

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 55, No 1 (2004)



Oregano, thyme and sage, as natural additives to foods

N. SOLOMAKOS (N. ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ), A. GOVARIS (A. ΓΚΟΒΑΡΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15156](https://doi.org/10.12681/jhvms.15156)

To cite this article:

SOLOMAKOS (N. ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ) N., & GOVARIS (A. ΓΚΟΒΑΡΗΣ) A. (2017). Oregano, thyme and sage, as natural additives to foods. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 55(1), 75–81.
<https://doi.org/10.12681/jhvms.15156>

Η ρίγανη, το θυμάρι και το φασκόμυλο, ως φυσικά πρόσθετα στα τρόφιμα

N. Σολωμάκος, Α. Γκόβαρης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Τα τελευταία χρόνια τα βότανα άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως φυσικά πρόσθετα στα τρόφιμα έναντι των χημικών προσθέτων, επειδή αυτά έχουν κατηγορηθεί ότι μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο τη ζωή του καταναλωτή. Η ρίγανη (*Origanum vulgare ssp hirtum*), το θυμάρι (*Thymus vulgaris*) και το φασκόμυλο (*Salvia officinalis*) είναι τρία βότανα που απαντούν στην ελληνική φύση και η χρήση τους ως φυσικών προσθέτων στα τρόφιμα ερευνάται τα τελευταία χρόνια σε παγκόσμια κλίμακα. Τα βότανα αυτά είναι πλούσια σε φαινόλες που χαρακτηρίζονται από σημαντικές αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η καρβακρόλη ($C_{10}H_{14}O$) και η θυμόλη ($C_{10}H_{14}O$) είναι οι δύο κυριότερες φαινόλες που ανευρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στη ρίγανη και το θυμάρι. Ανάμεσα στα κύρια ενεργά συστατικά που περιέχονται σε μεγαλύτερες αναλογίες στο φασκόμυλο είναι η θουζόνη ($C_{10}H_{16}O$) και η ροσμάνολη ($C_{20}H_{26}O_5$). Άλλες ενώσεις που περιέχονται σε μικρότερες ποσότητες, όπως το π-κυμένιο ($C_{10}H_{14}$) (στη ρίγανη και το θυμάρι) ή η α-τερπινεόλη ($C_{10}H_{18}O$) (στο φασκόμυλο) συμβάλλουν στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των βοτάνων αυτών. Η ρίγανη, το θυμάρι και το φασκόμυλο παρουσίασαν σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων, όπως *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *E. coli O157:H7*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* ή *Listeria monocytogenes*. Σημαντική είναι και η αντιμυκητιακή δράση των βοτάνων αυτών κατά μυκήτων, όπως *Aspergillus* spp. και *Candida* spp. που μπορούν να αναπτυχθούν στα τρόφιμα και να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή. Οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές τους ιδιότητες διαπιστώθηκαν τόσο σε *in-vitro* πειράματα όσο και σε πειράματα με τρόφιμα. Η χορήγηση του αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του φασκόμυλου με την τροφή σε όρνιθες και ινδόρνιθες, βρέθηκε ότι προστατεύει το λίπος του κρέατός τους από την οξείδωση, στη διάρκεια της συντήρησής του στην ψύξη ή την κατάψυξη.

Λέξεις ευρετηρίασης: Ρίγανη, θυμάρι, φασκόμυλο, αντιμικροβιακή δράση, αντιοξειδωτική δράση

Oregano, thyme and sage, as natural additives to foods

Solomakos N., Govaris A.

ABSTRACT. Herbs have been used as natural additives against chemical additives during the last few years, since the latter have been accused that can endanger consumers life. Oregano (*Origanum vulgare ssp hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris*) and sage (*Salvia officinalis*) are three herbs that are found in Greece and their use as natural additives to foods have been investigated in recent years all over the world. Herbs are rich in phenols, which are principally characterized by a notable antimicrobial and antioxidative activity. The two main phenols of oregano and thyme are carvacrol and thymol, which are in higher amounts than other compounds. The main phenolic compounds of sage are thusone and rosmanol. Other compounds found in lower amounts, like α -cymene (in oregano and thyme) or α -terpineol (in sage) contribute in the antimicrobial and antioxidative activity of these herbs. Oregano, thyme and sage present an important antimicrobial activity against several pathogens of foods, such as *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *E. coli O157:H7*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* or *Listeria monocytogenes*. The present herbs present also an important antifungal activity against fungi that can grow in foods like *Aspergillus* spp. or *Candida* spp., which can endanger consumers life. The antimicrobial and antioxidative activity of these herbs was verified either *in vitro* experiments or in foods. The dietary supplementation of oregano and thyme essential oil to chicken and turkeys resulted in the oxidative stability of their meat during refrigerated and frozen storage.

Key words: Oregano, thyme, sage, antimicrobial activity, antioxidant activity

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βότανα χρησιμοποιούνται για πολλούς αιώνες στα τρόφιμα για τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησής τους και την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς (Hirasa και Takemasa, 1998; Sherman και Billing, 1999). Τα βότανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα σε διάφορες μορφές, όπως αποξηραμένα ή τριμμένα φύλλα και άνθη, εκχυλίσματα με διάφορους διαλύτες, ή αιθέρια έλαια. Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων γίνεται με απόσταξη με υδρατμούς των φύλλων και ανθέων των βοτάνων.

Δύο από τους βασικότερους παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων είναι η οξειδωση των συστατικών τους και η ανάπτυξη μικροοργανισμών (Mielche και Bertelsen, 1994). Για τη μείωση αυτών των διεργασιών της αλλοίωσης προστίθενται στα τρόφιμα διάφορα χημικά πρόσθετα, αλλά η ενοχοποίηση πολλών εξ αυτών ως ουσιών πιθανώς καρκινογόνων προβληματίζει τους επιστήμονες για την περαιτέρω χρήση τους (Imaida και συν., 1983; Chen και συν., 1992). Το γεγονός αυτό ευαισθητοποιεί και τους καταναλωτές που απαιτούν τη χρήση φυσικών πρόσθετων ως εναλλακτικών ουσιών στα χημικά πρόσθετα (Sherman και Billing, 1999). Η χρήση των βοτάνων ως φυσικών πρόσθετων στα τρόφιμα ερευνάται τα τελευταία χρόνια σε μεγάλο βαθμό και σε παγκόσμια κλίμακα (Quattara και συν. 1997; Pol και Smid, 1999; Ultee και συν. 2000).

Στην παρούσα εργασία γίνεται ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τρία βότανα που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στα τρόφιμα στην Ελλάδα, τη ρίγανη, το θυμάρι και το φασκόμηλο.

ΡΙΓΑΝΗ

Ταξινόμηση

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, γένος *Origanum*. Το γένος αυτό περιλαμβάνει 38 είδη, τα περισσότερα των οποίων απαντούν σε όλη τη Μεσόγειο, ενώ 11 είδη από αυτά εντοπίζονται στην Ελλάδα (Greuter και συν., 1986). Στην Ελλάδα, η πιο γνωστή ρίγανη είναι εκείνη που ταξινομείται ως *Origanum vulgare* ssp *hirtum* (Kokkini 1994). Το είδος αυτής της ρίγανης βρίσκεται και σε άλλες περιοχές της Μεσογείου, είναι γνωστό στο εμπόριο ως Ελληνική ρίγανη και ανήκει στα 4 πλέον εμπορεύσιμα είδη ρίγανης που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα ανά τον κόσμο (Russo et al, 1998).

Ενεργά συστατικά.

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει πάνω από 30 χημικές ενώσεις και είναι πλούσιο σε φαινόλες. Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι οι δύο κύριες φαινόλες που αποτελούν περίπου το 78-82% του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και είναι υπεύθυνες για τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Adam και συν., 1998; Yanishlieva και συν., 1999). Η αναλογία καρβακρόλης / θυμόλης δεν είναι σταθερή, αλλά ποικίλλει με την εποχή

του έτους, την ανθοφορία της ρίγανης ή το υψόμετρο όπου φύεται η ρίγανη (Kokkini 1994). Επίσης, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο είναι δύο υδρογονάνθρακες που αποτελούν περίπου το 5% και 7%, αντίστοιχα του αιθέριου ελαίου και συνεισφέρουν στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης (Adam και συν., 1998). Εκτός των φαινόλων και υδρογονανθράκων, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει διάφορες αλκοόλες και εστέρες που περιέχονται και οι δύο σε μικρά ποσοστά, περίπου 1,5% (Daferera και συν. 2000).

Αντιμικροβιακή δράση

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης εμφανίζει βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση (Charai και συν., 1996; Sinvorouli και συν., 1996), που πιστεύεται ότι οφείλεται κατά κύριο λόγο στις φαινόλες που περιέχει (Beuchat, και συν., 1976; Zaika και Kissinger, 1981; Conner και Beuchat, 1984). Οι φαινόλες έχουν τη δυνατότητα να εισχωρούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και να προσβάλλουν τα ένζυμα του μεταβολισμού του μικροβιακού κυττάρου (Juven και συν., 1972). Λόγω της λιποφιλικής της ιδιότητας, η καρβακρόλη απορροφάται από τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των μικροβίων, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία της μεμβράνης και τη δυσκολία απορρόφησης των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων από τα μικρόβια (Judis, 1963; Juven και συν., 1972). Η καρβακρόλη δρα επίσης εναντίον των μικροβίων, προκαλώντας μείωση του ενδοκυτταρικού ATP, του καλίου και της τιμής του pH (Ultee και συν., 1999). Η καρβακρόλη παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση τόσο κατά των σπόρων (Ultee και συν., 1999) όσο και των βλαστικών κυττάρων του *Bacillus cereus* (Rybka-Rodgers, 2001).

Οι Marino και συν. (2001) μελέτησαν την επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, που επιμολύνουν τα τρόφιμα, όπως *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *E. coli O15:H7*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Micrococcus spp.*, *Sarcina flava*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης, όταν προστέθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα σε συγκεντρώσεις 800, 400 και 200 ppm, προκάλεσε αναστολή όλων των παραπάνω μικροοργανισμών σε ποσοστό 100%, αναστολή κυμαινόμενη μεταξύ 70-100% και αναστολή μόνο της *E. Coli O157:H7*, αντίστοιχα.

Οι Ettayebi και συν. (2000) βρήκαν ότι ενεργά συστατικά της ρίγανης (πχ. θυμόλη) σε συνδυασμό με τη νισίνη, που είναι πολυπεπτίδιο, είχαν συνεργό δράση εναντίον Gram αρνητικών βακτηρίων, ενώ παρατήρησαν μείωση του ποσοστού της νισίνης μέχρι και 40%, όταν χρησιμοποιήθηκαν κατά των Gram θετικών βακτηρίων. Η νισίνη είναι μια βακτηριοκίνη που παράγεται από πολλά στελέχη του λακτοβάκιλλου *Lactococcus lactis* και σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ε.Ε. μπορεί να χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα τρόφιμα. Η νισίνη παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον πολλών κυρίως Gram θετικών βακτηρίων.

Οι Ismael και συν. (1990) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης προκάλεσε ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του *Clostridium botulinum* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση του μπορεί να χρησιμεύσει στη μείωση των ποσοτήτων των νιτρικών και νιτρωδών αλάτων, που χρησιμοποιούνται στα κρεατοσκευάσματα. Όπως είναι γνωστό, τα άλατα αυτά έχουν κατηγορηθεί για πιθανή καρκινογένεση στον άνθρωπο, όταν ξεπερνούν ορισμένα ποσοστά.

Οι Skandamis και Nychas (2000) βρήκαν ότι η προσθήκη ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις (0.1 - 0.7%) σε κατεψυγμένα τρόφιμα με χαμηλό pH, αύξησε το ρυθμό θανάτου της *Escherichia coli* O157:H7 και μείωσε το χρόνο επιβίωσής της. Είναι γνωστό ότι η *Escherichia coli* O157:H7 επιβιώνει σε τρόφιμα με χαμηλό pH, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι Juven και συν. (1994) παρατήρησαν ότι σε τρόφιμα με χαμηλό pH, το αιθέριο έλαιο ήταν πιο δραστικό κατά της *Escherichia coli* O157:H7, γεγονός που το απέδωσαν στο ότι σε χαμηλό pH το έλαιο γίνεται περισσότερο υδρόφοβο, με αποτέλεσμα να επιδρά καλύτερα στη λιπιδική φάση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι Skandamis και συν. (2002) βρήκαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ποσοστό 0.8% στην επιφάνεια βοείου κρέατος, που επιμολύνθηκε τεχνητά με *Salmonella typhimurium*, οδήγησε σε σημαντική μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού στη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη για 15 μέρες.

Αντιμυκητιακή δράση

Οι φαινόλες του αιθέριου ελαίου της ρίγανης έχουν επίσης αξιοσημείωτη αντιμυκητιακή δράση (Daw και συν., 1995). Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* και *Penicillium spp.* (Daouk και συν., 1995; Venturini και συν., 2002). Η παραγωγή των μυκοτοξινών και ειδικότερα των αφλατοξινών στα τρόφιμα περιορίστηκε σε μεγάλο βαθμό με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (Bullerman και συν., 1977; Chatterjee, 1990; Daw και συν., 1995; El-Baroty, 1997). Αυτό αποδόθηκε στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με ενεργά ένζυμα των μυκήτων (*Aspergillus spp*) που οδηγούν σε απενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών (Juglal και συν., 2002). Αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2 μl/ml ανέστειλε πλήρως την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* και περιορίσε την παραγωγή αφλατοξινών *in vitro* (El-Baroty, 1997).

Αντιοξειδωτική δράση

Η ρίγανη είναι μία φυσική αντιοξειδωτική ουσία (Kokkini 1994; Exarchou και συν. 2002). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης οφείλονται σε μεγάλο ποσοστό στις φαινόλες της και κυρίως, όπως προαναφέρθηκε, στην καρβακρόλη και τη θυμόλη (Adam και συν. 1998). Άλλες χημικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, όπως το ροσμαρινικό οξύ, συντελούν στην αντιοξειδωτική αυτή συμπεριφορά (Exarchou και συν. 2002).

Η ρίγανη βρέθηκε ότι εμποδίζει την οξειδωση του λί-

πους σε διάφορα τρόφιμα (Abdalla και Roozen, 2001) και ζωικά λίπη (Economou και συν. 1991; Vekiaru και συν. 1993; Lagouri και συν. 1993; Milos και συν. 2000). Η χορήγηση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης με την τροφή σε πτηνά βρέθηκε ότι προστατεύει από την οξειδωση το λίπος του κρέατος των ορνιθίων (Botsoglou και συν. a,b, 2002; 2003) ή ινδοορνιθίων (Botsoglou και συν. a,b 2003, Papageorgiou και συν. 2003; Govaris και συν. 2004), στη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος αυτού στην ψύξη ή την κατάψυξη. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών με την τροφή στα ζώα αποδείχτηκε ότι είναι μια πολύ καλή τεχνική για την απορρόφηση και καθήλωση των ουσιών αυτών στις μεμβράνες των κυττάρων των ιστών, όπου δρουν εμποδίζοντας την οξειδωση στα σημεία όπου αυτή κυρίως εμφανίζεται (Botsoglou και συν. a,b, 2002).

ΘΥΜΑΡΙ

Ταξινόμηση

Το θυμάρι (γένος *Thymus*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* και περιλαμβάνει 350 είδη, 66 από τα οποία φύονται στην Ευρώπη (Juliano και συν. 2000). Το είδος του θυμαριού, που απαντάται συχνά στην Ελλάδα και στις χώρες της Μεσογείου, είναι το *Thymus vulgaris* L. Το είδος αυτό έχει ερευνηθεί περισσότερο από τα άλλα σε παγκόσμια κλίμακα (Economou και συν. 1991).

Ενεργά συστατικά

Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού είναι πλούσιο σε φαινόλες (θυμόλη και καρβακρόλη), που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητές του. Συνήθως σε μικρότερα ποσοστά βρίσκονται και άλλες ενώσεις, όπως οι υδρογονάνθρακες π-κμμένο και γ-τερπινένιο (C₁₀H₁₆) και άλλα συστατικά, όπως το β-καροφυλένιο (C₁₅H₂₄) ή β-βισαπολένιο (C₁₅H₂₄) (Senatore 1996; Daferera και συν. 2000). Ο Senatore (1996) παρατήρησε ότι υπήρχε εποχιακή διακύμανση των ενώσεων, που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο διαφόρων ειδών θυμαριού. Οι Hudaib και συν. (2002) βρήκαν ότι στο αιθέριο έλαιο θυμαριού το ποσοστό θυμόλης, καρβακρόλης, π-κμμένου και γ-τερπινένιου ήταν 42,75% , 3% , 16% και 18% αντίστοιχα. Σ' όλα τα είδη θυμαριού το ποσοστό της θυμόλης είναι εκείνο που υπερτερεί σε σχέση με τα ποσοστά των άλλων φαινολών (Juliano και συν. 2000; Karaman και συν. 2001).

Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Το θυμάρι εμφανίζει σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι μεγάλου αριθμού παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων (Friedman και συν. 2002). Οι Karaman και συν. (2001) βρήκαν ότι η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου του θυμαριού κατά των *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes* ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών αμπικιλίνη (10 μg) και πενικιλίνη G (10 IU). Οι Sağdıç και συν. (2002) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο από το θυμάρι είχε βακτηριοκτό-

νο δράση κατά της *Escherichia coli* O157:H7 σε συγκεντρώση 0,5% στο θρεπτικό υπόστρωμα. Σε άλλη μελέτη από τους Juliano και συν. (2000) βρέθηκε ότι η ελάχιστη συγκέντρωση ανάσχεσης (MIC) του αιθέριου ελαίου του θυμαριού, μετά από προσθήκη του στα θρεπτικά υποστρώματα, ήταν 0,25 mg/mL για *Bacillus spp.* και 0,062 mg/mL για *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus epidermitis*. Οι Friedman και συν. (2002) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο του θυμαριού παρουσίαζε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση *in-vitro* κατά των *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella enterica*.

Αντιμυκητιακή δράση

Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού, προστιθέμενο στα θρεπτικά υποστρώματα, βρέθηκε ότι ήταν δραστικό σε συγκέντρωση 250 ppm κατά του *Aspergillus flavus* και σε 500 ppm κατά των *A. parasiticus* και *A. ochraceus* (Soliman και Badeau 2002) και για το λόγο αυτό η χρήση του στα τρόφιμα θεωρήθηκε ότι ήταν δυνατόν να αναστείλει την παραγωγή των αφλατοξινών που παράγονται από τους μύκητες αυτούς. Η ελάχιστη συγκέντρωση ανάσχεσης (MIC) του αιθέριου ελαίου του θυμαριού κατά των μυκήτων *A. niger* και *Candida albicans* (Juliano και συν. 2000) βρέθηκε ότι ήταν 0,5 mg/mL και 0,25 mg/mL, αντίστοιχα.

Αντιοξειδωτική δράση

Το θυμάρι είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Economou και συν. 1991). Οι Lee και Shibamoto (2002) παρατήρησαν ότι η αντιοξειδωτική δράση του θυμαριού στα λίπη των τροφίμων ήταν εξίσου ισχυρή με γνωστά αντιοξειδωτικά, όπως η α-τοκοφερόλη και το βουτυλοϋδροξυτολουόλιο (BHT). Η καρβακρόλη και ιδιαίτερα η θυμόλη είναι τα φαινολικά συστατικά, που είναι κυρίως υπεύθυνα για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του θυμαριού (Farag 1989; Deighton και συν. 1993).

Η χορήγηση αιθέριου ελαίου θυμαριού με την τροφή σε όρνιθες αυγοπαραγωγής είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας του λίπους της λεκίθου των παραγόμενων αυγών στη διάρκεια της συντήρησής τους στην ψύξη (Botsoglou και συν. 1997).

ΦΑΣΚΟΜΗΛΟ

Ταξινόμηση

Το φασκόμηλο ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*. Πιο διαδεδομένο είναι το είδος *Salvia officinalis* που χαρακτηρίζεται και ως δαλματικό. Στην Ελλάδα υπάρχουν αρκετά είδη φασκόμηλου, όπως το *Salvia fruticosa*, που χαρακτηρίζεται ως ελληνικό φασκόμηλο και το *Salvia officinalis*, που απαντά σε πολλές περιοχές της χώρας μας, το *Salvia pomifera*, που απαντά στην Κρήτη και το είδος *Salvia sclarea*, που απαντά κυρίως στην κεντρική και νοτιοδυτική Ελλάδα (Hedge, 1982; Greuter, 1986; Vokou, και συν., 1993). Το όνομα *Salvia* προέρχεται από το Λατινικό *salvare*, που σημαίνει θεραπεύω.

Ενεργά συστατικά

Το αιθέριο έλαιο είναι πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Τα κύρια ενεργά συστατικά του φασκόμηλου είναι η θουζόνη, η 1,8 κινεόλη ($C_{10}H_{18}O$), η α-τερπινεόλη, α ή β-πινένιο ($C_{10}H_{16}$), β-καρνοφυλλένιο, η ροσμανόλη, το ροσμαρινικό οξύ ($C_{18}H_{16}O_8$), το καρνοσικό οξύ ($C_{20}H_{28}O_4$), η καρνοσόλη ($C_{20}H_{26}O_4$) και η λιναλοόλη (Cuvelier, και συν., 1994; Sivropoulou και συν. 1996; Robards, και συν., 1999; Daferera και συν. 2000; Exarchou και συν., 2002; Miura και συν., 2002). Η θουζόνη είναι η ένωση που βρίσκεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στο αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) κυμαινόμενη από περίπου 40% (Marino και συν. 2001) μέχρι 80% (Daferera και συν. 2000). Οι Marino και συν. (2001) παρατήρησαν εποχιακή και ανάλογη με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού διακύμανση της σύστασης του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου (*Salvia officinalis*). Το φασκόμηλο δεν περιέχει καρβακρόλη ή θυμόλη.

Αντιμικροβιακή δράση

Η περιεκτικότητα του φασκόμηλου σε φαινολικά συστατικά, όπως τα φλαβονοειδή, έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζει σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά πολλών παθογόνων μικροοργανισμών (Robards και συν. 1999).

Οι Hammer και συν., 1999 παρατήρησαν ότι σε συγκέντρωση $\leq 2.0\%$ (v/v) σε θρεπτικά υποστρώματα, το αιθέριο έλαιο φασκόμηλου του είδους *Salvia officinalis* προκάλεσε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sobria*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* και *Salmonella typhimurium*. Απέτυχε όμως να αναστείλει το είδος *Pseudomonas aeruginosa*, ενώ το αιθέριο έλαιο φασκόμηλου του είδους *Salvia sclarea* δεν παρουσίασε καμία αντιμικροβιακή δράση κατά των παραπάνω μικροοργανισμών. Όμοιες παρατηρήσεις για την ισχυρή *in vitro* αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου φασκόμηλου *Salvia officinalis* κατά των παθογόνων μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus epidermitis* αναφέρθηκαν από τους Foray και συν. (1999). Οι Sagdic και συν. (2002) παρατήρησαν αναστολή της ανάπτυξης της *Escherichia coli* O157:H7 κατά 3 περίπου λογάριθμους σε σχέση με το μάρτυρα σε συγκέντρωση φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*) 2% στο θρεπτικό υπόστρωμα και επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Οι Mejloim και Dalgaard (2002) παρατήρησαν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του *Photobacterium phosphoreum* ως και 36% στην διάρκεια συντήρησης 26 ημερών στους 2°C σε φιλέτα βακαλάου που ψεκάστηκαν με αιθέριο έλαιο φασκόμηλου (*Salvia officinalis*). Το *Photobacterium phosphoreum* είναι ένας μικροοργανισμός υπεύθυνος για την αλλοίωση των φιλέτων βακαλάου στη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP).

Δράση εναντίον μυκήτων και ζυμών

Το φασκόμηλο εμφανίζει σημαντική δράση κατά των

μυκήτων και των ζυμών. Οι Hammer και συν. (1999) διαπίστωσαν ότι αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου σε συγκέντρωση 2% (v/v) ανέστειλε την ανάπτυξη του μύκητα *Candida albicans*. Ακόμη, σημαντική δράση κατά των μυκήτων *Fusarium oxysporum* και *Sclerotinia sclerotiorum* εμφάνισε το αιθέριο έλαιο φασκόμηλου σύμφωνα με μελέτες των Pitarokili και συν. (2002). Οι Basilico και Basilico (1999) ανέφεραν ότι αιθέριο έλαιο από φασκόμηλο *Salvia officinalis* σε συγκέντρωση 1000 ppm εμφάνισε μικρή σχετικά ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus ochraceus*, καθώς και στην παραγωγή ωχρατοξίνης.

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* αποτελεί μια από τις κυριότερες ζύμες στο νωπό κρέας πουλερικών που συντελεί στην αλλοίωσή του στη συντήρηση σε ψύξη. Αιθέριο έλαιο φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) προκάλεσε σημαντική ανασταλτική δράση κατά στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, που είχαν ενοφθαλμιστεί σε κρέας κοτόπουλου κατά τη συντήρησή του για 9 ημέρες σε θερμοκρασία 5° C.

Αντιοξειδωτική δράση

Σημαντική αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν τα συστατικά του φασκόμηλου καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ και καρνοσοϊκό οξύ (Robards και συν., 1999; Wang και συν., 1999; Exarchou και συν., 2002; Miura και συν., 2002). Η ροσμανόλη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό με δράση εφάμιλλη της α-τοκοφερόλης και του συνθετικού αντιοξειδωτικού BHT (Robards και συν. 1999).

Οι Mc Carthy και συν. (2001) βρήκαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου φασκόμηλου (0,05%) σε κιμά κρέατος χοίρου είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη προστασία του λίπους από την οξείδωση και την καλύτερη διατήρηση του ερυθρού χρώματος του κρέατος σε σχέση με τους μάρτυρες τόσο στη συντήρηση όσο και στην κατάψυξη. Η χορήγηση του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου με την τροφή βρέθηκε ότι προστάτευε από την οξείδωση το λίπος του κρέατος ορνιθίων, στη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος αυτού στην ψύξη (Lopez –Bote και συν. 1998).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Abdalla A.E., Roozen J.P. (2001) The effects of stabilised extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. *Eur. Food Res. Technol.*, 212:551-560.
- Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., (1998) Antifungal activities of Oreganum vulgare subsp. hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agr. Food Chem.*, 46:1739-1745.
- Basilico M.Z., Basilico J.C. (1999) Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29:238-241.
- Bouchat L.R., (1976) Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food Sci.*, 41:899-902.
- Botsoglou N.A., Christaki E., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Spais A.B. (2002) The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Sci.*, 62:259-265.
- Botsoglou N.A., Yannakopoulos A.L., Fletouris D.J., Tservenigoussi A.S., Fortomaris P.D. (1997) Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *J. Agr. Food Chem.*, 45:3711-3716.
- Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Christaki G., Spais A.B. (2002) Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α-tocopherol acetate supplementation. *Food Res. Int.*, Article in Botsoglou N.A., Govaris A., Botsoglou E., Grigoropoulou S.H., Papageorgiou G. (2003) Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α-tocopherol acetate supplementation in long-term frozen turkey meat. *J. Agr. Food Chem.*, 51: 2930-2936.
- Botsoglou N.A., Grigoropoulou S.H., Botsoglou E.N., Govaris A., Papageorgiou G. (2003) The effects of dietary oregano essential oil and α-tocopherol acetate in lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Sci.*, 65:1193-1200.
- Bullerman L.B., Lieu F.Y., Seiler S.A. (1977) Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.*, 42:1107-1109.
- Charai M., Mosaddak M., Faid M. (1996) Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Oreganum majorana* L., and *Oreganum compactum*. *Benth, J. Essent. Oil Res.*, 8:657-664.
- Chatterjee D. (1990) Inhibition of fungal growth and infection in maize grains by spice oils. *Lett. Appl. Microbiol.*, 11:148-151.
- Chen C.H., Pearson A.M., Gray J.I. (1992) Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT, PG) on the mutagenic of IQ-like compounds. *Food Chem.*, 45:177-183.
- Conner D.E., Beuchat L.R. (1984) Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, 49:429-434.
- Cuvelier M.G., Berset C., Richard H. (1994) Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J. Agr. Food Chem.*, 42:665-669.
- Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G. (2000) GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungotoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agr. Food Chem.*, 48:2576-2581.
- Daouk R.K., Dagher S.M., Sattout E.J. (1995) Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L., *J. Food Prot.*, 58:1147-1149.
- Daw Z.Y., El-Baroty G.E., Mahmoud A.M. (1995) Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production by some essential oils. *J. Afr. Crop. Sci.*, 3:511-517.
- Deighton N., Glidewell S.M., Deans S.G., Goodman B.A. (1993) Identification by EPR spectroscopy of carvacrol and thymol as the major sources of free-radicals in the oxidation of plant essential oils. *J. Sci. Food Agr.*, 63:221-225.
- Economou K.D., Oreopoulou V., Thomopoulos C.D. (1991) Antioxidant properties of some plant extracts of the Labiateae family. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68:109-113.
- El-Baroty G.E. (1997) Antimicrobial and antioxidant activities of some essential spice oils. *J. Agric. Sci., Mansoura Univ.*, 22:1223-1233.
- Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B.D. (2000) Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 183:191-195.
- Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A., Boskou D. (2002) Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and Summer savory. *J. Agr. Food Chem.*, 50:5294-5299.
- Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M., El-Baroty G.S.A. (1989) Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J.*

- Food Prot., 52:665-667.
- Foray L., Bertrand C., Pinguet D., Soulier M., Astre C. (1999) In vitro cytotoxic activity of three essential oils from *Salvia* species. *J. Ess. Oil Res.*, 11:522-526.
- Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. (2002) Bactericidal activities of plant essential oils and some of their constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, 65:1545-1560.
- Govaris και συν. (2004) *Int. J. Food Sci. Nutr.*, In Press.
- Greuter W., Burdel H.M., Long G. (1986) Medical Checklist. In Editions de Conservatoire de Jardin Botaniques de la Ville de Geneve. Vol. 3.
- Hammer K.A., Carson E.F., Riley T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microb.*, 86:985-990.
- Hedge I.C. (1982) *Salvia L.* In: Davis P.H. (Ed) Flora of Turkey and the East Aegean islands vol. 7, pp. 400-461. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Hirasa K., Takemasa M. (1998) Spice science and technology, New York: Marcel Dekker.
- Hudaib M., Speroni E., Di Pietra A.M., Cavrini V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris L.*) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 29:691-700.
- Imaida K., Fukushima S., Shirai T., Ohtami M., Nakamishi K., Ito N. (1983) Promoting activities by butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of gamma-glutamyl trans-peptide-positive for development in the liver of rat. *Carcinogen*, 4:895-899.
- Ismael A., Pierson M.D. (1990) Inhibition of growth and germination of *Clostridium botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oils of spices. *J. Food Sci.*, 53:755-758.
- Ismail S.A.S., Deak T., Abd El-Rahman H.A., Yassie M.A.M., Beuchat L.R. (2001) Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. *Int. J. Food Microbiol.*, 64:13-19.
- Judis J. (1963) Studies on the mechanisms of action of phenolic disinfectants II, Patterns of release of radioactivity from *Escherichia coli* labeled by growth on various compounds. *J. Pharm. Sci.*, 52:261-264.
- Juglal S., Govinden R., Odhav B. (2002) Spice oils for the control of co-occurring Mycotoxin-Producing Fungi. *J. Food Prot.*, 65:683-687.
- Juliano C., Mattana A., Usai M. (2000) Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *J. Essent. Oil Res.*, 4:516-522.
- Juven B., Henis J., Jacoby B. (1972) Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *J. Appl. Bacteriol.*, 35:559-567.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994) Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, 76:626-631.
- Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ilcim A. (2001) Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharm.*, 76:183-186.
- Kokkini S. 1994. Herbs of the Labiatae. In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*; Macrae, R., Robinson, R., Sadler, M., Fuellerlove, G., Eds., Academic Press, London, pp. 2342-2348.
- Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M. Kokkini S. & Boskou D. (1993) Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 197:20-23.
- Lee K.G., Shibamoto T. (2002) Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agr. Food Chem.*, 50:4947-4952.
- Lopez -Bote, C. J., Gray, J.I., Gomaa, E.A., & Flegal, C.J. (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British Poultry Science*, 39, 235-240.
- Marino M., Bersani C., Comi G. (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.*, 67:187-195.
- McCarthy T.L., Kerry J.P., Kerry J.F., Lynch P.B., Buckley D.J. (2001) Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Sci.*, 57:177-184.
- Mejlholm O. and Dalgaard P. (2002) Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett. Appl. Microb.*, 34:27-31.
- Mielche M.M., Bertelsen G. (1994) Approaches to the prevention of warmed over-flavour, *Trends in Food Sci. Tech.*, 5:322-327.
- Milos M., Mastelic J., Jerkovic I. (2000) Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp. Hirtum*). *Food Cont.*, 71:79-83.
- Miura K., Kikuzaki H., Nakatan N. (2002) Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis L.*) and Thyme (*Thymus vulgaris L.*) Measured by the Oil Stability Index Method. *J. Agr. Food Chem.*, 50:1845-1851.
- Papageorgiou G., Botsoglou N.A., Govaris A., Giannenas I., Iliadis S., Botsoglou E.N. (2003) Effect of dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim Phys. Anim. Nutr.*, 87:324-335.
- Pitarokili D., Couladis M., Petsikas-Panayotarou N., Tzakou O. (2002) Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agr. Food Chem.*, 50:6688-6691.
- Pol I.E., Smid E.J. (1999) Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29:166-170.
- Quattara B., Simard R.E., Hollev R.A., Piette G.J.P., Begin A. (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 37:155-162.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66:401-436.
- Russo M., Galletti G.C., Bocchini P., Carnacini A. (1998) Essential oil composition of wild populations of Italy oregano spice (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis 1. *Inflorescens. J. Agr. Food Chem.*, 46:3741-3746.
- Rybka-Rodgers S. (2001) Improvement of food safety design of cook-chill foods. *Food Res. Int.*, 34:449-455.
- Sağdıç O., Kuşçu A., Özcan M., Özçelice S. (2002) Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 19:473-480.
- Senatore F. (1996) Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides L.*) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agr. Food Chem.*, 44:1327-1332.
- Sherman P.W., Billing J. (1999) Darwinian gastronomy, why we use spices. *BioSci.*, 49:453-463.
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996) Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agr. Food Chem.*, 44:1202-1205.
- Skandamis P.N., Nychas G.J.E. (2000) Development and evaluation of a Model Predicting the Survival of *Escherichia coli* O157:H7, NCTC 12900 in Homemade Eggplant salad at various Temperatures.

- ratues, pHs, and Oregano essential oil concentrations. *Appl. Env. Microbiol.*, 66:1646-1653.
- Skandamis P.N., Tsigarida E., Nychas G.J.E. (2002) The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C, under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiol.*, 19:97-103.
- Soliman K.M. Badeaa R.I. (2002) Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.*, 40:1669-1675.
- Ultee A., Kets E.P.W., Smid E.J. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Env. Microbiol.*, 65:4606-4610.
- Ultee A., Slump R.A., Steging G., Smid E.J. (2000) Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.*, 63:620-624.
- Vekiari, S.A., Oreopoulou, V., Tzia, C. & Thomopoulos, C.D. (1993) Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70:483-487.
- Venturini M.E., Blanco D., Oria R. (2002) In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.*, 65:834-839.
- Vokou D., Katradi K., Kokkini S. (1993) Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece) a renowned centre of folk medicine in the past. *J. Ethnopharm.*, 39:187-196.
- Wang M., Shao Y., Li J., Zhu N., Rangarajan M., Lavoie E.J., Ho C.T. (1999) Antioxidant phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). *J. Nat. Prod.*, 62:454-456.
- Yanishlieva N.Y., Marinova E.M., Gordon M.H., Ravena V.G. (1999) Antioxidant activity and mechanism of naction of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.*, 64:59-66.
- Zaika L., Kissinger J.C. (1981) Inhibitory and stimulating effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *J. Food Sci.*, 46:1205-1210.