυτική στην § 8.3 τα β-CD σύμπλοκα τα οποία παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους K.M.II και C.E. περιέχουν ένα μικρό ποσοστό μορίων κουρκουμίνης που δεν

εγκλείονται μέσα στην κοιλότητα της β-CD, και τα οποία πιθανότατα είναι πιο ευάλωτα στην θερμική αποικοδόμηση.

Πραγματοποιήθηκε επίσης ισόθερμη θέρμανση των δειγμάτων της κουρκουμίνης σε συνθήκες αδρανείς ή οξειδωτικές (σχήμα 10.8). Οι θερμοκρασίες που επιλέγονται είναι 100, 150 και 200^{o}C για χρονικό διάστημα έως 2 h, εφόσον τόσο στο πρώτο πείραμα (θέρμανση 10 ημέρες, 60^{o}C) όσο και στο πείραμα της μη-ισόθερμης θέρμανσης σε θερμοκρασίες κάτω από 60^{o}C η κουρκουμίνη παρουσίασε καλή σταθερότητα. Στους 100^{o}C (σε οξειδωτικές συνθήκες) η μη-ενθυλακωμένη στερεή κουρκουμίνη είναι σταθερή ακόμα και μετά από 120 min θέρμανσης (σχήμα 10.8.II.α) και όλες οι ενθυλακωμένες μορφές της παρουσιάζουν στατιστικά παρόμοια σταθερότητα. Στην ίδια θερμοκρασία οι Wang et al., (2009) αναφέρουν ελάττωση 25.9% για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη μετά από 50 min θέρμανσης, αλλά σε αυτή την περίπτωση η κουρκουμίνη βρισκόταν σε υδατικό διάλυμα. Στους 150^{o}C (σε οξειδωτικές συνθήκες) (σχήμα 10.8.II.β) και ιδιαίτερα μετά από θέρμανση 2 h τα δείγματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 ομάδες, με βάση τη θερμική σταθερότητά τους. Η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη παρουσιάζει την μικρότερη αντοχή στη θέρμανση, ενώ η μεγαλύτερη παρατηρείται για τις ενθυλακωμένες μορφές στα κύτταρα. Η προστασία που προσφέρει η ενθυλάκωση στην κουρκουμίνη ενάντια στην θερμική αποικοδόμησή της είναι ιδιαίτερα σημαντική στους 200^{o}C (σχήμα 10.8.II.γ). Κατά τη διάρκεια της 2 h θέρμανσης οι μικροκάψουλες των κυττάρων είναι οι πιο ανθεκτικές, ακολουθούμενες από τα (F.D., K.M.I, C.P.) β-CD σύμπλοκα και τις MS/tween κάψουλες. Ωστόσο, σε αυτή τη θερμοκρασία ακόμα και η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη αποικοδομείται συνεχώς, μετά από έκθεση 30 min. Παίρνοντας ως σημείο αναφοράς την % συγκράτηση της κουρκουμίνης όταν η θερμοκρασία φτάνει στους 200^{0}C (χρόνος μηδέν), μετά από θέρμανση 2 h στους 200^{o}C η ολική % σχετική μείωση *(% reducing ratio*) για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη είναι 42.1%, ενώ για τις μικροκάψουλες των κυττάρων 30.8, 29.2 και 26.7% για τα δείγματα με % EY~30, 15 και 4.0, αντίστοιχα. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, η ολική % σχετική μείωση της κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα της β-CD κυμαίνεται μεταξύ 32.5 και 40.0%, ενώ στις κάψουλες του MS από 39.4 (MS) και 38.9% (MS/tween). Από την στατιστική ανάλυση ($p<0.05$) προκύπτει ότι η μικρότερη αποικοδόμηση της κουρκουμίνης παρατηρείται για τις μικροκάψουλες των κυττάρων. Παρόμοια είναι η τάση που παρουσιάζουν τα δείγματα μετά από ισόθερμη θέρμανση σε αδρανείς συνθήκες (σχήμα 10.8.I).

Συνοψίζοντας, η μικροενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη προστατεύεται καλύτερα ενάντια στη θερμική αποικοδόμηση σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη ή η ενθυλακωμένη στην β-CD ή το MS. Ωστόσο, τόσο η β-CD όσο και το MS παρουσιάζουν αξιοσημείωτη προστατευτική δράση ενάντια στη θερμική αποικοδόμηση της κουρκουμίνης, κυρίως σε συνθήκες οξείδωσης, όπου ευνοείται η καταστροφή της. Συνεπώς η ενθυλάκωση μπορεί να εφαρμοστεί για να ενισχύσει τη θερμική σταθερότητα της κουρκουμίνης ή για να επιτευχθεί ελεγχόμενη απελευθέρωσή της σε υψηλές θερμοκρασίες.

10.5. Επίδραση του pH και της υψηλής θερμοκρασίας στην υδρολυτική σταθερότητα και την απελευθέρωση (*dissolution*) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Όπως αναφέρθηκε ήδη το pH αποτελεί καθοριστικό παράγοντα τόσο για την διαλυτότητα και για την αποικοδόμηση της κουρκουμίνης, όσο και για το μηχανισμό απελευθέρωσης και διαλυτοποίησής της (*dissolution profile*) από τις μικροκάψουλες (Bernabe-Pineda, et al., 2004). Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.2) περισσότερο από 90% της κουρκουμίνης αποικοδομείται μέσα σε 12 h δίνοντας trans-6-(4-υδρόξυ-3-μεθόξυ-φαινυλ-)2,4—διόξο-εξενάλη, βανιλλίνη, φερουλικό οξύ, φερουλόυλ-μεθάνιο και άλλα προϊόντα αποικοδόμησης, ενώ είναι πιο σταθερή σε καλλιέργειες κυττάρων που περιέχουν 10% ορό εμβρύου μοσχαριού, καθώς και στο ανθρώπινο αίμα (Pfeiffer et al., 2003). Η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών και κυκλοδεξτρινών ενισχύει την υδρολυτική αστάθεια της (Wang et al., 1997; Tonnesen et al., 1985; Oetari et al., 1996). Σε αλκαλικές συνθήκες, τόσο η διαλυτότητα όσο και η αστάθεια της κουρκουμίνης ενισχύονται, ενώ το χρώμα της κουρκουμίνης χάνεται, δίνοντας ως βασικά προϊόντα αποικοδόμησης φερουλικό οξύ και φερουλόυλ-μεθάνιο (Tomren et al., 2007). Η μελέτη της κινητικής της αποικοδόμησης της κουρκουμίνης σε υδατικό διάλυμα διαφόρων τιμών pH έδειξε ότι είναι δεύτερης τάξεως με τη μέγιστη σταθερότητα να επιτυγχάνεται σε pH <7, όπου όμως η διαλυτότητα της είναι μικρή (Tonnesen et al., 1985).

Στο παρόν πείραμα μελετάται η υδρολυτική σταθερότητα/διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης ή μη) σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα pH 2, 4, 7, 8 σε περιβάλλον ελεγχόμενης θερμοκρασίας (30, 60 και 100^{o}C) για μέγιστο διάστημα 2 h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται διαγραμματικά στο σχήμα 10.9. Η ποσότητα της κουρκουμίνης η οποία έχει απελευθερωθεί και διαλυτοποιηθεί σε καθένα ρυθμιστικό διάλυμα εκφράζεται ως μg

κουρκουμίνης/ml ρυθμιστικού διαλύματος. Αξίζει να αναφερθεί ότι για τις ενθυλακωμένες μορφές της κουρκουμίνης στην β-CD και το MS όπου η αποσάρθρωση και απελευθέρωση της κουρκουμίνης πραγματοποιείται σχεδόν στιγμιαία, η παρούσα μελέτη δίνει πληροφορίες σχετικά με την διαλυτότητα και την σταθερότητα της κουρκουμίνης σε συνάρτηση με το pH και την θερμοκρασία. Αντίθετα, όσον αφορά τις μικροκάψουλες των κυττάρων, οι οποίες αποσαρθρώνονται σταδιακά και η απελευθέρωση της κουρκουμίνης δεν συμβαίνει άμεσα, η μελέτη δίνει επιπλέον πληροφορίες για τον μηχανισμό απελευθέρωσης-διαλυτοποίησης (*dissolution*) σε σχέση με το pH και την θερμοκρασία.

Στο σχήμα 10.9.α παρουσιάζεται η υδρολυτική σταθερότητα όλων των δειγμάτων σε pH 2. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ενθυλακωμένων μορφών στην β-CD και το MS, ενώ οι μικροκάψουλες των κυττάρων μπορούν να χωριστούν σε δυο ομάδες: δείγματα 6 και 8 (με ΕΥ~ 4%) και δείγματα 1, 2, 3, 4, 5, 7 (με ΕΥ~12-30%), των οποίων όμως οι μικρές διαφοροποιήσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p>0.05$). Στους 30^{o}C για δεδομένο χρόνο παραμονής, η ενθυλακωμένη στην β-CD κουρκουμίνη παρουσιάζει την μέγιστη διαλυτότητα και ακολουθούν οι μικροκάψουλες του MS, των κυττάρων και η μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Πιθανότατα τα σύμπλοκα στην β-CD και το MS, γνωστά για την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζουν την υδατοδιαλυτότητα μιας ουσίας, διαλύονται άμεσα στο νερό και απελευθερώνουν την ενθυλακωμένη κουρκουμίνη επίσης άμεσα, ενισχύοντας την υδατοδιαλυτότητά της, σε αντίθεση με τις μικροκάψουλες των κυττάρων οι οποίες χρειάζονται χρόνο για να ενυδατωθούν στο ρυθμιστικό διάλυμα, οπότε και η κουρκουμίνη απελευθερώνεται από αυτές σταδιακά. Καθώς αυξάνεται ο χρόνος παραμονής, η διαλυτότητα της κουρκουμίνης σε όλα τα δείγματα ενισχύεται ($p<0.05$). Στους 60^{o}C, για δεδομένο δείγμα και χρόνο παραμονής, η διαλυτότητα της κουρκουμίνης, ενισχύεται ($p<0.05$) σε σχέση με τους 30^{o}C, ιδιαίτερα της μη-ενθυλακωμένης η οποία μετά από 60 και 120 min παραμονής παρουσίασε την μεγαλύτερη διαλυτότητα. Αντιθέτως, η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρά με τα κύτταρα και ο ρυθμός απελευθέρωσης της είναι αργός, αν και η χαμηλή τιμή του pH είναι καταστροφική για το κυτταρικό τοίχωμα. Η διαλυτότητα της ενθυλακωμένης στην β-CD κουρκουμίνης παραμένει υψηλή τα πρώτα 5 min, ενώ περαιτέρω παραμονή της σε υψηλή θερμοκρασία, ενεργοποιεί τον μηχανισμό αποικοδόμησής της. Στους 100^{o}C η διαλυτότητα της μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης ελαττώνεται μετά από θέρμανση της για 5 min (2.31±0.15 μg/ml) και έφτασε στο 1.64±0.11 μg/ml μετά από θέρμανση 120 min. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται για την

ενθυλακωμένη στην β-CD και το MS κουρκουμίνη η οποία αρχίζει να αποικοδομείται μετά από 5 min (2.85±0.12 και 2.54±0.11 μg/ml, αντίστοιχα) σε αντίθεση με την ενθυλακωμένη στα κύτταρα, της οποίας το προφίλ αποδεικνύει ότι με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται η διαλυτότητα (dissolution) της κουρκουμίνης και η αποικοδόμηση της αρχίζει μετά από παραμονή 60 min. Έτσι, ακόμα και μετά από θέρμανση 120 min η διαλυτότητα της ενθυλακωμένης στα κύτταρα κουρκουμίνης είναι η μέγιστη (2.81±0.14 και 2.28±0.08 μg/ml για τα δείγματα 1 και 8, αντίστοιχα) και ακολουθεί η μη-ενθυλακωμένη (1.64±0.11 μg/ml), η ενθυλακωμένη στο MS (1.58±0.10 μg/ml) και στην β-CD (1.00±0.07 μg/ml).

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα που παρατηρούνται σε pH 4. Για συγκεκριμένο δείγμα, θερμοκρασία και χρόνο, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των pH 2 και 4 ($p>0.05$). Εν συντομία, στους 30 και 60^{o}C σε όλα τα δείγματα, καθώς ο χρόνος παραμονής τους αυξάνεται, η συγκέντρωση της κουρκουμίνης αυξάνεται και τα κύτταρα φαίνεται να προστατεύουν την κουρκουμίνη από την θερμική αποικοδόμηση, καθώς απελευθερώνουν το περιεχόμενο τους σταδιακά. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, αυξάνεται και η ποσότητα της κουρκουμίνης που απελευθερώνεται από τα κύτταρα και στους 100^{o}C ακόμα και μετά από 120 min, η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται για την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη, επιβεβαιώνοντας τον προστατευτικό ρόλο των κυττάρων απέναντι στην αρνητική επίδραση της θέρμανσης, και τον αργό μηχανισμό απελευθέρωσης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) στην συγκέντρωση της κουρκουμίνης παρατηρούνται στο pH 7, όπου η διαλυτότητα της κουρκουμίνης σε όλα τα δείγματα, για συγκεκριμένη θερμοκρασία και χρόνο παραμονής , αυξάνεται σε σχέση με το pH 2 ή 4. Ο σχηματισμός του ανιόντος της κουρκουμίνης είναι υπεύθυνος για την μεγαλύτερη διαλυτότητα της καθώς αυξάνεται το pH (μεγαλύτερη πολική αλληλεπίδραση με το νερό).

Στους 30^{o}C η μέγιστη διαλυτότητα παρατηρείται για την ενθυλακωμένη στην β-CD κουρκουμίνη και ακολουθεί η ενθυλακωμένη στο MS και στα κύτταρα. Μεταξύ των δειγμάτων 8 και 1 των κυττάρων δεν παρατηρούνται διαφορές, δηλώνοντας ότι η διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης δεν επηρεάζεται από την θέση των μορίων της κουρκουμίνης στα κύτταρα, αλλά από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Η αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύει σημαντικά τη διαλυτότητα της κουρκουμίνης. Στους 60^{o}C η μέγιστη διαλυτότητα παρατηρείται για την ενθυλακωμένη στην β-CD κουρκουμίνη τα πρώτα 5 min (1.22±0.03 μg/ml), παρόμοια με αυτή που παρατηρείται για το MS (1.19±0.07 μg/ml), ενώ μετά από 30 min αυξάνεται η

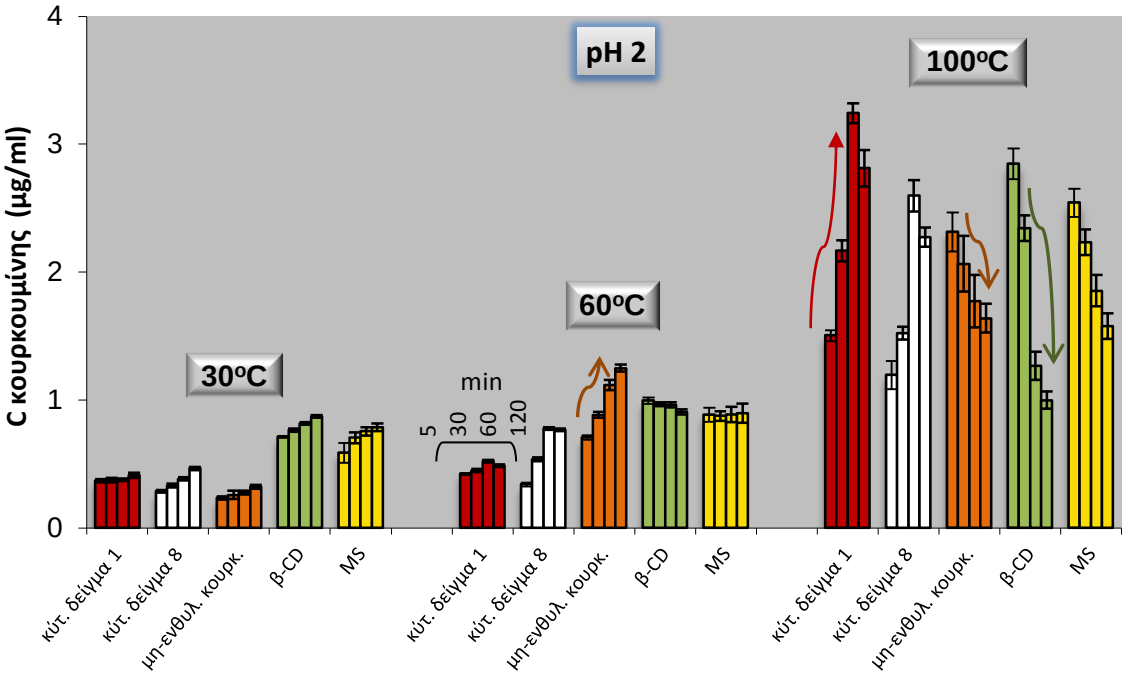
υδρόλυσή της και η μέγιστη διαλυτότητα παρατηρείται για την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη, ενώ ακολουθούν οι μικροκάψουλες των κυττάρων. Το ίδιο προφίλ παρατηρείται στους 100^{o}C με την β-CD να δείχνει την μέγιστη αποικοδόμηση μετά τα 5 πρώτα min. Καθώς ο χρόνος παραμονής αυξάνεται η ενθυλάκωση στα κύτταρα φαίνεται να προσφέρει καλύτερη προστασία ενάντια στην υδρόλυση της κουρκουμίνης, ακόμα και μετά από 2 h. Μεταξύ των 2 δειγμάτων κυττάρων το δείγμα 1 (%ΕΥ 31.8) παρουσιάζει την μεγαλύτερη διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης, πιθανότατα λόγω της παρουσίας μικρότερης ποσότητας κυττάρων τα οποία ενθυλακώνουν την συγκεκριμένη ποσότητα μορίων κουρκουμίνης, και δεν περιορίζουν την απελευθέρωση τους. Παρόλα αυτά, όλες οι μικροκάψουλες των κυττάρων, όπως συμβαίνει και στο χαμηλότερο pH, προσφέρουν μεγαλύτερη προστασία στην κουρκουμίνη ακόμα και μετά από 2 h ($p<0.05$).

Το προφίλ της διαλυτοποίησης της κουρκουμίνης σε pH 8 είναι παρόμοιο με του pH 7, με την διαφορά ότι για κάθε δείγμα παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές για δεδομένη θερμοκρασία και χρόνο, λόγω της ευαισθησίας της κουρκουμίνης στις αλκαλικές συνθήκες. Στους 30^{o}C η μέγιστη διαλυτότητα παρατηρείται για την ενθυλακωμένη στην β-CD και το MS κουρκουμίνη, στους 60^{o}C για την μη-ενθυλακωμένη μετά από παραμονή 60 min, ενώ στους 100^{o}C για τις μικροκάψουλες των κυττάρων.

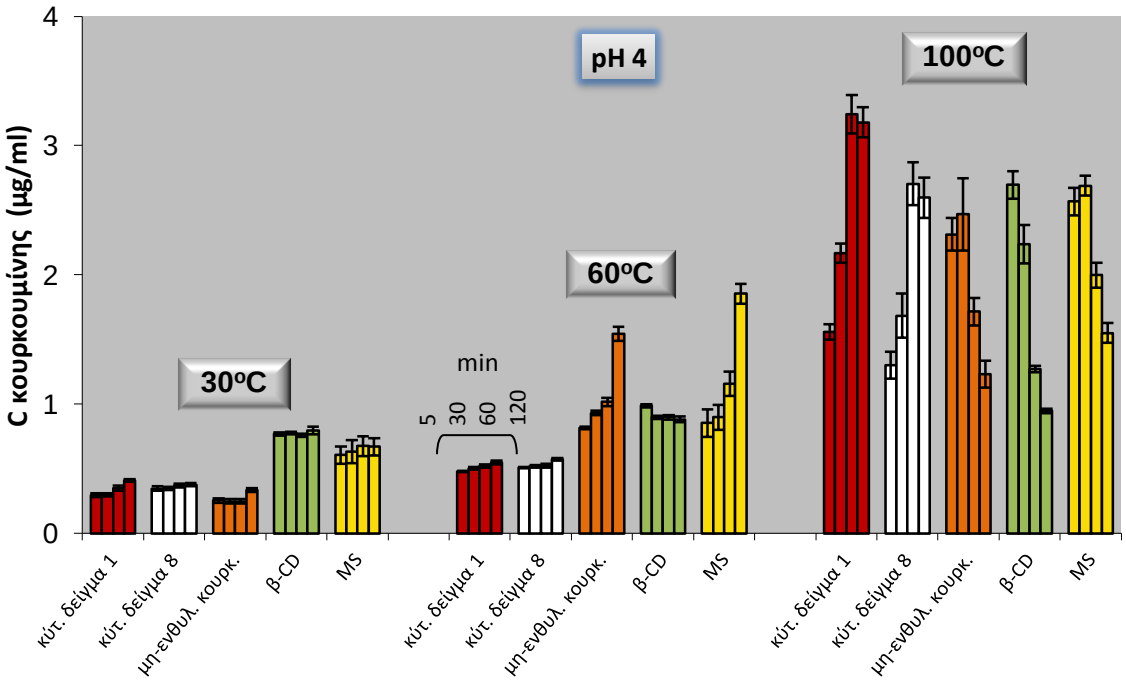
Συνοπτικά, η συμπλοκοποίηση της κουρκουμίνης στην β-CD και στο MS ενισχύει την διαλυτότητα της σε όλες τις τιμές pH, με εξαίρεση τις υψηλές θερμοκρασίες όπου ενισχύει την αποικοδόμηση της. Αντιθέτως, το κυτταρικό τοίχωμα και η πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του *S. cerevisiae* φαίνεται να εμποδίζουν την άμεση απελευθέρωση της κουρκουμίνης και παρατείνουν τον ρυθμό διαλυτοποίησης της, ιδιαίτερα στις χαμηλές θερμοκρασίες (30 και 60^{o}C) για μικρά διαστήματα παραμονής (έως 120 min). Με την άνοδο της θερμοκρασίας (100^{o}C) τα κύτταρα προστατεύουν την κουρκουμίνη πιο αποτελεσματικά και η παρατεταμένη παραμονή ενισχύει τη διαλυτότητα της κουρκουμίνης, σε όλες τις τιμές pH. Μεταξύ των 2 δειγμάτων κυττάρων, το δείγμα 1 (%ΕΥ 31.8) παρουσιάζει την μεγαλύτερη διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης, κυρίως στις υψηλές θερμοκρασίες (100^{o}C), πιθανότατα λόγω της παρουσίας μικρότερης ποσότητας κυττάρων τα οποία συγκρατούν τα μόρια της κουρκουμίνης. Όπως αναμένεται, σε pH 7 ενισχύεται η διαλυτότητα της κουρκουμίνης, ενώ σε pH 8, ενισχύεται ταυτόχρονα και η υδρόλυση της. Δεδομένου ότι η απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τις μικροκάψουλες των κυττάρων πραγματοποιείται πιο αργά σε σχέση με

τις κάψουλες των β-CD και MS, τα μόρια της κουρκουμίνης προστατεύονται πιο αποτελεσματικά από την αλκαλική αποικοδόμηση. Άρα τα κύτταρα αποτελούν ένα ανθεκτικό μέσο ενθυλάκωσης, το οποίο μπορεί να βελτιώσει την διαλυτότητα και την σταθερότητα της κουρκουμίνης κυρίως στις υψηλές θερμοκρασίες.

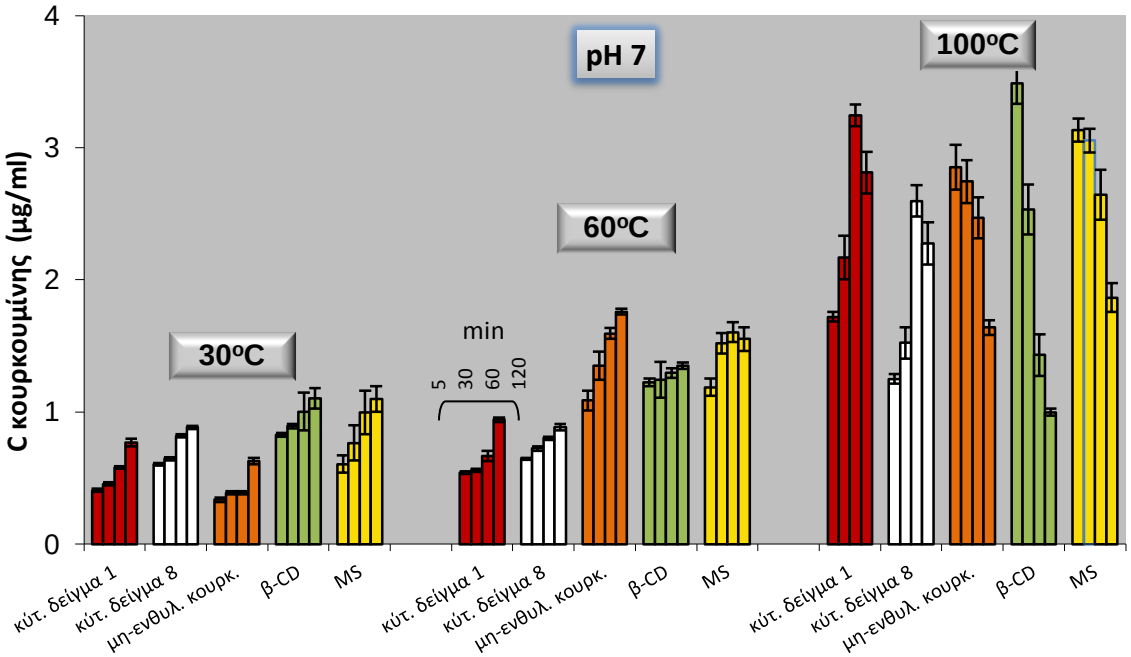
(α)



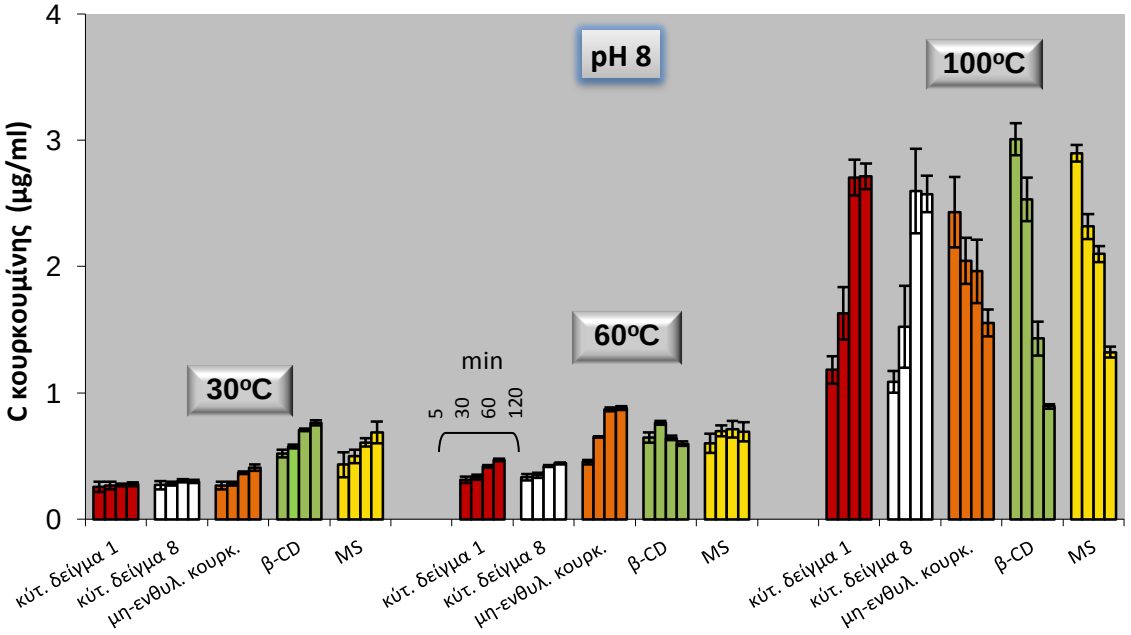
(β)



(γ)



(δ)



Σχήμα 10.9. *Προφίλ διαλυτοποίησης (dissolution profile) της κουρκουμίνης (μη-ενθυλακωμένης, δείγμα 8 κυττάρων με %ΕΥ 3.9, δείγμα 1 κυττάρων με %ΕΥ 31.8%, β-CD με %ΕΥ 3.4 και MS με %ΕΥ 2.9) σε pH (α) 2, (β) 4, (γ) 7 και (δ) 8, στους 30, 60 και 100^{o}C για μέγιστο χρόνο παραμονής 2 h. Μεταξύ των οχτώ μικροκαψουλών των κυττάρων που μελετήθηκαν, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, ούτε και μεταξύ των ενθυλακωμένων μορφών στην β-CD που παρασκευάστηκαν με τις πέντε μεθόδους, καθώς και ούτε μεταξύ των καψουλών MS και MS/tween.*

10.6. Συμπεράσματα

Ένα κατάλληλο μέσο ενθυλάκωσης πρέπει να προστατεύει το ενθυλακωμένο συστατικό από καταστροφικές αντιδράσεις, όπως η οξείδωση και η υδρόλυση καθώς και από αλληλεπιδράσεις με συστατικά του τροφίμου, να αυξάνει τη σταθερότητά του κατά την αποθήκευση και να παρέχει, όταν είναι αναγκαίο, ελεγχόμενη απελευθέρωση. Με τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου αποδεικνύεται ότι τόσο τα κύτταρα του *S. cerevisiae* όσο και η β-CD καθώς και το MS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης συνδυάζοντας κάποια από τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Τα κύτταρα και λιγότερο η β-CD καθώς και το MS, μπορούν να προστατεύσουν αποτελεσματικά την κουρκουμίνη από τις καταστροφικές συνέπειες της έκθεσης της στο φώς, από την αλκαλική υδρόλυση της καθώς και από οξειδωτική αποικοδόμηση της σε υψηλή aw (>0.75). Φαίνεται ότι το δίκτυο του κυτταρικού τοιχώματος το οποίο περιβάλλει την πλασματική μεμβράνη στα κύτταρα παρέχει επιπλέον προστασία στην κουρκουμίνη. Στην ισόθερμη θέρμανση έως τους 150^{o}C για 120 min, κάτω από αδρανείς ή οξειδωτικές συνθήκες, όλες οι ενθυλακωμένες μορφές παρέχουν παρόμοια προστασία ενάντια στην θερμική αποικοδόμηση, ενώ στους 200^{o}C την μεγαλύτερη συγκράτηση της κουρκουμίνης παρέχουν τα κύτταρα. Η μη-ισόθερμη θέρμανση των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες, ενισχύει την αποσύνθεση της κουρκουμίνης, ακόμα και της ενθυλακωμένης στα κύτταρα, η οποία ωστόσο είναι η πιο σταθερή, αν και η β-CD και το MS ενισχύουν επίσης σημαντικά τη θερμική σταθερότητά της. Όσον αφορά το προφίλ της διαλυτοποίησης (*dissolution profile*) της ενθυλακωμένης και μη κουρκουμίνης, επηρεάζεται σημαντικά από το pH. Συγκεκριμένα, η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-CD και MS ενισχύει σημαντικά την διαλυτότητα της στο υδατικό μέσο, αλλά σε υψηλό pH και θερμοκρασίες βρασμού, η ενθυλακωμένη σε κύτταρα κουρκουμίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα και καλύτερη διαλυτοποίηση. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό (Κεφάλαιο 9), φαίνεται ότι η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη απελευθερώνεται σταδιακά, με αργό ρυθμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11ο

Εφαρμογή της ενθυλακωμένης στα κύτταρα S. cerevisiae κουρκουμίνης

11.1. Εισαγωγή

Το τροποποιημένο άμυλο και η β-κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποικιλία τροφίμων (σάλτσες, σούπες, κρεατοσκευάσματα κ.λ.π.) ως μέσα ενθυλάκωσης διαφόρων διατρόφοδραστικών συστατικών. Κύτταρα του *S. cerevisiae* κυκλοφορούν στο εμπόριο ως συμπληρώματα διατροφής (πηγή απαραίτητων αμινοξέων, βιταμινών του συμπλέγματος Β, μαγνησίου, μαγγανίου, ψευδαργύρου, φωσφόρου) και βρίσκεται υπό συνεχή έρευνα η δράση τους έναντι μιας σειράς ασθενειών (σπαστική κολίτιδα, διάφορες μορφές καρκίνου). Ειδικότερα, νεκρά κύτταρα του *S. cerevisiae* και κυρίως οι πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, μελετώνται για πιθανές αντιοξειδωτικές-αντικαρκινικές ιδιότητες.

Η ιδέα της χρήσης των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσο ενθυλάκωσης έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας. Το 1973 αναφέρεται για πρώτη φορά η ικανότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae* που έχουν πλασμολυθεί να συγκρατούν υδατοδιαλυτά συστατικά (Serozym Laboratories). Λίγο αργότερα, το 1977, αναφέρεται η ενθυλάκωση λιποδιαλυτών συστατικών σε κύτταρα με μεγάλο ποσοστό λιπιδίων (> 40% κ.β.) (Swift Company), ενώ το 1982 (Dunlop Ltd), αναφέρεται η ενθυλάκωση με την βοήθεια διαλύτη (ξυλένιο ή τριακετίνη) που θα δράσει ως μεταφορέας της ουσίας. Μια πατέντα του 1987 λίγα χρόνια αργότερα (AD 2 Birmingham, UK) ανέφερε ότι η ενθυλάκωση μπορεί να επιτευχθεί και σε κύτταρα με κανονική περιεκτικότητα σε λιπίδια (<5% w/w), χωρίς την χρήση μεταφορέα και χωρίς να προηγηθεί πλασμόλυση των κυττάρων, επιτυγχάνοντας και

μεγαλύτερα ποσοστά ενθυλάκωσης. Η εργασία αυτή άνοιξε το δρόμο για τη βιομηχανική χρήση των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσα ενθυλάκωσης, τα οποία αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή χαρτιού καρμπόν, με την ενθυλάκωση χρωστικών ουσιών και αργότερα επεκτάθηκαν και στην ενθυλάκωση αρωματικών συστατικών των τροφίμων. Βασιζόμενες σε αυτή την πατέντα μετέπειτα έρευνες επέκτειναν την χρήση αυτού του συστήματος στην ενθυλάκωση αρωματικών ουσιών για την εφαρμογή του σε απορρυπαντικά (Quest, 1990) και αργότερα για την ενθυλάκωση αμινοξέων, ελαίων (British Textile Tech. Group, 1994). Σήμερα μια ελβετική εταιρεία παρασκευής αρωματικών συστατικών (Mincap plc, Merseyside, UK) σε συνεργασία με την Firmenich SA εφαρμόζει αυτό το σύστημα ενθυλάκωσης σε πτητικά αρωματικά συστατικά για εφαρμογή σε τηγανητά τρόφιμα, σούπες, σάλτσες, προκειμένου αυτά να παραμένουν αναλλοίωτα κατά το μαγείρεμα του τροφίμου, αλλά να απελευθερώνονται μετά την επαφή τους με την χλωρίδα του στόματος, επιτυγχάνοντας μεγαλύτερης διάρκειας συγκράτηση των αρωματικών συστατικών σε σχέση με άλλα μέσα ενθυλάκωσης.

Η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη μπορεί να βρει ευρεία εφαρμογή σε προϊόντα αρτοποιίας-ζαχαροπλαστικής. Ο σκοπός από την προσθήκη της κουρκουμίνης σε προϊόντα αρτοποιίας μπορεί να είναι διπλός: ι) παρασκευή λειτουργικών τροφίμων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, για την προαγωγή της υγείας (*health benefits*) και ιι) η αύξηση του χρόνου ζωής (*shelf-life*) του προϊόντος, προς αντικατάσταση των συνθετικών αντιοξειδωτικών.

Η προσθήκη αντιοξειδωτικών σε προϊόντα αρτοποιίας βοηθά στην διατήρηση των λιπαρών υλών, αποτρέποντας τη τάγγιση και το σχηματισμό προϊόντων οξείδωσης, τα οποία μπορεί να είναι τοξικά. Κατά την τάγγιση των λιπαρών υλών αποικοδομούνται οι βιταμίνες (A, C, D, E, φυλλικό οξύ), τα βασικά λιπαρά οξέα (λινολεϊκό οξύ), τα απαραίτητα αμινοξέα όπως η μεθειονίνη, η κυστίνη, η ιστιδίνη, η λυσίνη, η θρυπτοφάνη, ακόρεστες ουσίες επιρρεπείς στην οξείδωση, οδηγώντας σε απώλεια της διατροφικής αξίας του προϊόντος. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ενισχύσουν τον χρόνο ζωής του προϊόντος και να διατηρήσουν τη θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Μπορούν να αποτρέψουν τον αποχρωματισμό ευαίσθητων ουσιών, όπως οι ανθοκυανίνες, τα καροτενοειδή, η μυογλοβίνη, η χλωροφύλλη, καθώς και τις αντιδράσεις αμαύρωσης. Κάποια αντιοξειδωτικά παράλληλα με την αντιοξειδωτική τους δράση έχουν και αντιμικροβιακή. Οι εστέρες του γαλλικού οξέος, τα TBHQ BHA, BHT έχουν βρεθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση σε ποσότητα 300 ppm. Κάποια από τα

γνωστά συνθετικά αντιοξειδωτικά έχουν βρεθεί ότι έχουν τοξικές και καρκινογενείς ιδιότητες, γι' αυτό και υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως η α-τοκοφερόλη, το β-καροτένιο, το ασκορβικό οξύ και η κουρκουμίνη. Δυστυχώς πολλά από αυτά τα αντιοξειδωτικά έχουν μικρότερη δράση σε σχέση με τα συνθετικά και είναι πιθανό η διαδικασία του ψησίματος (baking) να ελαττώνει την αντιοξειδωτική τους δραστικότητα. Ωστόσο η χρησιμοποίηση αυτών των αντιοξειδωτικών σε ενθυλακωμένη μορφή μπορεί να βοηθήσει στο να διατηρήσουν την δραστικότητά τους (Nanditha and Prabhasankar., 2009).

Η προσθήκη κουρκουμίνης σε προϊόντα αρτοποιίας με σκοπό την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων ή την αντικατάσταση των συνθετικών αντιοξειδωτικών έχει αποτελέσει το αντικείμενο κάποιων πρόσφατων μελετών. Ψωμί το οποίο παρασκευάστηκε με αντικατάσταση του αλεύρου έως κατά 4% κ.β. από τουρμέρικ (περιεχόμενο σε κουρκουμίνη περίπου 100 ppm) ήταν οργανοληπτικά αποδεκτό και παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική δραστικότητα, μεγαλύτερη από των BHT, BHA, α-τοκοφερόλης (Lim at al., 2011). Η προσθήκη τουρμέρικ σε κέικ βουτύρου (0.1% κ.β.) επιβράδυνε την ανάπτυξη μυκήτων και ενίσχυσε την σταθερότητα του προϊόντος από 2 σε 4 εβδομάδες, προσφέροντας παρόμοια σταθερότητα με το BHT αλλά καλύτερη από το BHA (3 εβδομάδες). Η σταθερότητα στην οξείδωση, όπως μετρήθηκε με TBA (*thiobarbituric acid*), PV (*peroxide value*), AV (*anisidine value*), βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη του τουρμέρικ (Lean and Mohamed, 1999). Η προσθήκη τουρμέρικ σε τουρσί σε ποσότητα 250 ppm βρέθηκε ότι ελαττώνει τα επίπεδα των αλδεϋδών που σχηματίζονται κατά την οξείδωση, όταν αποθηκεύονται σε πλαστικές συσκευασίες με σημαντική διαπερατότητα στο οξυγόνο (Cleary and McFeeters, 2006).

Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται αρχικά η θέρμο-οξειδωτική σταθερότητα ενός ηλιέλαιου στο οποίο έχει προστεθεί ενθυλακωμένη (σε κύτταρα, β-CD, MS) κουρκουμίνη. Σκοπός δεν είναι η δημιουργία ενός καινοτομικού ηλιέλαιου, το οποίο άλλωστε οργανοληπτικά (κυρίως λόγω χρώματος) δεν θα είναι αποδεκτό. Η κουρκουμίνη (ενθυλακωμένη ή μη) που υπάρχει σε ένα τρόφιμο, έμμεσα, κατά το τηγάνισμα ή το μαγείρεμα του, πιθανότατα θα βρεθεί στο έλαιο και μπορεί να επηρεάσει την οξείδωση/σταθερότητά του. Πραγματοποιείται, επίσης, παρασκευή κριτσινιών στα οποία προστίθεται κουρκουμίνη (ενθυλακωμένη στα κύτταρα ή μη). Στα κριτσίνια γίνεται καταρχήν οργανοληπτικός έλεγχος, δίνοντας έμφαση στα χρωματικά χαρακτηριστικά (L, a, b) τους. Δεδομένου ότι η κουρκουμίνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική δραστικότητα προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική δραστικότητα των κριτσινιών. Μελετάται

επίσης το προφίλ της απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια σε συνθετικό γαστρικό και εντερικό υγρό και προσδιορίζεται και η σταθερότητα του προϊόντος κατά την αποθήκευση και σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης.

11.2. Οξειδωτική σταθερότητα ηλιέλαιου παρουσία ενθυλακωμένης κουρκουμίνης

Η καμπύλη οξείδωσης κάθε δείγματος προκύπτει από την μέτρηση της αγωγιμότητας της φιάλης όπου διαβιβάζονται τα προϊόντα οξείδωσης, τα οποία αποτελούνται από πολικά συστατικά (κυρίως μυρμηγκικό οξύ και άλλα πτητικά καρβοξυλικά οξέα). Από τις καμπύλες οξείδωσης προσδιορίζεται, για το κάθε δείγμα, ο *χρόνος επαγωγής (induction time, IT)* δηλαδή ο χρόνος που ξεκινάει η οξείδωση του ελαίου. Όσο μεγαλύτερος είναι, τόσο πιο σταθερό είναι το έλαιο.

Στον πίνακα 11.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σταθερότητας του ελαίου μετά την προσθήκη ποσότητας 100 και 200 ppm κουρκουμίνης, μη-ενθυλακωμένης καθώς και ενθυλακωμένης σε κύτταρα, β-CD και MS. Η ποσότητα επιλέχθηκε με βάση την μέγιστη επιτρεπόμενη ποσότητα κουρκουμίνης στα τρόφιμα, ως πρόσθετο (200 ppm). Για καθένα δείγμα υπολογίζεται ο *συντελεστής προστασίας (protection factor, PF):*

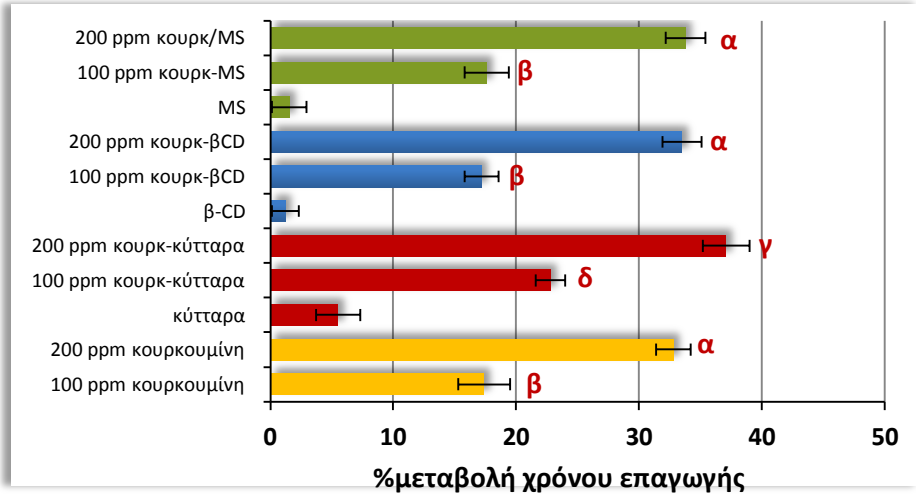
PF= IT με κουρκουμίνη /IT χωρίς κουρκουμίνη

Όσο >1 είναι ο PF, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική δραστικότητα του δείγματος. Η παρουσία β-CD ή MS στο ηλιέλαιο δεν αυξάνει την σταθερότητα του ηλιέλαιου, ενώ αντίθετα η παρουσία περίσσειας (20 mg) κυττάρων έχει την τάση να αυξήσει (5.52%) την οξειδωτική σταθερότητα του ηλιέλαιου. Η παρουσία έστω και 100 ppm κουρκουμίνης αυξάνει σημαντικά την σταθερότητα του ελαίου (17.41%). Η μεγαλύτερη σταθερότητα παρατηρείται για την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη ($p<0.05$) ενώ η ενθυλάκωση στην β-CD και το MS αυξάνει την σταθερότητα του ελαίου στον ίδιο βαθμό με την μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη ($p>0.05$). Μεταξύ των δειγμάτων 3 και 6 των μικροκαψουλών των κυττάρων δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0.05$). Παρόμοια τάση παρατηρείται και με την προσθήκη 200 ppm κουρκουμίνης στο έλαιο.

Πίνακας 11.1. *Χρόνος επαγωγής (IT) και συντελεστής προστασίας (PF) ηλιέλαιου, μετά την προσθήκη 100 και 200 ppm κουρκουμίνης, μη ενθυλακωμένης και ενθυλακωμένης σε κύτταρα S. cerevisiae, β-CD και MS. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει την μέση τιμή±S.D (n=3).*

Συνθήκες Rancimat : 90°C, ροή αερίου 20 l/h.

Δείγμα	***Χρόνος επαγωγής***	***PF***	***% αύξηση***
Ηλιέλαιο	5.80±0.12		
Ηλιέλαιο/κύτταρα	6.12±0.18	1.06	5.52
Ηλιέλαιο/β-CD	5.87±0.13	1.01	1.21
Ηλιέλαιο/MS	5.89±0.14	1.02	1.55
Ηλιέλαιο/100 ppm κουρκουμίνη	6.81±0.21	1.17	17.41
Ηλιέλαιο/100 ppm κουρκ-κύτταρα	7.12±0.12	1.23	22.76
Ηλιέλαιο/100 ppm κουρκ-βCD	6.80±0.14	1.17	17.24
Ηλιέλαιο/100 ppm κουρκ-MS	6.82±0.18	1.18	17.59
Ηλιέλαιο/200 ppm κουρκουμίνη	7.70±0.14	1.33	32.76
Ηλιέλαιο/200 ppm κουρκ-κύτταρα	7.95±0.19	1.37	37.07
Ηλιέλαιο/200 ppm κουρκ-βCD	7.74±0.16	1.33	33.45
Ηλιέλαιο/200 ppm κουρκ/MS	7.76±0.19	1.34	33.79

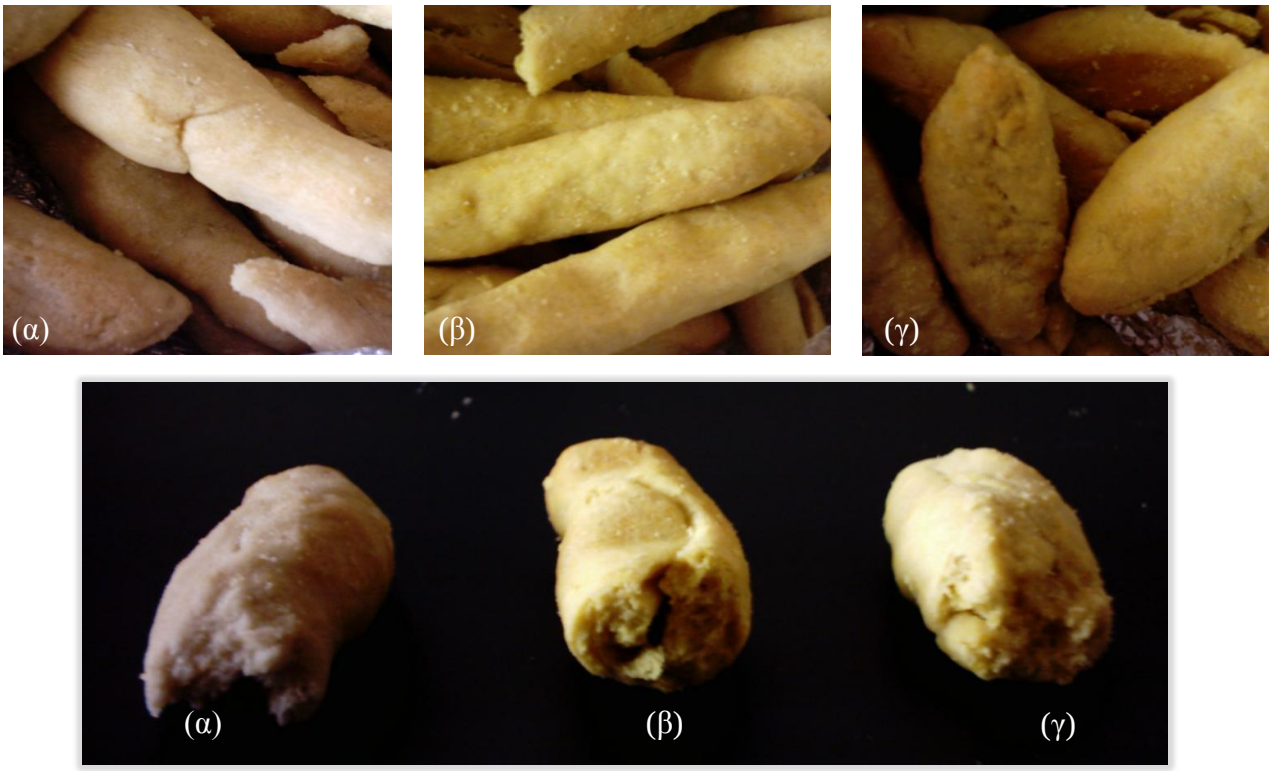


Επομένως, η παρουσία κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης ή μη) ακόμα και σε ποσότητες 100-200 ppm σε ένα έλαιο μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητά του απέναντι στην οξείδωση, έως 32%. Ιδιαίτερα η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη, αυξάνει περισσότερο την θέρμο-οξειδωτική σταθερότητα του ελαίου (σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη και την ενθυλακωμένη στην β-CD και το MS), πιθανότατα διότι ως ενθυλακωμένη στα κύτταρα προστατεύεται περισσότερο και διατηρεί τη δραστικότητά της στις υψηλές θερμοκρασίες και διότι τα κύτταρα από μόνα τους φαίνεται να παρουσιάζουν μια μικρή αντιοξειδωτική δραστικότητα.

11.3. Παρασκευή κριτσινιών με κουρκουμίνη

11.3.1. Οργανοληπτικός έλεγχος

Στα κριτσίνια που παρασκευάστηκαν αξιολογήθηκε το σχήμα, το μέγεθος τους, η γεύση, το χρώμα και η οσμή τους, έχοντας ως σημείο αναφοράς τα κριτσίνια που δεν περιέχουν κουρκουμίνη. Στο σχήμα 11.1 παρουσιάζεται φωτογραφία με τα κριτσίνια που παρασκευάστηκαν. Τα κριτσίνια τα οποία παρασκευάστηκαν με ενθυλακωμένη σε κύτταρα κουρκουμίνη (σχήμα 11.1.γ) είναι λίγο μεγαλύτερα σε μέγεθος σε σχέση με αυτά στα οποία προστέθηκε στερεή κουρκουμίνη, πιθανότατα λόγω της παρουσίας των κυττάρων. Η προσθήκη κουρκουμίνης, τουλάχιστον στην ποσότητα των θεωρητικά 200 ppm, δεν επέφερε ιδιαίτερες αλλαγές στην γεύση των κριτσινιών, ενώ αντίθετα τροποποίησε ελαφρώς το άρωμα τους. Η μεγαλύτερη αλλαγή που επέφερε η προσθήκη κουρκουμίνης είναι στο χρώμα του προϊόντος. Συγκεκριμένα, η προσθήκη κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης και μη) κατά την παρασκευή των κριτσινιών, δίνει ένα έντονο κίτρινο χρώμα στο τελικό προϊόν.



Σχήμα 11.1*. Φωτογραφία κριτσινιών που παρασκευάστηκαν: (α) χωρίς κουρκουμίνη και με την προσθήκη θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης (β) μη-ενθυλακωμένης και (γ) ενθυλακωμένης σε κύτταρα S. cerevisiae.*

Στον πίνακα 11.2 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά του χρώματος (L, a, b) των κριτσινιών, όπως μετρήθηκαν με το χρωματόμετρο. Είναι εμφανές ότι με την προσθήκη κουρκουμίνης στα κριτσίνια αυξάνεται σημαντικά η φωτεινότητα (L) των δειγμάτων, καθώς και η κίτρινη χροιά τους, όπως προκύπτει από την αύξηση (σχεδόν 100%) της τιμής του b. Σημαντικό είναι ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ($p>0.05$) στα χαρακτηριστικά χρώματος των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη ελεύθερης κουρκουμίνης και αυτών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη ενθυλακωμένης. Επομένως η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης στα κύτταρα δεν εξαλείφει την χρωστική της ικανότητα, κάτι που την καθιστά ικανή να εφαρμοστεί σε τρόφιμα, όπου σκοπός είναι να προσδώσει μια κίτρινη χροιά.

Πίνακας 11.2. Χαρακτηριστικά του χρώματος (L, a, b) των κριτσινιών *που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης σε κύτταρα S. cerevisiae και μη-ενθυλακωμένης).*

Δείγμα	***L***	***a***	***b***
Κριτσίνι	59.34	6.90	**28.42**
Κριτσίνι/200 ppm κουρκουμίνη	75.70	-3.79	**58.63**
Κριτσίνι/200 ppm κουρκουμίνη-κύτταρα	73.05	-1.04	**58.19**

11.3.2. Περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη και αντιοξειδωτική δραστικότητα των κριτσινιών

Η προσθήκη κουρκουμίνης στα κριτσίνια, πέρα από την αλλαγή που επιφέρει στο χρώμα, μελετάται κατά πόσο μπορεί να ενισχύσει και τη διατροφική του αξία, προσδίδοντας του αντιοξειδωτική δραστικότητα. Στον πίνακα 11.3 παρουσιάζεται η μετρούμενη πραγματική περιεκτικότητα των κριτσινιών σε κουρκουμίνη καθώς και η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH των εκχυλισμάτων των δειγμάτων. Δεδομένου ότι στα δείγματα που περιέχουν θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης προστέθηκαν 4 ml διαλύτη, τα εκχυλίσματα περιέχουν (θεωρητικά) 50 μg/ml κουρκουμίνη. Στην πραγματικότητα, η μέτρηση της περιεκτικότητας των κριτσινιών σε κουρκουμίνη δείχνει ότι τα κριτσίνια στα οποία προστέθηκε μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη περιέχουν πρακτικά 135 ppm κουρκουμίνης, σε αντίθεση με αυτά στα οποία προστέθηκε κουρκουμίνη ενθυλακωμένη στα κύτταρα, όπου περιέχουν 184

ppm κουρκουμίνης. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι κατά το ψήσιμο των κριτσινιών υπήρχε απώλεια κουρκουμίνης κατά 32.5% όταν αυτή προστέθηκε ως μη-ενθυλακωμένη, ενώ αντίθετα, η προσθήκη ενθυλακωμένης κουρκουμίνης οδήγησε σε απώλεια μόλις 8.0%. Άρα, η χρησιμοποίηση ενθυλακωμένης σε κύτταρα κουρκουμίνης έναντι μη-ενθυλακωμένης, έχει ως βασικό πλεονέκτημα ότι μπορεί να περιορίσει τις απώλειες της κουρκουμίνης (λόγω θερμικής αποικοδόμησής της) κατά το ψήσιμο, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της § 10.4. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στην αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων των δειγμάτων, όπου της ενθυλακωμένης είναι κατά 21.6% μεγαλύτερη σε σχέση με της μη-ενθυλακωμένης. Τα αποτελέσματα του πίνακα 11.3 έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δραστικότητας των δειγμάτων, όπως περιγράφηκαν στην § 9.5.

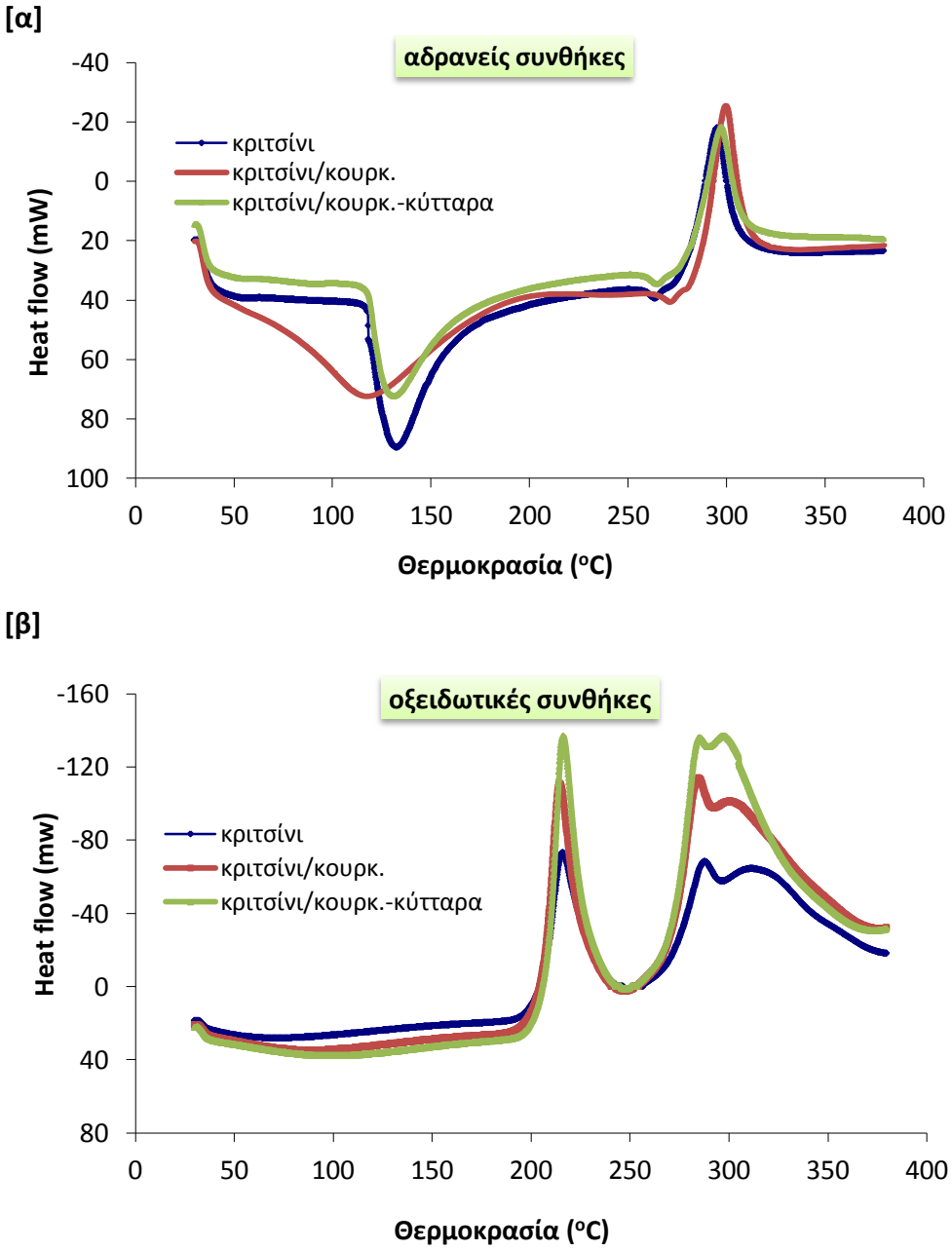
Πίνακας 11.3. *% Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH των εκχυλισμάτων των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης σε κύτταρα S. cerevisiae και μη-ενθυλακωμένης). Τα εκχυλίσματα θεωρητικά περιέχουν 50 μg/ml κουρκουμίνη.*

Δείγμα	*Πραγματική περιεκτικότητα κουρκουμίνης (ppm)*	***% DPPH scavenging***
Κριτσίνι	-	**0.92±0.06**
Κριτσίνι/200 ppm κουρκ.	135	**30.01±2.16 (33.8 μg/ml)**
Κριτσίνι/200 ppm κουρκ.-κύτταρα	**184**	**51.56±2.24 (46.0 μg/ml)**

Στα σκέτα κριτσίνια η μικρή αντιοξειδωτική δραστικότητα πιθανότατα προέρχεται από κάποια αντιοξειδωτικά συστατικά που περιέχονται στο ελαιόλαδο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους. Αν και τα κριτσίνια που παρασκευάστηκαν με τις δύο μορφές της κουρκουμίνης διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητα τους σε κουρκουμίνη, δεν διαφέρουν στα χαρακτηριστικά χρώματος, όπως αναφέρθηκε στην § 11.3.1. Αυτό πιθανότατα αποδίδεται στην παρουσία των κυττάρων, η οποία αντισταθμίζει την ένταση του χρώματος της μεγαλύτερης περιεχόμενης ποσότητας κουρκουμίνης. Ωστόσο, είναι προφανές ότι η προσθήκη κουρκουμίνης, ακόμα και μη-ενθυλακωμένης, αλλά περισσότερο της ενθυλακωμένης, προσδίδει αντιοξειδωτική δραστικότητα και λειτουργικές ιδιότητες στο προϊόν, ενισχύοντας τη διατροφική του αξία.

11.3.3. Μελέτη των κριτσινιών σε αδρανείς και οξειδωτικές συνθήκες με DSC

Στο σχήμα 11.2 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα DSC των κριτσινιών. Σε αδρανείς συνθήκες όλα τα δείγματα εμφανίζουν μια ευρεία ενδόθερμη κορυφή με μέγιστο στους περίπου 130°C, πιθανότατα λόγω της απώλειας υγρασίας και μια εξώθερμη που ξεκινά στους 280°C, δηλώνοντας την αποικοδόμηση του προϊόντος. Σε οξειδωτικές συνθήκες, σε όλα τα δείγματα, ξεκινά η οξείδωση-αποικοδόμηση του κριτσινιού, όπως αναμένεται, σε χαμηλότερη θερμοκρασία, στους περίπου 197°C. Μεταξύ των δειγμάτων δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές.



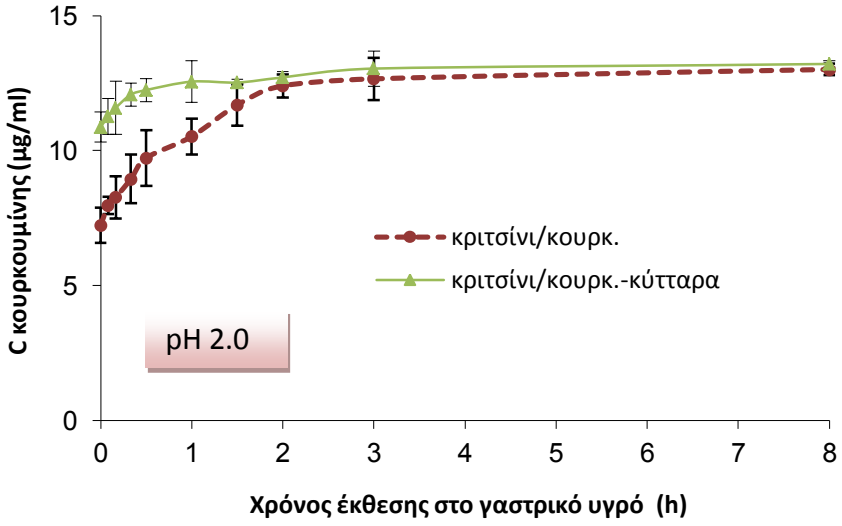
Σχήμα 11.2. *Θερμογραφήματα DSC σε: α) αδρανείς και β) οξειδωτικές συνθήκες, των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με κουρκουμίνη.*

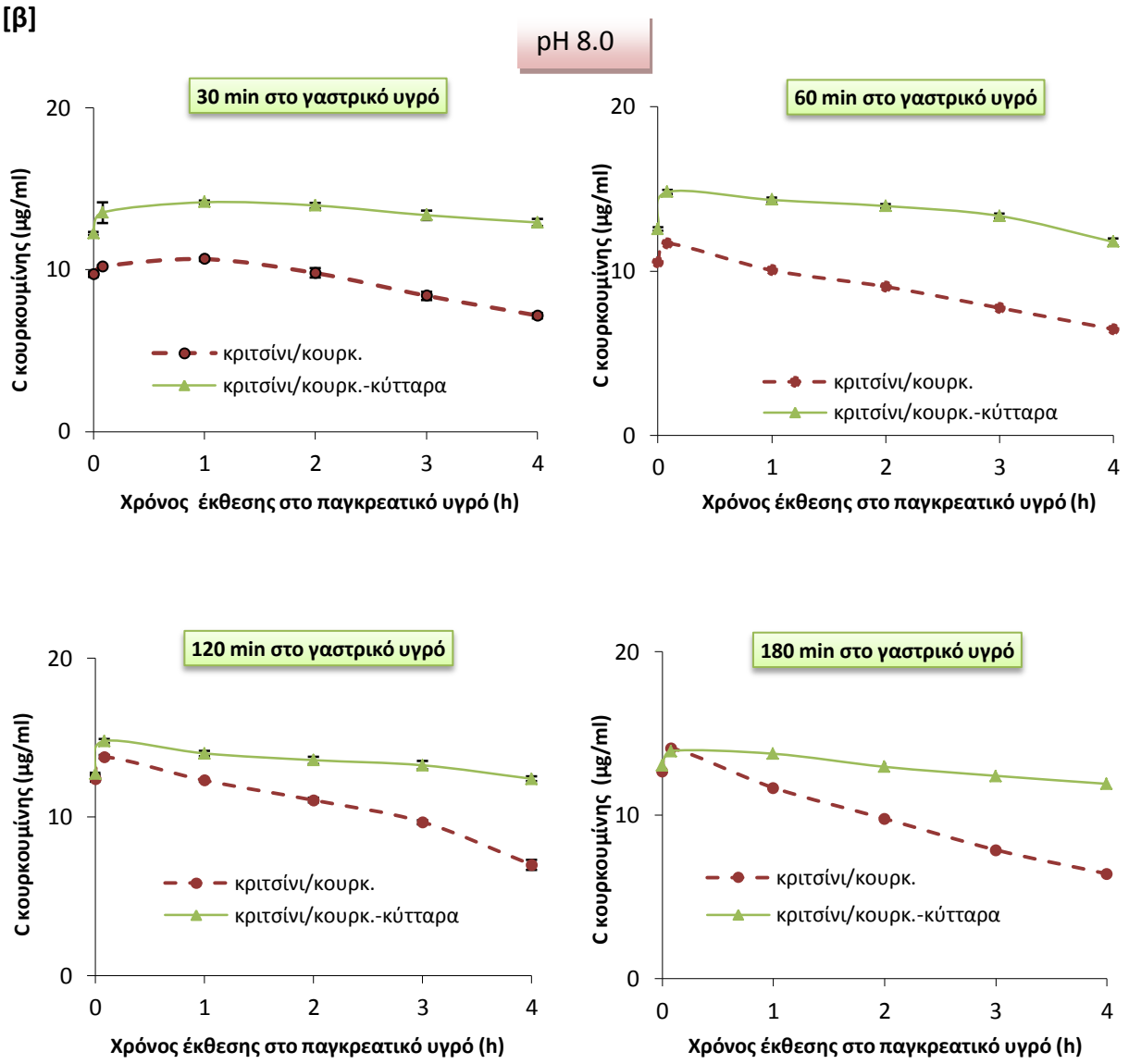
11.3.4. Προφίλ απελευθέρωσης (*dissolution profile*) της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό

Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 9 τροποποιεί τις ιδιότητες απελευθέρωσης της κουρκουμίνης κατά την πέψη του τροφίμου. Τα αποτελέσματα από την μελέτη των δειγμάτων των κριτσινιών σε συνθετικό γαστρικό και εντερικό υγρό συνοψίζονται στο σχήμα 11.3.

Κατά την έκθεση των κριτσινιών στο γαστρικό υγρό (σχήμα 11.3.α), αρχικά η συγκέντρωση της ενθυλακωμένης στα κύτταρα κουρκουμίνης είναι λίγο μεγαλύτερη σε σχέση με της μη-ενθυλακωμένης, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας των κριτσινιών σε ενθυλακωμένη απ' ότι σε μη-ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του κεφαλαίου 9, η διαλυτοποίηση της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης φαίνεται να ακολουθεί πιο αργό ρυθμό σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη και η ενθυλάκωση φαίνεται να ενισχύει την διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης. Κατά την έκθεση στο παγκρεατικό υγρό (σχήμα 11.3.β) η συγκέντρωση της κουρκουμίνης αρχικά αυξάνεται, λόγω του αλκαλικού pH, ενώ με την πάροδο του χρόνου η συγκέντρωση της ελαττώνεται λόγω της αλκαλικής υδρόλυσής της. Η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα και συνεπώς μεγαλύτερη συγκέντρωση στο αλκαλικό pH, σε σχέση με την μη-ενθυλακωμένη.

[α]





Σχήμα 11.3. *Προφίλ απελευθέρωσης (dissolution profile) της κουρκουμίνης από τα κριτσίνια μετά από έκθεση σε συνθετικό: (α) γαστρικό υγρό και (β) παγκρεατικό υγρό, αφού προηγηθεί επώαση 30, 60, 120 και 180 min σε γαστρικό υγρό.*

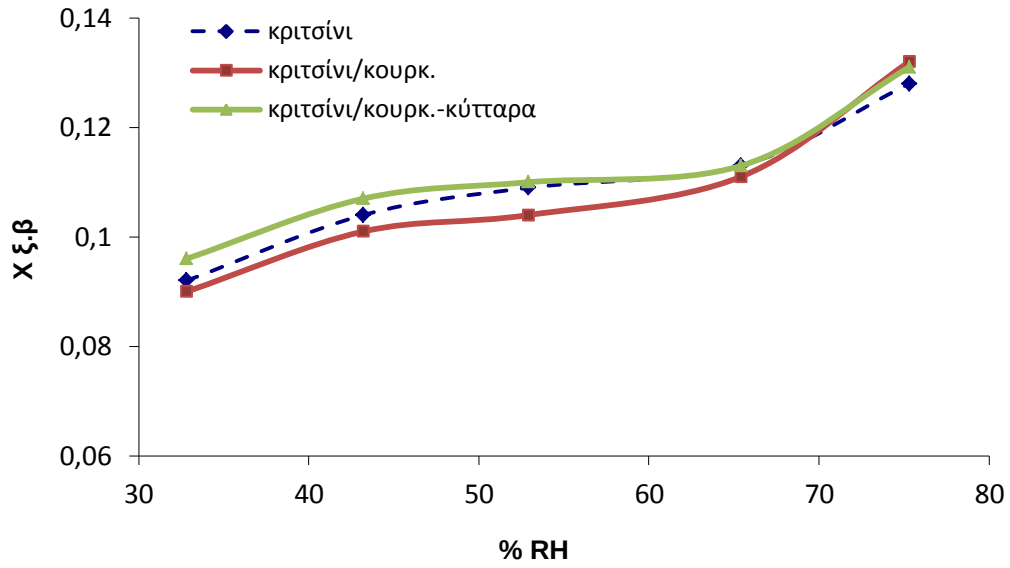
11.3.5. Προσδιορισμός της υγρασίας των κριτσινιών

Στον πίνακα 11.4 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της υγρασίας (σε νωπή και ξηρή βάση) των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με κουρκουμίνη (ενθυλακωμένη και μη-ενθυλακωμένη). Όπως αναμένεται, η προσθήκη κουρκουμίνης στην συγκεκριμένη ποσότητα, δεν τροποποιεί την % κ.β. περιεκτικότητα σε νερό του προϊόντος, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τις ισόθερμες ρόφησης των δειγμάτων (σχήμα 11.4).

Πίνακας 11.4. *% κ.β. υγρασία σε υγρή και ξηρή βάση, των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης (μη-ενθυλακωμένης και ενθυλακωμένης σε κύτταρα S. cerevisiae).*

Δείγμα	***% υγρασία (ν.β.)***	***% υγρασία (ξ.β.)***
Κριτσίνι	9.68±1.32	**10.7±0.98**
Κριτσίνι/200 ppm κουρκ.	9.52±0.76	**10.4±1.14**
Κριτσίνι/200 ppm κουρκ.-κύτταρα	9.32±1.11	10.3±0.96

**kg νερού/100 kg νωπού τροφίμου*
*** kg νερού/100 kg ξηρού τροφίμου*



Σχήμα 11.4. *Ισόθερμες ρόφησης των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης (μη-ενθυλακωμένης και ενθυλακωμένης σε κύτταρα S. cerevisiae).*

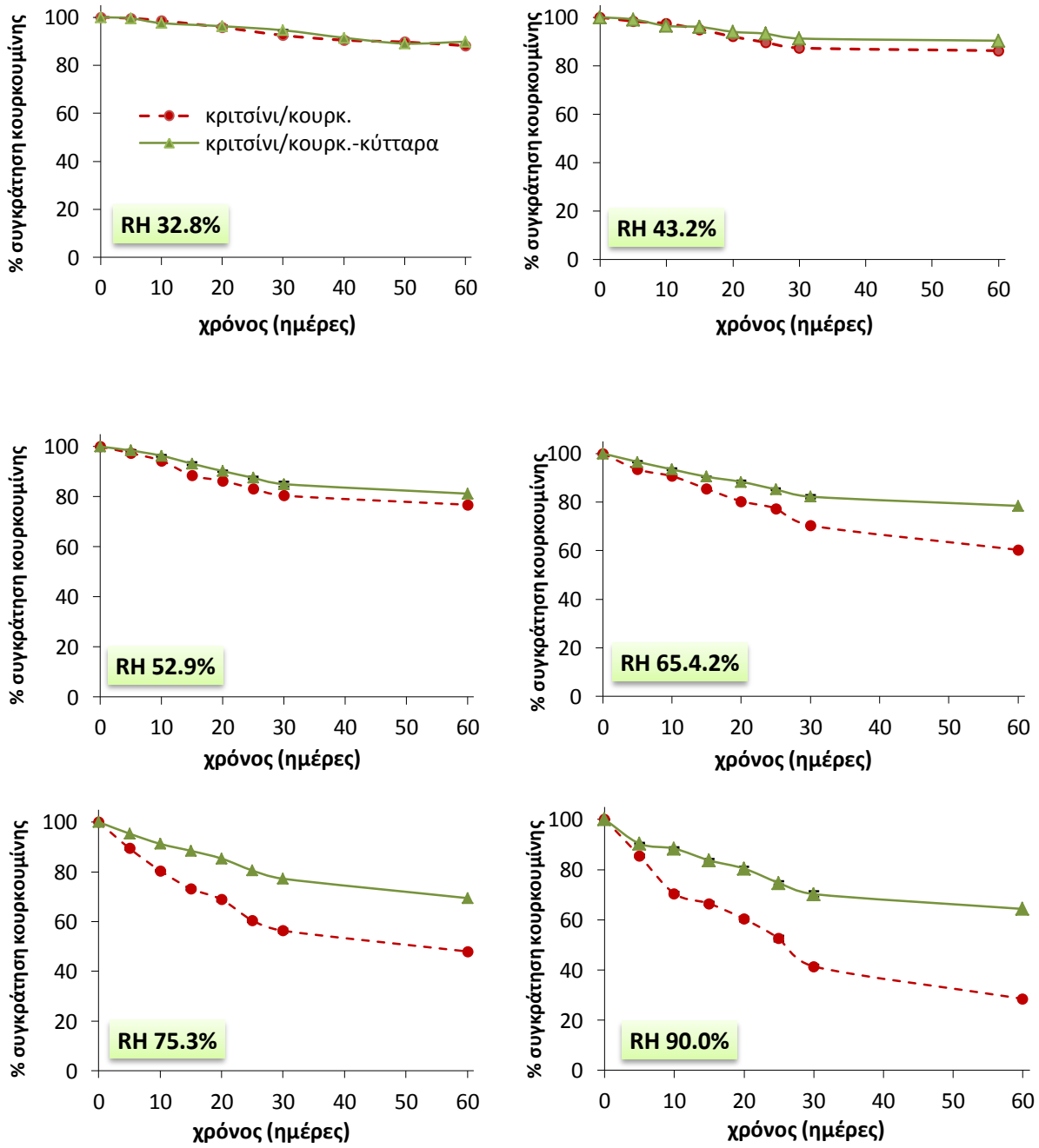
11.3.6. Σταθερότητα της κουρκουμίνης κατά την αποθήκευση των κριτσινιών

Η προσθήκη της κουρκουμίνης στο τρόφιμο τους προσέδωσε αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως αναφέρθηκε στην § 11.3.2. Η αντιοξειδωτική αυτή δραστικότητα καθώς και η περιεκτικότητα του τροφίμου σε κουρκουμίνη ενδέχεται να μεταβάλλονται κατά την αποθήκευση του

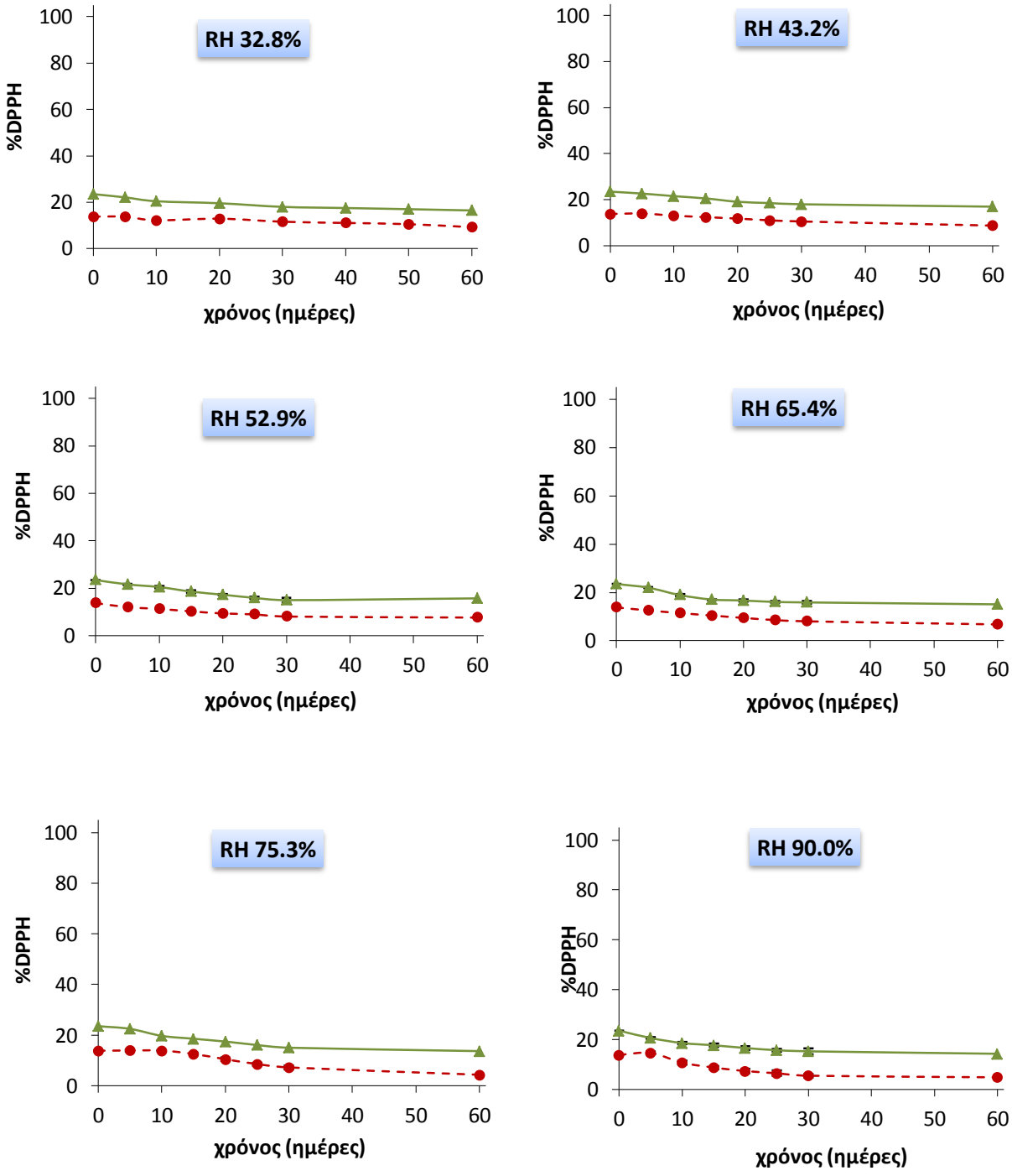
τροφίμου, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Ιδιαίτερο ρόλο στην σταθερότητα της κουρκουμίνης στο τρόφιμο παίζει η έκθεση της στο φώς.

Στο σχήμα 11.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την μελέτη της σταθερότητας της κουρκουμίνης στα κριτσίνια, κατά την έκθεση τους στο φώς, σε περιβάλλον ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας (σχήμα 11.5.α), καθώς και η αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων τους (σχήμα 11.5.β).

[α]



[β] %DPPH



Σχήμα 11.5. *(α) % Συγκράτηση της κουρκουμίνης και (β) αντιοξειδωτική δραστικότητα των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη θεωρητικά 200 ppm κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης σε κύτταρα ή μη) κατά την έκθεση τους στο φώς για 60 ημέρες, σε περιβάλλον ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας (% RH).*

Σε περιβάλλον %RH από 32.8 έως 52.9 η κουρκουμίνη (ενθυλακωμένη ή μη) παρουσιάζει καλή συγκράτηση (τουλάχιστον 70%) στα κριτσίνια ακόμα και μετά από αποθήκευση 2 μηνών. Όταν η σχετική υγρασία ξεπερνά το 65.4% και ιδιαίτερα σε περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας 90.0% η κουρκουμίνη αποικοδομείται με πιο έντονο ρυθμό, κυρίως τις πρώτες 30 ημέρες. Σε %RH 75.3 το 50% της κουρκουμίνης παραμένει σταθερό ακόμα και μετά από 2 μήνες, ενώ σε %RH 90.0 μόλις το περίπου 30% της κουρκουμίνης παραμένει σταθερό. Η κουρκουμίνη η οποία προστέθηκε στο προϊόν με την ενθυλακωμένη της μορφή παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα (τουλάχιστον κατά 30-97%, στις υψηλές τιμές %RH) κατά την αποθήκευση. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη της κουρκουμίνης σε ένα τρόφιμο στην ενθυλακωμένη της μορφή, την καθιστά πιο σταθερή ενάντια στην οξειδωτική αποικοδόμηση, η οποία ευνοείται στις υψηλές τιμές RH. Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δραστικότητας των δειγμάτων επιβεβαιώνει τα παραπάνω αποτελέσματα (σχήμα 11.5.β), με τα δείγματα που περιέχουν την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Στον πίνακα 11.5 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από την μέτρηση των χρωματικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων μετά από αποθήκευση τους για 60 ημέρες στο φως. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της % συγκράτησης της κουρκουμίνης και της αντιοξειδωτικής δραστικότητας των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, σε κάθε δείγμα καθώς αυξάνεται η σχετική υγρασία παρατηρείται αύξηση στην τιμή της φωτεινότητας και σημαντική μείωση της τιμής b (κιτρινότητας) λόγω αποικοδόμησης της κουρκουμίνης. Ωστόσο τα δείγματα που περιέχουν την ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη, παρουσιάζουν μικρότερες μεταβολές των χρωματικών τους χαρακτηριστικών και τις μεγαλύτερες τιμές της συνιστώσας b, λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας και περιεκτικότητάς τους σε κουρκουμίνη.

Πίνακας 11.5. *Χαρακτηριστικά χρώματος (L, a, b) των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη 200 ppm κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης σε κύτταρα ή μη) μετά την έκθεση τους στο φως για 60 ημέρες, σε περιβάλλον ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας (%RH).*

	Κριτσίνι			*Κριτσίνι/200 ppm κουρκουμίνη*			*Κριτσίνι/200 ppm ενθυλακωμένη κουρκουμίνη*		
	L	*a*	*b*	*L*	*a*	*b*	*L*	*a*	*b*
	59.34	6.90	28.42	75.70	-3.79	58.63	73.05	-1.04	58.19
60 ημέρες									
32.8%	61.05	6.32	25.98	77.04	-2.92	40.16	74.08	-1.11	52.59
43.2%	63.72	5.14	24.34	78.56	-2.95	36.93	75.48	-1.09	49.06
52.9%	64.03	5.05	23.40	79.17	-3.17	34.80	76.44	-3.16	47.96
65.4%	64.92	5.04	23.16	80.88	-3.12	30.05	76.91	-3.60	43.99
75.3%	65.64	4.97	22.61	81.74	-3.10	25.60	77.30	-3.13	41.57
90.0%	66.31	4.59	22.54	82.34	-3.21	23.12	77.87	-3.23	40.92

Τα δείγματα μελετήθηκαν επίσης ως προς την σταθερότητα της κουρκουμίνης σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης, μετά από παραμονή στους 60^{o}C για 20 ημέρες. Αξιολογήθηκε η % συγκράτηση της κουρκουμίνης, η αντιοξειδωτική τους δραστικότητα καθώς και τα χαρακτηριστικά χρώματος τους (πίνακας 11.6). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν την ίδια τάση με αυτή που παρατηρείται κατά την έκθεση των δειγμάτων στο φώς. Ειδικότερα, κατά την επιταχυνόμενη οξείδωση των δειγμάτων ελαττώνεται η ένταση του κίτρινου χρώματος της κουρκουμίνης, λόγω αποικοδόμησής της. Μετά το πέρας των 20 ημερών μόλις το 29.7% της κουρκουμίνης παρέμεινε στο τρόφιμο, ενώ όταν αυτή προστέθηκε με την μορφή ενθυλακωμένης σκόνης το 50.1% της αρχικής ποσότητας δεν οξειδώθηκε. Ομοίως, και η αντιοξειδωτική δραστικότητα του δείγματος που περιέχει την ενθυλακωμένη κουρκουμίνη, παρουσιάζεται μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνου που την περιέχει μη-ενθυλακωμένη. Επομένως, όταν η κουρκουμίνη προστίθεται σε ένα τρόφιμο ως ενθυλακωμένη φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα (ποσοστό συγκράτησης και αντιοξειδωτική δραστικότητα) απ' ότι η μη-ενθυλακωμένη, σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης.

Πίνακας 11.6. *% Συγκράτηση της κουρκουμίνης, αντιοξειδωτική δραστικότητα και χαρακτηριστικά χρώματος των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη 200 ppm κουρκουμίνης (ενθυλακωμένης σε κύτταρα και μη) κατά την αποθήκευση τους για 20 ημέρες στους 60°C.*

	0 ημέρες			*10 ημέρες*			*20 ημέρες*		
	% συγκράτηση	*% DPPH*	*Χρώμα L a b*	*% συγκράτηση*	*% DPPH*	*Χρώμα L a b*	*% συγκράτηση*	*% DPPH*	*Χρώμα L a b*
κριτσίνι		3.4	59.34 6.90 28.42		0.8	61.54 3.67 26.54		0.1	62.44 2.06 25.84
Κριτσίνι/ 200 ppm κουρκ.	100	13.8	75.70 -3.79 58.63	50.4	9.21	78.54 -2.23 38.43	29.7	5.43	79.43 -2.11 32.21
Κριτσίνι/ 200 ppm κουρκ.-κύτταρα	100	24.7	73.05 -1.04 58.19	71.8	19.7	75.34 -2.12 45.23	50.1	15.6	76.43 -2.34 40.31

11.3.7. Οξειδωτική σταθερότητα των κριτσινιών

Η συσκευή Rancimat (συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης) χρησιμοποιείται και για να εκτιμηθεί η οξειδωτική σταθερότητα των κριτσινιών και κατά πόσο η παρουσία κουρκουμίνης σε αυτά (ενθυλακωμένης και μη) μπορεί να αυξήσει τον χρόνο ζωής (*shelf-life*) του προϊόντος. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 11.7. Η σταθερότητα των δειγμάτων εκφράζεται ως:

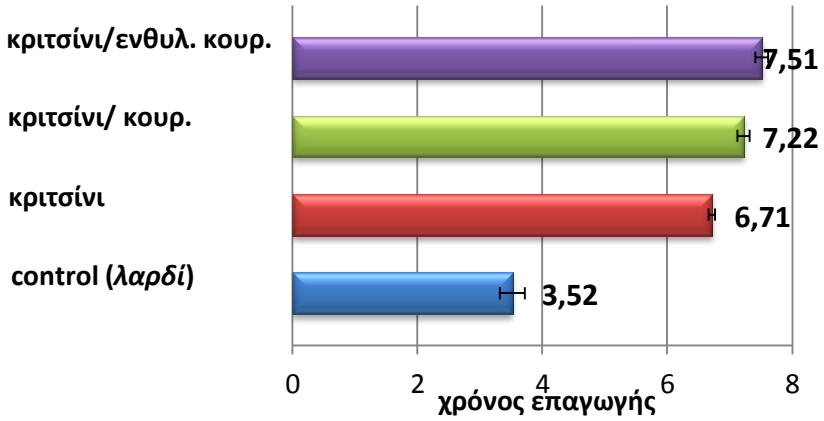
$$\textit{Stability Index (SI)} = \frac{\text{Χρόνος επαγωγής δείγματος}}{\text{Χρόνος επαγωγής control}}$$

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του *SI* τόσο πιο σταθερό είναι το δείγμα. Η ανάλυση δείχνει ότι, όπως αναμένεται, η οξειδωτική σταθερότητα των κριτσινιών είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το control (λαρδί). Η παρουσία μη-ενθυλακωμένης κουρκουμίνης (πρακτικά 135 ppm) ενισχύει λίγο την οξειδωτική σταθερότητα των κριτσινιών (7.4%) ενώ η παρουσία της ενθυλακωμένης

στα κύτταρα κουρκουμίνης σε μεγαλύτερη ποσότητα (πρακτικά 184 ppm), την ενισχύει, όπως αναμένεται, παραπάνω (11.7%). Δεδομένου ότι η κουρκουμίνη φαίνεται να έχει την τάση να αυξάνει την οξειδωτική σταθερότητα ενός τροφίμου και δεδομένου ότι μπορεί να προστεθεί στα τρόφιμα σε ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσει τον χρόνο ζωής ενός προϊόντος, αντικαθιστώντας τα συνθετικά αντιοξειδωτικά.

Πίνακας 11.7. *Σταθερότητα (Stability Index, SI) των κριτσινιών που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη 200 ppm κουρκουμίνης, μη-ενθυλακωμένης και ενθυλακωμένης σε κύτταρα. Συνθήκες Rancimat : 110^{o}C, ροή αερίου 20 l/h.*

Δείγμα	***Χρόνος επαγωγής (h)***	***SI***
Control (λαρδί)	3.52	
Κριτσίνι	6.71	1.91
Κριτσίνι/κουρκ.	7.22	2.05
Κριτσίνι/κουρκ-κύτταρα	7.51	2.13



11.4. Συμπεράσματα

Η προσθήκη κουρκουμίνης σε ένα τρόφιμο, τόσο μη-ενθυλακωμένης όσο και ενθυλακωμένης σε κύτταρα, μπορεί να του προσδώσει αντιοξειδωτική δραστικότητα και λειτουργικές

ιδιότητες, ενισχύοντας την διατροφική του αξία. Βρέθηκε ότι η παρουσία κουρκουμίνης σε ηλιέλαιο, ή σε ένα στερεό τρόφιμο (όπως τα κριτσίνια), σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης, μπορεί να ενισχύσει την οξειδωτική σταθερότητά τους, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό, αντί των συνθετικών. Κατά την προσθήκη της κουρκουμίνης σε προϊόν αρτοποιίας (κριτσίνια) μεταβλήθηκε το χρώμα του προϊόντος και απέκτησε μια κίτρινη χροιά. Όταν χρησιμοποιήθηκε ενθυλακωμένη σε κύτταρα κουρκουμίνη αντί για μη-ενθυλακωμένη, το τελικό προϊόν είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα, επομένως η ενθυλάκωση στα κύτταρα μπορεί να περιορίσει τις απώλειες κουρκουμίνης κατά το ψήσιμο. Οργανοληπτικά, τα κριτσίνια στα οποία προστέθηκε ενθυλακωμένη κουρκουμίνη δεν διέφεραν σημαντικά, από αυτά στα οποία προστέθηκε μη-ενθυλακωμένη. Ωστόσο, η παρουσία των κυττάρων, φάνηκε να ενισχύει την προστασία της κουρκουμίνης κατά την έκθεση των δειγμάτων στο φώς και από την αλκαλική αποικοδόμηση της στο συνθετικό παγκρεατικό υγρό. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η χρησιμοποίηση ενθυλακωμένης σε κύτταρα κουρκουμίνης, αντί για μη-ενθυλακωμένη μπορεί να περιορίσει κάποια μειονεκτήματα της και να διευρύνει την εφαρμογή της, με σκοπό είτε την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων ή την αντικατάσταση κάποιων συνθετικών αντιοξειδωτικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12ο

Διατροφική αξιολόγηση της κουρκουμίνης και των ενθυλακωμένων μορφών της

Η κουρκουμίνη, το 'ινδικό σαφράν', στο εμπόριο είναι διαθέσιμη με την ονομασία 'κιτρινόριζα, κουρκούμι ή κουρκουμάς' και αποτελεί το βασικό συστατικό του μπαχαρικού κάρυ. Στην βιομηχανία τροφίμων η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται ως φυσική κίτρινη χρωστική (αποτελεί το E100), καθώς και ως ενισχυτικό γεύσης στην μουστάρδα (Tilak et al., 2004; Shishodia et al., 2005). Ως χρωστική βρίσκει επίσης εφαρμογή στο τυρί, τα μπαχαρικά, τα δημητριακά, τα ψάρια, σε προϊόντα κρέατος, σάλτσες, αφεψήματα, τα κόρν φλέικς, σε σούπες, παγωτά και γιαούρτι και μπορεί να αντικαταστήσει τις τεχνητές χρωστικές. Μια από τις βασικές της εφαρμογές στην βιομηχανία είναι στα εμπορικά ζελεδάκια (Calvo and Salvador 2000) όπου βελτιώνει την σταθερότητά τους. Τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα της κουρκουμίνης στα τρόφιμα είναι από 5 έως 500 mg/Kg. Κατά το μαγείρεμα, η κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι είναι πολύ αποτελεσματική ενάντια στις ετεροκυκλικές αμίνες που σχηματίζονται σε τρόφιμα τα οποία είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και θεωρούνται πιθανά καρκινογόνα συστατικά (Shishu, 2008). Η προσθήκη της στα τρόφιμα προσδίδει μια 'γλυκό-πιπεράτη' γεύση.

Η κουρκουμίνη, όμως, δεν αποτελεί μια απλή χρωστική ή ένα ενισχυτικό γεύσης, αλλά η προσθήκη της στα τρόφιμα προσδίδει και λειτουργικές ιδιότητες. Η θεραπευτική της δράση είχε ανακαλυφθεί στην αρχαία Ινδία, όπου χρησιμοποιούταν για την ίαση χολικών διαταραχών, κρυολογημάτων, διαβητικών πληγών, ηπατικών διαταραχών, ρευματισμών και οδοντικών παθήσεων. Σήμερα από κλινικές μελέτες υπάρχουν ενδείξεις για την θεραπευτική της δράση ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στο πάγκρεας, σε ασθένειες του νωτιαίου μυελού, στην νόσο του Αλτζχάιμερ, στον ιό της ανοσοανεπάρκειας κλπ.

Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα *S. cerevisiae* μπορεί να περιορίσει κάποια από τα βασικά μειονεκτήματα της κουρκουμίνης (υδατοδιαλυτότητα, φωτοχημική και θερμική αστάθεια) και να διευρύνει την εφαρμογή της στα τρόφιμα. Επιπλέον τα κύτταρα του *S. cerevisiae* παρέχουν κάτι παραπάνω από ένα απλό σύστημα ενθυλάκωσης, σε αντίθεση με την β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο. Μελέτες των τελευταίων ετών δείχνουν ότι τα κύτταρα του *S. cerevisiae* από μόνα τους έχουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Τα ζωντανά κύτταρα έχει βρεθεί ότι βοηθούν στη θεραπεία κάποιων ασθενειών, όπως η κολίτιδα και το IBS (*Irritable Bowel Syndrome*) (Walker 1997). Πρόσφατες μελέτες αναφέρονται στην χρησιμοποίηση νεκρών κυττάρων του *S. cerevisiae* για την θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου (μαστού, στόματος, εντέρου) (Ghoneum et al., 2008; 2005; Ghoneum and Collapudi, 2004; Herberman, 2002). Μελετάται επίσης η δράση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και ειδικότερα των β-D-γλυκανών ως αντιοξειδωτικά, αντιμεταλλαξιογόνα, ιδιότητες που καθιστούν πιθανή την αντικαρκινική τους δράση (Kogan et al., 2008). Οι β-1,3 και β-1,6–D–γλυκάνες του τοιχώματος είναι αυτές που έχουν θετική δράση στο ανοσοποιητικό σύστημα, με αντιβακτηριακές, επουλωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, αλλά η αντιοξειδωτική τους δραστικότητα είναι μικρότερη σε σχέση με άλλα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. πρωτεΐνες) (Silke et al.,2008).

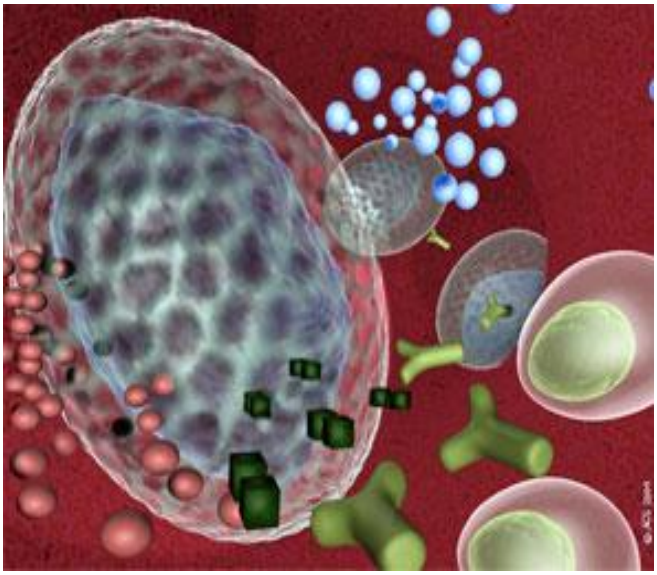
Στο εμπόριο κυκλοφορούν πολλά σκευάσματα με κύτταρα του *S. cerevisiae* τα οποία αποτελούν πηγή διαφόρων αμινοξέων, βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων και συνιστάται η ημερήσια πρόσληψη τους έως και 16 γρ. ημερησίως. Τα κύτταρα του *S.cerevisiae* παρέχουν μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών (περιέχουν αλανίνη, αργινίνη, γλυκίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, γλυκίνη, προλίνη, βαλίνη, τυροσίνη, σερίνη, θρυπτοφάνη σε ποσότητα 15-63 mg/γρ. κυττάρων) και βιταμίνες κυρίως του συμπλέγματος Β (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη, Β6, Β12, φολικό οξύ, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ) και μια ποικιλία μετάλλων και ιχνοστοιχείων (σίδηρος, φώσφορος, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, μαγγάνιο, θείο, κάλιο).

Στον πίνακα 12.1 παρουσιάζεται η διατροφική σύσταση σκόνης κυττάρων που κυκλοφορούν στο εμπόριο (*Twinlab, Genuine Brewer's yeast*). 16 γ. σκόνης κυττάρων αποδίδουν περίπου 35 Kcal. Κλινικές μελέτες αναφέρουν ότι η κατανάλωση έως 8 γρ. κουρκουμίνης/ημέρα για 3 μήνες, δεν είναι τοξική για τον άνθρωπο (Cheng et al., 2001).

Πίνακας 12.1. *Σύσταση σκόνης κυττάρων του S. cerevisiae που κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία Twinlab, Genuine Brewer's Yeast (http://www.iherb.com/Twinlab-Genuine-Brewer-s-Yeast-18-oz-510-g/2299?at=0).*

Διατροφικά στοιχεία	**Ποσότητα/ γρ. σκόνης κυττάρων**
Πρωτεΐνες	0.50 g
Θειαμίνη	87.5 μg
Ριβοφλαβίνη	43.8 μg
Νιασίνη	331 μg
B6	37.5 μg
Φυλλικό οξύ	15.0 μg
B12	0.13 μg
Βιοτίνη	1.00 μg
Παντοθενικό οξύ	25.0 μg
Ασβέστιο	3.69 mg
Σίδηρος	93.8 μg
Φώσφορος	14.6 mg
Μαγνήσιο	2.06 mg
Ψευδάργυρος	75.0 μg
Χαλκός	31.2 μg
Μαγγάνιο	8.12 μg
Χρώμιο	3.75 μg
Νάτριο	3.75 mg
Κάλιο	13.9 mg
Αλανίνη	37.0 mg
Αργινίνη	29.0 mg
Ασπαρτικό οξύ	50.0 mg
Γλουταμικό οξύ	70.0 mg
Γλυκίνη	25.0 mg
Ιστιδίνη	13.0 mg
Ισολευκίνη*	25.0 mg
Κυστίνη	7.00 mg
Λευκίνη*	39.0 mg
Λυσίνη*	37.0 mg
Μεθειονίνη*	9.00 mg
Φαινυλαλανίνη*	23.0 mg
Προλίνη	25.0 mg
Θρεονίνη*	25.0 mg
Σερίνη	28.0 mg
Θρυπτοφάνη*	6.00 mg
Τυροσίνη	19.0 mg
Βαλίνη	30.0 mg
Θερμιδική αξία: 2.19 Kcal/γρ. σκόνης κυττάρων	

*Απαραίτητα αμινοξέα



Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρασκευή '*λειτουργικών τροφίμων*' (*functional foods*), δηλαδή τροφίμων τα οποία, εκτός από τη διατροφική τους αξία, περιέχουν διατρόφοδραστικά συστατικά, δηλαδή συστατικά με ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον της Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Η τεχνική της *μικροενθυλάκωσης (μικροεγκλεισμός, microencapsulation*) αποτελεί έναν από τους τρόπους, σε κάποιες περιπτώσεις ο μοναδικός, για την εισαγωγή των διατρόφοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα ή για την καλύτερη αξιοποίηση των λειτουργικών ιδιοτήτων τους. Πρόκειται για μια μέθοδο όπου μία ουσία ή ένα μίγμα ουσιών (*core material*) περιβάλλεται από ένα άλλο υλικό, το οποίο αποτελεί το μέσο εγκλεισμού (*shell*, *wall material, carrier*, *coating* ή *encapsulant*) ή ενσωματώνεται σε μια ομοιογενή ή ετερογενή μήτρα (*matrix*), καταλήγοντας στον σχηματισμό μικρών καψουλών. Τα συνηθέστερα μέσα ενθυλάκωσης περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια (φωσφολιπίδια, λιποσώματα) και τους υδατάνθρακες (κόμμεα, άμυλο, μαλτοδεξτρίνες, κυκλοδεξτρίνες). Ωστόσο οι ανάγκες της βιομηχανίας των τροφίμων και το γεγονός ότι τα ενθυλακωμένα συστατικά χαρακτηρίζονται, συνήθως, από αυξημένη διαλυτότητα και σταθερότητα στην οξείδωση, την υγρασία, την θερμική αποικοδόμηση ή την εξάτμιση, επιβάλλουν την συνεχή έρευνα για την ανάπτυξη νέων συστημάτων ενθυλάκωσης.

Η δυνατότητα των κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae*, του γνωστού ζυμομύκητα της αρτοποιίας και την ζυθοποιίας, να χρησιμοποιηθεί ως μέσο ενθυλάκωσης, αξιολογήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Η ενθυλάκωση δραστικών συστατικών σε κύτταρα του *S. cerevisiae* έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, ξεκινώντας μόλις από το 1973, ωστόσο μόλις πέντε επιστημονικές αναφορές υπάρχουν μέχρι σήμερα. Βασικό χαρακτηριστικό όλων των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας είναι ότι δημιουργείται σύγχυση όσον αφορά τις βέλτιστες συνθήκες ενθυλάκωσης των δραστικών συστατικών και δεν υπάρχει συγκριτική μελέτη μεταξύ τους. Επιπλέον καμία αναφορά δεν γίνεται για τον τρόπο επιβεβαίωσης της ενθυλάκωσης, για την απόδοση της ενθυλάκωσης ή για τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των σχηματιζόμενων μικροκαψουλών.

Η ικανότητα του κυττάρου να προσλαμβάνει και να συγκρατεί δραστικά συστατικά και συνεπώς να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο ενθυλάκωσης, οφείλεται στην δομή του και ειδικότερα στον κυτταρικό του φάκελο, ο οποίος περιλαμβάνει το κυτταρικό τοίχωμα, το περίπλασμα και την πλασματική μεμβράνη. Το κυτταρικό τοίχωμα, γενικά διαπερατό σε μικρά

μόρια, αποτελείται εσωτερικά από ένα μικροϊνώδες δίκτυο (γλυκάνες οι οποίες συμπλέκονται με χιτίνη) που προσδίδει στο κύτταρο ανθεκτικότητα, και μια εξωτερική στοιβάδα, η οποία αποτελείται από πολυμερή της μαννόζης συνδεδεμένα με πρωτεΐνες (μαννοπρωτεΐνες), είναι υπεύθυνη για το πορώδες του κυττάρου. Η εκλεκτική διαπερατότητα του κυττάρου οφείλεται στην πλασματική του μεμβράνη, η οποία αποτελείται από διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων και η ρευστότητά της αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επιτυχή ενθυλάκωση μιας ουσίας.

Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης των κυττάρων του *S. cerevisiae* ως μέσο ενθυλάκωσης, είναι ότι συνδυάζουν πολλά πλεονεκτήματα που πολλά από τα υπόλοιπα μέσα διαθέτουν μεμονωμένα. Καταρχάς, αποτελούν ένα ασφαλές (*food grade*), φυσικό, οικονομικό και σε μεγάλη αφθονία προϊόν. Η διαδικασία ενθυλάκωσης των ενεργών συστατικών σε κύτταρα είναι απλή, γρήγορη και με ελάχιστο κόστος. Δεδομένου ότι τα κύτταρα του *S. cerevisiae* εφαρμόζονται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, τα ενθυλακωμένα συστατικά μπορούν, επίσης, εύκολα να βρούν πολλές εφαρμογές. Η παρουσία της πλασματικής μεμβράνης, με τις αμφιφιλικές ιδιότητες, στα κύτταρα επιτρέπει την ενθυλάκωση τόσο υδρόφιλων συστατικών στο εσωτερικό του κυττάρου, όσο και υδρόφοβων στην λιπιδιακή διπλοστοιβάδα. Επιπλέον το κυτταρικό τοίχωμα (στο οποίο έχουν αποδοθεί και αντιοξειδωτικές–αντικαρκινικές ιδιότητες) τους προσδίδει επιπλέον μηχανική αντοχή και εμποδίζει την ρήξη του κυττάρου σε περίπτωση μεγάλου ποσοστού ενθυλάκωσης.

Η κουρκουμίνη, ένα ιδιαίτερα βιοδραστικό συστατικό, που προέρχεται από το φυτό *Curcuma longa* ενθυλακώθηκε στα κύτταρα του *S. cerevisiae*. Η κουρκουμίνη, πέρα από βασικό συστατικό του μπαχαρικού κάρυ, στην βιομηχανία των τροφίμων χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική (E100). Ωστόσο, σήμερα η κουρκουμίνη δεν αποτελεί απλά ένα πρόσθετο των τροφίμων, αλλά παρατεταμένες κλινικές μελέτες τα τελευταία 50 χρόνια έχουν δείξει την φαρμακευτική της δράση έναντι μιας πληθώρας ασθενειών: στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στον καρκίνο του παγκρέατος, στη μείωση της χοληστερόλης, σε ασθένειες του νωτιαίου μυελού, στη νόσο του Αλτζχάιμερ, κ.λ.π. ενώ μια σειρά κλινικών μελετών βρίσκεται σε εξέλιξη. Βασικά μειονεκτήματά της είναι η σχεδόν ανύπαρκτη υδατοδιαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητά της, η ευαισθησία σε αλκαλικό περιβάλλον, όπως επίσης η φωτοχημική και θερμική αστάθειά της, αιτιολογώντας την πληθώρα των μέσων ενθυλάκωσης (λιποσώματα, φωσφολιπίδια, κυκλοδεξτρίνες, ζελατίνη, τροποποιημένο άμυλο, μαλτοδεξτρίνη), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για να υπερνικηθούν τα παραπάνω μειονεκτήματά της.

Από το σύνολο των πειραμάτων της παρούσας διατριβής συνάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* αποτελούν ένα αποτελεσματικό μέσο ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης. Η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπικές τεχνικές (Φθορισμού, Ηλεκτρονικής Σάρωσης) καθώς και με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) και Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR), απ' όπου αξιολογήθηκε και ο τρόπος κατανομής των μορίων της κουρκουμίνης στα κύτταρα.
- Η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης εκφράστηκε ποσοτικά με τον υπολογισμό της % κ.β. περιεκτικότητας των μικροκαψουλών σε κουρκουμίνη (*% Encapsulation Yield, %EY*) και με την απόδοση της ενθυλάκωσης (*% Encapsulation Efficiency, %EE*). Και οι δύο παράμετροι εξαρτώνται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η ενθυλάκωση:
    - Τη θερμοκρασία
    - Το διάλυμα ενθυλάκωσης: υδατικό ή 50% κ.ο. αλκοολικό
    - Το λόγο μάζας κουρκουμίνη:κύτταρα
    - Πλασμόλυση των κυττάρων με διάφορες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου

  Θερμοκρασίες πάνω από 35^{o}C και η χρησιμοποίηση περίσσειας κουρκουμίνης ευνόησαν την ενθυλάκωση. Όταν η ενθυλάκωση πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα, αντί για 50% κ.ο. αλκοολικό, οι τιμές των %ΕΥ και %ΕΕ, ενισχύθηκαν τουλάχιστον 2 φορές. Για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και κύτταρα τα οποία έχουν πλασμολυθεί. Βρέθηκε ότι η πλασμόλυση των κυττάρων αυξάνει την ρευστότητα της μεμβράνης τους και τροποποιεί την σύσταση/οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος. Ωστόσο, οι μικροκάψουλες που παρασκευάστηκαν με πλασμολυμένα κύτταρα αντί για μη-πλασμολυμένα, κάτω υπό τις ίδιες συνθήκες, δεν διέφεραν ως προς την περιεκτικότητά τους σε κουρκουμίνη. Για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία ακόμα και ζωντανά κύτταρα. Με κατάλληλο συνδυασμό, όλων των παραπάνω παραμέτρων μπορούν να παρασκευαστούν μικροκάψουλες με περιεκτικότητα έως και 35.8% κ.β. σε κουρκουμίνη, δηλαδή με εξαιρετικά υψηλά ποσοστά ενθυλάκωσης.
- Ο μηχανισμός ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης, όπως μελετήθηκε με DSC και FT-IR, περιλαμβάνει τόσο υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εντός της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, όσο και αλληλεπιδράσεις (δεσμούς υδρογόνου) με το δίκτυο του κυτταρικού τοιχώματος (γλυκάνες, μαννοπρωτεΐνες). Είναι επίσης πιθανή η δημιουργία

σταυροειδών δεσμών της κουρκουμίνης με τις επιφανειακές πρωτεΐνες του κυττάρου. Στην διαδικασία της ενθυλάκωσης σημαντικό ρόλο παίζουν οι υδρόξυλομάδες της κουρκουμίνης, οι οποίες προσελκύονται από τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων, ενισχύοντας την επαφή και μεταξύ των άκυλο-αλυσίδων και των υδρόφοβων τμημάτων της κουρκουμίνης.

- Τα κύτταρα μπορούν να συγκρατούν το ενθυλακωμένο συστατικό σε θερμοκρασίες έως 260^{o}C.
- Η β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο μπορούν να αποτελέσουν, επίσης, μέσα ενθυλάκωσης της κουρκουμίνης, αλλά χαρακτηρίζονται από μικρότερες τιμές *% EY* και *% EE.*
- Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα μπορεί να ενισχύσει την σχεδόν μηδαμινή υδατοδιαλυτότητά της, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό σε σχέση με την β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο.
- Προσομοιάζοντας τις συνθήκες πέψης χρησιμοποιώντας συνθετικό γαστρικό (SGF) και παγκρεατικό υγρό (SPF) βρέθηκε ότι: ι) είναι δυνατή η απελευθέρωση της κουρκουμίνης από όλα τα μέσα ενθυλάκωσης και ιι) η ενθυλακωμένη στα κύτταρα κουρκουμίνη παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ απελευθέρωσης. Η αποσάρθρωση και η διαλυτοποίηση (*dissolution profile*) της ενθυλακωμένης κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο γίνεται γρήγορα, ενώ αντίθετα στις μικροκάψουλες κυττάρων υπάρχει μια αργή και παρατεταμένη απελευθέρωση/διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης. Όλα τα μέσα ενθυλάκωσης αύξησαν την συγκέντρωση της κουρκουμίνης στο SGF και επιπλέον τα κύτταρα προστάτεψαν την κουρκουμίνη από την αλκαλική αποικοδόμηση στο SPF περισσότερο από τα άλλα μέσα.
- Η κουρκουμίνη παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δραστικότητα, η οποία ενισχύθηκε με την ενθυλάκωσή της στα κύτταρα.
- Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης (ιδιαίτερα στα κύτταρα) ελάττωσε την προσκολλητική της ικανότητα και την ένταση της κίτρινης χροιάς.
- Η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης και στα 3 μέσα (κύτταρα, β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο) έδρασε προστατευτικά απέναντι στην οξείδωση, όπως προέκυψε κατά την αποθήκευση των καψουλών σε συνθήκες ελεγχόμενης σχετικής υγρασίας (%RH). Τα κύτταρα προσέφεραν επιπλέον προστασία σε %RH μεγαλύτερη από 75.5%, όπου η οξείδωση της κουρκουμίνης ενισχύεται σημαντικά.

- Τα κύτταρα προσέφεραν καλύτερη προστασία στην κουρκουμίνη από ότι η β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο απέναντι στις καταστροφικές φωτοχημικές αντιδράσεις, και απέναντι στην θερμική αποικοδόμηση (σε αδρανείς και οξειδωτικές συνθήκες) στους 200^{o}C. Θέρμανση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (ισόθερμη και μη) έδειξε ότι η β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο μπορούν επίσης να ενισχύσουν την θερμική σταθερότητα της κουρκουμίνης. Φαίνεται ότι το δίκτυο του κυτταρικού τοιχώματος το οποίο περιβάλλει την πλασματική μεμβράνη παρέχει επιπλέον προστασία στα ενθυλακωμένα μόρια της κουρκουμίνης.
- Η προσθήκη κουρκουμίνης σε ένα προϊόν αρτοποιίας, του προσέδωσε αντιοξειδωτική δραστικότητα, ενισχύοντας τη διατροφική του αξία. Όταν χρησιμοποιήθηκε ενθυλακωμένη σε κύτταρα κουρκουμίνη, αντί για μη-ενθυλακωμένη, το τελικό προϊόν είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα και μεγαλύτερη σταθερότητα κουρκουμίνης καθώς και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα, ενώ ενισχύθηκε και η οξειδωτική σταθερότητά του. Επομένως, η ενθυλάκωση σε κύτταρα, μπορεί να περιορίσει κάποια μειονεκτήματα της κουρκουμίνης διευρύνοντας την εφαρμογή της, με σκοπό την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων ή την αντικατάσταση συνθετικών αντιοξειδωτικών.

Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα ενθυλάκωσης συστατικών τα οποία είναι ευπαθή στις υψηλές θερμοκρασίες που μπορεί να επικρατούν κατά το μαγείρεμα, το τηγάνισμα ή άλλη επεξεργασία ενός τροφίμου. Ιδιαίτερη εφαρμογή μπορεί να βρουν σε πτητικά αρωματικά συστατικά, για τα οποία απαιτείται μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης κατά το μαγείρεμα ή την επεξεργασία. Με την ενθυλάκωση στα κύτταρα μπορεί, επίσης, να επιτευχθεί ελεγχόμενη και ειδικότερα παρατεταμένη (μεγαλύτερης διάρκειας) απελευθέρωση. Για την απελευθέρωση ενός συστατικού από τις μικροκάψουλες των κυττάρων απαιτείται είτε υψηλή θερμοκρασία ή σχετική υγρασία μεγαλύτερη από 0.7. Διατροφικά τα κύτταρα του *S. cerevisiae* αποτελούν πηγή πρωτεϊνών και απαραίτητων αμινοξέων, βιταμινών κυρίως του συμπλέγματος Β και κάποιων μετάλλων και ιχνοστοιχείων (σίδηρος, φώσφορος, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, μαγγάνιο, θείο, κάλιο) ενώ τους έχουν αποδοθεί και αντικαρκινικές ιδιότητες. Η εφαρμογή των κυττάρων ως μέσου ενθυλάκωσης μπορεί να επεκταθεί και σε υδρόφιλα συστατικά καθώς και σε μίγματα συστατικών ή και φυσικών εκχυλισμάτων, δίνοντας προοπτικές αξιοποίησης τους για ερευνητικούς, διατροφικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς.



ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

AD2 Ltd **1987**. European patent application 0 242 135 assigned to Bestfoods.

Adamiec, J. & Kalemba, D., **2006**. Analysis of microencapsulation ability of essential oils during spray drying, *Drying Technology*, 24, 1127-1132.

Adya, A.K., Canetta, E. & Walker, G.M., **2006**. Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizocaccharomyces pombe*, *FEMS Yeast Research*, 6, 120-128.

Aggarwal, B.B, Kumar, A. & Bharti, A.C., **2003**. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research,* 23, 363–398.

Aggarwal, B.B., Bhatt, I.D., Ichikawa, H., Ahn, K.S., Sethi, G., Sandur, S.K., Natarajan, C., Seeram, N. & Shidhodia, S., **2006**. Curcumin: Biological and medicinal properties, *Willey Press*, 297-348.

Aguilar-Uscanga., B. & Francois. J.M., **2003**. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 268-274.

Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelin, J.M. & Prior, B.A, **1994**. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the highosmolarity glycerol response pathway, *Molecular Cell Biology*, 14, 4135–4144.

Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A. & Aggarwal, B.B., **2007**. Bioavailability of curcumin: problems and promises, *Molecular Pharmacology*, 4, 807-818.

Anand, P., Thomas, S.G., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikymar, K.B., Sung, B., Tharakan, S.T., Misra, K., Priyadarsini, I., RaJasekharan, K.N. & Aggarwal, B.B., **2008.** Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature, *Biochemical Pharmacology*, 76, 1590-1611.

Ang, D., Liberek, K., Skowyra, D., Zylicz, M. & Georgopoulos, C., **1991**. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins, *Journal of Biology & Chemistry*, 266, 24233–24236.

Ansari, M.J., Ahmad, S., Kohli, K., Ali, J. & Khar, R.K., **2005**. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis,* 39, 132-138.

Apintanapong, M. & Noomhorm, A., **2003**. The use of spray drying to microencapsulate 2-acetyl- 1- pyrroline, a major flavor compound of aromatic rice, *International Journal of Food Science & Technology*, 38, 95-102.

Arun, N. & Nalini, N., **2002**. Efficancy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats, *Plant Foods in Human Nutrition*, 57 (1), 41-52.

Asai, A. & Miyazawa, T., **2001**. Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue, *Journal of Nutrition,* 131 (11), 2932-2935.

Attfield P.V., **1987**. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response, *FEBS Letters*, 225, 259–263.

Attfield, P.V., Kletsas, S. & Hazell, B.W., **1994**. Concomitant appearance of intrinsic thermotolerance and storage of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* during early respiratory phase of batch-culture is CIFI-dependent, *Microbiology*, 140, 2625-2632.

Awasthi, S., Srivatava, S.K., Piper, J.T., Singhal, S.S., Chaubey, M. & Awasthi, Y.C., **1996**. Curcumin protects against 4-hydroxy-2-trans-nonenal-induced cataract formation in rat lenses, *American Journal of Clinical Nutrition*, 64 (5), 761-766.

Aziz, H.A., Kok Khiang, P. & Yvonne, T.T., **2007**. Solubility of core materials in aqueous polymeric solution effect on microencapsulation of curcumin, *Drug Development & Industrial Pharmacology*, 33, 1263-1272.

Babu, P.S. & Srinivasan, K., **1995**. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat, *Molecular Cell Biochemistry,* 152, 13-21.

Babu, P.S. & Srinivasan, K., **1997**. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (Curcuma longa) in streptozotocin induced diabetic rats, *Molecular Cell Biochemistry,* 166 (1-2), 169-175.

Baglole, K., Boland, P., & Wagner, B.D., **2005**. Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins, *Journal of Photochemistry & Photobiology A Chemistry*, 173, 230-237.

Baianu, I.C., Lozano, P.R., Pisecaru, V.I. & Lin H.C, **2001**. Novel techniques and their applications to agricultural biotechnology, health foods and medical biotechnology, *Journal of Agricultural & Food Chem*istry, 56, 457-463.

Ballou, C.E. & Raschke, W.C., **1974**. Polymorphism of the somatic antigen of yeast, *Science,* 184, 127-134.

Bandas, E.L., **1983**. Study of the role of metabolites and impurities in the mutagenic action of ethanol on yeast mitochondria, *Genetika*, 18, 1056-1059.

Bangham, A.D. & Mason, W.T., **1980**. Anaesthetics may act by collapsing pH gradients, *Anaesthesiology,* 53, 135-141.

Baptista, A.L.F., Coutinho, P.J.G., Real Oliveira M.E.C.D. & Rocha Gomes, J.I.N., **2003**. Effect of pH on the control release of microencapsulated dye in lecithin liposomes II, *Journal of Liposome Research*, 13, 123-130.

Baranauskiene, R., Rimantas Venskutonis, P., Dewettinck, K. & Verhe, R., **2006**. Properties of oregano, citronella and marjoram flavors encapsulated into milk-protein–based matrices, *Food Research International*, 39, 413- 425.

Barik, A., Mishra, B., Shen, L., Mohan, H., Kadam, R.M., Dutta, S., Hong-Yu Zhang, K. & Priyadarsini, I., **2005**. Evaluation of a new copper (II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions, *Free Radical Biology and Medicine,* 39, 811-822.

Barthelemy, S., Vergnes, L., Moynier, M., Guyot, D., Labidalle, S. & Bahraoui, E., **1998**. Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat, *Research Virology*, 149 (1), 43-52.

Benech, R.O., Kheadr, E.E., Lacroix, C. & Fliss I., **2002**. Antibacterial Activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during Cheddar Cheese ripening, *Applied & Environmental Microbiology,* 68, 5607-5619.

Benech, R.O., Kheadr, E.E., Lacroix, C. & Fliss, I., **2002**. Impact of nisin producing culture and liposome-encapsulated nisin on ripening of *Lactobacillus* added-Cheddar Cheese, *Journal of Dairy Science,* 86, 1895-1909.

Beney, L. & Gervais, P., **2001**. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 57, 34-39.

Benson, S.W., **1960**. The Foundations of Chemical Kinetics, McGraw-Hill, New York.

Beristain, C.I., Azuara, E. & Vernon-Carter, E.J., **2002**. Effect of water activity on the stability to oxidation of sray-dried encapsulated orange peel oil using Mesquite Gum (prosopis juliflora) as wall material, *Journal of Food Sci*ence, 67 (1), 206-211.

Bernabe-Pineda, M., Ramirez-Silva, M.T., Romero-Romo, M., Gonzalez-Vergara, E. & Rojas-Hernandez, A., **2004**. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution

and apparent rate constant of its decomposition, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy,* 60, 1091–1097.

Bhandari, B., D'Arcy, B. & Padukka, I., **1999**. Encapsulation of lemon oil by paste method using b- cyclodextrin: encapsulation efficiency and profile of oil volatives, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47, 5194-5197.

Bhandari, B.R., Dumoulin, E.D., Richard, H.M.J., Noleau, I. & Lebert, A.M, **1992**. Flavour encapsulation by spray-drying: application to citral and linalyl acatate, *Journal of Food Science*, 57 (1), 217-221.

Bibby, D.C., Davies, N.M. & Tucker, I.G., **2000**. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics,* 197, 1–11.

Bishop, J.R.P., Nelson, G. & Lamb, J., **1998**. Microencapsulation in yeast cells, *Journal of Microencapsulation*, 15 (6), 761-773.

Blomberg, A. & Adler, L., **1992**. Physiology of osmotolerance in fungi, *Advanced Microbiology Physics*, 33, 145–212.

Breddam, K. & Beenfeldt, T., **1991**. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 35, 323-329.

Brown, A.D. & Simpson, J.R., **1972**. Water relations of sugartolerant yeasts: the role of intracellular polyols, *Journal of General Microbiology*, 72, 589-591.

Brown, A.D., **1990**. Microbial water stress physiology. John Wiley and Sons, Chichester.

Bruzell, E.M., Morisbak, E. & Tonnesen, H.H., **2005.** Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations, *Photochemical Photobiology Science*, 4, 523-530.

Burattini, E., Cavanga, M., Dell Anna, R., Malvezzi Campeggi, F., Monti, F., Rossi, F. & Torriani, S., **2008**. An FT-IR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae, Vibrational Spectroscopy*, 47, 139-147.

Buttino, I., Rosa, G., Carotenuto, Y., Ianora, A., Fontana, A., Guaglia, F., Rotonda, M. & Miralto A., **2006**. Giant liposomes as delivery system for ecophysical studies in copepods, *The Journal of Experimental Biology*, 209, 801- 809.

Cabib, E., Roberts, R. & Bowers, B., **1982**. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation, *Annual Review of Biochemistry,* 51, 763-793.

Cabib, E., Roh, D., Schmidth, M., Crotti, L.B. & Varma, A., **2001**. Minireview: the yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (23), 19679-19682.

Calabro, M.L., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., Ficarra, R., Costa, C., Catania, S., Rustichelli, C. & Gamberini, G., **2004**. Effects of a- and b- cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 365-377.

Calvo, C. & Salvador, A., **2000**. Use of natural colorants in food gels. Influence of composition of gels on their color and study of their stability during storage, *Food Hydrocolloids*, 14, 439-443.

Canetta, E., Adya, A.K. & Walker, G.M., **2006**. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology, *FEMS Microbiology Letters*, 255, 308-315.

Carlsen. H.N., Degn, H. & Lloyd, D., **1991**. Effects of alcohols on the respiration of fermentation of aerated suspensions of baker's yeast, *Journal of General Microbiology*, 137, 2879-2883.

Carpenter, J.F. & Crowe, J.H., **1988**. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes, *Cryobiology*, 25, 244-255.

Carriere, F., Renou, C., Lopez, V., De Caro, J., Ferrato, F., Lengsfelt, H., De Caro, A., Laugier, R. & Verger, R., **2000**. The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals, *Gastroenterology*, 57, 241-252.

Cartwrlght, C.P., Veazey, F.J. & Rose, A.H., **1987**. Effect of ethanol on activity of the plasma membrane ATPase in, and accumulation of glycine by *Saccharomyces cerevisiae, Journal of General Microbiology*, 133, 857-865.

Cerbon, J. & Calderon, V., **1995**. Generation, modulation and maintainance of the plasma membrane asymmetric phospholipid composition in yeast cells during growth: their relation to surface potential and membrane protein activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1235, 100-106.

Chan, Y., Chen, B., Chiu, C.P. & Lu, Y., **2004**. The influence of phytosterols on the encapsulation efficiency of cholesterol liposomes, *International Journal of Food Science & Technology*, 39, 985-995.

Chavanpatil, M.D., Jain, P.J., Chaudhari, S., Shear, R. & Vavia, P.R., **2006**. Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastroretentive drug delivery system for ofloxacin, *International Journal of Pharmaceutics,* 316 (1-2), 86-92.

Chen, H.W. & Huang, H.C., **1998**. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells, *British Journal of Pharmacology*, 124 (6), 1029-1040.

Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C. & Hsieh, C.Y., **2001**. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or premalignant lesions, *Anticancer Research*, 21, 2895-2900.

Chin, J.H. & Goldstein, D.B., **1977**. Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spinlabelled erythrocyte and brain membranes, *Molecular Pharmacology,* 13, 435-441.

Chirife, J., Favetto, G. & Ferro FontAn, C., **1984**. Microbial growth at reduced water activities: some–physicochemical properties of compatible solutes, *Journal of Applied Bacteriology*, 56, 259-268.

Chow, C. & Palecet, P., **2004**. Enzyme encapsulation in permeabilized *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biotechnology Progress*, 20, 449-456.

Clarot, D.C., Battu, S. & Cardot P.J.P., **2000**. Chromatographic of study of terpene derivatives on porous graphitic carbon stationary phase with β-cyclodextrin as mobile phase modifier, *Journal of Chromatography A*, 903, 67-76.

Clas, S.D., Dalton, C.R. & Hancock, B.C., **1999**. Differential scanning calorimetry: Applications in drug development, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2, 311-320.

Cleary, K. & McFeeters, R.F., **2006**. Effects of oxygen and turmeric on the formation of oxidative aldehydes in fresh-pack dill pickles, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 54, 3421-3427.

Codex, **200**1. *Report of the 33rd session of the codex Committee of Additives and Contaminants*. The Hague, Netherland.

Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. & Roser, B., **1992.** Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology, *Biotechnology*, 10, 1007-1011.

Commision Directive 95/45/EC laying down specific purity criteria concerning colours for use in foodstuffs. **1995**. *OJ L* 226: 1.

Connors, K.A., **1997**. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution, *Chemical Reviews,* 97, 1325-1357.

Costa, V., Reis, E., Quintanilha, A. & Moradas-Ferreira, P., **1993**. Acquisition of ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae: the key role of mitochondrial superoxide dismutase, *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 300, 608–614.

Coury, L., Hiller, M., Mathal, J., Jones, E., Zeidel, M. & Brodsky, J.L., **1999**. Water transport across yeast vacuolar and plasma membrane-Targeted secretory vesicles occurs by passive diffusion, *Journal of Bacteriology*, 18 (14), 4437-4440.

Cristian, A., Acevedo, C.A., Skurtys, O., Young, M.E., Enrione, J., Pedreschi, F. & Osorio, F., **2009**. A non-destructive digital imaging method to predict immobilized yeast-biomass, *Food Science & Technology,* 42, 1444–1449.

Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman, D., **1984**. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose, *Science*, 223, 701-703.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Wistrom, C.A., Spargo, B.J. & Anchordoguy, T.J., **1988**. Interactions of sugars with membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 947, 367-384.

Curran, M. & Seeman, P., **1979**. Mechanisms of ethanol tolerance at a cholinergic nerve terminal, *Drug* & *Alcohol Dependence,* 4, 167-172.

Danckwerts, M.P., Van Der Watt, J.G. & Moodley, I., **1998**. Zero-order release of theophylline from a core-in-cup tablet in sequenced simulated gastric and intestinal fluid, *Drug Development & industrial Pharmacy,* 24 (2), 163-167.

Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P., Chevalier, M., & Baumgartner, **2007**. Flavor encapsulation and flavor release performances of a commercial yeast-based delivery system, *Food Hydrocolloids*, 21, 953-960.

Das, R.K., Kasoju, N., & Bora, U., **2010**. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells, *Nanomedicine*, 6 (1), 153-160.

Davidson, J.F., Whyte, B., Bissinger, P.H. & Schiestle, R.H., **1996**. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae, Proceedings of the National Academy of Science of the USA,* 93, 5116–5121.

Demetzos, C., **2008**. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability, *Journal of Liposome Research*, 18 (3), 159-173.

De Nobel, J.G., Dijkers, C., Hooijberg, E. & Klis, F.M., **1989**. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA, *Journal of General Microbiology,* 135, 2077-2084.

De Nobel, J.G., Klis, F.M., Munnik, Priem, J. & Van Den Ende, H., **1990**. An assay of the relative cell wall porosity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis and Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast*, 6, 483-490.

De Nobel, J.G., Klis, F.M., Ram, A., Van Unen, H., Priem, J., Munnik, T. & Van Den Ende, H., **1991**. Cyclic variations in the permeability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 7, 589-598.

De Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T. & Van Den Ende, H., **1990**. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 6, 491-499.

Deodhar, S.D., Sethi, R. & Srimal, R.C., **1980**. Preliminary study on anti-rheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane), *Indian Journal of Medical Research*, 71, 632-634.

Dhillon, N., Wolff, R.A., Abbruzzese, J.L. & Camachi, L.H., Li, L., **2006**. Phase II clinical trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 24 (18S), 141-151.

Dikshit, M., Rastogi, L. & Shukla R Srimal, R.C., **1995**. Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin and quinidine in the cat heart, *Indian Journal of Medical Research,* 101, 31-35.

Dodziuk, H., **2006**. Cyclodextrins and their complexes. Chemistry, analytical methods and application. Wiley-VCH, Weinheim.

Dressman, J.B., Berardi, R., Dermentzoglou, L., Russell, T., Schmaltz, S., Barnett, J. & Jarvenpaa, K., **1990**. Upper gastrointestinal pH in young, healthy men and women, *Pharmaceutical Research*, 7, 756-761.

Dror, Y., Cohen, O. & Freeman, A., **1988**. Stabilization effect on immobilised yeast: effect of gel composition on tolerance of water miscible solvents, *Enzyme Microbiology & Technology*, 10, 273-279.

Duarte, A., Sousa Costa, M., Simplicio, A., Cardoso, M. & Duarte, C., **2006**. Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 308, 168-174.

Dubey, S.K., Sharma, A.K., Narain, U., Misra, K. & Pati, U., **2007**. Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylanated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 32, 234-243.

Dubois, A., Eerdewegh, P.V. & Gardner, J.D., **1977**. Gastric emptying and secretion in Zollinger-Ellison syndrome, *Journal of Clinical Investigation*, 59, 255-263.

Dukic-Ott, A., Remon, J.P., Foreman, P. & Vervaet, C., **2007**. Immediate release of poorly soluble drugs from starch-based pellets prepared via extrusion/spheronisation, *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 67, 715-724.

Dunlop Ltd, **1982**. European patent 0 085 805.

Edwards, K.A. & Baeumner, A.J., **2006**. Analysis of liposomes, *Talanta,* 68, 1432- 1441.

Efentakis, M. & Dressman, J.B., **1998**. Gastric juice as a dissolution medium: surface tension and pH, *European Journal of Drug Metabolic Pharmacokinetics*, 23, 97-102.

Eigner, D. & Sholz, D., **1999**. Ferula asa-foetida and curcuma longa in traditional medical treatment and diet in Nepal, *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 1–6.

Erlejman, A.G., Verstraeten, S.V., Fraga, C.G., & Oteiza, P.I., **2004**. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects, *Free Radical Research*, 38, 1311- 1320.

Esposito, E., Cervellati, F., Menegatti, E., Nastruzzi, C., & Cortesi, R., **2002**. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devises for vitamin C, *International Journal of Pharmaceutics,* 242, 329-334.

Fang, J., Hwang, T., Huang, T. & Fang C., **2006**. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol, *International Journal of Pharmaceutics*, 310, 131-138.

FAO, **2004.** Curcumin: Chemical and Technical Assesment (CTA).

FAO, **2000**. Evaluation of certain food additives (pp. 26-27). FAO/ WHO Expert Committee Report on Food Additives, WHO Technical Report Series 891, WHO, Geneva.

Fatouros, D.G., Gortzi, O., Klepetsanis, P., Antimisiaris, S.G., Stuart, M.C.A., Brisson A. & Ioannou, P.V., **2001**. Preparation and properties of arsonolipid containing liposomes, *Chemistry & Physics of Lipids*, 109, 75-89.

Fatouros, D.G., Hatzidimitriou, K. & Antimisiaris, S.G., **2001**. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone- cyclodextrin complexes; comparison of membrane integrity and drug release*, International Journal of Pharmaceutics*, 13, 287-296.

Fatouros, D.G., Klepetsanis, P., Ioannou, P.V. & Antimisiaris, S.G., **2005**. The effect of pH on the electrophoretic behaviour of a new class of liposomes: arsonoliposomes, *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 151-156.

Fennema, O.R., **1996**. *Food Chemistry,* 3rd ed., Marcel Dekker, New York.

Frautschy, S.A., Hu, W., Kim, P., Miller, S.A., Chu, T. & Harris-White, M.E., **2001**. Phenolic anti-inflammatory anti-oxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology, *Neurobiology of Aging*, 22 (6), 993-1005.

Frevert, J. & Ballou, C.E., **1985**. *Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall mannoproteins, *Biochemistry*, 24, 753-759.

Fu, Y., Tong, C.H. & Lung D.B, **2003**. Flavor migration out of food matrices: II. Quantifying flavour migration from dough undergoing isothermal heating, *Journal of Food Science*, 68 (3), 923-930.

Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M.E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, N.M. & Dumoulin E., **2006**. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration, *Journal of Food Engineering*, 75, 27-35.

Gabrieelska, J., Soczynska- Kordala, M., Hladyszowski, J., Zulka, R., Miskiewicz, J. & Przestalski S., **2006**. Antioxidant effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 54, 7735-7746.

Gal, S., Lichtenberg, D., Bor, A. & Pinchuk, I., **2007.** Copper-induced peroxidation of phosphatidylserine–containing liposomes is inhibited by nanomolar concentrations of specific antioxidants, *Chemistry & Physics of Lipids*, 150, 186-203.

Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Viras, K., Wagner, M. & Demetzos, C., **2006.** Interaction of dedrimers with model lipid membranes assessed by DSC and RAMAN spectroscopy, In: Mozafari, M.R., ed., *Nanocarrier Technologies: Frontiers of nanotherapy,* Springer: The Netherlands, 207-220.

Ghoneum, M., Badr El-Din, N., Noaman, E. & Tolentino, L., **2008**. *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, suppresses the growth of Ehrlich carcinoma-bearing mice, *Cancer Immunology & Immunotherapy*, 57, 581-592.

Ghoneum, M. & Gollapudi, S., **2004**. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro, *Anticancer Research*, 24, 1455-1463.

Gibbs, B.F., Kermasha S., Alli I. & Mulligan, N., **1999**. Encapsulation in the food industry: a review, *International Journal of Food Science & Nutrition*, 50, 213-224.

Gibbs, B.F., Kermasha S., Alli I., Mulligan, N., **1999**. Encapsulation in the food industry: a review, *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 50, 213-224.

Goel, A., Ajaikumar, B., Kunnumakkara, Bharat, B. & Aggarwal, **2008**. Curcumin as 'Curecumin': from Kitchen to clinic, *Biochemical Pharmacology*, 75, 787- 809.

Gomes Dde, C, Alegrio, L.V., de Lima, M.E., Leon, L.L. & Araujo, C.A., **2002**. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against Leishmania amazonensis, *Arzneimittel-Forschung*, 52 (2), 120-124.

Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I. & Tsaknis, J., **2006**. Reevaluation of antimicrobial and antioxidant activity of Thymus spp. extracts before and after encapsulation in liposomes, *Journal of Food Protection*, 69 (12), 2998-3005.

Goubet, I., Le Quere, L. & Voilley, A.J., **1998**. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state: a review, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46, 1981- 1990.

Grattard, N., Salaun, F., Champion, D., Roudaut, G. & Meste, M., **2002**. Influence of physical state and molecular mobility of freeze- dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids, *Journal of Food Science*, 67 (8), 3002-3010.

Griffin, D.M., **1977**. Water potential and wood decay fungi, *Annual Review of Phytopathology*, 15, 319-329.

Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Anese, M. & Lerici, C.R., **1994**. Influence of some selected ions on system water activity and on ethanol vapour pressure and its inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae, Canadian Journal of Microbiology*, 40, 1051-1056.

Gutierrez, M.E., Garcia, F.A., Madariaga, M.A., Sagrista, M.L., Casado, F.J. & Mora, M., **2003**. Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components; evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system, *Life Sciences*, 72, 2337-2360.

Haiyee, Z.A., Saim, N., Said, M., Illias, R.M., Mustapha, W.A.W. & Hassan, O., **2009**. Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin, *Food Chemistry*, 114, 459-465.

Hallsworth, J.E. & Magan, N., **1995.** Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability, *Microbiology,* 141, 1109-1115.

Hallsworth, J.E., **1998**. Ethanol–induced water stress in yeast, *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 85 (2), 125-137.

Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M. & Torti, S.V., **2008**. Review. Curcumin: From Ancient Medicine to current clinical trials, *Cellular & Molecular Life Sciences*, 65, 1631-1652.

Healthspan, turmeric tablets 500mg standardized extract providing 95% curcumin, 2005 (online): http:// www.healthspam.co.uk/shop/product.aspx?id=TURM&ct=true.

Hedges, A.R., **1998**. Industrial applications of cyclodextrines, *Chemical Rev*iews, 98, 2035-2044.

Herberman, R.B., **2002**. Cancer immunotherapy with natural killer cells, *Seminars in Oncology*, 29, 27-30.

Higuchi, T. & Connors, K.A., **1965**. Phase solubility technique, *Advances in Analytical Chemistry & Instrumentation*, 4, 117-212.

Hodgman, C.D., **1944**. Handbook of chemistry and physics, *Chemical Rubber Publishing, Co.,* Cleveland, Ohio.

Hoerter, D. & Dressman, J.B., **1997**. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25, 3-14.

Hoffman, A., Stepensky, D., Lavy, E., Eyal, S., Klausner, E. & Friedman, M., **2004**. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms, *International Journal of Pharmaceutics,* 277, 141-153.

Hohmann, S., **1997**. Shaping up: the response of the yeast to osmotic stress. In. Hohman S., Mager WH (eds) Yeast stress responses. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 101-145.

Hohmann, S., **2002**. Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeasts, *Microbiology & Molecular Biology Reviews,* 66, 300–372.

Horisberger, M. & Vonlanthen, M., **1977**. Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeasts with gold markers, *Archives of Microbiology,* 115, 1-7.

Hottiger, T, Schmutz, P. & Wiemken, A., **1987**. Heat-induced ccumulation and futile cycling of trehalose in Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Bacteriology,* 169, 5518–5522.

Hottiger, T., Boiler, T. & Wiemken, A, **1987**. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts, *FEBS Letters*, 220, 113-115.

Hsieh, Y.F., Chen T.L., Wang Y.T., Chang, J.H. & Chang H.M., **2002**. Properties of liposomes prepared with various lipids, *Journal of Food Science*, 67 (8), 2808-2813.

Huang, M.T., Wang, Z.Y., Georgiadis, C.A., Laskin, J.D. & Conney, A.H., **1992**. Inhibitory effects of curcumin on tumour initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, 13 (11) , 2183-2186.

Hussain, M.S. & Chandrasekhara, N., **1992**. Effect on curcumin on cholesterol gall-stone induction in mice, *Indian Journal of Medical Research,* 96, 288-291.

Iherb.com, turmeric force, New chapter, 60-hexane-Free-Soft-gel capsules (2005) (online): http:// www.iherb.com/ turmericforce.html.

Inoue, Chiaki, **1991**. Process for preparation of microcapsules. European Patent Application 0 453 316 A1, 1991.

Israelachvili, J. & Wennerstrijm, H., **1996**. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions, *Nature,* 379, 219-225.

Iwahashi, H., Odani, M., Ishidou, E. & Kitagawa, E., **2005**. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition, *FEBS Letters*, 579, 2847-2852.

Jaehring, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Wildernauer, F.X., Lisdat, F., Fleischer, L. & Kurz, T., **2008**. Antioxidative activity of (1-3), (1-6)-b-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media, *Food Science and Technology*, 41 (5), 868-877.

Jain, M. & Wu, N.M., **1977**. Effect of small molecules on the dipalmitoyllecithin liposomal bilayers, phase transition in lipid bilayer, *Journal of Membane Biology*, 34, 157-165.

James, **1982**. Process for encapsulating substances by means of microorganisms and the encapsulated products obtained thereby.

James, J.S., **1996**. Curcumin: Clinical trial finds no anti-viral effect, *AIDS Treatment News*, 242, 1-2.

Jamieson, D.J., **1995**. The effects of oxidative stress on *Saccharomyces cerevisiae*, *Redox Report,* 1, 89-95.

Jennings, D.H. & Burke, R.M., **1990**. Compatible solutes-the mycological dimension and their role as physiological buffering agents, *New Phytology*, 116, 277-283.

Jobansson, M. & SjiistrGm, J.E., **1984**. Ethanol and glycerol production under anaerobic conditions by wild-type, respiratory-deficient mutants and a fusion product of Sac*charomyces cerevisiae, Applied Microbiology & Biotechnol*ogy, 20, 105-110.

Joseph, R., **2004**. Yeasts: production and commercial uses, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2335-2341.

Jones, R. & Greenfield, P., **1987**. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane, *Yeast*, 3, 223-232.

Jones, R.P. & Greenfield, P.F., **1986**. Role of water activity in ethanol fermentations, *Biotechnology & Bioengineering,* 28, 29-40.

Jones, R.P., **1989**. Biological principles for the effects of ethanol, *Enzyme & Microbial Technology*, 11, 130-153.

Jordan, W.C. & Drew, C.R., **1996**. Curcumin: a natural herb with anti-HIV activity, *Journal of Natural Medical Association*, 88 (6), 333.

Kaewnopparat, N., Kaewnopparat, S., Jangwang, A., Maneenaum, D., Chuchome, T. & Panichayupakaranant, P., **2009**. Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin-polyvinylpyrrolidone K-30 solids dispersions, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 55, 229-234.

Kalab, M., Allan-Wojitas, P. & Miller, S.S., **1995**. Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis, *Trends in Food Science & Technology,* 6, 177-186.

Karathanos, V.T., Mourtzinos, I., Yannakopoulou, K. & Andrikopoulos, N.K., **2007**. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with b-cyclodextrin, *Food Chemistry*, 101, 652-658.

Keshavarz, K., **1976**. The influence of turmeric and curcumin on cholesterol concentration of eggs and tissues, *Poult Science,* 55 (3), 1077-1083.

Kim, B. & Peppas, N.A., **2003**. *In vitro* release behavior and stability of insulin in complexation hydrogels as oral drug delivery carriers, *International Journal of Pharmaceutics,* 266, 29-37.

Kirilenko, V.N. & Gregoriadis, G., **1993**. Fat soluble vitamins in liposomes; studies on incorporation efficiency and bile salt induced vesicle disintegration, *Journal of Drug Targeting*, 1, 361-368.

Kiuchi, F., Goto, Y., Sugimoto, N., Akao, N., Kondo, K. & Tsuda, Y., **1993**. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 41, 1640–1643.

Klis, F., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S., **2002**. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 239-256.

Koennecke, L.A., Zito, M.A.M, Proescholdt, M.G., Rooijen, N. & Heyes, M.P., **1999**. Depletion of systemic macrophages by liposome- encapsulated clodronate attenuates increases in brain quinolicc acid during CNS-localized and systemic immume activation, *Journal of Neurochemistry*, 73 (2), 770-779.

Kogan, G., Pajtinka, M., Babincova, M., Miadokova, E., Rauko, P., Slamenova, D. & Korolenko, T.A., **2008**. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: can they fight cancer?, *Neoplasma*, 55 (5), 387-393.

Koide, T., Nose, M., Ogihara, Y., Yabu, Y. & Ohta, N., **2002**. Leishmanicidal effect of curcumin in vitro, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25 (1), 131-133.

Kokkona, M., Kallinteri, P., Fatouros, D. & Antimisiaris, S.G., **2000**. Stability of SUV liposomes in the presence of chilate salts and pancreatic lipases: effect o lipid composition, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, 245-252.

Kollar, R., Sturcbk, E. & BablatirovB, E., **1993**. Biochemical, morphological and cytochemical studies of enhanced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae, I. Biochemical studies. Folia Microbiologica*, 38, 473-478.

Kong, F. & Singh, R.P., **2008**. Disintegration of solid foods in human stomach, *Journal of Food Science*, 73 (5), R67-R80.

Korber, D.R., Choi, A., Wolfaardt, G.M. & Caldwell, D.E., **1996**. Bacterial plasmolysis as a physical indicator of viability, *Applied & Environmental Microbiology*, 62 (11), 3939-3947.

Kostewicz, E.S., Brauns, U., Becker, R. & Dressman, J.B., **2002**. Forecasting the oral absorption behaviour of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media, *Pharmaceutical Research*, 19, 345-349.

Koutsopoulos, S., Fatouros, D.G., Ioannou, P.V. & Antimisiaris, S.G., **2006**. Thermal behaviour of novel- sonicated arsonolipid- containing liposomes, *Biophysical Chemistry*, 121, 150-154.

Krishnan, S., Kshirsagar, A. & Singhal, R., **2005**. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent, *Carbohydrate Polymers*, 62, 309-315.

Kshirsagar, A.C., Yenge, V.B., Sarkar, A. & Singhal, R.S., **2009**. Efficancy of pullulan in emulsification of turmeric oleoresin and its subsequent microencapsulation, *Food Chemistry*, 113, 1139-1145.

Kuttan, R., Sudheeran, P.C. & Josph, C.D., **1987**. Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy, *Tumori,* 73 (1), 29-31.

Labuza, T.P. & Karnman, J.F., **1983**. Reaction kinetics and accelerated tests simulation as a temperature, in *Computer-Aided Techniques in Food Technology,* Saguy, I., Ed., Marcel Deklsc. York.

Labuza, T.P., **1980**. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration, *Food Technology,* 34 (4), 36-41.

Laroche, C., Beney, L., Marechal, P.A. & Gervais, P., **2001**. The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperarures, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 56, 249-254.

Laroche, C. & Gervais, P., **2003**. Achievement of rapid dehydration at specific temperatures could maintain high Saccharomyces cerevisiae viability, *Applied & Environmental Biotechnology*, 60, 743-747.

Lal, B., Kapoor, A.K., Aggrawal, P.K., Asthana, O.P. & Srimal, R.C., **2000**. Role of curcumin in idiopathic inflammatory orbital pseudotumours, *Phytotherapy Research*, 14, 443-447.

Lal, B., Kapoor, A.K., Asthana, O.P., Aggrawal, P.K., Prasad, R., Kumar, P. & Srimal, R.C., **1999**. Efficancy of curcumin in the management of chronic anterior uveitis, *Phytotherapy Research*, 13, 318-322.

Lambert, R., Martin, F. & Vagne, M., **1968**. Relationship between hydrogen ion and pepsin concentration in human gastric secretion, *Digestion*, 1, 65-77.

Lampe, V. & Milobedzka, J., **1913**. *Ber. Dtsch. Chem. Ges*., 46: 2235 cited by Roughley and Whiting (1971), in Diarylheptanoids: the problems of biosynthesis, *Tetrahedron Letters*, 40, 5741-5746.

Lande, M.B., Donovan, J.M. & Zeidel., M.L., **1995**. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons, *The Journal of General Physiology*, 106, 67–84.

Lao, C.D., Ruffin, M.T., Normolle, D., Heath, D.D., Murray, S.I. & Bailey, J.M., **2006**. Dose escalation of a curcuminoid formulation, *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 6, 10-17.

Laroche, C. & Gervais, P., **2003**. Achievement of rapid dehydration at specific temperatures could maintain high *Sacharomyces cerevisiae* viability, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 60, 743-747.

Lasic, D.D., **1998**. Novel applications of liposomes, *Tibtech*, 16, 307-321.

Lean, L.P. & Mohamed, S., **1999**. Antioxidative and antimycotic effects of turmeric, lemon-grass, betel leaves, clove, black pepper leaves and Garcinia atriviridis on butter cakes, *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 79 (13), 1817-1822.

Leao, C. & Van Uden, N., **1982**. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae, Biotechnology & Bioengineering,* 24, 2501-2604.

Leao, C. & Van Uden, N., **1984**. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae, Biochimica et Biophysica Acta,* 774, 43-48.

Lee, D.H. & Goldberg, A.L., **1998**. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Cell Biology,* 18, 30–38.

Lee, M.H., Lin, H.Y., Chen, H.C. & Thomas, J.L., **2008**. Ultrasound mediates the release of curcumin from microemulsions, *Langmuir*, 24, 1707-1713.

Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M. & Crowe, J.H., **1994**. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells, *Biochimica Biophysica Acta*, 1192, 7-13.

Letchford, K., Liggins, R. & Burt, H, **2008**. Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly (ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: theoretical and experimental data and correlations, *Journal of Pharmaceutical Science*, 97, 1179-1190.

Leung, M.H.M., Colangelo, H. & Kee, T.W., **2008.** Encapsulation of curcumin in cationic micelles suppresses alkaline hydrolysis, *Langmuir,* 24, 5672-5675.

Levine, I.N., **1988**. *Physical Chemistry,* 3rd ed., McGraw-Hill, New York.

Levy, G., **1967**. Effect of dissolution rate on absorption, metabolism and pharmaceutical activity of drugs, *Journal of Pharmacology*, 3, 237-254.

Lewis, J.G., Learmonth, R.P. & Watson, K., **1995**. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae, Microbiology UK*, 141, 687-694.

Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S. & Pardee, A.B., **1993**. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 90 (5), 1839-1842.

Li, L., Braitech, F. & Kurzrock, R**., 2005.** Liposome-encapsulated curcumin, *Cancer*, 104, 1322-1331.

Liang, G., Yang, Y., Zhou, H., Shao, L., Huang, K., Xiao, J., Huang, Z. & Li, X., **2008**. Synthesis, crystal structure and anti-inflammatory properties of curcumin analogues, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 32, 123-134.

Lidner, D.W., Moeckel, J.E. & Lippold, B.C., **1996**. Controlled release of drugs from hydrocolloid embeddings, *Pharmazie*, 51, 263-272.

Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A. & Cole, G.M., **2001**. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse, *Journal of Neuroscience*, 21 (21), 8370-8377.

Lim, H.S., Park, S.O., Ghafoor, K., Hwang, S.Y. & Park, J., **2011**. Quality and antioxidant properties of bread containing turmeric (Curcuma longa L) cultivated in South Korea, *Food Chemistry*, 124, 1577-1582.

Lin, C., Lin, H., Chen, H., Yu, M. & Lee, M., **2009**. Stability and characterization of phospholipid-based curcumin- encapsulated microemulasions, *Food Chemistry*, 116, 923-928.

Lin, J.K., Pan, M.H., Shiau, S.Y.L., **2000**. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin, *Biofactors*, 13, 153–158.

Lindquist, S. & Kim, G., **1996**. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 93, 5301–5306.

Lipke, P.N. & Ovalle, R., **1998**. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges, *Journal of Bacteriology*, 180 (15), 3735-3740.

Littleton, J.M., **1979**. Cellular tolerance to ethanol as membrane adaptation: a review, *British Journal on Alcohol* & *Alcoholism,* 14, 23-36.

Lodato, P., Segovia de Huergo, M. & Buera, M.P., **1999**. Viability and thermal stability of a strain of Saccharomyces cerevisiae freeze-dried in different sugar and polymer matrices, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 52, 215-220.

Loftsson, T. & Brewster, M., **1996**. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization, *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 85, 1017-1024.

Loksuwan, J., **2007**. Characteristics of microencapsulated b-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin, *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935.

Lopes, L.B., Scarpa, M.V., Silva, G.V.J., Rodringes, D.C., Santilli, C.V., & Oliveira, A.G., **2004**. Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39, 151-158.

Loukas, Y.L., Vraka, V. & Gregoriadis, G., **1998**. Drugs in cyclodextrins, in liposomes; a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis, *International Journal of Pharmaceutics*, 162, 137-142.

Lubitz, Werner, US Patent 6 951 756, **2005**. Closure of bacterial ghost.

Lydon, A., Murray, C., McGinley, J., Plant, R., Duggan, F. & Shorten, G., 1999. Cisapride does not alter gastric volume or pH in patients undergoing ambulatory surgery, *Cancer Journal of Anaesthiology*, 46, 1181-1184.

MacGregor, H., **2006**. Out of the spice box, into the lab: Turmeric, an Indian staple has long medicinal uses. Now the West is taking notice, Los Angeles Times, Los Angeles, CA.

MacKay, V.L., Welch, S.K., Insley, M.Y., Manney, T.R., Holly, J. Saari, G.C. & Parker, M.L., **1988**. The *Saccharomyces cerevisiae BAR1* gene encodes an exported protein with homology to pepsin, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 8555-59.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. & Desobry, S., **2006**. Flavour encapsulation and controlled release- a review, *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 1-21.

Maestrelli, F., Gonzalez-Rotriguez, M., Rabasco, A. & Mura, P., **2005**. Preparation and characterization of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 298, 55-67.

Maestrelli, F., Gonzalez-Rotriguez, M., Rabasco, A. & Mura, P**., 2006**. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 53-60.

Magnusdottir, A., Masson, M. & Loftsson, T., **2002**. Cyclodextrines, *Journal of Inclusion Phenomena & Macrocyclic Chemistry*, 44, 213-218.

Majeed, M., Badmaev, V., Shivakumar, U. & Rajendran, R., **2000**. Research Report from Sabinsa Corporation in *Curcuminoids: Antioxidant phytonutrients*, online edition www. curcuminoids.com/antioxidant.htm.

Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Pada Saha, B. & Mukherjee, **2007**. Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats, *International Journal of Pharmaceutics*, 330, 155-163.

Makarow, M., **1985**. Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiue:* internalization of alpha-amylase and fluorescent dextran intocells, *EMBU*, 4, 1861-1866.

Maltby, J.R., Sutherland, A.D., Sale, J.P. & Shaffer, E.A., **1986**. Preoperative oral fluids: is a five-hour fast justified prior to elective surgery, *Anesthesia & Analgesia*, 65, 1112-1116.

Manolikar, M.K. & Sawant, M.R., **2003**. Study of solubility of isoproturon by its complexation with b-cyclodextrin, *Chemosphere*, 51, 811-816.

Mazumder, A., Neamati, N., Sunder, S., Schulz, J., Pertz, H. & Eich, E., **1997**. Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action, *Journal of Medical Chemistry,* 40 (19), 3057-3063.

McCormack, B. & Gregoriadis, G., **1998**. Drugs in cyclodextrins, in liposomes; an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo, *International Journal of Pharmaceutics*, 162, 59-69.

Melia, C.D. & Davis, S.S., **1989a**. Review article: mechanisms of drug release from tablets and capsules. 1: Disintegration, *Alimentary Pharmacology & Theurapeutics*, 3, 223-232.

Melia, C.D. & Davis, S.S., **1989b**. Review article: mechanisms of drug release from tablets and capsules. 2: Dissolution, *Alimentary Pharmacology & Theurapeutics*, 3, 513-525.

Millar, D.G., GriffithSmith, K., Algar, E. & Scopes, R.K., **1982**. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol, *Biotechnology Letters*, 4, 601-606.

Mishra, P. & Prasad, R., **1989**. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 30, 294-298.

Molly, K., Woestyne, M.V., De Smet, I. & Verstraete, W., **1994**. Validation of the simulator of the of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganisms-associated activities, *Microbial Ecology in Health & Disease*, 7 (1), 191-200.

Morikawa, T., Matsuda, H., Ninomiya, K. & Yoshikawa, M., **2002**. Medicinal foodstuffs. *XXIX.* Potent protective effects of sesquiterpenes and curcumin from Zedoariae Rhizoma on liver injury induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide or tumour necrosis factor-alpha, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25 (5), 627-631.

Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E. & Clark, K.J., **1983**. Effects of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of General Microbiology*, 129, 2023-2034.

Mourtzinos, I., Kalogeropoulos, N., Papadakis, S. E., Konstantinou, K. & Karathanos, V.T., **2008**. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β-cyclodextrin and modified starch, *Journal of Food Science,* 73 (1), S89-S94.

Mura, P., Faucci, M.T., Parrini, P.L., Furlanetto, S. & Pinzauti, S., **1999**. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen-cyclodextrin binary systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 179, 117-128.

Naidu, K.A. & Thippeswamy, N.B., **2002**. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices, *Molecular & Cellular Biochemistry,* 229 (1-2), 19-23.

Naim, F., Messier, S., Saucier, L. & Piette, G., **2004**. Postprocessing *in vitro* digestion challenge to evaluate survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented dry sausages, *Applied & Environmental Microbiology,* 70 (11), 6637-6642.

Nanditha, B. & Prabhasankar., P., **2009**. Antioxidants in bakery products: a review, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition,* 49, 1-27.

Natarajan, C. & Bright, J.J., **2002**. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signalling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes, *Journal of Immunology*, 168 (12), 6506-6513.

NCI, DCPC, **1996**. Clinical development plan: curcumin, *Journal of Cellular Biochemistry*, 26S, 72–85.

Nelson, UK Patent Application 2 418 654 A, **2006**. Microbial encapsulation.

Nelson, Duckham, UK Patent Application 2 413 495 A, **2005**. Phytoactive composition.

Nelson, J.M. & Schubert, M.P., **1928**. Water concentration and the rate of hydrolysis of sucrose by invertase, *Journal of the American Chemical Society*, 50, 2188-2193.

Nenadis, N., Zafiropoulou, I. & Tsimidou, M., **2003**. Commonly used food antioxidants: a comparative study in dispersed systems, *Food Chemistry*, 82, 403-407.

Neves, M.J. & Francois, J., **1992**. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in Saccharomyces cerevisiae, *Biochemistry Journal*, 15, 859–864.

Ni, Z., Xing, F., Wang, P. & Cao, G., **2008**. Synthesis, characterization and release of curcumin-intercalated Mg-Al-layered double hydroxides, *Applied Clay Science*, 40, 72-80.

Nirmala, C. & Puvanakrishnan, R., **1996**. Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats, *Molecular & Cellular Biochemistry,* 159 (2), 85-93.

Normand, V., Dardelle, G., Bouquerand, P., Nicolas, L. & Johnston, **2005**. Flavor encapsulation in yeasts: limonene used as a model system for characterization of the release model, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 53, 7532-7543.

Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J.N., Samhoedi, R. & Vermeulen, N.P., **1996**. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione-S-transferase activities in rat liver, *Biochemical Pharmacology*, 51, 39–45.

Omi, K. & Kamihara, T., **1989**. Accumulation of CAMP in the cells of *Candida tropicalis* at an early stage of ethanol-induced filamentous growth and its prevention by myo-inositol, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 162, 646-650.

Omori, T., Ogawa, K, Umemoto, Y., Yuki, Y., Kajihara, Y., Shimoda, M. & Wada, H., **1996**. Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat-shock treatment, *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 82, 187-190.

Onofre, F., Wang, Y. & Mauromoustakos, A., **2009**. Effects of structure and modification on sustained release properties of starches, *Carbohydrate polymers*, 76, 541-547.

Onwulata, C.I., Konstance, R.P. & Holsinger, V.H., **1998**. Properties of single- and double-encapsulated butteroil powders, *Journal of Food Science,* 63 (1), 100-103.

Otake, K., Shomomura, T., Goto, T., Imura, T., Furuya, T., Yoda, S., Takebayashi, Y., Sakai, H. & Abe, M., **2006**. Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method, *Langmuir*, 22, 2543-2550.

Pabon, H.J, **1964**. A synthesis of curcumin and related compounds, *Rec. Trav. Chimica Pays-Bas.* 83, 379-386.

Paiva-Martins, F., Gordon M. & Cameiro P., **2003**. Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes, *Chemistry & Physics of Lipids*, 124, 23-36.

Pandeya, N., **2005**. Old wive's tales: Modern miracles, *Trees for Life Journal,* 1, 23-25.

Pang, K.Y., Chang, T.L. & Miller, K.W., **1979**. On the coupling between anaesthetic induced membrane fluidization and cation permeability in lipid vesicles, *Molecular Pharmacology,* 15, 729-738.

Pannell, European Patent Application 0 242 135, **1987**. Microbial encapsulation.

Pannell, UK Patent Application 2 162 147 A, **1984**. Encapsulation and encapsulated products.

Pannell, US patent 5,288,632, **1994**. Encapsulation of material in microbial cells.

Paradkar, A., Ambike, A.A., Jadhav, B.K. & Mahadik, K.R., **2004**. Characterization pf curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray-drying, *International Journal of Pharmaceutics*, 271 (1-2), 281-286.

Pari, L. & Murugan, P., **2007**. Tetrahydrocurcumin prevents brain lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Medicine Food*, 10, 323–329.

Pari, L., Tewas, D. & Eckel, J., **2008**. Role of curcumin in health and disease, *Archives of Physiology & Biochemistry*, 114 (2), 127-149.

Partanen, R., Yoshii, H., Kallio, H., Yang, B. & Forsshell, P., **2002**. Encapsulation of sea buckthorn kernel oil in modified starches, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (3), 219-223.

Pastor, F.I.J., Valentin, E., Herrero, E. & Sentandreu, R., **1984**. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoproteins released by Zymolyase and their contribution to wall architecture, *Biochimica et Biophysica Acta,* 802, 292-300.

Patil, T.N. & Srinivasan, M., **1971**. Hypocholesteremic effect of curcumin in induced hypercholesteremic rats, *Indian Journal of Experimantal Biology*, 9 (2), 167-169.

Patro, B.S., Rele, S., Chintalwar, G.J., Chattopadhyay, S., Adhikari, S. & Mukherjee, T., **2002**. Protective activities of some phenolic 1,3-diketones against lipid peroxidation: possible involvement of the 1,3-diketone moiety, *Chembiochem,* 3 (4), 364-370.

Penttill, M.E., Andre, L., Lehtovaara, P., Bailey, M., Teeri, T.T. & Knowles, J.K.C., **1988**. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiue, Gene,* 63, 103-112.

Perkins, S., Verschoyle, R.D. & Hill, K.A., **2002**. Chemopreventiveefficacy and pharmacokinetics of curcumin in the Min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis, *Cancer Epidemic Biomarker Prevent*, 11, 535–540.

Perry, J. H., **1963**. Chemical Engineers's Handbook, 3rd rd.McGraw Hill Book Co., New York.

Petrov, V.V. & Okorokov, L.A., **1990**. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces cerevisiae* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization, *Yeast,* 6, 311–318.

Pfeiffer, E., Hohle, S., Solyom, A.M. & Metzler, M., **2003**. Studies on the stability of turmeric constituents, *Journal of Food Engineering*, 56, 257-259.

Phan, T. T., See, P., Lee, S. T. & Chan, S. Y., **2001**. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing, *Journal of Trauma,* 51 (5), 927-931.

Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B. & Delattre L., **2006**. Betamethasone- in-cyclodextrin- in- liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics, *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 75-82.

Piper, P.W., **1993**. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast Saccharomyces cerevisiae, *FEMS Microbiology Reviews*, 11, 339–356.

Pitombo, R. N. M., Spring, C., Passos, R.F., Tonato, M. & Vitolo, M., **1994**. Effect of moisture content on the invertase activity of freeze-dried *S. Cerevisiae, Cryobiology*, 31, 383-392.

Polyakov, N.E., Leshina, T., Konovalova, T.A., Hand, E.O. & Kispert, L., **2004**. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: HNMR, EPR and optical studies, *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (7), 872-880.

Ponce Cevallos, P.A., Buera, M.P. & Elizande, B.E., **2010**. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β-cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability, *Journal of Food Engineering*, 99, 70-75.

Pralhad, T. & Rajendrekumar, K., **2004**. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-Ray diffraction and SEM analysis, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 34, 333-339.

Price, L.C. & Buescher, R.W., **1996**. Decomposition of turmeric curcuminoids as affected by light, solvent and oxygen, *Journal of Food Biochemistry*, 20 (2), 125-133.

Priyadarsini, K.I., **2009**. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells*, Journal of Photochemistry & Photobiology C: Photochemistry Reviews,* 10, 81-95.

Pszczola, D., **1998**. Encapsulated ingredients: providing the right fit, *Food Technology, 5*2, 70-77.

Punithavathi, D., Venkatesan, N. & Babu, M., **2000**. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats, *British Journal of Pharmacology,* 131 (2), 169-172.

Purohit, A.P., Gupta, P.K., Pokharkar, V.B. & Verma, M., **2002**. Development of transdermal drug dosage formulation for the anti- rheumatic ayurvedic medicinal plants (online): http:// www.ayurvedam.com/pdf/deverhematic.pdf.

Qureshi, S.A., **2006**. Developing discriminatory drug dissolution tests and profiles: some thoughts for consideration on the concept and its interpretation, *Dissolution Technologies*, 13 (4), 18-23.

Ramirez-Tortosa, M.C., Mesa, M.D., Aguilera, M.C., Quiles, J.L., Baro, L. & Ramirez-Tortosa, C. L., **1999**. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has

hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis, *Atherosclerosis,* 147 (2), 371-378.

Ramprasad, C. & Sirsi, M., **1956**. Studies on Indian medicinal plants: Curcuma longa Linn.-effect of curcumin & the essential oils of C. longa on bile secretion, *Journal of Science Industrial Research,* 15, 262-265.

Rankin, M. & Wagner, B., **2004**. Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into cucurbituril, *Supramolecular Chemistry*, 16, 513-519.

Rao, C.V., **2007**. Regulation of COX and LOX by curcumin, *Advances in Experimental Medicine & Biol*ogy, 595, 213-226.

Rao, D.S., Sekhara, N.C., Satyanarayana, M.N. & Srinivasan, M., **1970**. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat, *Journal of Nutrition,* 100 (11), 1307-1315.

Ravindran, P.N., **2006**. Turmeric—the golden spice of life. Turmeric: The genus Curcuma. Taylor and Francis Group, 1–14.

Reddy, A.C.P. & Lokesh, B.R. **1992**. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Molecular & Cellular Biochemistry,* 111, 117-124.

Reineccius, T.A., Reineccius, G.A. & Peppard, T.L., **2002**. Encapsulation of flavours using cyclodextrins: Comparison of flavour retention in alpha, beta and gamma types, *Journal of Food Science*, 67 (9), 3271- 3279.

Rest, M., Kamminga, A.H., Nakano, A., Andraku, Y., Poolman, B. & Konings, W.N., **1995**. The plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae: structure, function and biogenesis, *Microbiological reviews*, 59 (2), 304-322.

Rhodes, J., Barnardo, D., Rhillips, S., Rovelstad, R. & Hofmann, A., **1969**. Increased reflux of bile into the stomach into patients with gastric ulcer, *Gastroenterology*, 57, 241-252.

Rockland, L.B. & Stewart, G.F., Ed., **1981**. *Water Activity: Influences on Food Quality,* Academic Press, New York.

Rodis, P., Karathanos, V. & Mantzavinou, A., **2002**. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50, 596-601.

Roos, Y.H., **1995**. Phase Transitions in Foods, *Academic Press, New York*.

Rose, A.H., **1993**. Composition of the envelope layers of Saccharomyces cerevisiae in relation to flocculation and ethanol tolerance, *Journal of Applied Bacteriology*, 74, S110-S118.

Round, Nelson, UK Patent Application 2 424 408 A, **2006**. Encapsulation using microbial cells.

Rust, C., Aelion M. & Flora, J., **2000**. Control of pH during denitrification in subsurface sediment microcosms using encapsulated phosphate buffer, *Water Research*, 34 (5), 1447-1454.

Safavy, A., Raisch, K.P., Mantena, S., Sanford, L.L., Sham, S.W. & Krishna, N.R., **2007**. Design and development of water-soluble curcumin conjugates as potential anticancer agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 6284-6288.

Sahelian, P.M.D., **2005**. Turmeric by Ray Sahelian: turmeric research turmeric benefits curcumin (online). Available from world wide web: http:// www. Raysahelian.com/turmeric.html.

Sahu, A., Bora, U., Kasoju, N. & Goswami, P., **2008**. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly (ethylene glycol)-palmitate nannocarrier for curcumin delivery to cancer cells, *Acta Biomaterialia*, 4, 1752-1761.

Sahu, A., Kasoju, N. & Bora, U., **2008.** Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells, *Biomacromolecules*, 9 (10), 2905-2912.

Sajbidor, J., **1997**. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17 (2), 87-103.

Saleheen, D., Ali, S.A., Ashfaq, K., Siddiqui, A.A., Agha, A. & Yasinzai, M.M., **2002**. Latent activity of curcumin against leishmaniasis *in vitro*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* 25 (3), 386-389.

Salem, I., & Duzgunes, N., **2003**. Efficancies of cyclodextrin- complexed and liposome-encapsulated clarithromycin against Mycobacterium auium complex infection in human macrophages, *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 403- 414.

Salgueiro, S.P., Sa-Correia, I. & Novais, J.M., **1988**. Ethanol induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae:* Kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity, *Applied & Environmental Microbiology*, 54, 903-909.

Salmaso, S., Bersani, S., Semenzato, A. & Caliceti, P., **2007**. New cyclodextrin bioconjugates for active tumor targeting, *Journal of Drug Target*, 15, 379-390.

Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A. & Lindquis, S., **1992**. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress, The *EMBO Journal,* 11, 2357–2364.

Sanders, C. & Skerry, D.W., **1961**. The distribution of blood cells on haemacytometer counting chambers with special reference to the amended British Standards Specification 748 -1958, *Journal of Clinical Pathology,* 14, 298-304.

Sanz, P., Herrero, E. & Sentandreu, R., **1989**. Role of glycosylation in the incorporation of intrinsic mannoproteins into the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae, FEMS Microbiology Letters,* 57, 265-270.

Satoskar, R., Shah, S.J. & Shenoy, S.G., **1986**. Evaluation of antiflmmatory property of curcumin (di-feroylmethane) in patients with postoperative inflammation, *International Journal of Clinical Pharmacology Therapy & Toxicology*, 24, 651-654.

Scbuchmann, M.N. & Von Sonntag, C., **1988**. The rapid hydration of the acetyl radical. A pulse radiolysis study of acetaldehyde in aqueous solution, *Journal of the American Chemical Society*, 110, 5698-5701.

Scherrer, R., Louden, L. & Gerhardt, P., **1974**. Porosity of the yeast cell wall and membrane, *Journal of Bacteriology*, 118 (2), 534-540.

Schmidt, H.A., Fritzlar, G., Doelle, W. & Goebell, H., **1970**. Verglelchende Untersuchungen der histamine- and insulin-stimulierten Saeure-Pepsin Sekretion bei Patienten mit Ulcuus duodeni und Kontrollpersonen, *Dtsch Med. Wochenschr*, 95, 2011-2016.

Shahed, A.R., Jones, E. & Shoskes, D., **2001**. Quercetin and curcumin up-regulate anti-oxidant gene expression in rat kidney after ureteral obstruction or ischemia/reperfusion injury, *Transplantation Proceedings,* 73 (9), 1434-1445.

Shaikh, J., Bhosale, R. & Singhal, R., **2006**. Microencapsulation of black pepper oleoresin, *Food Chemistry*, 94, 105-110.

Sharma, S.C., **2001**. Influence of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biologicheskie Membrany*, 18 (5), 370-374.

Sharma, R.A., Euden, S.A., Platton, S.L., Cooke, D.N., Shafayat, A., Hewitt, H.R., Marczylo, T.H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S.M., Pirmohamed, M., Gescher, A.J. & Steward, W.P., **2004**. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance, *Clinical Cancer Research*, 10, 6847-6854.

Sharma, R.A., Gescher, A.J. & Steward, W.P., **2005**. Curcumin: The story so far, *European Journal of Cancer,* 41, 1955-1968.

Sharma, R.A., Ireson, C.R. & Verschoyle, R.D., **2001**. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde- DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels, *Clinical Cancer Research*, 7, 1452–1458.

Sharma, R.A., McLelland, H.R., Hill, K.A., Ireson, C.R., Euden, S.A.M Manson, M.M., Pirmohamed, M., Marnett, L.J., Gescher, A.J. & Steward, W.P., **2001**. Pharmacodynamics and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer, *Clinical Cancer Research*, 7, 1894-1299.

Sharma, S.C., Raj, D., Forouzandeh, M. & Bansal, M.P., **1996**. Saltinduced changes in lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Biochemistry &. Biotechnology,* 56, 189–195.

Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Pen, G., Long, S. & Yang, C., **2007**. Yeast- cell based microencapsulation of chlorogenic acid as a water–soluble antioxidant, *Journal of Food Engineering*, 80, 1060-1067.

Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Yang, H. & Ji, R., **2008**. Stabilization of photosensitive resveratrol within yeast cell, *International Journal of Pharmaceutics*, 349, 83-93.

Shibata, N., Mizugami, K., Takano, K. and Suzuki, S., **1983**. Isolation of mannanprotein complexes from viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A wild type and *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A-5 mutant strains by the action of Zymolyase-60,000, *Journal of Bacteriology*, 156, 552-558.

Shiga H., Yoshii, H., Ohe, H., Yasuda, M., Furuta, T., Kuwahara, H., Ohkawara M.& Linko P., **2004**. Encapsulation of Shiitake (Lenthinus Edodes) flavours by spray drying, *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry,* 68 (1), 66-71.

Shishodia, S., Sethi, G. & Aggarwal, B.B., **2005.** Curcumin: Getting back to the roots, Ann, N.Y., *Academic Science,* 1056, 206-217.

Shishu, Indu Pal Kaur, **2008.** Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: the structural requirement, *Food Chemistry*, 111, 573-579.

Simonin, H., Beney, L. & Gervais, P., **2007**. Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatment, *Biotechnology & Bioengineering*, 100 (2), 325-333.

Sindhu, G.S., Singh, A.K., Thaloor, D., Banaudha, K.K., Patnaik, G.K., Srimal, R.C. & Maheshwari, R.K., **1998**. Enhancement of wound healing by curcumin in animals, *Wound Repair & Regeneration,* 6 (2), 167-177.

Singer, M.A. & Lindquist, S., **1998**. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose, *Trends Biotechnology*, 16, 460–468.

Singh, R. & Lillard, J.W., **2009**. Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology,* 86, 215-223.

Slaninova, I., Sestak, S., Svoboda, A. & Farkas, V., **2000**. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*, *Archives of Microbiology*, 173, 245-252.

Slater, S.J., Frank, C.H., Taddeo, F.J., Kelly, M.B. & Stubbs, C.D., **1993**. Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol, *Biochemistry*, 32, 3714-3721.

Snoek, I. & Steensma, Y., **2007**. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 24, 1-10.

Somparn, P., Phisalaphong, C., Nakornchai, S., Unchern, S. & Morales, N.P., **2007**. Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 74-78.

Soni, K. & Kuttan, R., **1992**. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers, *Indian Journal of Physiology & Pharmacology*, 36, 273-275.

Soni, K.B. & Kuttan, R., **1992**. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers, *Indian Journal of Physiology & Pharmacology,* 36 (4), 273-275.

Soni, K.B., Rajan, A. & Kuttan, R., **1992**. Reversal of aflatoxin induced liver damage by turmeric and curcumin, *Cancer Letters*, 66 (2), 115-121.

Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. & Linko, P., **2005**. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d- limonene by spray-drying, *Innovvative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 107-114.

Soottitantawat, A., Takayama, K., Okamura, K., Muranaka, D., Liu, X., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. & Linko, P., **2005**. Microencapsulation of l- menthol by spray drying and its release characteristics, *Innovvative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 163-170.

Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M., Forssel, P., Partanen, R., Poutanen, K. & Linko, P., **2004**. Effect of water activity on the release characteristics and oxidative stability of D-limonene encapsulated by spray drying, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 52, 269- 1276.

Soottitantawata, A., Takayama, K., Okamura, K., Muranaka, D., Yoshiia, H., Furuta, T., Ohkawara, M. & Linko, P., **2005.** Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 163–170.

Soudamini, K. K., Unnikrishnan, M. C., Soni, K. B. & Kuttan, R., **1992**. Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin, *Indian Journal of Physiology & Pharmacology,* 36 (4), 239-243.

Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S.H., Goulding, P.N., Magnolato, D., Lilley, T. & Haslam, E., **1988**. Polyphenol complexation-Some thoughts and observations, *Photochemistry*, 27 (8), 2937-2409.

Srinivasan, K.R., **1952**. The colouring matter in Turmeric, *Current Science*, 311-317.

Srinivasan, M., **1972**. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject, *Indian Journal of Medical Science*, m26 (4), 269-270.

Srivastava, K.C., Bordia, A. & Verma, S.K., **1995**. Curcumin, a major component of food spice turmeric (Curcuma longa) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets, *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 52 (4), 223-227.

Srivastava, R., Dikshit, M., Srimal, R.C. & Dhawan, B.N., **1985**. Anti-thrombotic effect of curcumin, *Thrombosis Research,* 40 (3), 413-417.

Srivastava, R., Puri, V., Srimal, R.C. & Dhawan, B.N., **1986**. Effect of curcumin on platelet aggregation and vascular prostacyclin synthesis, *Arzneimittelforschung,* 36 (4), 715-717.

Stanley, G.A. & Pamment, N.B., **1993**. Transport and intracellular accumulation of acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae, Biotechnology Bioengineering*, 42, 24-29.

Stephen, D.W.S. & Jamieson, D.J., **1996**. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, 141, 207–212.

Stewart, G.G., D'Amore, T., Panchal, C.J. & Russell, I., **1988**. Factors that influence the ethanol tolerance of brewer's yeast strains during high gravity wort fermentations, *MBAA Technical Quarterly*, 25, 47-53.

Stippler, E., Kopp, S. & Dressman, J.B., **2004**. Comparison of US pharmacopeia simulated intestinal fluid TS (without pancreatin) and phosphate standard buffer pH 6.8, TS of the International Pharmacopeia with respect to their use in vitro dissolution testing, *Dissolution Technologies*, 11 (2), 6-10.

Sui, Z., Salto, R., Li, J., Craik, C. & Ortiz de Montellano, P.R., **1993**. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1 (6), 415-422.

Sun, Z., Lv, G., Li, S., Xie, Y., Yu, W., Wang, W. & Ma, X., **2007**. Probing the role of microenvironment for microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress, *Journal of Biotechnology*, 128, 150-161.

Swan, T.M. & Watson, K., **1997**. Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast, *Cancer Journal of Microbiology*, 43, 70–77.

Szejtli, J. & Szente, L., **2005**. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins, *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutcs*, 61, 115-125.

Szente, L., Mikuni, K., Hashimoto, H. & Szejtli, J., **1998.** Stabilization and solubilisation of lipophilic natural colourants with cyclodextrins, *Journal of Inclusion Phenomena & Molecular Recognition in Chemistry*, 32, 81-89.

Szente, L.L. & Szejtli J., **2004**. Cyclodextrins as food ingredients, *Trends in Food Science & Technology,* 15, 137-142.

Tang, B., Ma, L., Wang, H. & Zhang, G**., 2002**. Study of the supramolecular interaction of curcumin and b-cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application, *Journal of Agricultural & Food Chem*istry, 50, 1355-1361.

Tavares, G.D., Viana, C.M., Araujo, J., Ramaldes, G.A., Carvalho, W., Pesquero, J.L., Vilela, J., Andrade, M., Oliveira, M., **2006**. Development and physico- chemical characterization of cyclodextrin- DNA complexes loaded liposomes, *Chemical Physics Letters*, 429, 507-512.

Taylor, T.M., Davinson, P.M., Bruce, B.D. & Weiss, J., **2005**. Liposomal nanocapsules in Food Science and Agriculture, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 45, 587- 605.

Thakur, R., Puri, H.S. & Husain, A., **1989**. Major medicinal plants of India, Central Institute of medicinal and aromatic plants, Lucknow.

Thangapazham, R.L., Puri, A., Tele, S., Blumenthal, R. & Maheshwari, R.K., **2008**. Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells, *International Journal of Oncology*, 32, 1119-1123.

Thomas, D.S., Hossack, J.A. & Rose, A.H., **1978**. Plasma- membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Archives of Microbiology*, 117, 239-245.

Thomas, K.C., Hynes, S.H. & Ingledew, W.M., **1994**. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-highgravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae, Applied & Environmental Microbiology*, 60, 1519-1524.

Thompson, A.K., Haisman, D. & Singh, H., **2006**. Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 54, 6390- 6397.

Tilak, J., Banerjee, M., Moham, H., & Devasagayam, T.P.A., **2004**. Antioxidant availability of turmeric in relation to its medicinal and culinary uses, *Phytotherapy Research*, 18, 798-804.

Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra R. & Calabro M.L., **2004**. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β-cyclodextrin, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis,* 35, 379-387.

Tomren, M.A., Masson, M., Loftsson, T. & Tonnesen, H.H., **2007**. Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin, *International Journal of Pharmaceutics,* 338, 27–34.

Tonnesen, H., Masson, M. & Loftsson, T., **2002**. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation; solubility, chemical and photochemical stability, *International Journal of Pharmaceutics*, 244, 127-135.

Tonnesen, H.H. & Karlsen, J., **1985**. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung*, 180, 402–404.

Tonnesen, H.H., Karlsen, J. & Henegouwen, G.B., **1986**. Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung*, 183, 116-122.

Tuba, A. & Gulcin, I., **2008**. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin, *Chemico-biological Interactions*, 174, 27-37.

Ubbink, J. & Kruger, J., **2006**. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 244-254.

Vaidya, S., Bhosale, R. & Singhal, R.S., **2006**. Microencapsulation of cinnamon oleoresin by spray drying using different wall materials, *Drying Technology*, 24, 983-992.

Vairo, M., **1961**. Methylene blue solutions for staining dead yeast cells, *Stain Technology,* 36, 329-330.

Valentin, E., Herrero, E., Pastor, F.I.J. & Sentandreu, R., **1984**. Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae, Journal of General Microbiology,* 130, 1419-1428.

Van Uden, N. (ed.), **1989**: Alcohol toxicity in yeasts and bacteria. CRC Press, Boca Raton, FL.

Van Uden, N., **1985**. Ethanol toxicity and tolerance in yeasts, *Ann. Rep. Fermen. Proc*., 8, 11-58.

Velasco, J., Andersen, M.L. & Skibsted, L.H., **2004**. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry, *Food Chemistry*, 85, 623-632.

Venkatesan, N. & Chandrakasan, G., **1995**. Modulation of cyclophosphamide-induced early lung injury by curcumin, an anti-inflammatory anti-oxidant, *Molecular & Cellular Biochemistry,* 142 (1), 79-87.

Venkatesan, N., **1998**. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats, *British Journal of Pharmacology*, 124 (3), 425-427.

Venkatesan, N., **2000**. Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity, *Life Scienc*e, 66 (2), PL21-PL28.

Venkatesan, N., Punithavathi, V. & Chandrakasan, G., **1997**. Curcumin protects bleomycin-induced lung injury in rats, *Life Science,* 61 (6), PL51-PL58.

Verma, M., Borse, B.B., Sulochanamma, G. & Raghavan, B., **2005**. Retention of benchmark flavour impact components in encapsulated rose oil, *Flavour Fragance Journal*, 20, 122-126.

Vertzoni, M., Dressman, J., Butler, J., Hempenstall, J. & Reppas, C., **2005**. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds, *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics,* 60, 413-417.

Vertzoni, M., Kartezini, T., Reppas, C., Archodaki, H. & Valsami, G., **2006**. Solubilization & quantification of lycopene in aqueous media in the form of cyclodextrin binary systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 115-122.

Vranska, M., Biely, P. & Kratki, Z., **1977**. Enzymes of the yeast lytic system produced by *Arthrobacter* GJM-1 bacterium and their role in the lysis of yeast cell wall, *Z. AIIg. Mikrobiologica,* 17, 465-480.

Wahlstrom, B. & Blennow, G., **1978**. A study on the fate of curcumin in the rat, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 43, 86-92.

Walker, G.M., **1997**. Yeast Physiology and Biotechnology, Wiley Press.

Wang, Y., Lu, Z., Lv, F., & Bie, X., **2009**. Study of microencapsulation of curcumin pigments by spray drying, *European Food Research Technology*, 43, 256-267.

Wang, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.I., Ho, Y.S., Hsieh, C.Y., **1997**. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 15, 1867-1876.

Wessels, J.G.H. & Sietsma, J. H., 1**981**. Fungal cell walls: a survey. InTanner, W. and Loewus, F. A. (Eds), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series,* Vol. 13B. Springer-Verlag, Berlin, 352-394.

Whitehead, L., Fell, J.T., Collett, J.H., Sharma, L., & Smith, M., **1998**. Floating dasage forms: an *in vivo* study demonstrating prolonged gastric retention, *Journal of Controlled Release,* 55 (1), 3-12.

Williams, R.O., Mahaguna, V. & Sriwongjanya, M., **1998**. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl-β-cyclodextrin, *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 46, 355-360.

Wood, C.R., Boss, M.A., Kenten, J.H., Calvert, J.E., Roberts, N.A. & Emtage, J.S., **1985**. The synthesis and in *vivo* assembly of functional antibodies in yeast, *Nature,* 314, 442-449.

Wulff, G., Avgenaki, G. & Guzmann, M.S.P., **2005**. Molecular encapsulation of flavours as helical inclusion complexes of amylose, *Journal of Cereal Science*, 41, 239-249.

Yoshii, H., Soottitantawat, A., Liu, X., Atarashi, T., Furuta, T., Aishima, S., Ohgawara, M. & Linko, P., **2001**. Flavor release from spray-dried maltodextrin/ gum Arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 55-61.

Yu, S., Bochot, A., Le Bas, G., Cheron, M., Mahuteau, J., Grossiord, J., Seiller M. & Duchene, D., **2003**. Effect of camphor/cyclodextrin complexation on the stability of o/w/o multiple emulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, 261, 1-8.

Yu, H. & Huang, Q., **2010**. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch, *Food Chemistry*, 119, 669-674.

Yuliani, S., Torley, J.P., D'Arcy B., Nicholson, T. & Bhandari, B., **2005**. Extrusion of mixtures of starch and D-Limonene encapsulated with β-cyclodextrin: Flavour retention and physical propertie, *Food Research International*, 54, 321-328.

Zeller, B.L., Saleeb, F.Z. & Ludescher, R.D., **1999**. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation, *Trends in Food Science & Technology,* 9, 389-394.

Zhao, Z.J., Wang, Q. & Zhang, L., **2007**. Size effect on competition of two diffusion mechanisms for drug molecules in amorphous polymers, *Journal of Physical Chemistry B,* 111, 13167-13172.

Zingone, G. & Rubessa, F., **2005**. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- b-cyclodextrin, *International Journal of Pharmaceutics*, 291, 3-10.

Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B. & Carib, E., **1984**. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity, *Journal of Bacteriology*, 159, 1018-1026.

Zornoza, A., Martin, C., Sanchez, M., Velaz, I. & Piquer, A., **1998**. Inclusion complexation of glisentide with α-, β- and γ-cyclodextrins*, International Journal of Pharmaceutics*, 169, 239-244.

Zueco, J., Mormeneo, S. & Sentandreu, R., **1986**. Temporal aspects of the 0-glycosylation of *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins, *Biochimica et Biophysica Acta,* 884, 93-100.

Z. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Πίνακας 1. *Εφαρμογές της μικροενθυλάκωσης στην βιομηχανία των τροφίμων (Pszczola, 1998).*

Πατέντα		*Εφαρμογή*
Patent W0 98/ 03076A1		**Σε τσίχλες εγκλείεται ασπαρτάμη κ.α. ευαίσθητα συστατικά σε πολυβίνυλο-οξικό και ζεΐνη**
U.S Patent 5, 824, 342: Solloids		**Ενθυλακώνονται αρωματικά, γλυκαντικά σε τσίχλες και προϊόντα ζαχαροπλαστικής σε λίπος**
U.S Patent 5, 736, 187		**Χρησιμοποιούνται εγκλεισμένα μέσα οξίνισης σε σάλτσες. Το μέσο ενθυλάκωσης έχει ΣΖ τουλάχιστον 90°F**
U.S Patent 5, 756, 136		**Εγκλείεται ενεργό συστατικό σε πρωτεΐνη γάλακτος για εφαρμογή σε ζύμη αρτοποιίας**
U.S Patent 5, 601, 760		**Ενθυλακώνονται λίπη, έλαια, αρωματικά συστατικά, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία κ.α. σε υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη γάλακτος**
U.S Patent 5,603, 952		**Σχηματίζονται κάψουλες ελαίων, πιπεριού, αρωματικών σκόρδου- μήλου σε ζελατίνη ψαριού**
U.S Patent 5,633, 027		**Το σύστημα περιλαμβάνει 1 μέτριας αλυσίδας τριγλυκερίδιο με πτητικό αρωματικό, το οποίο μπορεί να προσροφηθεί σε μη λιπαρό υπόστρωμα και να ενσωματωθεί σε μήτρα σακχάρου. Εφαρμογή σε τσίχλες και προϊόντα ζαχαροπλαστικής**
U.S Patent 5, 603, 971		**Υδατάνθρακες στην υαλώδη κατάσταση παρασκευάζονται με υδατικούς πλαστικοποιητές και ενθυλακώνουν αρωματικά συστατικά.**
U.S Patent 5, 536, 513		**Allium oil κάψουλες αρωματίζουν αλεύρια. Προστίθενται όταν το αλεύρι ζυμώνεται και δεν επηρεάζουν τη ρεολογία της ζύμης**
U.S Patent 5,824, 345		**Πρωτεϊνικές μικροσφαίρες εγκλείουν αρώματα και ελευθερώνουν το ενεργό συστατικό σε συγκεκριμένο pH**

***Πίνακας 2**. Μελέτες που αφορούν τους υδατάνθρακες ως μέσο εγκλεισμού διαφόρων διατρόφοδραστικών συστατικών.*

	Ουσία που ενθυλακώνεται	***Μέσο ενθυλάκωσης***	***Μέθοδος ενθυλάκωσης***	***Παρατηρήσεις***
Soottitantawat et al., 2004	D-λεμονένιο	Αραβικό κόμμι, πολυσακχαρίτης σόγιας, Τροποποιημένο άμυλο, Μαλτοδεξτρίνη	Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)	Επίδραση της aw στην απελευθέρωση και την οξειδωτική σταθερότητα:η οξείδωση και η απελευθέρωση ↑ καθώς ↑ aw. Κοντά στο Tg ↓ λόγω αλλαγής στην δομή της σκόνης
Yoshii et al., 2001	Αιθυλικός βουτυλεστέρας	Πολυσακχαρίτης σόγιας, Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Η συγκράτηση εξαρτάται από συγκέντρωση MD & είδος γαλακτω/τη. Η ζελατίνη ↑ την συγκράτηση
Soottitantawat et al., 2005	L-μενθόλη	Αραβικό κόμμι, Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Ο ρυθμός απελευθέρωσης ↑ με την ↑ της RH & της T. Υπάρχει ↑ υπόλειμμα μενθόλης στην επιφάνεια της σκόνης
Soottitantawat et al., 2005	D- λεμονένιο	Αραβικό κόμμι, Τροποποιημένο άμυλο, Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Η απελευθέρωση και η οξείδωση ↓ καθώς ↑ το μέγεθος των σωματιδίων
Krishnan et al., 2005	Cardamon oleoresin	Αραβικό κόμμι, Τροποποιημένο άμυλο, Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Το αραβικό κόμμι παρέχει περισσότερη προστασία από την μαλτοδεξτρίνη ή το τροποποιημένο άμυλο
Shaikh et al., 2006	Black pepper oleoresin	Αραβικό κόμμι, Τροποποιημένο άμυλο, Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Το αραβικό κόμμι παρέχει περισσότερη προστασία από το τροποποιημένο άμυλο
Bhandari et al., 1992	Citral & lanalyl acetate	Αραβικό κόμμι, , Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Επίδραση της T εισόδου στον spray dryer. Αποτελεσματική τεχνική για εγκλεισμό ευαίσθητων ουσιών
Onwulata et al., 1998	Butteroil	σακχαρόζη	Spray drying	Διπλή ενθυλάκωση Η ↓ της υγρασίας ↑ ποσοστό λίπους στην κάψουλα
Beristain et al., 2002	Αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού	Κόμμι mesquite	Spray drying	Επίδραση της aw. Η T επηρεάζει την σταθερότητα του ελαίου
Zingone et al., 2005	Warfarin	β- κυκλοδεξτρίνη (β-CD)	Freeze drying	Ο εγκλεισμός βελτίωσε την βιοδιαθεσιμότητά της σε όξινο μέσο
Gratard et al., 2002	Flaxseed oil	Μαλτοδεξτρίνη	Freeze drying	Προστασία λιπιδίων απέναντι στην οξείδωση
Reineccius et al., 2002	Αρωματικά	α, β, γ -CD	Spray drying	Η γ- CD είναι καλύτερη για συγκράτηση αρωματικού. Οι απώλειες είναι μεγαλύτερες για την β και ελάχιστες για την α- CD
Fu et al., 2003	Λεμονένιο, πυραζίνη	Ζύμη αλεύρου	Cold-trap on line	Μελέτη της διάχυσης του αρωματικού στους πόρους της ζύμης κατά τη θέρμανση.
Polyakov et al., 2004	καροτενοειδή	κυκλοδεξτρίνες		Οι CDs προστατεύουν από τις ελεύθερες ρίζες, αλλά ↓ την Αντιοξειδωτική Δραστικότητα των καροτενοειδών

	Ουσία που ενθυλακώνεται	***Μέσο ενθυλάκωσης***	***Μέθοδος ενθυλάκωσης***	***Παρατηρήσεις***
Adamiec et al., 2006	Αιθέριο έλαιο πιπεριού	Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Μέτρηση των ελαίων επιφανειακά και εντός της κάψουλας
Vaidya et al., 2006	Αρωματικά κανέλας	Αραβικό κόμμι, Τροποποιημένο άμυλο, Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Μέτρηση της σταθερότητας των πτητικών
Baranauskiene et al., 2006	ρίγανη, μαντζουράνα	Πρωτεΐνες γάλακτος	Spray drying	Μέτρηση των αρωματικών επιφανειακά και εντός της κάψουλας
Calabro et al., 2004	κερκετίνη, 3-OH-φλαβόνη	α, β- CDS	Co- evaporation	Η ενθυλάκωση στις CDS αυξάνει την αντιοξειδωτική δραστικότητα και την διαλυτότητα των συστατικών
Bhandari et al., 1999	Αιθέριο έλαιο λεμονιού	β- CD	Vaccum ή spray drying	Ο χρόνος ανάδευσης και η μέθοδος ξήρανσης δεν επηρεάζουν τα επίπεδα των πτητικών
Verma et al., 2005	Αιθέριο έλαιο τριαντάφυλλου	Κόμμι ακακίας , υδρολυμένο άμυλο	Spray drying	Αποθήκευση στους 27 και 4^{o}C για 3 μήνες: καλύτερη συγκράτηση σε αναλογία μέσων 1:1 απ' ότι σε καθένα μεμονωμένα
Fuchs et al., 2006	Αιθέριο Έλαιο	Μαλτοδεξτρίνη και κόμμι ακακίας	Spray drying & bed agglom.	Προστατεύει το έλαιο από την οξείδωση
Karathanos et al., 2007	Βανιλλίνη	β- CD	Freeze drying	Η ενθυλάκωση αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα της βανιλλίνης
Tommasini et al., 2004	Φλαβονοειδή	β- CD		Μελέτη του ρυθμού διάλυσης σε διάφορα pH (HCl, KCL, κιτρικό, φωσφορικό)
Apintanapong et al., 2003	2- acetyl – 1- pyrroline (ρύζι)	Κόμμι ακακίας , Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Καλύτερη συγκράτηση σε μίγμα 70:30 Κόμμι ακακίας: Μαλτοδεξτρίνη
Shiga et al., 2004	Shiitake	Μαλτοδεξτρίνη	Spray drying	Η συγκράτηση ↑ με ↑ της Τ ξήρανσης και ↓ με ↑ των ισοδυνάμων δεξτρόζης της Μαλτοδεξτρίνης
Szejtli et al., 2005	Πικρά συστατικά	CDS		Ο εγκλεισμός σε CDs ↓ ή εξαλείφει την πικρή γεύση λόγω σχηματισμού συμπλόκου εγκλεισμού

Πίνακας 3. *Ενθυλάκωση διατρόφοδραστικών συστατικών σε κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae.*

	Ουσία	***πλασμόλυση***	***Μέθοδος ενθυλάκωσης***	***Επιβεβαίωση ενθυλάκωσης***	***Παράμετροι που μελετήθηκαν***	***Παρατηρήσεις***
Shi et al.,2008	ρεσβερατρόλη	5%NaCl 54^0C, 150 rpm, 24h- φυγοκεντρηση-5 εκπλύσεις με νερό- λυοφιλίωση	ρεσβερατρόλη (0.10 γρ)+ κύτταρα (0.30 γρ) +νερό+ αιθανόλη 1:1 (10ml)- ανάδευση -25 MPα, 40^0C, 4h, - φυγοκέντρηση 12000 rpm, 10min- 3 εκπλύσεις με νερό- λυοφιλίωση	-FT-IR -Fluorescence & Laser Confocal Microscopy	*Απελευθέρωση σε γαστρικό *Αντιοξειδωτική δραστικότητα *Υδατοδιαλυτότητα *Σταθερότητα σε : -σχετική υγρασία 75 & 90%/ 25^0C - 60^0C, 10 ημέρες - Στο φως	Η ενθυλάκωση στα κύτταρα ζύμης μπορεί να ενισχύσει την υδατοδιαλυτότητα, την αντιοξειδωτική δραστικότητα και την σταθερότητα της ρεσβερατρόλης
Shi et al.,2007	Χλωρογενικό οξύ (υδατοδιαλυτό) καθαρότητας 35, 85, 98%	5%NaCl 54^0C, 150 rpm, 24h.- φυγοκέντρηση-5 εκπλύσεις με νερό- λυοφιλίωση	Χλωρογενικό (0.10 γρ)+ ζύμες (0.30 γρ) +νερό (5ml)- ανάδευση -25 MPα, 40^0C, 4h, - φυγοκέντρηση 12000 rpm, 10 min- 3 εκπλύσεις με νερό- λυοφιλίωση	-FT-IR -Fluorescence microscopy	*Απελευθέρωση σε γαστρικό υγρό/ νερό & Ρ.Δ φωσφορικών *Σταθερότητα σε : σχετική υγρασία 75% /25^0C & 90%/ 25^0C & 60^0C-10 ημέρες	- Η πλασμόλυση κυττάρων και η καθαρότητα του χλωρογενιού↑απόδοση - Η ενθυλάκωση ↑ σταθερότητα χλωρογενικού - Η απελευθέρωση: γαστρικό> ΡΔ φωσφορικών> νερό
Bishop et al., 1998	Λιπόφιλα αιθέρια έλαια: δυόσμος, πορτοκάλι	Δεν υπάρχει πλασμόλυση - Σύγκριση ζωντανών-νεκρών (με αποστείρωση)	21 γρ ελαίου +16 γρ ζύμης+100γρ νερό (1:2:4)-ανάδευση, 4h, 100rpm, 40^0C-φυγοκέντρηση, 2000 g, 10 min- 5 εκπλύσεις με νερό- λυοφιλίωση	-Scanning Confocal Microscope -Transmission Electron Microscope (TEM)	*επίδραση της Τ στην ενθυλάκωση, για 4h *Η αποστείρωση των κυττάρων (απώλεια ζωτικότητας) αυξάνει τον ενδοκυτταρικό χώρο λόγω εκχύλισης υδατοδιαλυτών ουσιών & πρωτεϊνών και/ή διασπά μερικώς δομή μεμβράνης αυξάνοντας ρυθμό διάχυσης -ενθυλάκωση υδρογονανθρακών, λεμονένιου για επίδραση του ΜΒ,	-το νερό είναι απαραίτητο για ενθυλάκωση. Το έλαιο ενθυλακώνεται εντός του κυττάρου. Το τοίχωμα & η μεμβράνη παραμένουν ανέπαφα. -σε θερμοκρασίες>Tm~ 40^oC ενθυλακώνεται περισσότερο -τα κύτταρα χάνουν ζωτικότητα τους μετά από

					σχήματος & ΟΗ στην ικανότητα ενθυλάκωσης	2h κατά την ενθυλάκωση, αλλά ακόμα και τα νεκρά κύτταρα μπορεί να χρησιμοποιηθούν για ενθυλάκωση (μηχανισμός: παθητική διάχυση) -Μόρια με ΟΗ ή αμφιφιλικές ιδιότητες ενθυλακώνονται περισσότερο
Normand et al., 2005	λεμονένιο	Υπάρχει πλασμόλυση	80 γρ ζυμών+440 γρ υδατικού δμτος ζύμης 9%w/w – ενθυλάκωση- εκπλύσεις με νερό - φυγοκέντρηση-spray drying	- Transmission Electron (TEM) & Atomic force microscopy(AFM - DSC, TGA	-Μορφολογία κυττάρων - θερμική σταθερότητα	-απελευθέρωση ενθυλακωμένης ουσίας γίνεται με 2 τρόπους: T>260^{o} C ή aw>0.7. Σε aw<0.7 δεν υπάρχει απελευθέρωση
Dardelle et al., 2007		**Υπάρχει πλασμόλυση**	**80 γρ ζυμών+440 γρ υδατικού δμτος ζύμης 9%w/w – ενθυλάκωση- εκπλύσεις με νερό - φυγοκέντρηση-spray drying**	**TEM**	**Μελέτη απελευθέρωσης σε:** **- ξηρή κάψουλα (~0,5γρ) σε: 50 ml νερό/& 50 γρ μίγμα λιπαρών οξέων.** **- νωπή κάψουλα (0,55 γρ) σε 50 γρ μίγμα λιπαρών οξέων.** **- ξηρή +νωπή κάψουλα σε κλειστό δοχείο.** **Όλα ανακινούνται ελαφρά για 2h +αφήνονται σε ηρεμία 2 εβδομάδες** **- εφαρμογή κάψουλας σε λαζάνια και οργανοληπτικός έλεγχος**	**Για να υπάρχει απελευθέρωση στο λάδι ή στον αέρα πρέπει η κάψουλα να είναι νωπή: το νερό είναι απαραίτητο για απελευθέρωση: τα ΟΗ από το κυτταρικό τοίχωμα (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες) έλκουν με δεσμούς Η μόρια νερού, το τοίχωμα διογκώνεται, διατηρεί την δομή β-φύλλου σχηματίζοντας πόρους και ενισχύεται η διάχυση.**

Πίνακας 4. *Πατέντες που αναφέρονται στην ενθυλάκωση διατρόφοδραστικών συστατικών σε κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae.*

Πατέντα	***Ουσία***	***Κύτταρα***	***Συνθήκες πλασμόλυσης***	***Μέθοδος ενθυλάκωσης***	***Παρατηρήσεις***
Inoue, 1991	υδρόφοβη	S. cerevisiae με συγκέντρωση λιπιδίων 2% κ.β.	10 γρ ξηρών –ζωντανών κυττάρων + 90 γρ νερό+10 γρ αιθανόλη-ανάδευση 24h, 40^{0}C-φυγοκέντρηση-ξήρανση 105^{0}C->ζύγιση: έφυγε το 60% του βάρους των αρχικών κυττάρων	22 γρ ουσίας+1,1 γρ μαύρης χρωστικής(PSD-150)+20 γρ υδατικό διάλυμα με 0,5% κ.β. tween 80- ισχυρή ανάδευση-σχημ. γαλακτώματος-> +στο αιώρημα ζύμης -> ανάδευση 200 rpm, 3h, 50^{0}C	▪ **για πλασμόλυση:** **-αντί για αιθανόλη σε ίδιες συνθήκες 5 γρ ακετόνης ->απώλεια 45% του βάρους των αρχικών κυττάρων** **- αντί για αιθανόλη έγινε αποστείρωση 120^{0}C, 10 min ->απώλεια 30% του βάρους των αρχικών κυττάρων** **-αντί για αιθανόλη έγινε ρύθμιση του pH σε 5.5-16h, 51^{0}C ->απώλεια 46%** **-όταν μια ζύμη με Cλιπιδίων >10% κ.β. έρθει σε επαφή με πολικούς διαλύτες τότε αυτοί δρουν ως 'lipid extending agent' , ενώ εάν έχουν Cλιπιδίων <10% κ.β. αυτοί οι διαλύτες δρουν ως 'elution promoting agent' προκαλώντας πλασμόλυση. Εδώ, η αιθανόλη προκαλεί πλασμόλυση** **- συγκρίνοντας την πλασμόλυση με διάφορους τρόπους , ως προς το ποσοστό του ενδοκυτταρικού υλικού που αφαιρέθηκε, η ETOH είναι πιο αποτελεσματική από την ακετόνη ή την αποστείρωση**
Pannell, 1989	Υδρόφοβα Αιθέρια έλαια	S. cerevisiae με συγκέντρωση λιπιδίων <5% κ.β.	Όχι πλασμόλυση	Νωπά κύτταρα ζύμης που περιέχουν 10 γρ κυττάρων + 10 γρ έλαιο λεβάντας-> ανάδευση 4h, 45^{0}C-ξήρανση στον αέρα	**Μέθοδος για ενθυλάκωση υγρής ουσίας σε κύτταρα με συγκέντρωση λιπιδίων < 40%, χωρίς πλασμόλυση ή προσθήκη lipid-extending ουσίας ή γαλακτωματοποιητή.** **Απαιτείται η παρουσία νερού για τον εγκλεισμό.** **Αν η ουσία είναι στερεή τότε διαλύεται σε οργανικό διαλύτη (αιθανόλη, μεθανόλη, ~5-10%):**

					~5 γρ + νωπά κύτταρα(~10 γρ νερό+5 γρ κύτταρα)
Πατέντα	***Ουσία***	***Κύτταρα***	***Συνθήκες πλασμόλυσης***	***Μέθοδος ενθυλάκωσης***	***Παρατηρήσεις***
Pannell, 1984		S. cerevisiae με λιπιδια<5% κ.β.	Όχι πλασμόλυση	Νωπά κύτταρα ζύμης που περιέχουν 5 γρ κυττάρων + 5 γρ διάλυμα 2% κ.β. χρωστικής - ανάδευση 24h, 40^{0}C- ξήρανση στον αέρα	**Περιγράφεται διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης των λιπιδίων**
James, 1982		S. cerevisiae με συγκέντρωση λιπιδίων <40% κ.β.	Όχι πλασμόλυση	Αιώρημα κυττάρων 15% κ.β. που περιέχει 1 γρ κυττάρων +0.8γρ από δμα 1% χρωστικής σε ακετόνη- ανάδευση 6h -φυγοκέντρηση -διάλυση σε νερό, 15% - εφαρμογή σε χαρτί	**Περιγράφεται διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης των λιπιδίων**
Round & Nelson, 2006		S. cerevisiae Με χαμηλή συγκέντρωση λιπιδίων	Κύτταρα που έχουν αυτολυθεί με ανέπαφο κυτταρικό τοίχωμα και μεμβράνη κατεστραμμένη ή απούσα	50 γρ υδατοδιαλυτού αρωματικού+100 γρ κυττάρων +200 γρ. νερό (ουσία/ ζύμη/ νερό 1/2/4) -ανάδευση 38^{0}C, 3,5h- φυγοκέντρηση- spray drying	**Εδώ δεν προστίθεται οργανικός διαλύτης . Οι ζύμες έχουν αυτολυθεί, οπότε χρησιμοποιείται το κυτταρικό τοίχωμα τους και ακολουθεί η προσθήκη υδρόφιλων ουσιών , παρουσία νερού**
Nelson, 2006		**S. cerevisiae με λιπίδια <40% κ.β.**	**Ξεπλυμένα με αιθανόλη κύτταρα ζυμομυκήτων Όχι πλασμόλυση**	**50 γρ ουσίας (αιθέριο έλαιο)+1800 γρ νερό+100 γρ ζύμης (ουσία/ ζύμη/ νερό 1/2/4)- ανάδευση 40^{0}c, 17,5 h- φυγοκέντρηση - spray drying**	**Για την ενθυλάκωση χρησιμοποιείται λόγος βάρους κύτταρα ζύμης: ουσίας τουλάχιστον 2:1, για να υπάρχει μεγάλη απόδοση στο ποσό την ουσίας που ενθυλακώνεται σε σχέση με την ποσότητα της που προστέθηκε αρχικά. Κατά την διαδικασία της ενθυλάκωσης των υδρόφοβων συστατικών δεν προστίθεται οργανικός διαλύτης**

Πίνακας 5. *Λιπιδιακή σύσταση της πλασματικής μεμβράνης και των λιπαρών οξέων του S. cerevisiae.*

Λιπίδιο	*% σύσταση*	*Λιπαρό οξύ*	*% στο σύνολο των Λ.Ο*
PC	17,0	10:0- 14:1	**7,0**
PE	14,0	16:0	**12,8**
PI	27,7	16:1	**32,3**
PS	3,8	18:0	**8,0**
CL	4,2	18:1	**28,0**
PA	2,5	18:3	**1,4**
Σφιγγολιπίδια	**30,7**	**20-24**	**8,0**

Πίνακας 6. *Φυσιολογικές λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμομυκήτων και πρακτική σημασία του στη βιοτεχνολογία και την ιατρική.*

Ρόλος στο κύτταρο	
Φυσική προστασία	Διατήρηση του σχήματος, προστασία του πρωτοπλάσματος
Ωσμωτική σταθερότητα	Η αφαίρεση του κυτταρικού τοιχώματος καταλήγει σε λύση των πρωτοπλαστών, εάν δεν υπάρχουν ωσμωτικοί σταθεροποιητές
Διαπερατότητα	Ουσίες με μέγεθος μεγαλύτερο από 600 Da δεν διαπερνούν το τοίχωμα.
Ενζυμική ακινητοποίηση	Ένζυμα που μαλακώνουν το τοίχωμα (πχ γλουκανάσες) και υδρολάσες (πχ ιμβερτάση) ακινητοποιούνται στο κυτταρικό τοίχωμα
Δέσμευση κατιόντων	Πολλά απομακρύνονται από το κυτταρικό τοίχωμα, ακόμα και βαρέα μέταλλα
Αναγνώριση κυττάρου-κυττάρου	Υπάρχουν σημεία αναγνώρισης των φερρομονών και των φονικών τοξινών
Προσκόλληση κυττάρων	Λόγω των ιδιοτήτων του τοιχώματος τα κύτταρα μπορεί να προσκολλώνται ή να συσσωματώνονται
Πρακτική σημασία:	***Εφαρμογές στην βιοτεχνολογία και την ιατρική***
Βιοπροσρόφηση μετάλλων	Τα κυτταρικά τοιχώματα έχουν χρήση στην βιοθεραπεία των βαρέων μετάλλων (Cd, Cu, Ag, Zn) και στα βιομηχανικά απόβλητα
Αντιγονικές ιδιότητες	Μπορεί να χρησιμεύσουν στην ταξινόμηση και την διάγνωση παθογόνων στελεχών
Γλυκάνη	Μη – θρεπτικός σταθεροποιητής τροφίμου
Ετερόλογη σύνδεση πρωτεϊνών	Επιφανειακά αντιγόνα του ιού της ηπατίτιδας Β έχουν εκφραστεί στην εξωτερική μαννοπρωτεΐνη του *S. Cerevisiae* που μπορεί να εφαρμοστούν στην παραγωγή δια του στόματος εμβολίου
Προσκόλληση κυττάρων	Σημαντική κατά την ζύμωση στην ζυθοποιία
Υποδοχή φονικών τοξινών	Οι φονικές ζύμες έχουν εφαρμογή στην βιοτεχνολογία
Αντικαρκινικός παράγοντας	Συστατικά του τοιχώματος, όπως οι β-1,3 γλυκάνες μπορεί να δράσουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Πίνακας 7. *Διατροφικές απαιτήσεις των ζυμομυκήτων και ιδανικές συγκεντρώσεις κατιόντων (Walker, 1997).*

Στοιχείο	*Πηγές*	*Ιδανική συγκέντρωση*	*Κυτταρικές λειτουργίες*
Άνθρακας	Σάκχαρα		Βασικό δομικό στοιχείο σε συνδυασμό με το υδρογόνο, το οξυγόνο, το άζωτο. Ο καταβολισμός των ανθρακικών συστατικών παρέχει ενέργεια
Υδρογόνο	H^+ από όξινο περιβάλλον	1.0 μM (pH6.0)	Διαμεμβρανική κινητήρια δύναμη πρωτονίων απαραίτητη για την διατροφή Ενδοκυτταρικό όξινο pH (περίπου 5-6) είναι απαραίτητο για τον μεταβολισμό και την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών
Οξυγόνο	Αέρας		Απαραίτητο για τα αναπνευστικά κ.α. οξειδωτικά ένζυμα, την σύνθεση της εργοστερόλης και των ακόρεστων λιπαρών οξέων
Άζωτο	Άλατα αμμωνίου, ουρία, αμινοξέα		Δόμηση και λειτουργία των πρωτεϊνών και των ενζύμων Αποτελεί το 10% του ξηρού βάρους των κυττάρων
Φώσφορος	Φωσφορικά		Μεταφορά ενέργειας, δόμηση νουκλεϊνικών οξέων και μεμβράνης Αποτελεί το 3-5% του ξηρού βάρους των κυττάρων
Κάλιο	Άλατα K^+	2-4 mM	Ιονική ισορροπία, ενζυμική δραστικότητα : συμπαράγοντας ενζύμων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, βιοσύνθεσης πρωτεϊνών, μεταβολισμού υδατανθράκων. Αποτελεί το 1-2% του ξηρού βάρους των κυττάρων
Μαγνήσιο	Άλατα Mg^{2+}	2-4 mM	Ενζυμική δραστικότητα, δόμηση κυττάρου και οργανιδίων Αποτελεί το 0.3% του ξηρού βάρους των κυττάρων
Θείο	Θειικά, μεθειονίνη		Σουλφιδικά αμινοξέα και βιταμίνες Αποτελεί το 0.3% του ξηρού βάρους των κυττάρων
Ασβέστιο	Άλατα Ca^{2+}	<μM	Πιθανός δεύτερος σηματοδότης στην μεταγωγή σημάτων
Χαλκός	Άλατα Cu^{+2}	1.5μM	Οξειδοαναγωγικά τμήματα
Σίδηρος	Άλατα Fe^{+2}	1-3 μM	Κυτοχρώματα
Μαγγάνιο	Άλατα Mn^{2+}	2-4 mM	Ενζυμική ενεργότητα
Ψευδάργυρος	Άλατα Zn^{2+}	4-8 μM	Ενζυμική ενεργότητα
Νικέλιο	Άλατα Ni^{2+}	10-90 μM	Ενεργότητα ουρεάσης
Μολυβδαίνιο	Na_2MoO_4	1.5μM	Μεταβολισμός νιτρικών, βιταμίνη B12

.

Πίνακας 8. *Φυσιολογικές αποκρίσεις των ζυμομυκήτων στο στρες (* Walker, 1997*).*

Στρες	***Απόκριση***
Υψηλής Θερμοκρασίας	Βιοσύνθεση πρωτεϊνών Μειωμένη ακορεστότητα μεμβρανικών λιπιδίων Αλλαγή ενδοκυτταρικού pH Βιοσύνθεση πολυαμινών
Χαμηλής Θερμοκρασίας	Συσσώρευση τρεχαλόζης Αυξημένη πολυακορεστότητα μεμβρανικών λιπιδίων
Ωσμωτικό	Συσσώρευση γλυκερόλης, τρεχαλόζης Αυξημένη πρόσληψη K^+/ εκροή Na^+
Ξήρανση	Συσσώρευση τρεχαλόζης
Οξείδωση	Ενζυμική: δισμουτάση υπεροξειδίου, καταλάση, κυτοχρωμική υπεροξειδάση Μη- ενζυμική: γλουταθειόνη, θειοredοξίνη, μεταλλοθειονίνη, πολυαμίνες, καροτενοειδή
Τοξικότητα	Αιθανόλη: σύνθεση πρωτεϊνών, τροποποίηση σύστασης- ρευστότητας μεμβράνης, μιτοχονδριακή δισμουτάση υπεροξειδίου Ξενοβιοτικά: γλουταθειόνη
	Βαρέα μέταλλα: μεταλλοθειονίνες

Πίνακας 9. *Μελέτες που αφορούν την βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης, από μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα και ανθρώπους.*

	Τρόπος χορήγησης	***Δόση***	***Παρατηρήσεις***	***Αναφορές***
ποντίκια	Ενδο-περιτονιακή	0.1 g/kg	2.25 μg/ml στο πλάσμα τα πρώτα 15 min Σε 1h το λεπτό έντερο, η σπλήνα, το συκώτι, το νεφρό έχουν 177, 26, 27, 8 μg/Kg; 0,4 μg/g στο μυαλό	*Pan et al., 1999*
ποντίκια	Ενδο-περιτονιακή	100 mg/Kg	39-240 nmol/g ιστού λεπτού εντέρου	*Perkins et al., 2002*
αρουραίοι	στόμα ενδοφλεβίως	1 g/kg -	75% αποβλήθηκε στα κόπρανα Ανύπαρκτο στα ούρα Μικρή απορρόφηση στο έντερο Όχι τοξικότητα σε δόση 5 g/kg Μεταφέρθηκε στη χολή Το κυρίως μέρος μεταβολίστηκε	*Whalstrom and Blennow, 1978*
αρουραίοι	Στόμα, ενδοφλεβίως και Ενδο-περιτονιακή		Κυρίως αποβάλλεται με τα κόπρανα Εκκρίνεται στη χολή Κυρίαρχος μεταβολίτης στη χολή THC/HHC glucuronides (γλυκουρονίδιο)	*Holder et al., 1978*
αρουραίοι	στόμα	400 mg	60% απορροφάται Καθόλου στα ούρα: συζευγμένα γλυκουρονίδια και θειικά άλατα Καθόλου στο αίμα της καρδιάς	*Ravindranath and Chandashekara, 1980*

			< 5 μg/ml στο τριχοειδές αίμα Σχεδόν ανύπαρκτο στο συκώτι/ νεφρό (<20 μg/ιστό) για 24 h Στις 24h, 38% στο χαμηλό τμήμα του εντέρου	
αρουραίοι	-	2 g/Kg	Χαμηλά επίπεδα στον ορό Η πιπερίνη αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα σε 154%	*Sobha et al., 1998*
αρουραίοι	Στόμα, ενδογαστρκώς	2% της δίαιτας	Επίπεδα στο πλάσμα 12 nM Συκώτι (0.1-0.9 nmol/g), παχύ έντερο(0.2-1.8 μmol/g) Αυξημένη ηπατική GST (16%) Μειωμένη MDH-DNA παχέος εντέρου (36%) Περισσότερη στο πλάσμα, λιγότερη στο παχύ έντερο	*Sharma et al., 2001*
αρουραίοι	ενδοφλεβίως και post oral	40 mg/Kg 500 mg/Kg	Εξαφανίστηκε από το πλάσμα σε 1h Ανιχνεύσιμο στο πλάσμα Μετατροπή σε γλυκουρονίδιο κουρκουμίνης και θειικά	*Ireson et al., 2001*
Άνθρωπος	στόμα	2 g	Μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στον ορό Η πιπερίνη αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα κατά 2000%	*Sobha et al 1998*
Άνθρωπος	στόμα	375 mg x 3/ημέρα	Καλή ανοχή για 12 εβδομάδες Σημαντικό όφελος	*Lal et al., 1999*
Άνθρωπος	στόμα	375 mg x 3/ημέρα	Καλή ανοχή για 6-22 εβδομάδες Σημαντικό όφελος	*Lal et al., 1999*
Άνθρωπος	στόμα	1-12 g/ημέρα	Καλή ανοχή έως 8 g/ημέρα για 3 μήνες Τα επίπεδα στον ορό όταν μέγιστα σε 1-2h και έπεσε σε 12h Επίπεδα στον ορό 0.51±0.11, 0.63± 0.06, 1.77± 1.87 μM	*Cheng et al., 2001*
Άνθρωπος	στόμα	36-180 mg /ημέρα	Περισσότερο στα κόπρανα, καθόλου στο αίμα ή τα ούρα 59% ελάττωση στην λυμφοκυτική GST μετά από 14 ημέρες	*Sharma et al., 2001*

DHC: dihydrocurcumin
THC: tetrahydrocurcumin
HHC: hexahydrocurcumin
GST : glutathione-S--transerase

Πίνακας 10. *Κλινικές μελέτες της κουρκουμίνης (Pari et al., 2008).*

Μελέτη	***Ασθενείς***	***Δόση***	***Παρατηρήσεις***	***Αναφορές***
Double blind crosss-over	18 ασθενείς (22-48 ετών)	1200 mg/ημέρα X 2 εβδομάδες	Αντιρρευματικές ιδιότητες	*Deodar et al., 1980*
	46 άντρες ασθενείς (15-68 ετών)	400 mg X 3/ημέρα X 5 ημέρες	Στην Βουβωνική χώρα μετεγχειρητική φλεγμονή	*Satosakar et al., 1986*
	10 εθελοντές	500 mg/ημέρα X 7 ημέρες	Χοληστερόλη ορού και υπεροξείδια λιπιδίων	*Soni& Kuttan et al., 1992*
	40 ασθενείς	625 mg X 4/ημέρα X 8 εβδομάδες	Αντι-ιικό	*James at al., 1994*
	53 ασθενείς	375 mg X3 /ημέρα X 12 εβδομάδες	Χρόνια φλεγμονή ίριδας	*Lal et al., 1999*
	8 ασθενείς	375 mg X 3/ημέρα X 6-22 μήνες	Ιδιοπαθής φλεγμονή Orbital pseudotumors	*Lal et al., 2000*
Prospective phase I	25 ασθενείς	500-12.000 mg/ημέρα X 3 μήνες	H &N καρκίνοι	*Cheng et al., 2001*
	15 ασθενείς	36-180 mg X 4 μήνες	Colorectal serum GST-down	*Sharma et al., 2001*
	12 ασθενείς	450-3600 mg/ημέρα X 1 εβδομάδα	Ηπατική μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου	*Garcea et al., 2004*
	15 ασθενείς	450-3600 mg/ημέρα X 4 μήνες	Προχωρημένος καρκίνος του παχέος εντέρου	*Sharma et al., 2004*
	12 ασθενείς (47-72 ετών)	3.6, 1.8 ή 0.45 g/ημέρα X 7 ημέρες	καρκίνος του παχέος εντέρου	*Garcea et al., 2005*
	3-6 cohort (>18 ετών)	-	Αποτροπή του καρκίνου του παχέος εντέρου	*Brenner DE et al., 2005*
	24 υγιείς εθελοντές	500-12000 mg μια δόση από το στόμα	Παρεμπόδιση καρκίνου του παχέος εντέρου Μέγιστη ανεκτή δόση δεν βρέθηκε	*Lao et al., 2006*
Phase II κλινική δοκιμή	**17 ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου**	**8000 mg/ημέρα από το στόμα X 2 μήνες**	**Καλή βιολογική δράση στον καρκίνο του παγκρέατος**	*Dhillon et al., 2006*

Πίνακας 11. *Εν εξελίξει κλινικές μελέτες της κουρκουμίνης (Pari et al., 2008).*

Όνομα Δοκιμής	***Ασθένεια***	***Ινστιτούτο***	***Κατάσταση***
Πιλοτική μελέτη	Πολλαπλό μυέλωμα	M.D Anderson Cancer Center, USA	Εκκρεμεί από τον Μάη του 2006
Interventional Φαρμακοκινητική	Βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης σε υγιείς εθελοντές	Massachusetts General Hospital, USA	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Σεπτέμβρη του 2006
Interventional gemcitabine	Καρκίνος στο πάγκρεας	Rambarn Health Care Campus, Israel	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Σεπτέμβρη του 2005
Συνένζυμο Q10 και κουρκουμίνη	Αναιμία, διαταραχές στο αίμα, ασθένειες του νωτιαίου μυελού, καρκίνος	Hadassah Medical Organization, Israel	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Σεπτέμβρη του 2006
Ήπιας- μέτριας μορφής Αλτζχάιμερ	Αλτζχάιμερ	Institute for the Study of Aging (ISOA), USA	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Νοέμβρη του 2006
Φάσης III δοκιμή του gemcitabine, κουρκουμίνης και celebrex	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Tel-Aviv Sourasky Medical Center, Israel	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Φεβρουάριο του 2006
Δοκιμή της κουρκουμίνης σε προχωρημένο καρκίνο στο πάγκρεας	Καρκίνος στο πάγκρεας	M.D Anderson Cancer Center, USA	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Ιούνιο του 2006
Η κουρκουμίνη στην παρεμπόδιση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε καπνιστές	Καρκίνος του παχέος εντέρου, κατάχρηση φαρμάκων	National Cancer Institute (NCI), USA	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Οκτώμβρη του 2006
Πιλοτική μελέτη κουρκουμίνης και ginkgo για την θεραπεία του Αλτζχάιμερ	Αλτζχάιμερ	Chinese University of Hong Kong	Δεν συνέρχεται πλέον ομάδα ασθενών
Sulindac και συστατικά των φυτών στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Rockefeller University, USA	Εκκρεμεί από τον Μάη του 2004
Η κουρκουμίνη για την χημική αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου	Καρκίνος του παχέος εντέρου	University of Pennsylvania, USA	Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Νοέμβρη του 2006
Τα κουρκουμινοειδή για την θεραπεία της χρόνιας ψωρίασης vulgaris	**Ψωρίαση**	**University of Pennsylvania, USA**	**Συνέρχεται ομάδα ασθενών από τον Οκτώμβρη του 2006**