Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

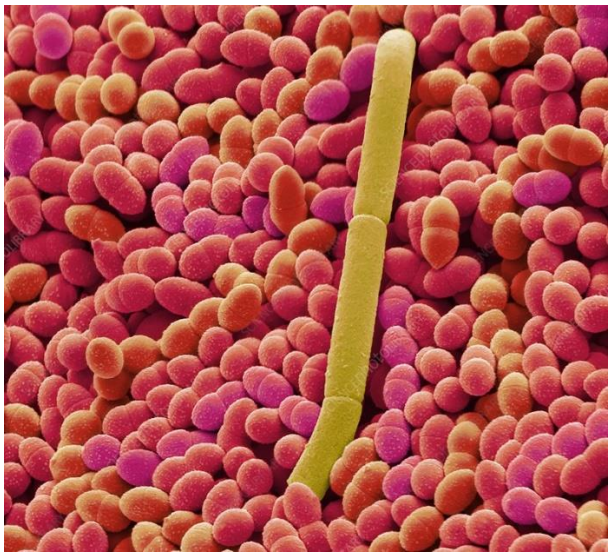
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας ΙΙ: Ανάλυσης, Σχεδιασμού & Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων

Εργαστήριο Σχεδιασμού & Ανάλυσης Διεργασιών

Διπλωματική Εργασία

ΜΙΚΡΟ- ΚΑΙ ΝΑΝΟ-ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΕΣ ΜΗΤΡΕΣ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΣΤΑΤΙΚΟΥ ΨΕΚΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΞΗΡΑΝΣΗΣ ΥΠΟ ΚΑΤΑΨΥΞΗ



ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ ΜΟΥΝΤΑΝΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Υπεύθυνη καθηγήτρια

ΚΡΟΚΙΔΑ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας ΙΙ: Ανάλυσης, Σχεδιασμού & Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων

Εργαστήριο Σχεδιασμού & Ανάλυσης Διεργασιών

Διπλωματική Εργασία

ΜΙΚΡΟ- ΚΑΙ ΝΑΝΟ-ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΕΣ ΜΗΤΡΕΣ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΣΤΑΤΙΚΟΥ ΨΕΚΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΞΗΡΑΝΣΗΣ ΥΠΟ ΚΑΤΑΨΥΞΗ

ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ ΜΟΥΝΤΑΝΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Υπεύθυνη καθηγήτρια

ΚΡΟΚΙΔΑ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

στη γιαγιά μου, Ελευθερία

και στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών και στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018-2019. Αποτελεί μέρος συνεργασίας μεταξύ ακαδημαϊκών ιδρυμάτων και εταιρειών από την Κίνα και την Ελλάδα, στα πλαίσια του προγράμματος «ProbiYo», που στοχεύει στην προώθηση σχέσεων συνεργασίας μεταξύ των δύο χωρών και στην ανάπτυξη καινοτόμων, λειτουργικών γαλακτοκομικών προϊόντων. Βασικός συνεργάτης που συνέβαλε στην εργασία αποτελεί η βιομηχανία τροφίμων «Γιώτης Α.Ε.».

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων (*Streptococcus thermophilus*) σε μίκρο- και νάνο- σωματίδια πολυμερών με πρεβιοτική δράση για εφαρμογή σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι παράμετροι λειτουργίας της διεργασίας του Ηλεκτροστατικού Ψεκασμού βελτιστοποιήθηκαν σε εργαστηριακή κλίμακα. Ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε μέσω των μεθόδων του Ηλεκτροστατικού Ψεκασμού και της Ξήρανσης υπό Κατάψυξη, ενώ τα εγκλεισμένα βακτήρια ελέγχθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα με την οποία ενθυλακώθηκαν στις πολυμερικές μήτρες και ως προς τη βιωσιμότητα τους σε διάλυμα προσομοίωσης των οξέων του στομάχου. Οι παραγόμενες δομές προσδιορίστηκαν μέσω των μεθόδων της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης και της Φασματομετρίας Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier.

Για την ανάληψη και την αποπεράτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Καθηγήτρια Μ. Κροκίδα για την αποφασιστικότητά της, την καθοδήγησή της, τη διαρκή εμπιστοσύνη που μού έδειξε από τη στιγμή που ανέλαβα το συγκεκριμένο θέμα, αλλά και για την ευκαιρία που μού πρόσφερε να ασχοληθώ με ένα θέμα που συνδυάζει δύο αγαπημένους μου επιστημονικούς κλάδους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον καθηγητή και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Αναπληρωτή Καθηγητή Ε. Τόπακα, διότι συνέβαλε ουσιωδώς στην ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας με την επιστημονική του αρτιότητα.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Υποψήφια Διδάκτορα κα Χριστίνα Δρόσου (Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών) για το χρόνο που αφιέρωσε για την καθοδήγησή και για την πολύτιμη βοήθεια που μού πρόσφερε, οποτεδήποτε τη χρειάστηκα.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη Μεταδιδακτορικό Ερευνήτρια κα Ανθή Καρναούρη (Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας) για τις καίριες συμβουλές και την καθοδήγησή της. Επιπλέον, ειδική αναφορά αξίζει σε καθένα εκ των μελών των δύο Εργαστηρίων, επειδή για έξι μήνες παρέμειναν προσηνείς και έκαναν εμένα και τους συμφοιτητές μου να αισθανθούμε μέλη της ομάδας τους.

Στο τέλος των σπουδών μου, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια που μού εμφύσησε τη δίψα για μόρφωση από μικρό παιδί και μού συμπαραστέκεται ανελλιπώς μέχρι και σήμερα και ειδικά την αδερφή μου, η οποία -κατανοώντας τις δυσκολίες της φοίτησης στη σχολή Χημικών Μηχανικών- δε σταμάτησε να με παρακινεί και να με στηρίζει. Ένα τελευταίο, αλλά όχι λιγότερο ένθερμο, ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου που ήταν εκεί σε όλη τη διάρκεια των ακαδημαϊκών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν και εφαρμόστηκαν οι τεχνικές του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης υπό κατάψυξη για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων *Streptococcus thermophilus* σε πρεβιοτικές μήτρες, με σκοπό τη βελτίωση της βιωσιμότητας και της βιοδιαθεσιμότητας τους.

Ως προβιοτικά ορίζονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί, που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσφέρουν ορισμένο όφελος για την υγεία του ξενιστή. Πλέον, τα τρόφιμα εκτός από την παροχή των θρεπτικών συστατικών, αποτελούν μέσο επίτευξης της ευεξίας, διότι οι καταναλωτές είναι πιο ευαισθητοποιημένοι σε θέματα υγιεινής και ωφέλιμης διατροφής. Η εισαγωγή των προβιοτικών βακτηρίων σε γαλακτοκομικά προϊόντα εξυπηρετεί το σκοπό της ευεργετικής διατροφής, καθώς εμφανίζουν ποικίλα οφέλη στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού, αποκαθιστώντας το φυσιολογικό εντερικό μικροβιακό πληθυσμό.

Πολλά στελέχη προβιοτικών, όπως εκείνα του γένους *Streptococcus thermophilus.* αδυνατούν να επιβιώσουν στις συνθήκες που επικρατούν στο πεπτικό σύστημα. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητος ο εγκλεισμός των προβιοτικών, σε μήτρες που θα τα προστατεύσουν από τις δυσμενείς συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό ενός ξενιστή. Ο εγκλεισμός των προβιοτικών πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους, με ιδανικές τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό/ξήρανση και την ξήρανση υπό κατάψυξη, καθώς οι συγκεκριμένες μέθοδοι περιλαμβάνουν ήπιες συνθήκες, οι οποίες δε μειώνουν τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών.

Στις ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες (ηλεκτροστατική ινοποίηση και ψεκασμός), με την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης, παράγεται ένας ηλεκτρικά φορτισμένος πίδακας (jet) από πολυμέρες διάλυμα, σχηματίζεται ο κώνος Taylor στον πίδακα, με αποτέλεσμα την ξήρανση του διαλύτη και την παραγωγή των ινών ή των σωματιδίων αντίστοιχα. Στην ξήρανση υπό κατάψυξη, το υδατικό διάλυμα του πολυμερούς αφυδατώνεται μέσω της κατάψυξης του περιεχόμενου νερού και της ακόλουθης εξάχνωσης των σχηματιζόμενων παγοκρυστάλλων.

Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετήθηκαν οι διάφορες παράμετροι της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying) και πιο συγκεκριμένα, η ροή του διαλύματος, η εφαρμοζόμενη τάση και η απόσταση μεταξύ του ακροφυσίου και της επιφάνειας συλλογής με σκοπό την ανάπτυξη σταθερών δομών με υψηλή απόδοση εγκλεισμού. Τα διαλύματα που μελετήθηκαν ήταν το μίγμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (ηλεκτροστατικός ψεκασμός) και ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης (ομοαξονικός ηλεκτροστατικός ψεκασμός). Οι βέλτιστες συνθήκες του ηλεκτροστατικού ψεκασμού ήταν οι παρακάτω:

- για το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40% w/w η ροή διαλύματος 500, 600, 700 $\frac{\mu L}{h}$και η απόσταση του ακροφυσίου από το συλλέκτη 6, 7, 8 cm, εκ των οποίων οι συνθήκες στις οποίες παρήχθησαν οι ποσότητες των διαφόρων δειγμάτων ήταν η ροή διαλύματος 600 $\frac{\mu L}{h}$, η απόσταση 7 cm και η εφαρμοζόμενη τάση 27.2-29.2 kV

- για τα διαλύματα ζεΐνης συγκέντρωσης 5% w/w σε αιθανόλη-νερό (αναλογίας 80:20 v/v) και ολιγοφρουκτόζης συγκέντρωσης 3% w/w σε νερό η ροή διαλύματος 600, 700, 800 $\frac{\mu L}{h}$ και η απόσταση του ακροφυσίου από το συλλέκτη 4, 5, 6 cm, εκ των οποίων οι συνθήκες στις οποίες παρήχθησαν οι ποσότητες των διαφόρων δειγμάτων ήταν η ροή διαλύματος ζεΐνης 700 $\frac{\mu L}{h}$, η ροή διαλύματος ολιγοφρουκτόζης 100 μL/h, η απόσταση 5 cm και η εφαρμοζόμενη τάση 25.2-28.2 kV.

Επιπλέον, καλλιεργήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Streptococcus thermophilus* σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό στους 37^{o}C και σε pH=6.5 και ξηράνθηκε υπό κατάψυξη, με σκοπό να εγκλειστεί σε μήτρες πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης μέσω του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης υπό κατάψυξη.

Η παραγωγικότητα της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης μετρήθηκε ίση με 0.1503 $\frac{g}{h}$, ενώ για το διάλυμα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης προσδιορίστηκε ίση με 0.024$\frac{g}{h}$. . Η απόδοση εγκλεισμού για την ξήρανση υπό κατάψυξη προσδιορίστηκε ίση με 38.7%, ενώ για τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό υπολογίστηκε ίση με 86.5%.

Η βιωσιμότητα των ελεύθερων βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε διάλυμα προσομοίωσης των οξέων στομάχου βελτιώθηκε σημαντικά μέσω της ενθυλάκωσής τους σε μήτρα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης με ηλεκτροστατικό ψεκασμό και με ξήρανση υπό κατάψυξη. Μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού, ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός φαίνεται ότι προστατεύει εντονότερα τα βακτήρια και διατηρεί υψηλότερη βιωσιμότητα. Ιδανική μήτρα για τον εγκλεισμό των προβιοτικών αποτελεί η ζεΐνη-ολιγοφρουκτόζη, καθώς, χάρη στον υδρόφοβο χαρακτήρα της, η ζεΐνη δε διαλύεται στα οξέα του στομάχου και προστατεύει πλήρως τα ενθυλακωμένα σε αυτή βακτήρια.

Η μέθοδος της Φασματομετρίας υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier απέδειξε τον εγκλεισμό των προβιοτικών στις μήτρες πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης τόσο με τη μέθοδο του ηλεκτροστατικού ψεκασμού όσο και με τη μέθοδο της ξήρανσης υπό κατάψυξη. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν μετατοπίσεις των κορυφών μεταξύ των φασματογραφημάτων των σωματιδίων πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και των εγκλεισμένων βακτηρίων σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη σε άλλους κυματαριθμούς, το οποίο σημαίνει πως δεν παρουσιάζεται αλληλεπίδραση μεταξύ των προβιοτικών βακτηρίων και της πολυμερικής μήτρας.

Μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, προσδιορίστηκε η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) της σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης ίση με 133.423±0.261^{o}C.

ABSTRACT

During the present diploma thesis, the processes of electrospraying and freeze drying were researched and applied for the encapsulation of probiotic bacteria *Streptococcus thermophilus* in prebiotic matrices, in order to improve their viability and bioavailability.

Probiotics are defined as living microbes, that -when administered in adequate amounts- confer a health benefit on the host. Nowadays, beyond providing the necessary nutrients, food constitute a mean of wellness, because of the consumers' sensitization in healthy and beneficial diet. The inclusion of probiotics in dairy products serves the purpose of beneficial nutrition, because they induce the amelioration of human's health, by restoring normal intestinal microflora.

Many strains of probiotics, such as *Streptococcus thermophilus* fail to survive under the severe conditions of digestive system. Therefore, the encapsulation of probiotics in protecting matrices is necessary to cope with the adverse conditions that occur in the internal of the host. Probiotics' encapsulation is accomplished through a variety of methods. Among them, electrohydrodynamic processes and freeze drying are proved to be ideal, due to the mild conditions, applied to the samples, that do not affect microbes' viability.

During electrohydrodynamic processes (electrospinning or electrospraying), a high-voltage electrical field is applied, so as to produce an electrically charged jet by a polymer solution, that forms the recognizable Taylor cone. As a result, the solvent is being dried and fibers or particles are produced respectively. In freeze drying, the aqueous polymer solution is dehydrated through freezing of water content and subsequent sublimation of the icicles formed.

In the present project, several electrospraying parameters - in particular solution supply, applied voltage and tip-to-collector distance - were studied, in order to develop stable structures, characterized by high encapsulation efficiency. The mixtures studied were those of whey protein concentrate-fructooligosaccharide (electrospraying) and those of zein and fructooligosaccharide (coaxial electrospinning). Optimal electrospraying conditions are presented below:

- for whey protein concentrate-fructooligosaccharide (ratio 80:20 w/w) aqueous solution with total concentration of 40% w/w, solution's flow was set at 500, 600, 700 uL/h and tip-to-collector distance at 6, 7, 8 cm. Among these conditions, the amount of powder produced and analyzed was collected in a solution flow of 600 uL/h, a distance of 7 cm and an applied voltage range of 27.2-29.2 kV
- for zein solution with concentration of 5% w/w in ethanol-water(ratio 80:20 v/v) coaxially electrospun with fructooligosaccharide aqueous solution with concentration of 3% w/w, solution's flow was set at 600, 700, 800 uL/h and tip-to-collector distance at 4, 5, 6 cm. Among these conditions, the amount of powder produced and analyzed was collected in a zein solution flow of 700 uL/h, a fructooligosaccharide solution flow of 100 uL/h, a distance of 5 cm and an applied voltage range of 25.2-28.2 kV.

Furthermore, the bacterial strain of Streptococcus thermophilus was cultivated in appropriate growth medium at 37^{o} C, pH=6.5 and then was freeze dried, in order to be encapsulated in matrices of whey protein-fructooligosaccharide and zein-fructooligosaccharide, via electrospraying and freeze drying.

Electrospraying process productivity for whey protein-fructooligosaccharide solution was measured at 0.1503 $\frac{g}{h}$, while for zein-fructooligosaccharide solution it was determined to be 0.0024 $\frac{g}{h}$. The encapsulation efficiency was calculated equal to 38.7% for freeze drying and 86.5% for electrospraying.

The viability of free probiotics, after their exposure in simulated gastric juices was significantly enhanced, owing to their encapsulation in a whey protein-fructooligosaccharide matrix through either electrospraying or freeze drying. Between these two methods, electrospraying seems to protect probiotics more intensively and preserve a higher viability. Zein is an ideal matrix for the encapsulation of probiotics, because of his hydrophobic nature, which render this protein non-soluble in gastrointestinal juice and perfect protector of probiotics.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy substantiated the encapsulation of probiotics in whey protein- fructooligosaccharide and zein-fructooligosaccharide matrices either by electrospraying or by freeze drying techniques. Moreover, there were no shifts in band peaks between whey protein-fructooligosaccharide particles and encapsulated probiotics in whey protein-fructooligosaccharide spectra, which suggests that there is no interaction between these prebiotic matrices and bacteria.

Through Differential Scanning Calorimetry glass transition temperature (T_g) for zein-fructooligosaccharide powder was measured equal to 133.423±0.261^{o}C.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ IX

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ X

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ XIII

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ XV

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1

1.1 Εισαγωγή 1
1.1.1 Αντικείμενο και μεθοδολογική προσέγγιση της διπλωματικής εργασίας 1
1.1.2 Στόχοι της διπλωματικής εργασίας 1

1.2 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί 2
1.2.1 Ορισμός των προβιοτικών μικροοργανισμών 2
1.2.2 Ορισμός πρεβιοτικών, συμβιοτικών και μεταβιοτικών 3
1.2.3 Σύγχρονες τάσεις ανάπτυξης του κλάδου των προβιοτικών 4
1.2.4 Οικολογία της εντερικής μικροχλωρίδας 6
1.2.5 Ποικιλομορφία εντερικού μικροβιώματος ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση 9
1.2.6 Είδη προβιοτικών μικροοργανισμών 10
1.2.7 Streptococcus thermophilus- Επιλεγμένο είδος προβιοτικού βακτηρίου 15
1.2.8 Ποσοτικοποίηση προβιοτικών βακτηρίων 16
1.2.9 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών 19
1.2.10 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών 23
1.2.11 Ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών 24
1.2.12 Βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών 25
1.2.13 Τεχνικές βελτίωσης βιωσιμότητας των προβιοτικών 26

1.3 Διεργασίες εγκλεισμού προβιοτικών 28
1.3.1 Μέθοδοι εγκλεισμού προβιοτικών 28
1.3.2 Επιλεγμένες τεχνικές εγκλεισμού 31
1.3.3 Φορείς – Μέσα εγκλεισμού 46

1.4 Χαρακτηρισμός τελικού προϊόντος εγκλεισμού 53
1.4.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry-DSC) 53
1.4.2 Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR) 55

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 57

2.1 Υλικά 57
2.1.1 Καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους Streptococcus thermophilus 57
2.1.2 Εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων 58
2.1.3 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού 58

2.2 Μέθοδοι, όργανα και συσκευές 59
2.2.1 Καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους Streptococcus thermophilus 59

2.2.2 Εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων 64
2.2.3 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού 81

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 91

3.1 Παραγωγικότητα της καλλιέργειας του βακτηριακού στελέχους Streptococcus thermophilus ... 91

3.2 Παραγωγικότητα της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού 91

3.3 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού 92

3.4 Μελέτη βιωσιμότητας των παραγόμενων ενθυλακωμένων βακτηρίων 94

3.5 Υπόλοιπες τεχνικές (DSC, ATR-FTIR) 105
3.5.1 Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR) 105
3.5.2 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry-DSC) 108

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 111

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 113

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ζύμωση διαλυτών, μη διαλυτών ινών και ανθεκτικού αμύλου από προβιοτικά μικρόβια. 9

Σχήμα 2: Κύριοι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροβίων. 24

Σχήμα 3: Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών. 26

Σχήμα 4: Συνοπτικό διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας. 90

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:Μια μεγάλη ποικιλία απαραίτητων μικροβίων, της φυσιολογικής μικροχλωρίδας εντοπίζεται στο ανθρώπινο έντερο. 3

Εικόνα 2: Τα είδη των προβιοτικών μικροοργανισμών. 15

Εικόνα 3:Τρυβλίο για τη μέτρηση των αποικιών με τις κατάλληλες αραιώσεις. 19

Εικόνα 4: Κριτήρια επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών. 22

Εικόνα 5: Εγκλεισμός προβιοτικών σε αλγινικά άλατα. 30

Εικόνα 6: Τυπικές διάμετροι διαφόρων ινών. Η ειδική επιφάνεια αυξάνεται ραγδαία με την αύξηση της διαμέτρου. (Εικόνες από Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης- SEM) 33

Εικόνα 7: Ο σχηματιζόμενος κώνος Taylor κατά τη διαδικασία του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. 35

Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροστατικής ινοποίησης ενός διαλύματος πολυμερούς μονής σύριγγας (A) και ελεύθερης επιφάνειας (B) 36

Εικόνα 9: Βασική διεργασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. 37

Εικόνα 10: Οι ασκούμενες δυνάμεις στη φορτισμένη σταγόνα κατά τη διάρκεια του electrospinning, (A): Ηλεκτροστατική δύναμη, (B): Οπισθέλκουσα δύναμη, (C): Βαρύτητα, (D): Άπωση Coulomb, (E): Επιφανειακή τάση και ιξωδοελαστική δύναμη. 37

Εικόνα 11: Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση στο μοριακό επίπεδο για τη συμπεριφορά αραιών και πυκνών πολυμερικών διαλυμάτων.Κέντρο: Διάγραμμα του βασικού σχηματισμού κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση (σχηματισμός πίδακα) και κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό (ατομοποίηση της σταγόνας-σχηματισμός σωματιδίων).Δεξιά: Παραδείγματα απεικόνισης στο μικροσκόπιο SEM των μικροσφαιριδίων του electrospraying και των νανοϊνών του electrospinning. 38

Εικόνα 12: Διάταξη του electrospinning. 39

Εικόνα 13: Ξηραντήρας με κατάψυξη πιλοτικής κλίμακας. 44

Εικόνα 14: Σιρόπι φρουκτοολιγοσακχαριτών. 48

Εικόνα 15: Σκόνη της πρωτεΐνης ορού γάλακτος. 49

Εικόνα 16: Απομόνωση της πρωτεΐνης από τον ορό γάλακτος. 50

Εικόνα 17: Ζεΐνη. 51

Εικόνα 18: Η τυπική διάταξη του υπέρυθρου φασματομέτρου με μετασχηματισμό Fourier 56

Εικόνα 19:Ο καταψύκτης (SANYO BIOMEDICAL FREEZER MDF-436). 58

Εικόνα 20: Αναλυτικός Ζυγός, ακρίβειας 4 δεκαδικών (KERN ABS 220). 59

Εικόνα 21: Μαγνητικός Αναδευτήρας (SELECTA MULTIMATIC-5N). 60

Εικόνα 22: Ηλεκτρονικό πεχάμετρο (MARTINI Instruments 180 Bench Meter). 60

Εικόνα 23: Εργαστηριακό αυτόκλειστο για αποστείρωση (SANYO Labo Autoclave MLS 2420). 61

Εικόνα 24: Απαγωγός μικροβιολογίας (NÜVE MN 090 Microbiological Safety Cabinet). 62

Εικόνα 25: Οι κωνικές φιάλες στο εσωτερικό του επωαστήρα (Zhicheng ZHWY-211C Incubator Shaker). 63

Εικόνα 26: Η χρησιμοποιούμενη φυγόκεντρος (NÜVE NF 400 Centrifuge). 63

Εικόνα 27: Η διάταξη ανάδευσης του Vortex (VORTEX-GENIE 2). 65

Εικόνα 28: Η σκόνη των σωματιδίων εγκλεισμού που εναποτίθεται στο αλουμινόφυλλο. 67

Εικόνα 29: Σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια αποθήκευσης των παραγόμενων εγκλεισμένων βακτηρίων. 67

Εικόνα 30: Η διάταξη του electrospinning (BioInicia FLUIDNATEK LE-10) σε λειτουργία με τα διαλύματα ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης. 78

Εικόνα 31: Η διάταξη του electrospinning σε λειτουργία με το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης. 78

Εικόνα 32: Η διάταξη της ξήρανσης με κατάψυξη (LEYBOLD-HERAEUS GT2)..... 80

Εικόνα 33: Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (PERKIN ELMER DSC 6). 83

Εικόνα 34: Φασματόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (JASCO FT/IR-4200). 84

Εικόνα 35: Θάλαμος επώασης ελεγχόμενης θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτός (NÜVE Test Cabinet TK 120). 87

Εικόνα 36: Αριστερά: η πλάκα Microplate, Κέντρο: η αυτόματη πιπέτα των 100-1000 μL, Δεξιά: η αυτόματη πιπέτα των 20-200 μL. 89

Εικόνα 37: Απόδοση εγκλεισμού με ξήρανση υπό κατάψυξη (αριστερά) και ξήρανση με ηλεκτροστατικό ψεκασμό (δεξιά), μέσω μελέτης της βιωσιμότητας των αντίστοιχων εγκλεισμένων βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε αιθανόλη. 92

Εικόνα 38: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω). 94

Εικόνα 39: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω) μετά από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 30 min..... 95

Εικόνα 40: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω) μετά από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 60 min..... 96

Εικόνα 41: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω) μετά από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 90 min..... 97

Εικόνα 42:Σύγκριση της βιωσιμότητας μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (α.), 30 (β.), 60 (γ.) και 90(δ.) λεπτά των ελεύθερων (επάνω, σε κάθε φωτογραφία), των εγκλεισμένων με ηλεκτροστατικό ψεκασμό (κάτω αριστερά, σε κάθε φωτογραφία) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω δεξιά, σε κάθε φωτογραφία). 101

Εικόνα 43:Οι σχηματιζόμενες αποικίες των ελεύθερων (μη εγκλεισμένων) βακτηρίων μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (πάνω αριστερά) , 30 (πάνω δεξιά), 60 (κάτω αριστερά) και 90 (κάτω δεξιά) λεπτά. 102

Εικόνα 44:Οι σχηματιζόμενες αποικίες των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (πάνω αριστερά) , 30 (πάνω δεξιά), 60 (κάτω αριστερά) και 90 (κάτω δεξιά) λεπτά. 103

Εικόνα 45: Οι σχηματιζόμενες αποικίες των εγκλεισμένων με ηλεκτροστατικό ψεκασμό βακτηρίων μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (πάνω αριστερά) , 30 (πάνω δεξιά), 60 (κάτω αριστερά) και 90 (κάτω δεξιά) λεπτά. 104

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Είδη προβιοτικών μικροοργανισμών. 11

Πίνακας 2: Θεραπευτικές και προφυλακτικές ιδιότητες των Lactobacillus. 13

Πίνακας 3: Οι παράγοντες που επιδρούν στη συμπεριφορά ενός διαλύματος πολυμερούς κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση. 43

Πίνακας 4: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα ινουλίνης-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 50:50 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w 68

Πίνακας 5: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 20%w/w. 69

Πίνακας 6: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 50:50 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w. 69

Πίνακας 7: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 50:50 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 50%w/w. 70

Πίνακας 8: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w. 70

Πίνακας 9: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για διάλυμα ζεΐνης συγκέντρωσης 5%w/w σε αιθανόλη-νερό (αναλογίας 80:20 v/v) και υδατικό διάλυμα ολιγοφρουκτόζης συγκέντρωσης 3%w/w. 73

Πίνακας 10: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w. 76

Πίνακας 11: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για διάλυμα ζεΐνης συγκέντρωσης 5%w/w σε αιθανόλη-νερό (αναλογίας 80:20 v/v) και υδατικό διάλυμα ολιγοφρουκτόζης συγκέντρωσης 3%w/w. 77

Πίνακας 12: Παραγωγικότητα της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για τα διαλύματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης. 91

Πίνακας 13: Σχηματιζόμενες αποικίες από τα εγκλεισμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη και με ηλεκτροστατικό ψεκασμό βακτήρια, μετά την επεξεργασία τους με αιθανόλη(για θανάτωση των μη εγκλεισμένων). 93

Πίνακας 14: Απόδοση εγκλεισμού με ξήρανση υπό κατάψυξη και ηλεκτροστατικό ψεκασμό. 93

Πίνακας 15: Καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία για ελεύθερα και εγκλεισμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτήρια που έχουν εκτεθεί σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά. 98

Πίνακας 16: Αναπτυσσόμενες αποικίες/g (CFU/g) για ελεύθερα και εγκλεισμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτήρια που έχουν εκτεθεί σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά. 98

Πίνακας 17: Θερμοκρασία εμφάνισης και διαφορά ενθαλπίας των ενδόθερμων διεργασιών στα δείγματα σκόνης πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης που παράγονται από το freeze drying και από το electrospraying. 108

Πίνακας 18: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης της παραγόμενης από τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης. 110

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Υποβάθμιση της βιωσιμότητας των ελεύθερων βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά..... 99

Διάγραμμα 2: Υποβάθμιση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά. 99

Διάγραμμα 3: Συγκριτικό διάγραμμα της υποβάθμισης βιωσιμότητας των ελεύθερων και των εγκελισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά. 100

Διάγραμμα 4: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού προβιοτικών σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη μέσω του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. 105

Διάγραμμα 5: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού προβιοτικών σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη μέσω της ξήρανσης υπό κατάψυξη. 106

Διάγραμμα 6: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού προβιοτικών σε ζεΐνη - ολιγοφρουκτόζη μέσω του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. 107

Διάγραμμα 7: Καμπύλες DSC της παραγόμενης σκόνης πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης από την ξήρανση με κατάψυξη κα τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό. 109

Διάγραμμα 8: Καμπύλη DSC της παραγόμενης σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης από την ξήρανση με κατάψυξη. 109

Διάγραμμα 9: Καμπύλη DSC της παραγόμενης σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης από την ξήρανση με κατάψυξη. 110

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

1.1.1 Αντικείμενο και μεθοδολογική προσέγγιση της διπλωματικής εργασίας

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη και η εφαρμογή των τεχνικών του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης υπό κατάψυξη για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων *Streptococcus thermophilus* σε πρεβιοτικές μήτρες, με σκοπό τη βελτίωση της βιωσιμότητας και της βιοδιαθεσιμότητας τους.

Μέσω της μεθόδου της ενθυλάκωσης επιτυγχάνεται τόσο η βελτίωση της βιωσιμότητας κατά την παραγωγή, αποθήκευση και την κατανάλωση του προϊόντος (όπως η αντίσταση στα οξέα του στομάχου) που περιέχει τα εγκλεισμένα βακτήρια όσο και της βιοδιαθεσιμότητας και της ελεγχόμενης αποδέσμευσης των προβιοτικών βακτηρίων στο ανθρώπινο έντερο, συγκριτικά με την άμεση ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα. Το αυξημένο επιστημονικό και εμπορικό ενδιαφέρον για την παρούσα έρευνα έγκειται στις βελτιωμένες ιδιότητες των εγκλεισμένων προϊόντων, καθώς η εφαρμογή της μελετούμενης μεθόδου σε γαλακτοκομικά και άλλα προϊόντα κρίνεται ιδιαιτέρως ευεργετική για την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι πολλά υποσχόμενες τεχνικές των ηλεκτροϋδροδυναμικών διεργασιών επιτυγχάνει το μίκρο- και νάνο-εγκλεισμό των προβιοτικών, με αποτέλεσμα τη σύνθεση καινοτόμων προϊόντων, αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας. Παράλληλα, η συμβατική τεχνική της ξήρανσης υπό κατάψυξη αποδίδει προϊόντα με βελτιωμένη σταθερότητα και βιωσιμότητα.

Στην παρακάτω μεθοδολογική προσέγγιση, τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης και στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε πρεβιοτικές μήτρες οι οποίες χρησιμοποιούνται κατά κόρον από τη βιομηχανία τροφίμων (καλλιέργειες παρασκευής γιαουρτιού) και εμφανίζουν πολλαπλές ευεργετικές δράσεις στον οργανισμό. Οι πρεβιοτικές μήτρες επιλέχθηκαν, διότι παρουσιάζουν υψηλό βαθμό προστασίας προς τα ενθυλακωμένα βακτήρια καθώς και ιδανική συμπεριφορά κατά τις διεργασίες εγκλεισμού. Οι συνθήκες των τεχνικών εγκλεισμού, οι οποίες εφαρμόστηκαν, βελτιστοποιήθηκαν, με βάση τα χρησιμοποιούμενα υλικά.

1.1.2 Στόχοι της διπλωματικής εργασίας

Οι επιμέρους στόχοι της παρούσας εργασίας περιλαμβάνουν συνοπτικά:

- την παραγωγή προβιοτικών βακτηρίων *Streptococcus thermophilus*
- τη διερεύνηση και βελτιστοποίηση των τεχνικών ηλεκτροστατικού ψεκασμού και ξήρανσης υπό κατάψυξη για τον εγκλεισμό των βακτηρίων σε πρεβιοτικές μήτρες
- την ανάπτυξη πρεβιοτικών δομών με εγκλεισμένα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* μέσω των τεχνικών ηλεκτροστατικού ψεκασμού και ξήρανσης υπό κατάψυξη
- τη διαπίστωση υψηλής απόδοσης εγκλεισμού και αυξημένης βιωσιμότητας κατά την αποθήκευση και τη διέλευσή των εγκλεισμένων βακτηρίων από το γαστρεντερικό σωλήνα.

Οι παραπάνω στόχοι διεκπεραιώθηκαν με απόλυτη επιτυχία, συνεπώς η παρούσα διπλωματική εργασία δύναται να συνεισφέρει στην παροχή εξειδικευμένης τεχνογνωσίας για τη διεξαγωγή αντίστοιχων πειραμάτων από άλλους ερευνητές στο μέλλον. Επιπλέον, οι παραγόμενες δομές με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια σε πρεβιοτικές μήτρες μπορούν να ενσωματωθούν σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως γιαούρτι, με σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων γαλακτοκομικών προϊόντων από τις βιομηχανίες τροφίμων, με αυξημένη βιωσιμότητα και βιοδιαθεσιμότητα των περιεχόμενων προβιοτικών βακτηρίων.

1.2 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

1.2.1 Ορισμός των προβιοτικών μικροοργανισμών

Η διατύπωση της ‘υπόθεσης υγιεινής’ προκάλεσε την επανεξέταση του ρόλου των μικροοργανισμών στην υγεία του ξενιστή και προώθησε την ιδέα της σκόπιμης διαμόρφωσης του εντερικού μικροβιόκοσμου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ωστόσο, η ιδέα της καταστολής και αντικατάστασης των παθογόνων μέσω της στοματικής χορήγησης “ωφέλιμων” βακτηρίων για τη βελτίωση της μικροβιακής ισορροπίας, της υγείας και της μακροζωίας δεν είναι καινοφανής, αλλά παρουσιάστηκε για πρώτη φορά σχεδόν έναν αιώνα νωρίτερα από τον Tissier (1906) και τον Metchnikoff (1907). Ο Tissier έδειξε ότι τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* αποτελούν κυρίαρχα μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας των βρεφών και πρότεινε τη χορήγηση τους για την αποκατάσταση της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας και τη θεραπεία της διάρροιας. Την ίδια περίοδο, ο Metchnikoff ανέπτυξε τη θεωρία της αυτό-αποτοξίνωσης του οργανισμού και συνέδεσε την κατανάλωση γιαουρτιού που περιέχει βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, με την παρατηρούμενη μακροζωία των Βουλγάρων χωρικών.

Έπειτα από τις εξελίξεις αυτές, το 1965, εισήχθη από τους Lilly και Stillwell ο όρος προβιοτικός (προ-βίος, προάγω τη ζωή), για να περιγράψει βακτήρια και ενδοσπόρια που χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής των ζώων και τα οποία θα μπορούσαν να περιορίσουν τη χρήση αντιβιοτικών ουσιών. Έκτοτε, ο όρος προβιοτικός επαναδιατυπώθηκε αρκετές φορές για να καταλήξει σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Η.Π.Α και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (FAO/WHO, 2001) σε μία γενικώς αποδεκτή αναθεώρηση, στον ορισμό που παρατίθεται παρακάτω.[1]

Σύμφωνα, λοιπόν, με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO/WHO) τα προβιοτικά ορίζονται ως ζωντανοί μικροοργανισμοί, που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν ορισμένο όφελος για την υγεία του ξενιστή. Ένας παρόμοιος αλλά περαιτέρω απλουστευμένος ορισμός δόθηκε και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Γαστρεντερολογίας (WGO) ο οποίος αναφέρει πως τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που προσδίδουν ένα όφελος για την υγεία του ξενιστή. [2]

Τα προβιοτικά (και τα πρεβιοτικά) έχουν κερδίσει έδαφος λόγω της πληθώρας στοιχείων που υποστηρίζουν τα ευεργετικά αποτελέσματα τους σε διάφορες ασθένειες. Καλλιέργειες της μικροχλωρίδας του εντέρου σε ενήλικες ασθενείς με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (Short Bowel Syndrome - SBS) έδειξαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις πολλών βακτηριακών κλώνων, οι οποίοι αντιθέτως βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε υγιείς ενήλικες. Όσον αφορά το ρόλο των προβιοτικών (και των πρεβιοτικών) στη διατήρηση της μικροχλωρίδας του εντέρου,

παρουσιάζουν ενδιαφέρον τα αποτελέσματά τους για την ελάττωση της βακτηριακής υπερανάπτυξης και την πρόληψη της βακτηριακής μετατόπισης σε SBS.

Ορισμένα προβιοτικά στελέχη έχουν διερευνηθεί εκτενώς, για να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος στη δυσανεξία στη λακτόζη, τη διάρροια, τη δυσκοιλιότητα, καθώς και τη διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας του εντέρου κ.α.. Τα πρεβιοτικά - τα περισσότερα από τα οποία είναι ενώσεις υδατανθράκων- έχουν διερευνηθεί με περίσσιο ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών δράσεών τους στον ξενιστή. Πράγματι, αυτό το πεδίο βρίσκεται υπό ραγδαία ανάπτυξη και το δυνητικό όφελος από τη χρήση προβιοτικών και πρεβιοτικών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό σε ασθενείς με ποικίλες νόσους, όπως το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου.[3]

Εικόνα 1:Μια μεγάλη ποικιλία απαραίτητων μικροβίων, της φυσιολογικής μικροχλωρίδας εντοπίζεται στο ανθρώπινο έντερο.

1.2.2 Ορισμός πρεβιοτικών, συμβιοτικών και μεταβιοτικών

Ακολούθως, θα αναφερθούν τα πρεβιοτικά ως τα συστατικά τροφίμων που υποβοηθούν την υγιή ανάπτυξη της φυσιολογικής μικροχλωρίδας. Όταν αναφερόμαστε στα προβιοτικά, η σύγχυσή τους με τα πρεβιοτικά είναι συνήθης, και αντίστροφα. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητος ο ορισμός των πρεβιοτικών, ώστε να αντιπαρατίθεται με εκείνον για τα προβιοτικά. Συγκεκριμένα, ως πρεβιοτικά περιγράφονται συστατικά των τροφίμων που δε χωνεύονται, αλλά ευεργετούν την υγεία του ξενιστή πυροδοτώντας την ανάπτυξη ή και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων εντεροβακτηρίων. Ακολουθώντας τον ορισμό αυτό, μόνο λίγοι από τους υδατάνθρακες μπορούν να θεωρηθούν ως πρεβιοτικά και συγκεκριμένα (κυρίως) οι μικρές και μεγάλες αλυσίδες β-φρουκτανών (φρουκτοολιγοσακχαρίτες και ινουλίνη), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες και η λακτουλόζη. Στο 6ο Συνέδριο της Παγκόσμιας Επιστημονικής Ένωσης Προβιοτικών και Πρεβιοτικών, το 2008, ο ορισμός αυτός εκσυγχρονίστηκε και διατυπώνεται ως εξής: ως πρεβιοτικά χαρακτηρίζεται ένα επιλεκτικά ζυμούμενο συστατικό που προξενεί συγκεκριμένες μεταβολές στη σύνθεση ή και στην ενεργότητα των γαστροεντερικών βακτηρίων, απονέμοντας ποικίλα οφέλη στην υγεία του οργανισμού-ξενιστή. Επίσης, ως συμβιοτικά ταξινομούνται τα συμπληρώματα διατροφής που συνδυάζουν τα προβιοτικά με τα πρεβιοτικά σε μία μορφή συνεργιστικής δράσης, η οποία επιφέρει τη βελτιωμένη επιβίωση και εμφύτευση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο έντερο.[4] Ορισμένα βακτηριακά προϊόντα, απουσία των ζώντων οργανισμών (βακτηρίων από τα οποία παρήχθησαν) ενδέχεται να έχουν παρόμοιες επιδράσεις στην κωδικοποίηση διαφόρων μονοπατιών και στην ενεργοποίηση φραγμών στον οργανισμό. Αυτά τα βακτηριακά προϊόντα χαρακτηρίζονται ευρέως ως μεταβιοτικά και μπορούν να οριστούν ως άβια, βακτηριακά προϊόντα ή μεταβολικά παραπροϊόντα από προβιοτικούς μικροοργανισμούς που έχουν βιολογική δραστικότητα στον

ξενιστή. Γενικά, τα μεταβιοτικά περιλαμβάνουν βακτηριακά μεταβολικά παραπροϊόντα, όπως βακτηριοσίνες, οργανικά οξέα, αιθανόλη, διακετύλιο, ακεταλδεΰδες και υπεροξείδιο του υδρογόνου.[5]

1.2.3 Σύγχρονες τάσεις ανάπτυξης του κλάδου των προβιοτικών

Τα πρότυπα υγείας και διατροφής έχουν μεταβληθεί δραματικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Εκτός από την προσφορά των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για τον ανθρώπινο οργανισμό, τα τρόφιμα αποτελούν πλέον μέσο επίτευξης της ευεξίας, καθιστώντας τους καταναλωτές πιο ευαισθητοποιημένους σε θέματα υγιεινής και ωφέλιμης διατροφής. Δεδομένου ότι το προσδόκιμο όριο ζωής συνεχώς επιμηκύνεται, γίνονται προσπάθειες στον κλάδο της γηριατρικής, για την επίτευξη της υγιούς γήρανσης, χωρίς προβλήματα υγείας. Η ανάπτυξη επιστημονικών κλάδων, όπως η Βιοτεχνολογία, η Νανοτεχνολογία και η Διατροφογενομική αποκαλύπτει πως πολυάριθμα παραδοσιακά φαγητά και συστατικά τροφίμων επιτελούν λειτουργική δράση, ενώ παράλληλα αναπτύσσονται και καινοτόμα λειτουργικά τρόφιμα. Η συσσώρευση ερευνών που συσχετίζουν τη διατροφική δίαιτα με μη γενετικές, χρόνιες ασθένειες έχει προκαλέσει ραγδαίες αλλαγές στην Τεχνολογία Τροφίμων και στην αξιολόγηση των συνεπειών στην υγεία. Τα λειτουργικά τρόφιμα είναι εκείνα που περιέχουν βιολογικά ενεργές ενώσεις, οι οποίες – εκτός από την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών- περιέχουν και θρεπτικά συστατικά (όπως απαραίτητα λιπαρά οξέα ή βιταμίνες) όντας ζωτικής σημασίας για μια ισορροπημένη διατροφή. Τα τρόφιμα αυτά ταξινομούνται ως ολόκληρα, εμπλουτισμένα ή ενισχυμένα τρόφιμα ή ενώσεις τροφίμων που έχουν θετικά οφέλη για την υγεία του οργανισμού.

Το μερίδιο αγοράς των συγκεκριμένων τροφίμων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα προβιοτικά αυξάνεται ραγδαία. Τα προβιοτικά τρόφιμα κατέχουν το 60-70% της αγοράς των λειτουργικών τροφίμων. Συγκεκριμένα, τα λειτουργικά γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γιαούρτι που περιέχει σωματίδια συμβιοτικών κατέχουν εξέχουσα θέση στον τομέα των λειτουργικών τροφίμων, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 40% της εν λόγω αγοράς. Η μεγάλη πλειονότητα των λειτουργικών γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελείται από τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Τα λειτουργικά προϊόντα τύπου γιαουρτιού στα οποία έχουν προστεθεί προβιοτικά ως λειτουργικά συστατικά κατέχουν μεγάλο μερίδιο στην αγορά των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η παγκόσμια αγορά λειτουργικών γαλακτοκομικών προϊόντων είναι ένα πολύ δυναμικό τμήμα της γαλακτοκομικής βιομηχανίας και η παγκόσμια αγορά γαλακτοκομικών προϊόντων προβλέπεται να φτάσει σε τιμή αγοράς 13,9 δισεκατομμυρίων δολαρίων έως το 2021. Σε μια ευρεία αγορά, όπως εκείνη της Κίνας, οι πωλήσεις λειτουργικών και ενισχυμένων γιαουρτιών στην Κίνα υπολογίζεται πως αυξήθηκαν 23% το 2019 συγκριτικά με το 2016, μέχρι τα 43 δισ. κινεζικά γουάν, ενώ μέχρι το 2022 οι πωλήσεις αναμένεται να αυξηθούν εκ νέου κατά 56%, μέχρι τα 75 δισ. γουάν, σύμφωνα με την Euromonitor International.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία των προβιοτικών επηρεάζει και την ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Προσπάθειες έχουν γίνει τις τελευταίες δεκαετίες για βελτίωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών σε διάφορα προϊόντα κατά την παραγωγή τους μέχρι τη στιγμή της κατανάλωσής τους. Οι προσπάθειες επικεντρώνονται κυρίως στην προστασία των μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η τεχνική της

ενθυλάκωσης, η προσθήκη διάφορων προστατευτικών και η μεταβολή της διαδικασίας παραγωγής και αποθήκευσης.

Μεγάλη επιτυχία έχει σημειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στην ανάπτυξη γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια όπως ζυμούμενο γάλα, παγωτό, διάφορα είδη τυριού, βρεφική τροφή, σκόνη γάλακτος, παγωμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια, ροφήματα ορού γάλακτος, ξινή κρέμα, βουτυρόγαλα, κανονικό και με γεύσεις γάλα. Όμως με την εξάπλωση της δυσανεξίας στη λακτόζη, έχουν αναπτυχθεί επίσης και μη γαλακτοκομικά, λειτουργικά προϊόντα, όπως σε χυμούς, χορτοφαγικά τρόφιμα, δημητριακά, σόγια και βρώμη.

Τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να είναι ασφαλή και να περιέχουν την απαραίτητη ποσότητα προβιοτικών οργανισμών όταν καταναλώνονται. Γι' αυτό το λόγο, τα στελέχη των προβιοτικών που επιλέγονται πρέπει να είναι τα κατάλληλα για βιομηχανική παραγωγή μεγάλης κλίμακας και να έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους κατά την παραγωγή και αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης ή ξηρές.

Παρόλο που μία μεγάλη ποικιλία γενών και ειδών θεωρούνται σαν πιθανά προβιοτικά αυτά που χρησιμοποιούνται, κυρίως, εμπορικά σε προβιοτικά τρόφιμα είναι βακτήρια από τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Η κύρια αιτία είναι η μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης τους – θεωρούνται GRAS (generally recognized as safe) – καθώς και το γεγονός ότι είναι κυρίαρχοι μικροβιακοί πληθυσμοί στο ανθρώπινο έντερο. Εκτός από τα παραπάνω χρησιμοποιούνται και είδη που ανήκουν στα γένη *Lactococcus*, *Enterococcus*, ζύμες *Saccharomyces* και *Propionibacterium* και *filamentus fungi* (νηματώδεις μύκητες) λόγω των θετικών επιδράσεων τους στην υγεία.

Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών των προβιοτικών σε επαρκή δόση είναι η πρώτη προτεραιότητα για την ανάπτυξη ενός προβιοτικού τροφίμου. Βασικά κριτήρια επιλογής αποτελούν η βιωσιμότητα κατά την παραγωγική διαδικασία και αποθήκευση καθώς και η επιβίωση κατά τη μεταφορά στο γαστρεντερικό σύστημα και τα πιθανά οφέλη για την υγεία μέσα από την κατανάλωσή τους. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια, το *Lactobacillus* είναι πιο ανθεκτικό, σε σχέση με το *Bifidobacteria*, σε χαμηλό pH και προσαρμόζεται σε προϊόντα παρουσία γάλακτος και άλλα υποστρώματα τροφίμων, με αποτέλεσμα να θεωρείται καταλληλότερο για χρήση σε προϊόντα τροφίμων.

Η βιομηχανία τροφίμων, όπως και ο FDA των ΗΠΑ, έχει ορίσει ως ελάχιστη προτεινόμενη ποσότητα μικροοργανισμών κατά την κατανάλωση ενός προβιοτικού τροφίμου τα 10^6 CFU ml^{-1}. Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση που έχει η αποθήκευση του προβιοτικού τροφίμου στη βιωσιμότητα του μικροοργανισμού και την ποσότητα που λαμβάνεται, η ημερήσια πρόσληψη 10^8-10^9 προβιοτικών μικροοργανισμών είναι απαραίτητη για να επωφεληθεί ο ανθρώπινος οργανισμός. Αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 100g προβιοτικού προϊόντος/ημέρα, ανάλογα και τη συγκέντρωση των αποικιών.

Πολλοί παράγοντες έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά την παραγωγή, επεξεργασία και αποθήκευση. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι ιδιότητες του τροφίμου όπως το pH, η οξύτητα, το μοριακό οξυγόνο, η ενεργότητα του νερού, η παρουσία αλατιού, ζάχαρης, χημικών όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι βακτηριοσίνες, τεχνητές

αρωματικές και χρωστικές ουσίες. Επίσης, παράμετροι που αφορούν την επεξεργασία, όπως η θερμική κατεργασία, η θερμοκρασία επώασης, ο ρυθμός ψύξης του προϊόντος, τα υλικά συσκευασίας, οι μέθοδοι αποθήκευσης και η κλίμακα παραγωγής. Τέλος, μικροβιολογικές παράμετροι όπως τα στελέχη των προβιοτικών, ο ρυθμός και η αναλογία του εμβολιασμού. [6],[7],[8]

1.2.4 Οικολογία της εντερικής μικροχλωρίδας

Ο εντερικός μικροβιακός πληθυσμός στον υγιή ανθρώπινο οργανισμό υπολογίζεται σε 10^{14} μικροοργανισμούς, οι οποίοι συνολικά κωδικοποιούν 3-4 εκατομμύρια γονίδια, ήτοι περίπου 150 φορές περισσότερα από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Αυτό το μικροβιακό γονιδίωμα επιτρέπει στην μικροχλωρίδα να εκτελεί ποικίλες μεταβολικές δραστηριότητες που δεν κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα και είναι ωφέλιμα για τον ξενιστή. Αυτά περιλαμβάνουν την αξιοποίηση της ενέργειας και των θρεπτικών συστατικών από τη διατροφή, τη βιοσύνθεση των βιταμινών, τον μετασχηματισμό των χολικών αλάτων, την ανάπτυξη εγγενούς και προσαρμοστικής ανοσίας, διατηρώντας την επιθηλιακή ακεραιότητα του εντέρου, και λειτουργώντας ως φραγμός στον πολλαπλασιασμό παθογόνων μικροβιακών αποικιών, αλλά και τον μεταβολισμό των φαρμάκων. Για το λόγο αυτό, οι σύγχρονες απόψεις προτείνουν ότι ο οργανισμός του ανθρώπου θα πρέπει να αναγνωρίζεται μαζί με τον ενδογενή μικροβιόκοσμό του ως υπέρ-οργανισμός ή μετα-οργανισμός (metaorganism) με σύνθετο γονιδίωμα το οποίο θα μπορούσε να αναφέρεται ως ανθρώπινο μετα-γονιδίωμα.

Τα προϊόντα από το μεταβολισμό των τροφίμων, τα οποία δεν μπορούν να χωνευθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό (π.χ., κυτταρίνη ή ολιγοσακχαρίτες) ζυμώνονται από τους εντερικούς μικροοργανισμούς προς λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας τα οποία ο άνθρωπος μπορεί να χρησιμεύσει ως πηγές ενέργειας ή σε άλλες ευεργετικές για τον ίδιο δράσεις. Συνεπώς, η ζύμωση από τα προβιοτικά αποτελεί μια διαδικασία που προσφέρει συμβιωτικά οφέλη στον ξενιστή επιτρέποντας τη χρήση μιας ευρύτερης ποικιλίας τροφίμων. Οι μεταβολές της σύνθεσης των μικροβιακών πληθυσμών του εντέρου που είναι δυσμενείς για τον ξενιστή (δυσβίωση ή δυσβακτηρίωση) έχουν συνδεθεί με μια σειρά ασθενειών, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, οι λοιμώξεις του *Clostridium difficile*, ο διαβήτης και η παχυσαρκία.

Η οικολογία του μικροβιακού πληθυσμού του εντέρου μεταβάλλεται με την ηλικία. Κατά το φυσιολογικό τοκετό, το έντερο αποικίζεται με μικροοργανισμούς παρόμοιους με τη κολπική χλωρίδα της μητέρας του. Αντίθετα, κατά τον τοκετό με καισαρική τομή αναπτύσσονται βακτηριακοί πληθυσμοί που ομοιάζουν με εκείνες του δέρματος, όπως τα είδη *Staphylococcus*, *Corynebacterium* και *Propionibacterium*. Ο βακτηριακός αποικισμός που παρέχεται από τη διέλευση μέσω του κόλπου της μητέρας βοηθά στην ανάπτυξη της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας. Η έλλειψη της έμφυτης απόκτησης αυτού του φυσικού εμβολίου σε βρέφη που γεννιούνται με καισαρική τομή μπορεί να ενοχοποιηθεί για μεταγενέστερες μεταβολές της ανοσίας τους που τούς θέτει σε υψηλότερο κίνδυνο μολύνσεων ή ατοπικής νόσου. Τα ευεργετικά βακτήρια όπως το *Bifidobacterium* μεταφέρονται επίσης στο βρέφος από τη μητέρα, κατά τη διάρκεια του θηλασμού και χρησιμεύουν για την αποίκηση του εντέρου του βρέφους. Κατά τη διάρκεια των πρώτων χρόνων της ζωής, η ποικιλομορφία του μικροβιακού εντέρου αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς ως αποτέλεσμα της διατροφή και των ασθενειών. Η χορήγηση

αντιβιοτικών σε βρέφη φαίνεται πως μειώνει την ποικιλία της χλωρίδας του εντέρου, γεγονός που θα μπορούσε να έχει αρνητικές επιπτώσεις στη μακροπρόθεσμη υγεία, όπως η αύξηση του κινδύνου εμφάνισης άσθματος, αλλεργιών και παχυσαρκίας. Κατά την ενηλικίωση, ο μικροβιακός πληθυσμός συνεχίζει να αλλάζει, αν και με βραδύτερο ρυθμό συγκριτικά με την παιδική ηλικία. Τέλος, ο μικροβιακός πληθυσμός των υγειών ηλικιωμένων ατόμων είναι παρόμοιος με τα νεότερα άτομα. Ωστόσο, ο αντίστοιχος σε ευπαθείς ηλικιωμένους μπορεί να είναι ουσιαστικά διαφορετικός.

Η κατανομή των βακτηρίων στην ευρύτερη περιοχή του εντέρου διαφέρει από σημείο σε σημείο. Η βακτηριακή πυκνότητα είναι χαμηλή στο στομάχι και στο δωδεκαδάκτυλο, λόγω της παρουσίας γαστρικού οξέος και παγκρεατικών ενζύμων, ενώ η πυκνότητα αυξάνεται στο απομακρυσμένο λεπτό έντερο (όπου παρατηρείται ένα μείγμα αερόβιων και αναερόβιων) και είναι ακόμη μεγαλύτερο στο παχύ έντερο, όπου η συγκέντρωση των βακτηρίων αυξάνεται στα εκτιμώμενα 10^{11}-10^{13} βακτήρια ανά γραμμάριο, εκ των οποίων το 99,99% είναι αναερόβια.

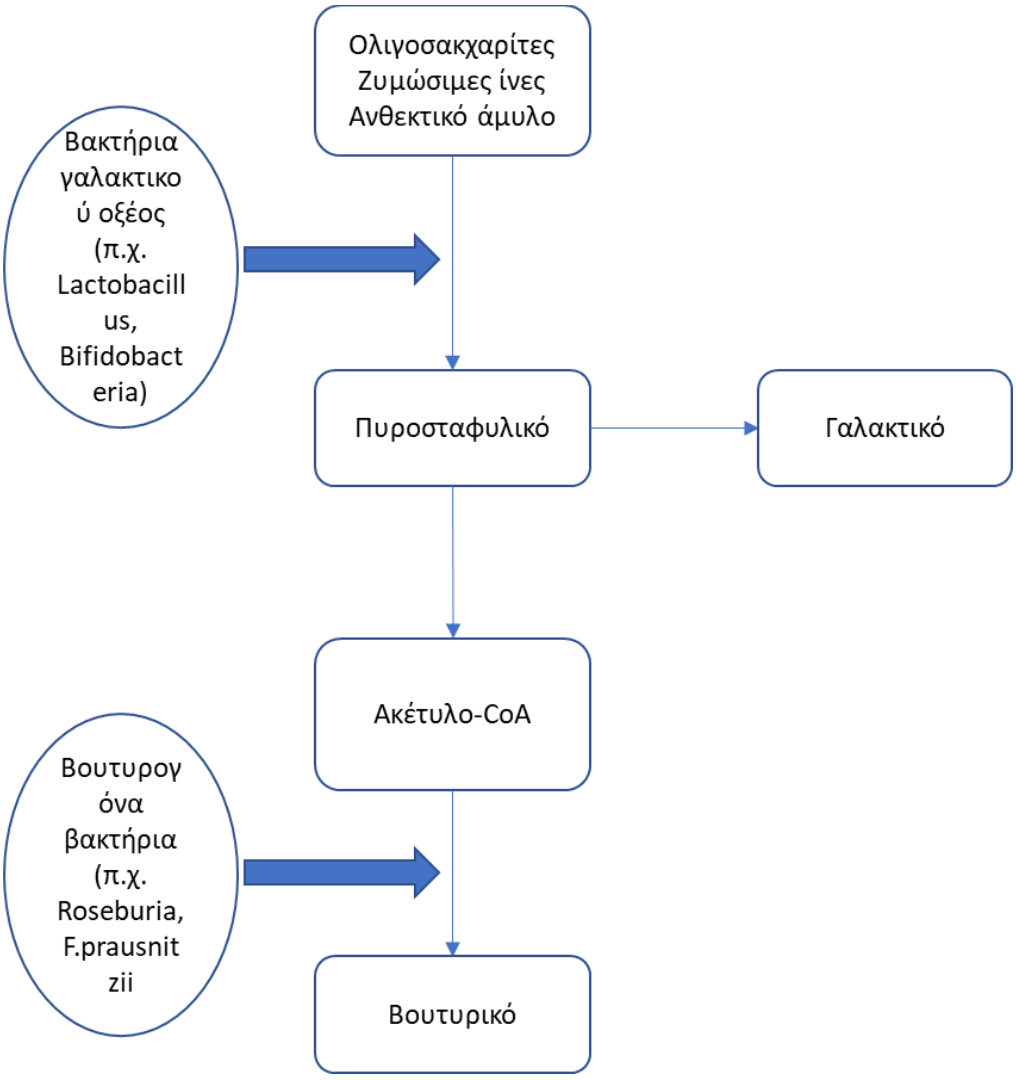
Έχει μελετηθεί με βάση τα αποτελέσματα καλλιέργειας κοπράνων ότι η ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα περιέχει περίπου 5000 είδη. Ωστόσο, ο προσδιορισμός αυτού του πληθυσμού με χρήση της καλλιέργειας έχει σοβαρούς περιορισμούς. Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών ανάλυσης όπως η ανάλυση γονιδιακής αλληλουχίας 16S rRNA έδειξε ότι περίπου το 60-80% των αλληλουχιών δεν ταυτοποιούνται με γνωστά καλλιεργημένα είδη βακτηρίων. Έτσι, μια σημαντική αναλογία των άφθονων αριθμητικά βακτηριδίων εντός του εντέρου παραμένουν άγνωστα ή ανώνυμα. Αν και η ανάλυση ακολουθίας γονιδίου 16S rRNA είναι χρήσιμη στην ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών, δεν παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με τη φυσιολογία ή το μεταβολισμό των βακτηρίων. Νεότερες τεχνικές που περιλαμβάνουν την αλληλούχιση γονιδιώματος των μικροβιακών πληθυσμών μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες, επειδή καθιστούν δυνατή την ταυτοποίηση ορισμένων βακτηριακών γονιδίων που κωδικοποιούν μεταβολικές λειτουργίες. Αυτό έχει οδηγήσει στην αναλυτική τεχνική που ονομάζεται Λειτουργική Μεταγενομική.

Η παρουσία ενός "πυρήνα μικροχλωρίδας"(δηλαδή ενός σταθερού μικροβιακού πληθυσμού) έχει προταθεί από τους Arumagam et al. στον οποίο το μικροβιακό φορτίο του ανθρώπινου εντέρου κατηγοριοποιείται σε τρεις διακριτούς τύπους ή "εντεροτύπους". Καθένας από τους τρεις εντεροτύπους μπορεί να ταυτοποιηθεί με μεταβολή στα επίπεδα ενός από τα τρία κύρια γένη: γένος *Bacteroides*, (εντερότυπος 1), γένος *Prevotella* (εντεροτύπος 2) και γένος *Ruminococcus* (εντερότυπος 3). Ακολούθως, διαπιστώθηκε ότι οι «οικότυποι» θα μπορούσαν να είναι πιο ακριβής ομαδοποίηση από τους εντερότυπους, λόγω της μεταβολής του μικροβιακού πληθυσμού καθ’ όλη την γαστρεντερική οδό. Το 2011, οι Wu et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μόνο οι εντερότυποι 1 και 2 υποστηρίζονται επαρκώς από τα δεδομένα και ότι δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για τον εντεροτύτυπο *Ruminococcus*. Παρατήρησαν επίσης ότι αυτοί οι δύο εντεροτύποι συνδέονται με μακροχρόνιες δίαιτες. Οι εντερότυποι 1 *(Bacteroides)* ευνοούνται με δίαιτες πλούσιες σε πρωτεΐνες και ζωικά λίπη, ενώ τα μικρόβια εντερότυπου 2 *(Prevotella)* αναπτύσσονται περισσότερο με δίαιτες απλών υδατανθράκων. Ωστόσο, η ύπαρξη και η βιολογική σημασία των διακριτών εντεροτύπων αποτέλεσε αντικείμενο πολυάριθμων συζητήσεων μεταξύ ερευνητών, καταλήγοντας στην υιοθέτηση της έννοιας της συνεχούς λειτουργικότητας των ειδών παρά εκείνης των διακριτών τύπων. Μελέτες σε ανθρώπους έχουν

δείξει ότι οι μικροβιακές κοινότητες του εντέρου είναι άκρως μεταβλητές με την πάροδο του χρόνου. Μια μακροχρόνια μελέτη τεσσάρων σημείων στον ανθρώπινο οργανισμό απέδειξε έντονη μεταβλητότητα εντός μηνών, εβδομάδων, ακόμη και ημερών. Αυτό υποδηλώνει ότι δεν υπήρχε κάποιος πυρήνας μικροβίων σε μεγάλη αφθονία. Αντί να κατηγοριοποιήσουμε την εντερική μικροχλωρίδα με βάση κριτήρια μορφολογίας ή καλλιέργειας, μπορεί να είναι πιο χρήσιμο να συνδέσουμε τη μικροβιακή σύνθεση με τη λειτουργία. Επομένως, αν και ο πληθυσμός μεμονωμένων βακτηριδιακών ειδών μπορεί να παρουσιάσει χρονική διακύμανση, ομάδες βακτηριδίων που μοιράζονται μια κοινή μεταβολική λειτουργία διατηρούνται πιο σταθερές. Έτσι, οι λειτουργικές ιδιότητες μιας βακτηριακής κοινότητας μπορούν να διατηρηθούν παρά τις αλλαγές στα επιμέρους μικροβιακά είδη.

Μια υγιεινή διατροφή καταλύει την ανάπτυξη μικροβίων ευεργετικών για τον ξενιστή. Ένα από τα βασικά συστατικά μιας υγιεινής διατροφής είναι η περιεκτικότητα σε ορισμένες ουσίες που τροφοδοτούν και συντηρούν τα επιθυμητά, μη παθογόνα μικρόβια στο παχύ έντερο. Βασικά μέλη αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν όσα τρόφιμα περιέχουν ίνες και ανθεκτικά άμυλα, όπως αυτά που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια ή το σκόρδο. Αυτές οι τροφές ανθίστανται σε πολλαπλά πεπτικά ένζυμα που περιέχονται στις εκκρίσεις του σάλιου, του γαστρικού υγρού και του παγκρέατος. Συνεπώς, δε χωνεύονται στο λεπτό έντερο αλλά υφίστανται ζύμωση και περαιτέρω μεταβολισμό. Οι ζυμώσιμες ουσίες όπως οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες ή η ινουλίνη διατίθενται επίσης ως συμπληρώματα διατροφής, κυρίως σε δίαιτες ενίσχυσης της μικροχλωρίδας του εντέρου.

Η μεταβολική διασταυρούμενη σίτιση είναι ένα φαινόμενο στο οποίο ένα είδος ζει και πολλαπλασιάζεται αξιοποιώντας τα προϊόντα ενός άλλου είδους σε μια συμβιωτική σχέση. Διαλυτές (π.χ. ολιγοσακχαρίτες), μη διαλυτές ίνες (π.χ. κυτταρίνη) και ανθεκτικό άμυλο αποφεύγουν την πέψη στο λεπτό έντερο -όπως προαναφέρθηκε- αλλά ζυμώνονται με σακχαρολυτικά βακτήρια όπως οι *Lactobacillus* ή *Bifidobacterium* στο έντερο προς σχηματισμό πυροσταφυλικού και γαλακτικού οξέος (*Σχήμα 1*). Τα βουτυρικά και άλλα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA-Shorta Chain Fatty Acids) συντίθενται από πυροσταφυλικό με αναερόβια βακτήρια, με τους κύριους παραγωγούς βουτυρικού να είναι τα στελέχη του *Clostridium clusters XIVa* και *IV* (π.χ. *Roseburia* και *Faecalibacterium prausnitzii*). Έτσι, η άμεση πυροδότηση της ζύμωσης από ορισμένα τρόφιμα και τα πρεβιοτικά συμπληρώματα μπορεί να οδηγήσουν έμμεσα σε αυξημένο σχηματισμό βουτυρικού. Στους ανθρώπους, το βουτυρικό είναι η προτιμώμενη πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Το βουτυρικό επηρεάζει επίσης την γονιδιακή έκφραση και αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα NFkB, οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών και έχοντας επακόλουθη αντιφλεγμονώδη δράση. Τα κλύσματα βουτυρικού έχουν χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά σε ασθενείς με περιφερική ελκώδη κολίτιδα. [9]



Σχήμα 1: Ζύμωση διαλυτών, μη διαλυτών ινών και ανθεκτικού αμύλου από προβιοτικά μικρόβια.

1.2.5 Ποικιλομορφία εντερικού μικροβιώματος ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση

Η διαφοροποίηση στις διατροφικές συνήθειες συνιστά μια επαρκή εξήγηση για την ισχυρή επιρροή που έχει η γεωγραφική προέλευση στη σύνθεση των μικροβιακών πληθυσμών του γαστρεντερικού συστήματος. Έχει αποδειχθεί ότι ο εντεροτύπος *Bacteroides* αυξάνεται στα έντερα των ανθρώπων που ζουν στις δυτικές χώρες ακολουθώντας μια διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και πρωτεΐνες, ενώ ο εντερότυπος Prevotella είναι περισσότερο συνηθισμένος στις μη δυτικές χώρες, όπου ο πληθυσμός καταναλώνει πολλές ίνες. Αυτή η αντίθεση στη σύνθεση των μικροβιωμάτων του εντέρου έχει επίσης αναφερθεί από ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποίησαν πολλαπλή πυροαλληλούχιση των V5 και V6 υπερ-μεταβλητών περιοχών του γονιδίου του 16S rRNA για τη σύγκριση των μικροβίων του εντέρου παιδιών της Ιταλίας (Ευρώπης) και της Μπουρκίνα Φάσο (Αφρικής). Αναφέρθηκε πλεονασμός σε *Bacteroidetes, Actinobacteria* και *Enterobacteriaceae (Shigella* και *Escherichia)* στα παιδιά της Μπουρκίνα Φάσο, ενώ τα *Firmicutes* ήταν πιο επικρατή σε εκείνα από την Ιταλία. Επιπλέον, τα γένη *Prevotella, Xylanibacter (Bacteroidetes)* και *Treponema (Spirochaetes)* βρέθηκαν μόνο στη

Μπουρκίνα Φάσο. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η συγκεκριμένη γεωγραφική διαφορά στον εντερικό μικροβιακό πληθυσμό οφείλεται στη διαφοροποίηση των διατροφικών συνηθειών μεταξύ της σύγχρονης δυτικής και της αγροτικής διατροφής στην Ιταλία (και γενικά στην Ευρώπη) και τη Μπουρκίνα Φάσο (και γενικά στην Αφρική και Ασία) αντίστοιχα [60]. Επιπλέον, έχει διερευνηθεί η σύνθεση των μικροβίων του εντέρου σε άτομα από την Κορέα, την Ιαπωνία και την Αμερική. Εξήχθη το συμπέρασμα ότι η ποσότητα της μικροβιακής κοινότητας των κοπράνων κυμαινόταν από τη μια γεωγραφική περιοχή στην άλλη. Σε επίπεδο φυλών, τα *Firmicutes* (61,0%) ήταν επικρατέστερα στον αμερικανικό πληθυσμό από ό, τι σε άλλες χώρες (55,6%), ενώ τα *Actinobacteria* κατείχαν ποσοστό 22.1 % στους Ιάπωνες, έναντι 2.5% στα υπόλοιπα άτομα και τα *Bacteroidetes* παρουσιάζονταν σε ποσοστά 30.2% και 36.6% σε κορεάτικα και ιαπωνικά άτομα, αντίστοιχα, και σε ποσοστό 18,2% στους Αμερικανούς. Σε επίπεδο γένους, το *Bifidobacterium* (20.6%) και το *Clostridium* (10.3%) έδειξαν υψηλότερη αφθονία στην ιαπωνική ομάδα, ενώ το γένος *Bacteroides* (30.3%) ήταν υψηλότερο στην Κίνα συγκριτικά με άλλες χώρες.[10]

1.2.6 Είδη προβιοτικών μικροοργανισμών

Η πληθώρα των προβιοτικών στελεχών που έχουν αναγνωριστεί ως προς την συνεισφορά τους στην καλύτερη υγεία των ανθρώπων ανήκουν στα γένη των *Lactobacillus* (γαλακτοβακίλλων) και των *Bifidobacteria*. Υπάρχουν, ωστόσο, και άλλα είδη όπως οι λακτόκοκκοι, εντερόκοκκοι, σακχαρομύκητες και προπιονικά βακτήρια που έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά είδη. Τα κυριότερα είδη προβιοτικών μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 1: Είδη προβιοτικών μικροοργανισμών.

Βακτήρια	*Lactobacillus*	*Lactobacillus acidophilus, L. gasseri, L. johnsonii, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L.helveticus, L. paracasei ssp. paracasei, L. casei, L. plantarum, L. rhamnosus, L. curvatus, L. brevis, L. fermentum, L. reuteri, L. cellobiosus*
	Lactococcus	*Lactococcus lactis ssp. lactis, Lc. lactis ssp. cremoris*
	Streptococcus	*Streptococcus thermophilus*
	Enterococcus	*Enterococcus faecium, E. faecalis*
	Pediococcus	*Pediococcus acidilactici*
	Bifidobacterium	*Bifidobacterium bifidum, B. infantis, B. longum, B. breve, B. adolescentis*
	Propionibacterium	*Propionibacterium freudenreichii*
Ζύμες	*Saccharomyces*	*Saccharomyces cerevisiae, S. boulardii*

<u>Γαλακτικά βακτήρια</u>

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι οι πιο σημαντικοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί που συνδέονται συνήθως με το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα. Είναι μια ομάδα βακτηρίων με παρόμοιες ιδιότητες και κύριο χαρακτηριστικό τους την παραγωγή γαλακτικού οξέος μέσω της ζύμωσης των υδατανθράκων. Στην κατηγορία των γαλακτικών βακτηρίων ανήκουν τα γένη *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus* κ.α.), *Tetragenococcus, Weissella, Lactococcus και Vagcoccus*.

Τα γαλακτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται ως μεσόφιλα, ωστόσο μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες 5^{o} C ως 45^{o}C. Το pH για την ανάπτυξη της πλειοψηφίας των βακτηρίων αυτής της κατηγορίας κυμαίνεται 4,0 -6,5 ενώ κάποια είδη μπορούν να αναπτυχθούν και σε χαμηλότερο ή υψηλότερο pH. Τα βακτήρια αυτά, έχουν ασθενή λιπολυτική και πρωτεολυτική ικανότητα. Η ανάπτυξη τους γίνεται παρουσία βιταμινών αμινοξέων και βάσεων πουρίνης και πυριμιδίνης, και για το λόγο αυτό τα μέσα στα οποία καλλιεργούνται περιέχουν πεπτόνη , εκχύλισμα ζύμης, διάφορα ιχνοστοιχεία και υδατάνθρακα ως πηγή ενέργειας.

Τα γαλακτικά βακτήρια σχηματίζουν μικρές αποικίες ανεξάρτητα από την αφθονία των απαραίτητων συστατικών του μέσου ανάπτυξης τους, ενώ χαρακτηρίζονται από υψηλή ανεκτικότητα στα οξέα. Η ικανότητα τους να παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος και να αντέχουν υπό αυτές τις συνθήκες αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα των γαλακτικών βακτηρίων έναντι των άλλων βακτηρίων.

Υπάρχουν δύο είδη γαλακτικών βακτηρίων, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά. Τα ομοζυμωτικά βακτήρια γλυκολύουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ. Χαρακτηριστικά ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια είναι τα γένη των *Streptococcus, Lactobacillus, Lactococcus* και *Pediococcus*. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια οξειδώνουν τις εξόζες προς πεντόζες (τη γλυκόζη σε ριβόζη) και έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος σε ίσα μέρη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* και μερικά στελέχη του *Lactobacillus spp*.

Η χρήση των γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων, συμβάλλει στη συντήρηση των τροφίμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα (λόγω μείωσης του pH από την παραγωγή γαλακτικού οξέος), στη βελτίωση της γεύσης, του αρώματος και της υφής των προϊόντων. Ορισμένα γαλακτικά βακτήρια παράγουν διάφορα παράγωγα πολυσακχαριτών τα οποία συμβάλλουν στη διαμόρφωση της υφής των ζυμωμένων τροφίμων και κυρίως των γιαουρτιών.

Γένος *Lactobacillus*

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι γηγενή βακτήρια της βλεννογόνου μεμβράνης των ανθρώπων και ζώων, της στοματικής κοιλότητας, του εντέρου ή του κόλπου. Οι οργανισμοί αυτοί είναι μικροαναερόβιοι ή αναερόβιοι, οξυάντοχοι ή οξύφιλοι. Γενικά, οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν περίπλοκες διατροφικές απαιτήσεις διότι απαιτούν μικρή ποσότητα οξυγόνου, υδατάνθρακες επιδεκτικούς για ζύμωση, πρωτεΐνες και αμινοξέα, βιταμίνες της Β-ομάδας, παράγωγα νουκλεϊκών οξέων, ακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα, και μέταλλα όπως μαγνήσιο, μαγγάνιο και σίδηρο. Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι ανθεκτικοί στις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα και ταυτόχρονα διαθέτουν τεχνολογικό δυναμικό, για αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως ως προβιοτικά. Ορισμένα από τα πιο γνωστά γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι τα εξής: *L.acidophilus, L.amylovorous, L.casei, L.crispatus, L.delbrueckii, L. gasseri, L.johnsonoo, L.paracasei, L.plantarum, L.reuteri* και *L.rhamnosus*.[11]

Η πιθανή ευεργετική επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στον άνθρωπο τεκμηριώνεται με την πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών. Αν και υπάρχει πληθώρα δεδομένων που αφορούν την ευεργετική δράση των *Lactobacillus*, τα περισσότερα από αυτά προέρχονται από in vitro δοκιμές και από δοκιμές σε ζώα, ενώ αντιθέτως λίγες τυχαιοποιημένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί στον άνθρωπο. Η ανάλυση και αξιολόγηση των κλινικών ερευνών των *Lactobacillus* όπως και των υπόλοιπων προβιοτικών, που έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα, παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες. Ποικιλία παραμέτρων, όπως η διαφορετική δόση και βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών, οι διαφορές των υπό μελέτη πληθυσμών του ανθρώπου καθώς και οι διαφορές στα προβιοτικά στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί,

δυσκολεύει την ερμηνεία των κλινικών δοκιμών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μετά- ανάλυσης των κλινικών αυτών δοκιμών τεκμηριώνουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των *Lactobacillus* ως προφυλακτικό ή θεραπευτικό παράγοντα για την αντιμετώπιση των γαστρεντερικών επιμολύνσεων, των φλεγμονωδών διαταραχών και των αλλεργιών στα τρόφιμα.[1]

Πίνακας 2: Θεραπευτικές και προφυλακτικές ιδιότητες των Lactobacillus.

Στέλεχος μικροοργανισμού	Κλινική μελέτη που τεκμηριώνει προβιοτική δράση
L. casei Shirota	Βελτίωση της θεραπείας της δυσκοιλιότητας
L. casei DN114 001	Μικρότερη διάρκεια των χειμερινών λοιμώξεων σε άτομα μεγάλης ηλικίας
L. rhamnosus GG	Βελτίωση της θεραπείας της διάρροιας και αντιμετώπιση της ατοπίας
L. rhamnosus HN001	Ενίσχυση της ανοσίας των ηλικιωμένων ατόμων όπως αυτή προσδιορίζεται από την αύξηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων του αίματος, έπειτα από τη χορήγηση του προβιοτικού επί 3 εβδομάδες
L. rhamnosus 19070-2* και *L. reuteri DSM 12246	Περιορισμός της οξείας διάρροιας σε παιδιά
L. rhamnosus GR-1* και *L. reuteri RC-14	Περιορισμός και καλύτερη αντιμετώπιση των ουρογεννητικών επιμολύνσεων σε γυναίκες που λάμβαναν στοματικά τα παρασκευάσματα των προβιοτικών για 2 μήνες
L. plantarum 299V	Μείωση των περιστατικών επιμόλυνσης των ασθενών με μεταμόσχευση ήπατος
L. acidophilus La5	Καταστολή του *Helicobacter pylori*, έπειτα από τη χορήγηση γιαουρτιού με La5 και B.lactis BB12 2 φορές την ημέρα, επί 15 ημέρες
L. acidophilus L1	Ζυμωμένο γάλα που περιείχε το συγκεκριμένο μικροοργανισμό προκάλεσε μείωση της χοληστερόλης του ορού

L. paracasei LP-33	Βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα

Γένος *Bifidobacterium*

Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί περίπου 30 είδη *Bifidobacteria* από ανθρώπους, ζώα, έντομα και από το περιβάλλον. Σε ένα ενήλικο άτομο το *Bifidobacterium ssp.* είναι ένα από τα πιο χαρακτηριστικά και πολυπληθέστερα βακτήρια που αποικίζουν το παχύ έντερο, ενώ στελέχη των *Bifidobacteria* έχουν εντοπιστεί στη στοματική κοιλότητα και το γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων και ζώων. Τα πιο γνωστά είδη που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι : *B.adolescentis, B.animalis, B.bifidum, B. Breve, B. infantis, B. Lactis* και *B.longum*.

Τα *Bifidobacteria* είναι θετικά κατά Gram, ραβδόμορφοι, υποχρεωτικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μη κινητοί , αρνητικοί στην καταλάση. Το βέλτιστο pH ανάπτυξης τους κυμαίνεται μεταξύ 6 και 7, ενώ ουσιαστικά δεν αναπτύσσονται σε pH 4.5-5.0 και χαμηλότερες τιμές, ούτε σε pH μεγαλύτερο από 8.0. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι 37-41^{o} C. Κατά τη ζύμωση των υδατανθράκων παράγουν κυρίως οξικό και γαλακτικό οξύ. Τα *Bifidobacteria* είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο, έχουν υψηλές διατροφικές απαιτήσεις, για το λόγο αυτό η χρήση τους είναι περιορισμένη συγκριτικά με τους γαλακτοβάκιλλους. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ημισυνθετικό μέσο που περιέχει μόνο λακτόζη, τρία ελεύθερα αμινοξέα (κυστεΐνη, γλυκίνη και τρυπτοφάνη), διάφορες βιταμίνες και νουκλεοτίδια, καθώς και ορισμένα μέταλλα. Ορισμένα στελέχη του *Bififobacteria* έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει άζωτο ως ιόν αμμωνίου, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη του απαιτούν άζωτο από οργανικές πηγές.[11]

Ζύμες ως προβιοτικά

Παρόλο που οι ζύμες αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων το ενδιαφέρον για τη χρήση τους σε διατροφικά πρόσθετα ή προβιοτικά σκευάσματα είναι περιορισμένο και μόλις τα τελευταία χρόνια άρχισε να αναπτύσσεται. Ιστορικά οι ζύμες ως προβιοτικά έχουν συνδεθεί με τις τροφές ζώων που αναπτύσσονται σε φάρμες. Ιδιαίτερα έχουν χρησιμοποιηθεί οι ζύμες του γένους *Saccharomyces* στη βιομηχανία ζωοτροφών για βοοειδή, γουρούνια και πουλερικά.

Η πιθανή χρήση των ζυμών ως προβιοτικά ενισχύεται και από το γεγονός ότι οι ζύμες, κυρίως του είδους *S. cerevisiae*, μπορούν και επιβιώνουν στις αντίξοες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα και παρουσιάζουν φυσική ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Οι άνθρωποι στην καθημερινή δίαιτά τους καταναλώνουν αυξημένες ποσότητες ζυμών χωρίς βλαβερές συνέπειες για τον οργανισμό. Οι ζύμες δεν αποτελούν απειλητικούς μολυσματικούς παράγοντες αλλά συγκεκριμένα στελέχη, τα οποία εμφανίζονται συχνά στα τρόφιμα *(Saccharomyces cerevisiae, Pischia, Candida, Kluyveromyces)* μπορεί να γίνονται περιστασιακά

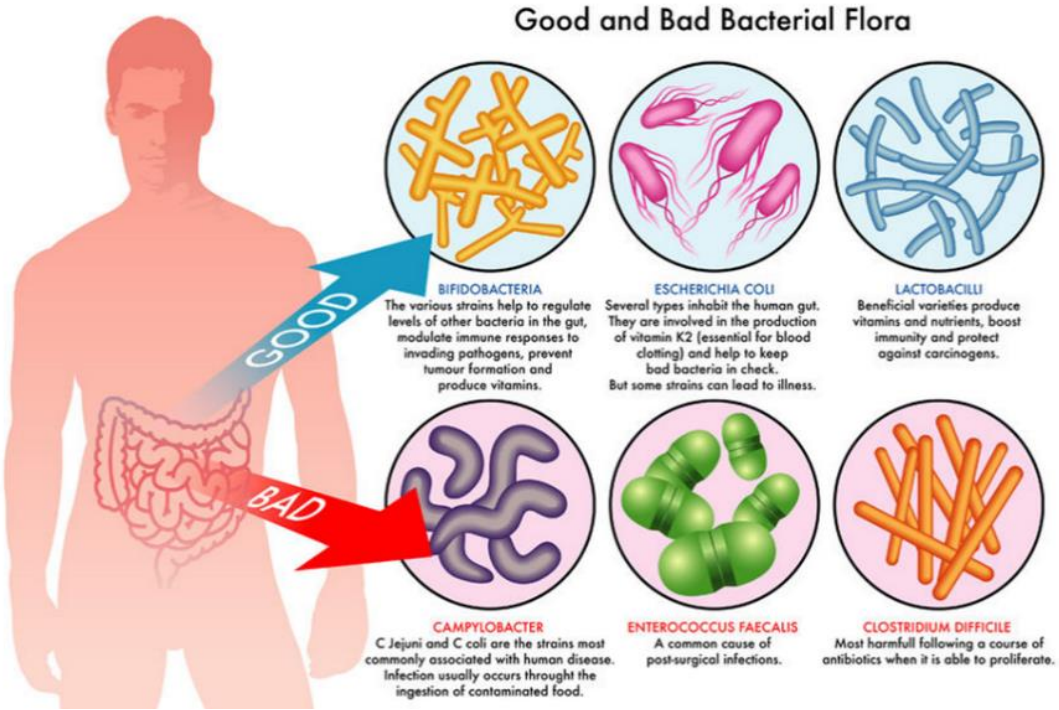
παθογόνα και ορισμένα άτομα μπορεί να εμφανίσουν υπερευαισθησία του ανοσοβιολογικού συστήματος σε αυτά. Παράγοντες που προδιαθέτουν για λοίμωξη από ζύμες είναι:

α) φυσικοί παράγοντες όπως ενδοκρινικές δυσλειτουργίες, νεοπλασίες, μικροβιακές ασθένειες

β) διατροφικοί παράγοντες όπως διατροφή πλούσια σε σάκχαρα και με έλλειψη σιδήρου και βιταμινών

γ) μηχανικοί παράγοντες όπως εγκαύματα και προσθετικά δοντιών

δ) νοσοκομειακοί παράγοντες όπως ανοσοκαταστολή, θεραπεία με αντιβιοτικά, χειρουργικές επεμβάσεις, χρήση καθετήρων και μολύνσεις από ιούς όπως ο HIV ιός. [12]



Εικόνα 2: Τα είδη των προβιοτικών μικροοργανισμών.

1.2.7 *Streptococcus thermophilus*- Επιλεγμένο είδος προβιοτικού βακτηρίου

Ο *Streptococcus thermophilus* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο που αναπτύσσεται σε ωοειδή κύτταρα, τα οποία εμφανίζονται σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Πρόκειται για θερμόφιλο βακτήριο με σύνηθες εύρος ανάπτυξης τους 35-42 ^{o}C και βέλτιστη θερμοκρασία τους 37° C. Είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, που ανήκει στα γαλακτικά βακτήρια (LAB-Lactic Acid Bacteria). Ο *S. thermophilus* κατατάσσεται στην ομάδα των μικροοργανισμών *salivarius* που περιέχει επίσης τους *S. salivarius* και *S. vestibularis*. Το γονιδίωμα του *S. thermophilus* αποτελείται από 1.8 Mb, δηλαδή 1.8 εκατομμύρια βάσεις, καθιστώντας το μεταξύ των μικρότερων γονιδιωμάτων, σε σύγκριση με άλλα LAB και άλλα στελέχη του γένους *Streptococcus*. Γενετικές μελέτες δείχνουν ότι ο *S. thermophilus* διαφοροποιήθηκε από τα υπόλοιπα παθογόνα είδη *Streptococcus* πριν από περίπου 7000 χρόνια. Δεδομένου ότι το είδος *S. thermophilus* απέκλινε από τους παθογόνους συγγενείς του, έχει απωλέσει τα περισσότερα

από τα γονίδια που ευθύνονται για τη λοιμογόνο δράση, ενώ έχει αποκτήσει αρκετά χρήσιμα γονίδια για την επεξεργασία του γάλακτος σε γιαούρτι. Η ανάλυση μεγάλου αριθμού γονιδιωμάτων *S. thermophilus* αποκαλύπτει γονίδια που αποκτήθηκαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς και κωδικοποιούν διάφορες λειτουργίες, όπως η βιοσύνθεση της βακτηριοσίνης, οι αντλίες εκροής/πρόσληψης συστατικών, η πρωτεάση του κυτταρικού περιβλήματος και η παραγωγή πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσληψη πεπτιδίων και τη βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών.

Ο *S. thermophilus* είναι το μόνο είδος του γένους *Streptococcus* που χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων. Καταναλώνεται από τον άνθρωπο για αιώνες χωρίς να προξενεί καμία ασθένεια, κι έτσι είναι το μόνο είδος *Streptococcus* που έχει επισημανθεί ως GRAS (Generally Recognized as Safe) βακτήριο από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ο *S. thermophilus* είναι ένα από τα βασικά βακτήρια που συμμετέχουν στη μαγιά του γιαουρτιού και αποτελεί το δεύτερο σημαντικότερο είδος των βιομηχανικά χρησιμοποιούμενων LAB, μετά το *Lactococcus lactis*. Εκτός από την παραδοσιακή χρήση του *S. thermophilus* στην παρασκευή του γιαουρτιού, χρησιμοποιείται επίσης στην παραγωγή αρκετών ποικιλιών τυριών όπως το emmental, το camembert, το brie, η mozzarella και η παρμεζάνα. Στην παραγωγή του γιαουρτιού, ο κύριος ρόλος του S. thermophilus είναι η ταχεία οξίνιση που οφείλεται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, αλλά και η παραγωγή δευτερογενών προϊόντων ζύμωσης, όπως το μυρμηγκικό, η ακεταλδεϋδη ή το διακετύλιο, τα οποία συνεισφέρουν στο άρωμα και στην υφή των προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση. Στη μαγιά του γιαουρτιού, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του *S. thermophilus* και του *Lb. bulgaricus* περιγράφονται ως πρωτο-συνεργατικές, δηλαδή εμφανίζεται μια συμβιωτική σχέση μεταξύ των δύο ειδών. Ο *S. thermophilus* παράγει CO_2 και μυρμηγκικό οξύ, ενώσεις που διεγείρουν την ανάπτυξη του *Lb. bulgaricus*, ενώ παράλληλα ο *Lb. bulgaricus* υδρολύει τις πρωτεΐνες γάλακτος απελευθερώνοντας πεπτίδια και αμινοξέα που βελτιώνουν την ανάπτυξη του *S. thermophilus*. Στη βιομηχανία τυριού, ο *S. thermophilus* χρησιμοποιείται κυρίως για τον εξευγενισμό σκληρών τυριών μέσω της παραγωγής αρωματικών ενώσεων από αμινοξέα, χάρη στη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού.

1.2.8 Ποσοτικοποίηση προβιοτικών βακτηρίων

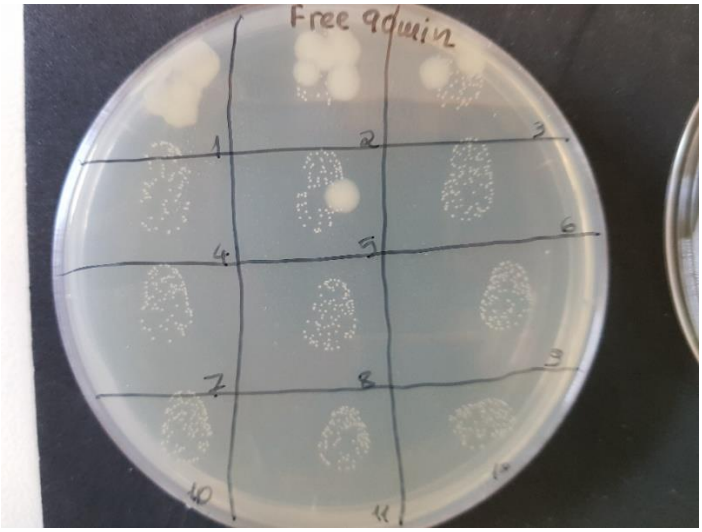
Η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων σε ένα δεδομένο δείγμα επιτυγχάνεται συνήθως με την καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των μονάδων που σχηματίζουν αποικίες, οι οποίες αναπτύσσονται σε άγαρ. Ωστόσο, αυτή η τεχνική δεν είναι η ενδεδειγμένη, διότι προσμετρούνται μόνο τα κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες κάτω από τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Η πιο αξιόπιστη μέθοδος ποσοτικοποίησης είναι η μέτρηση αποικιών σε πλάκα, καθώς βρέθηκε ότι παράγοντες όπως το μέγεθος των αποικιών και κατ' επέκταση ο αριθμός των αποικιών ανά πλάκα, διέφεραν ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τεχνική της καταμέτρησης σε πλάκες βασίζεται σε ένα σχετικά περιορισμένο εύρος τιμών, που γενικά θεωρείται ότι είναι 25-250 CFU βακτήρια σε ένα τυπικό τρυβλίο Petri. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή δεν υποστηρίζει ακριβείς, αναπαραγωγήσιμες εκτιμήσεις των κυτταρικών πυκνοτήτων προβιοτικών στελεχών, ειδικά σε μικτές καλλιέργειες.

Πέρα από τα παραπάνω, έχουν προταθεί και εναλλακτικές μέθοδοι για την ακριβή καταμέτρηση των προβιοτικών στελεχών. Οι τεχνικές ποσοτικού προσδιορισμού του συνόλου των προβιοτικών βακτηρίων στηρίζονται στην χρήση χρωστικών για τη διαφοροποίηση ζωντανών και νεκρών κυττάρων με άμεση παρατήρηση, καθώς και στη μέτρηση της παρουσίας μίας ακέραιης κυτταρικής μεμβράνης. Παράλληλα, μέσο καταμέτρησης μπορεί να είναι κάποια πτυχή της μεταβολικής δραστηριότητας, όπως η σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων , ή αναπνοή. Οι παραπάνω παράμετροι υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα είναι ζωντανά ακόμη και αν δεν είναι ικανά να αναπτυχθούν σε αποικίες σε μέσα καλλιέργειας. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι τεχνικές αυτές:

- **Απεικόνιση με τη χρήση φθοριζουσών ουσιών:** Τα βακτήρια σε ένα δείγμα μπορούν να παρατηρούνται απευθείας με τη βοήθεια μικροσκοπίου, αλλά η απαρίθμηση βιώσιμων μικροβίων απαιτεί διαφοροποίηση ζωντανών και νεκρών βακτηρίων. Η άμεση μέτρηση του επιφθορισμού με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού, έχει περιγραφεί ως μια κατάλληλη μέθοδος για την απαρίθμηση των συνολικών βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτή η τεχνική μπορεί να έχει αξία για την ταχεία εκτίμηση βιώσιμων βακτηρίων σε ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα.
- **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR):** Η ανίχνευση αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (DNA, mRNA και rRNA) είναι μια μοριακή τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί στον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων. Οι περισσότερες μοριακές αναλύσεις στοχεύουν στην ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος για μεγιστοποίηση της αναλυτικής ευαισθησίας. Η ενίσχυση DNA με PCR διερευνήθηκε για καταμέτρηση των ζωντανών προβιοτικών με βάση την υπόθεση ότι το DNA θα αποικοδομηθεί ταχύτερα μετά από κυτταρικό θάνατο από άλλα κυτταρικά συστατικά και ότι ανέπαφες ακολουθίες DNA υποδηλώνουν βιωσιμότητα των κυττάρων. Ωστόσο, η παρουσία του DNA δεν υποδεικνύει απαραίτητα βιωσιμότητα, αν και η ανίχνευση μακρύτερων άθικτων ακολουθιών DNA συσχετίζεται περισσότερο με τη βιωσιμότητα από τις βραχύτερες αλληλουχίες.
- **Κυτταρομετρία ροής (FC-Flow Cytometry):** Η τεχνική επιτρέπει ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση φυσικών και / ή χημικών χαρακτηριστικών έως και χιλιάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Πρώτο στάδιο αποτελεί η επισήμανση της κυτταρικής επιφάνειας ή των συστατικών της με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ευθυγραμμίζονται ώστε να περνούν χωριστά μέσω δέσμης λέιζερ. Τέλος, διεγείρονται με λέιζερ και έτσι τα φθορίζοντα μόριά τους εκπέμπουν φως σε διάφορα μήκη κύματος. Η φθορίζουσα ποσότητα και ο τύπος υποδεικνύει το ποσοστό διαφόρων κυτταρικών τύπων ή κυτταρικών συστατικών που υπάρχουν στο δείγμα. Το FC επιτρέπει την εξέταση ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων κάθε φορά (200 έως 2000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο), καταγράφοντας, για κάθε κύτταρο, αρκετές διαφορετικές παραμέτρους που μπορούν αργότερα να συνδεθούν με μια ευρεία ποικιλία κυτταρικών χαρακτηριστικών. Η τεχνική αυτή μειώνει σημαντικά τον χρόνο που απαιτείται για τον

προσδιορισμό του αριθμού, του μεγέθους και της μεταβολικής δραστηριότητας των προβιοτικών στελεχών. [13]

- **Καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία:** Υπάρχουν διάφοροι τρόποι να μετρηθεί ο αριθμός των μικροβίων σε ένα δείγμα. Η απαρίθμηση των ζωντανών κυττάρων σε τρυβλία επιτρέπει την ταυτοποίηση του αριθμού των αναπτυσσόμενων/ενεργά διαιρούμενων κυττάρων σε ένα δείγμα. Η μέθοδος μέτρησης αποικιών βασίζεται σε μικροοργανισμούς που αναπτύσσουν αποικίες σε καθορισμένο θρεπτικό μέσο, το οποίο περιέχει τις απαραίτητες πηγές αζώτου, άνθρακα, βιταμινών, άλατα, το άγαρ (πολυμερές που απομονώνεται από φύκη και λειτουργεί ως πηκτικό μέσο) και διαθέτει ρυθμισμένο pH. Κάθε αποικία καθίσταται ορατή με γυμνό οφθαλμό, ενώ ο αριθμός των αποικιών σε μια πλάκα μπορεί να μετρηθεί. Για να είναι αποτελεσματική η καταμέτρηση, η αραίωση του αρχικού δείγματος πρέπει να επιλεχθεί κατάλληλα, έτσι ώστε να αναπτυχθούν κατά μέσο όρο μεταξύ 30 και 300 αποικιών του μικροβίου-στόχου. Αυτή η συνθήκη πρέπει να ισχύει, διότι λιγότερες από 30 αποικίες καθιστούν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων στατιστικά επισφαλή, ενώ περισσότερες από 300 αποικίες οδηγούν συχνά σε αλληλοεπικαλύψεις και ασάφειες στην καταμέτρησή τους. Για να εξασφαλιστεί ότι θα παραχθεί κατάλληλος αριθμός αποικιών, πραγματοποιούνται αρκετές αραιώσεις της βιομάζας πριν το στρώσιμο του τρυβλίου. Επίσης, κάθε τρυβλίο μπορεί να διαιρεθεί σε επιμέρους τμήματα, σε καθένα από τα οποία θα γίνει ο εμβολιασμός συγκεκριμένης αραίωσης. Η εργαστηριακή διαδικασία περιλαμβάνει τη διενέργεια σειριακών αραιώσεων του αρχικού μικροβιακού δείγματος (π.χ. 1:10, 1:100, 1:1000 κ.λ.π.) σε αποστειρωμένο νερό ή σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα και την καλλιέργεια αυτών σε θρεπτικό υλικό με άγαρ σε ένα κλειστό δισκίο, το οποίο επωάζεται στην βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του εκάστοτε μικροοργανισμού. Μια τυπική επώαση για βακτήρια πραγματοποιείται στους 37 ˚ C για 24 ώρες. Στα συστατικά του θρεπτικού υλικού περιλαμβάνονται αρκετές φορές αντιδραστήρια που αντιστέκονται στην ανάπτυξη μη επιθυμητών μικροοργανισμών και στην επακόλουθη επιμόλυνση των τρυβλίων ή και αντιδραστήρια που καθιστούν το μικροοργανισμό-στόχο εύκολα αναγνωρίσιμο (για παράδειγμα με αλλαγή χρώματος στο μέσο). Μερικές πρόσφατες μέθοδοι περιλαμβάνουν ένα φθορίζοντα παράγοντα, ούτως ώστε η μέτρηση των αποικιών να μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Στο τέλος της περιόδου επώασης, οι αποικίες μετριούνται με το μάτι. Η διαδικασία αυτή δεν είναι καθόλου χρονοβόρα και δεν απαιτεί μικροσκόπιο, καθώς οι αποικίες απέχουν μεταξύ τους μερικά χιλιοστά (mm).[14]



Εικόνα 3:Τρυβλίο για τη μέτρηση των αποικιών με τις κατάλληλες αραιώσεις.

1.2.9 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών

Τα προβιοτικά θα πρέπει να διατηρούν τη βιωσιμότητα και τη μεταβολική τους ικανότητα κατά τη διέλευση τους διαμέσου της γαστρεντερικής οδού. Για να μπορεί να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός θα πρέπει να εκπληρώνει συγκεκριμένα κριτήρια όπως:

- Να έχει γίνει ταυτοποίηση τους σε επίπεδο είδους (ή ακόμα και στελέχους) με φαινοτυπικές και γενοτυπικές μεθόδους. Η ασφαλής χρήση, οι ιδιότητες και η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών συνιστούν γνωρίσματα συγκεκριμένων μικροβιακών στελεχών, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη διάκριση σε επίπεδο στελέχους. Δεδομένου ότι οι συμβατικές φαινοτυπικές μέθοδοι παρουσιάζουν περιορισμούς ως προς την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη διακριτική τους ικανότητα, η σύγχρονη ερευνητική δραστηριότητα προτείνει το συνδυασμό διαφορετικών τεχνικών (πολυφασική ταξινόμηση) για το χαρακτηρισμό των προβιοτικών στελεχών. Για το λόγο αυτό, εφαρμόζεται ένας συνδυασμός αξιόπιστων φαινοτυπικών και γενοτυπικών μεθόδων ταυτοποίησης που προσδίδει σταθερή και σαφή ονομασία-προσδιορισμό στα στελέχη που επιλέγονται για προβιοτική χρήση. Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους χρησιμοποιούνται διεθνώς αναγνωρισμένες γενοτυπικές μέθοδοι, όπως ο υβριδισμός μεταξύ ομόλογων μορίων DNA και η ανάλυση γονιδίων ριβοσωμικού RNA. Για τη διάκριση των προβιοτικών σε επίπεδο στελέχους χρησιμοποιείται η τεχνική του τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD)- PCR καθώς και η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου (PFGE), που θεωρείται η πλέον αξιόπιστη μέθοδος.[15]
- Να αποτελεί γηγενή συστατικό του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος (ανθρώπινης προέλευσης). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από

τον πεπτικό σωλήνα υγιούς ανθρώπου θεωρούνται ασφαλέστεροι για κατανάλωση και ταυτόχρονα αποτελεσματικότεροι στην αποίκιση του γαστρεντερικού σωλήνα.[11]

- Να είναι ασφαλή για χρήση σε τρόφιμα και φαρμακευτικά σκευάσματα (έλεγχος αιμολυτικής και τοξικής δράσης, επιδημιολογικές μελέτες). Ο κίνδυνος μόλυνσης κατά την εισαγωγή ζωντανών μικροοργανισμών στη διατροφή θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν (Generally Recognized as Safe/GRAS). Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ορθή καθιέρωση κριτηρίων για την αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών για ανθρώπινη χρήση τόσο από την Ευρώπη (The European Union Novel Food regulation, QPS, and PROSAFE) όσο και από τις Η.Π.Α. (FDA and WHO), και τον Καναδά(Health Canada: NHPR). Οι συνηθέστερες συστάσεις περιλαμβάνουν τα αρχεία ιστορικού απομόνωσης, ταξινομική ταυτοποίηση και απουσία τοξικότητας, μολυσματικότητας και μεταβιβάσιμων γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά.
- Να επιβιώνουν και να διατηρούν τις ιδιότητες τους στο γαστρεντερικό σωλήνα. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη στιγμή της χορήγησης, το προβιοτικό θα πρέπει να είναι ανθεκτικό στα ένζυμα που υπάρχουν στην στοματική κοιλότητα, όπως η αμυλάση και η λυσοζύμη, αν και τα θετικά κατά gram βακτήρια είναι γενικά ευαίσθητα στη λυσοζύμη, μερικά γαλακτικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά από άλλα θετικά κατά gram βακτήρια, όντας ικανά να γίνουν τμήμα των μικροβίων της στοματικής κοιλότητας. Μετά την κατάποση τα προβιοτικά αντιμετωπίζουν αντιμικροβιακούς παράγοντες στο στομάχι (όπως είναι το χαμηλό pH και το γαστρικό οξύ) και στο έντερο (παγκρεατίνη και χολικά άλατα), ενώ επίσης υφίστανται θερμικό σοκ λόγω της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος. Τα προβιοτικά πρέπει παρουσιάζουν μηχανισμούς ανοχής σε οξέα και χολικά άλατα ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν στο έντερο. Η γαστρεντερική αντίσταση ποικίλει ανάλογα με τα είδη, για παράδειγμα το γένος των *Lactobacillus* είναι πολύ ανθεκτικός στις μεταβολές του pH, ενώ αντιθέτως το γένος των *Bifidobacteria* είναι εξαιρετικά ευαίσθητος σε χαμηλό pH, παρουσιάζοντας μικρά ποσοστά επιβίωσης σε pH 2-3. Έτσι, η ανοχή στις ανασταλτικές συνθήκες αποκλείει έναν σημαντικό αριθμό μικροοργανισμών. Η αντίσταση ενός μικροοργανισμού σε αυτές τις συνθήκες μπορεί να εξετασθεί πειραματικά καλλιεργώντας το στέλεχος που μας ενδιαφέρει σε διαφορετικό pH με την παρουσία ενζύμων (όπως η πεψίνη, η λυσοζύμη και η αμυλάση), φαινόλης, NaCl, Oxgall, γαστρικού οξέος χοίρου, παγκρεατικού υγρού και ταυροδεοξυχολικού οξέος. Η αντοχή σε αυτές τις ενώσεις μετριέται με τον αριθμό των αποικιών ή την απορρόφηση σε διαφορετικό χρονικό διάστημα.
- Να μπορούν να προσκολληθούν και να πολλαπλασιαστούν σε επιφάνειες βλεννογόνου και ιδιαίτερα στον εντερικό βλεννογόνο.
- Να παρουσιάζουν ανοσοτροποποιητική δράση.
- Να παρεμποδίζουν ή να μειώνουν την προσκόλληση παθογόνων μικροβίων στον εντερικό βλεννογόνο (ανταγωνιστική ή αντιμικροβιακή δράση). Μόλις προσκολληθούν

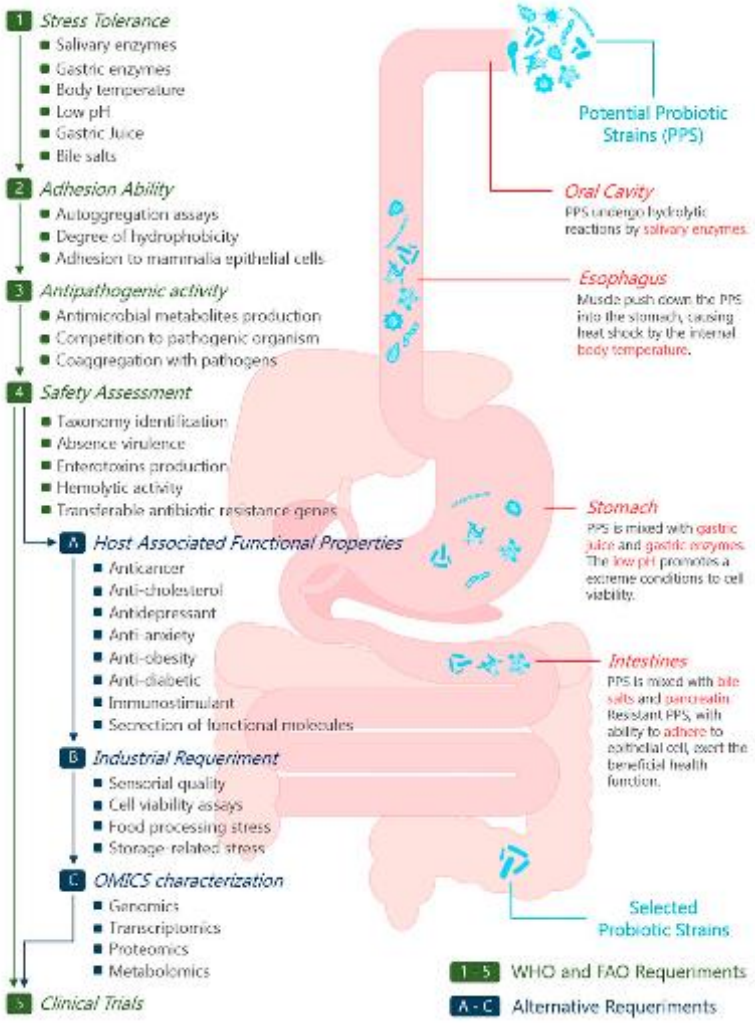
στο έντερο, τα προβιοτικά παράγουν εξωκυτταρικά αντιμικροβιακά συστατικά μέσω της μετατροπής των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και άλλων δευτερευουσών ενώσεων σε σημαντικές ουσίες (όπως οργανικά οξέα, ένζυμα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, βακτηριοκίνες και χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια) και να εξοντώσουν με αυτόν τον τρόπο παθογόνα βακτήρια. Άλλοι μηχανισμοί προβιοτικού ανταγωνισμού περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά, την συσσωμάτωση με παθογόνα και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτές οι ανταγωνιστικές δράσεις ποικίλουν ανάλογα με τα μικροβιακά στελέχη. Η παραγωγή αντιμικροβιακού μεταβολίτη μπορεί να εκτιμηθεί σε πλάκες άγαρ μέσω της δοκιμασίας ζώνης αναστολής, ενώ η ανταγωνιστική δραστικότητα μπορεί να μελετηθεί με αναστολή της προσκόλλησης παθογόνων μικροοργανισμών σε κύτταρα λόγω της προβιοτικής προσκόλλησης. Μια άλλη σημαντική δυνατότητα των προβιοτικών είναι η συσσωμάτωση τους με παθογόνους μικροοργανισμούς και η αποβολή του συσσωματώματος μέσω των κοπράνων, η ιδιότητα αυτή μπορεί να εξετασθεί με δοκιμές της συσσωμάτωσης των προβιοτικών με διάφορα παθογόνα βακτήρια όπως τα *E. Coli, S. Aureus, Candida spp., Listeria monocytogenes* και *Salomonella choleraesuis*. [15]

Από τα παραπάνω, η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών στον εντερικό βλεννογόνο θεωρείται από τα σημαντικότερα κριτήρια, καθώς με αυτόν τον τρόπο τα προβιοτικά παραμένουν στο έντερο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και παρεμποδίζουν τη προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών λειτουργώντας ανοσορυθμιστικά. Η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών ποικίλλει, διότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως τα γαστρικά υγρά του στομάχου, τις συνθήκες ανάπτυξης τους, τον αριθμό των ανακαλλιεργειών και την χρησιμοποίηση κρυοπροστατευτικών στην περίπτωση που αυτά έχουν λυοφιλιωθεί.

Επίσης τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένες τεχνολογικές ιδιότητες, εφόσον χρησιμοποιηθούν σε λειτουργικά τρόφιμα, πιο συγκεκριμένα πρέπει να παρουσιάζουν τις εξής ιδιότητες:

- Να πολλαπλασιάζονται σε μεγάλη κλίμακα.
- Να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής.
- Να συμβάλλουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των προϊόντων όταν χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης, χωρίς να έχουν επίδραση στη γεύση του προϊόντος.
- Να διατηρείται η βιωσιμότητα τους σε όλης τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.[11]
- Να επιβιώνουν κατά την επεξεργασία των τροφίμων (όπως η ζύμωση, η συγκομιδή, η ξήρανση και η κατάψυξη) στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, του pH και της οξείδωσης κατά την αποθήκευση. Τέλος, από την άποψη της ασφάλειας, είναι σημαντικό τα προβιοτικά κύτταρα να είναι γενετικά σταθερά για να αποφευχθεί η ανάπτυξη παθογένειας ή η απώλεια παραγωγικότητας.

Για την προβιοτική αποτελεσματικότητα, απαιτούνται πληθυσμοί 10^6 έως 10^8 CFU / g τη στιγμή της κατανάλωσης. Η αναλογία πληθυσμού μπορεί να επηρεαστεί από βακτηριοφάγους, οι οποίοι μολύνουν προβιοτικά κύτταρα, προκαλώντας έτσι την κυτταρική λύση. Η επιλογή των ανθεκτικών σε βακτηριοφάγους προβιοτικών μπορεί να διεξαχθεί μέσω κλασσικών μεθόδων, όπως δοκιμασίες πλάκας ή παρακολούθησης οξίνισης, ή μέσω πιο εξελιγμένων εργαλείων, όπως qPCR και βιοαισθητήρες. Επιπλέον, ορισμένα προϊόντα μπορούν να παρουσιάσουν τροποποιήσεις κατά τη διάρκεια της ζωής τους, όπως μετά την οξίνιση, με αποτέλεσμα την απώλεια της προβιοτικής βιωσιμότητας. Η παρουσία οξυγόνου κατά τη διάρκεια ορισμένων διαδικασιών και αποθήκευσης μπορεί επίσης να επηρεάσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ο έλεγχος των βιώσιμων κυττάρων μπορεί να διεξαχθεί μέσω μικροβιολογικών μεθόδων, όπως επίστρωση σε ένα κλασικό μέσο καλλιέργειας ή qPCR. [15]



Εικόνα 4: Κριτήρια επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών.

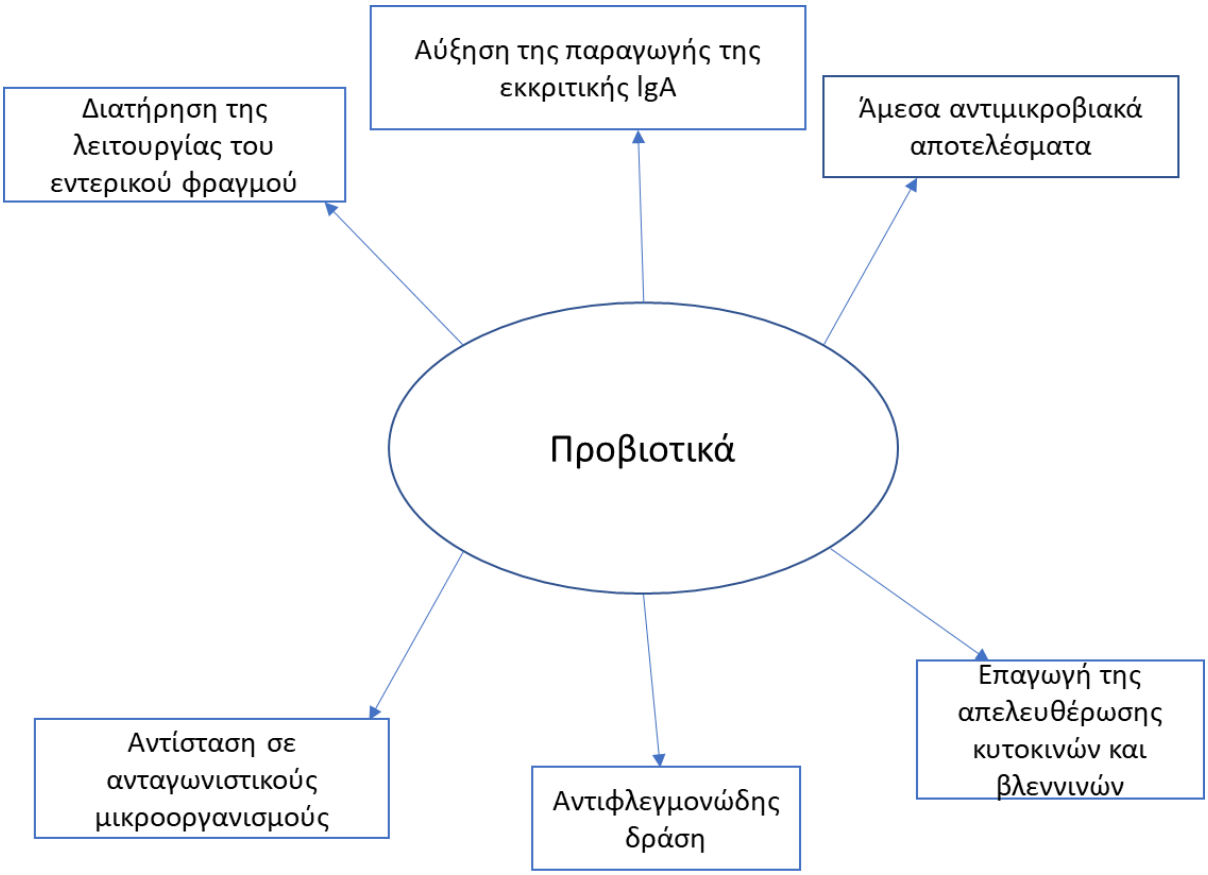
<u>Κριτήρια επιλογής ζυμομυκήτων</u>

Τα κριτήρια που υιοθετήθηκαν από τις περισσότερες μελέτες για την επιλογή των ζυμομυκήτων είναι ουσιαστικά εκείνα που έχουν καθιερωθεί για τα βακτήρια, δηλαδή η ικανότητα επιβίωσης,

της διέλευσης μέσω από το γαστρεντερολογικού συστήματος του ανθρώπου, η ανοχή σε χολικά άλατα και χαμηλό pH, η ικανότητα προσκόλλησης σε βλεννογόνους και ο έλεγχος της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Βάσει αυτών των κριτηρίων, έχει απομονωθεί ένας σημαντικός αριθμός δυνητικών προβιοτικών ζυμών, συμπεριλαμβανομένων των *Saccharomyces, Rhodotorula, Pichia, Candida, Meyerozyma, Yarrowia, Torulaspora, Debaryomyces* και *Kluyveromyces*. Παρ 'όλα αυτά, προς το παρόν, το *Saccharomyces boulardii*, είναι το μόνο σκεύασμα ζυμομυκήτων, που έχει αναγνωριστεί επισήμως και εμπορεύεται για να καταναλωθεί από τον άνθρωπο. [15]

1.2.10 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών

Υπάρχουν πολυάριθμοι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών που προσφέρουν πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στο έντερο (*Σχήμα 2*). Όπως προαναφέρθηκε, τα κυριότερα βακτήρια που χρησιμοποιούνται σαν προβιοτικά είναι τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, ενώ οι κυριότερες ζύμες είναι οι ζύμες του γένους *Saccharomyces*. Δεδομένου ότι οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροβίων παρουσιάζουν ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα, τα διαφορετικά στελέχη των προβιοτικών επιδεικνύουν διαφορετικό τρόπο δράσης, εξαρτώμενο από το είδος των μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων τους ή εκκρίνονται από αυτά. Ειδικότερα, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, θεωρείται ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιδρούν ευεργετικά στην υγεία μέσω 3 γενικότερων μηχανισμών: 1) της ενίσχυσης της λειτουργίας του επιθηλιακού εντερικού φραγμού, 2) της ρύθμισης της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας και 3) της ρύθμισης των αποκρίσεων του έμφυτου και επίκτητου ανοσοβιολογικού συστήματος (ανοσοτροποποιητική δράση).[1]



Σχήμα 2: Κύριοι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροβίων.

1.2.11 Ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών

Η κλινική εφαρμογή των προβιοτικών έχει αποδείξει πως αντιμετωπίζουν ποικίλα προβλήματα υγείας. Συγκεκριμένα, τα προβιοτικά δρουν ενάντια στην παχυσαρκία και το διαβήτη, καθώς αντιμετωπίζουν την εντερική δυσβίωση, που ορίζεται ως μια αφύσικη μεταβολή της σύνθεσης της μικροχλωρίδας του εντέρου και συνδέεται με μια ανισορροπία μεταξύ προστατευτικών (απαραίτητων, μη παθογόνων) και επιβλαβών (παθογόνων) βακτηρίων. Η εντερική δυσβίωση και οι σχετικές αλλοιώσεις στον εντερικό μικροβιακό πληθυσμό μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της παχυσαρκίας και άλλων σχετικών ασθενειών, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο διαβήτης τύπου 2 και η ηπατική νόσος. Η αντιμικροβιακή/αντιπαθογόνος δράση των προβιοτικών που δρουν ανταγωνιστικά προς τα παθογόνα μικρόβια θεωρείται ως μία από τις πιο ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών, διότι, σε αντίθεση με τα κλασικά αντιβιοτικά, παρεμποδίζεται η διαταραχή ή η μεταβολή στη σύνθεση του πολύπλοκου πληθυσμού των μικροβίων του εντέρου. Επίσης, θεωρείται πως τα προβιοτικά παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση (συγκεκριμένα αντιμετωπίζουν τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα που σχετίζονται με μη φυσιολογικές αλλοιώσεις του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού), αντιαλλεργική και αντικαρκινική δράση (εναντίον του καρκίνου του παχέος εντέρου και του στήθους), αλλά και ευεργετούν τη λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος. [5],[9]

1.2.12 Βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επιδρούν στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το στέλεχος του προβιοτικού βακτηρίου, το pH, η παρουσία γαλακτικού και οξικού οξέος, οι αλληλεπιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς, η θερμοκρασία αποθήκευσης και οι συνθήκες παρασκευής. Για παράδειγμα, η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στα τυριά είναι περισσότερο περίπλοκη συγκριτικά με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς επηρεάζεται από παράγοντες όπως η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του προϊόντος, η σκληρότερη μήτρα του τροφίμου και η παρουσία άλλων μικροοργανισμών.

Όπως προαναφέρθηκε η βιωσιμότητα των προβιοτικών μπορεί να επηρεαστεί από ανασταλτικές ουσίες όπως το γαλακτικό οξύ που παράγεται κατά την παραγωγή του γαλακτοκομικού προϊόντος και την αποθήκευση του σε ψύξη. Κατά την παραγωγή γιαουρτιού, η καλλιέργεια γιαούρτης και τα προβιοτικά βακτήρια παράγουν οργανικά οξέα, το pH των προϊόντων πρέπει να είναι 4.5 ή χαμηλότερο. Ανάλογα με το βαθμό ανάπτυξης των προβιοτικών οι συγκεντρώσεις του οξικού οξέος μπορεί να ποικίλουν.

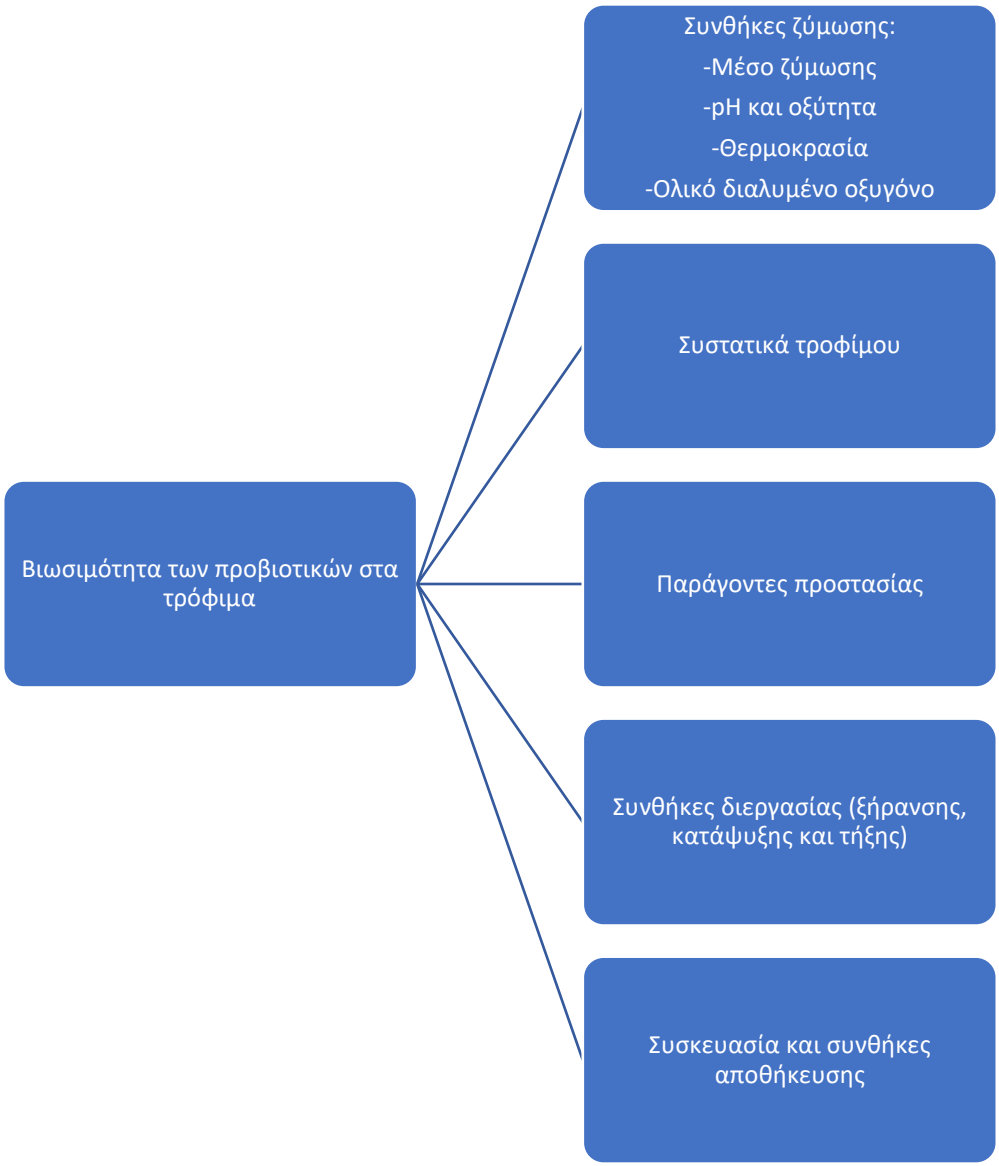
Ένας άλλος παράγοντας είναι ο ανταγωνισμός ανάμεσα στους διάφορους μικροοργανισμούς. Ο ανταγωνισμός ανάμεσα στα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως αρχικές καλλιέργειες προκαλείται από την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών όπως οι βακτηριοσίνες και μπορεί να μειώσει σημαντικά τον αριθμό των ευαίσθητων οργανισμών που μπορεί να βρίσκονται σε ένα προϊόν ή σε μια αρχική καλλιέργεια.

Εξίσου σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη βιωσιμότητα είναι το οξυγόνο. Ορισμένα βακτήρια είναι αναερόβια, οπότε η τοξικότητα του οξυγόνου αποτελεί σημαντικό πρόβλημα.

Επιπλέον, η βιωσιμότητα επηρεάζεται και από το pH. Κάθε μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε ορισμένη περιοχή pH. Για παράδειγμα, η βέλτιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του L.acidophilus βρίσκεται στο 5.5-6.0.

Η θερμοκρασία επώασης έχει επίσης σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων. Καθώς κάθε μικροοργανισμός παρουσιάζει συγκεκριμένη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης.

Άλλοι παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα της καλλιέργειας γιαούρτης και των προβιοτικών σε ζυμωμένα γάλατα είναι η συγκέντρωση των σακχάρων, το ποσοστό του εμβολίου, ο χρόνος ζύμωσης και η θερμοκρασία αποθήκευσης.



Σχήμα 3: Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών.

1.2.13 Τεχνικές βελτίωσης βιωσιμότητας των προβιοτικών

Η βιωσιμότητα των προβιοτικών μπορεί να βελτιωθεί με μεθόδους όπως η ακινητοποίηση, κατάλληλη επιλογή και χρήση ανθεκτικών στελεχών στα χολικά οξέα και άλατα, χρήση αδιαπέραστων στο οξυγόνο συσκευασιών, προσαρμογή σε συνθήκες στρες και άλλες. Πιο αναλυτικά έχουμε:

•Επιλογή στελεχών ανθεκτικά σε χολικά άλατα και οξέα:

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών είναι η ικανότητα τους να επιζούν στα οξέα του ανθρώπινου στομάχου, της χολής και του εντέρου. Ωστόσο υπάρχουν μικροοργανισμοί όπως στελέχη του *L. acidophilus* και *Bifidobacterium ssp.* που δεν μπορούν να επιβιώσουν στις

συνθήκες που επικρατούν στο έντερο και για αυτό οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν είναι κατάλληλοι για χρήση ως διαιτητικά πρόσθετα στα ζυμωμένα τρόφιμα.

•Αντικατάσταση των πλαστικών από γυάλινες συσκευασίες:

Το υλικό συσκευασίας αποτελεί σημαντική παράμετρο για τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων. Σύμφωνα με μελέτες, οι αριθμοί των ζωντανών κυττάρων προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα που αποθηκεύτηκαν σε γυάλινα δοχεία ήταν υψηλότερα συγκριτικά με αυτά που αποθηκεύτηκαν σε πλαστικούς περιέκτες. Καθώς οι πλαστικοί περιέκτες έχουν μεγαλύτερη διαπερατότητα στο οξυγόνο συγκριτικά με τους γυάλινους, και όπως έχει αναφερθεί το οξυγόνο είναι τοξικό για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς.

•Επίδραση του μεγέθους του εμβολίου στην επιβίωση των προβιοτικών:

Η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών είναι υψηλότερη όταν είναι υψηλότερη η συγκέντρωση του εμβολίου, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο αρχικό πληθυσμό.

•Προσαρμογή σε αντίξοες συνθήκες:

Η βιωσιμότητα μερικών προβιοτικών μπορεί να βελτιωθεί με τη προσαρμογή τους σε αντίξοες περιβαλλοντολογικές συνθήκες που κανονικά προκαλούν απώλεια της βιωσιμότητας. Η προσαρμογή, αυτή, αυξάνει το ποσοστό επιβίωσης των μικροοργανισμών σε δυσμενείς συνθήκες. Οι μηχανισμοί που συμβάλουν στην προσαρμοστικότητα των κυττάρων περιλαμβάνουν την επαγωγή ενός νέου ομοιοστατικού συστήματος του pH και τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών.

•Ζύμωση δύο σταδίων:

Τα βακτήρια καλλιέργειας της γιαούρτης δρούν ανταγωνιστικά προς τα προβιοτικά βακτήρια, καθώς πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα από τα προβιοτικά βακτήρια κατά τη ζύμωση παράγοντας, έτσι, οξέα που μπορούν επηρεάζουν και να μειώσουν τη βιοσυμβατότητα των προβιοτικών. Σύμφωνα με μελέτες, η ζύμωση με προβιοτικά βακτήρια που προηγείται της ζύμωσης με βακτήρια της γιαούρτης μπορεί να βελτιώσει τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων.

•Προσθήκη Κυστεΐνης:

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση των προβιοτικών (*Bifidobacteria, S. Thermophilus, L. acidophilus*) συνήθως περιέχουν L-κυστεΐνη. Η κυστεΐνη παρέχει αμινικό άζωτο ως παράγοντα ανάπτυξης, ενώ παράλληλα μειώνει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των αναερόβιων μικροοργανισμών.

•Υγρασία:

Η απομάκρυνση της υγρασίας είναι σημαντική για την αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων. Ωστόσο, οι κάψουλες των προβιοτικών τυπικά έχουν υγρασία περισσότερο από 10% που τις επιτρέπει να παραμείνουν εύκαμπτες. [10]

•Χρήση πρεβιοτικών/Εγκλεισμός:

Ένας άλλος τρόπος να διασφαλίσουμε τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων είναι η χρήση πρεβιοτικών κι η ενθυλάκωσή τους μέσα στις συγκεκριμένες μήτρες. Η ενθυλάκωση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ενίσχυσης της βιωσιμότητας των προβιοτικών μικροβίων και της σταθερότητας του προϊόντος, στο οποίο εγκλείονται τα προβιοτικά. Η σταθερότητα του τελικού προϊόντος συνίσταται τόσο στην αρχική βιωσιμότητα όσο και στη διατηρησιμότητα των ευεργετικών ιδιοτήτων των προβιοτικών μικροβίων. Η ενθυλάκωση βακτηρίων από προβιοτικές καλλιέργειες σε κατάλληλους φορείς επιφέρει πολλά οφέλη, αφού τα κύτταρα μπορούν να συλλεχθούν από το αρχικό υπόστρωμα και να επαναχρησιμοποιηθούν, ενώ τα εγκλεισμένα προβιοτικά προστατεύονται από εξωτερικούς παράγοντες. Επιπλέον, εντός του φορέα αποκτούν μεγαλύτερη ικανότητα να επιβιώνουν συναρτήσει του χρόνο αποθήκευσης, επιβιώνουν σε δυσμενέστερες συνθήκες, όπως το χαμηλό pH, η παρουσία πεπτικών ενζύμων και χολικού άλατος στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά και απελευθερώνονται με ελεγχόμενο τρόπο μετά την πέψη. Όλες οι σύγχρονες τεχνολογίες ενθυλάκωσης προβιοτικών κυττάρων έχουν μια σημαντική προϋπόθεση: να διατηρούνται ζωντανοί οι μικροοργανισμοί. Η συγκεκριμένη απαίτηση έχει καθοριστική σημασία για την επιλογή της κατάλληλης τεχνολογίας εγκλεισμού, η οποία πρέπει να εκτελείται υπό ήπιες συνθήκες.

Γενικά, η ενθυλάκωση ζωντανών μικροοργανισμών και βιοδραστικών συστατικών περιορίζεται σε φορείς που δύνανται να σχηματίζουν “δίκτυο” γύρω από τους μικροοργανισμούς-εγκλείσματα, κάτω από ήπιες συνθήκες. Η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος, η ολιγοφρουκτόζη και η ζεΐνη συνιστούν 3 τέτοιους φορείς.[10]

1.3 Διεργασίες εγκλεισμού προβιοτικών

1.3.1 Μέθοδοι εγκλεισμού προβιοτικών

Τα προβιοτικά βακτήρια προσφέρουν στον άνθρωπο σημαντικά οφέλη, τα οποία εξασφαλίζονται μέσω της υψηλής δραστικότητας και βιωσιμότητας των μικροοργανισμών. Παράλληλα, ιδιαιτέρως σημαντική κρίνεται η ικανότητα των προβιοτικών βακτηρίων να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται στον οργανισμό του ξενιστή που εγκαθίστανται. Ως εκ τούτου, τα βακτήρια που προστίθενται σε ένα προϊόν, χρειάζεται να παραμένουν μεταβολικά σταθερά και δραστικά, επιβιώνοντας σε επαρκή αριθμό κατά τη διέλευσή τους από τον πεπτικό σωλήνα, διασφαλίζοντας την ωφέλιμη δράση τους στον ξενιστή. Ωστόσο, παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα στελέχη προβιοτικών, και συγκεκριμένα εκείνα του γένους *Bifidobacterium spp.*, αδυνατούν να επιβιώσουν σε συνθήκες που επικρατούν στο πεπτικό σύστημα. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός μιας μεθόδου πρόσληψης των προβιοτικών, που θα τα προστατεύσει από τις δυσμενείς συνθήκες που μπορεί να επικρατούν στο εσωτερικό ενός ξενιστή.

Λύση στην επίδραση του εσωτερικού περιβάλλοντος του ξενιστή στα προβιοτικά βακτήρια αποτελεί η μέθοδος του εγκλεισμού. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε διάφορους επιστημονικούς και βιομηχανικούς τομείς, όπως ο χώρος της φαρμακοβιομηχανίας και της γεωργικής καλλιέργειας. Ο εγκλεισμός συνίσταται στην επικάλυψη ή παγίδευση ενός επιθυμητού συστατικού μέσα σε ένα δευτερεύον για τον έλεγχο της απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού ή του πυρήνα για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα ή μέχρι την επίτευξη των

κατάλληλων συνθηκών. Αναφέρεται ότι τα σωματίδια που προκύπτουν έχουν διάμετρο από λίγα nm μέχρι μερικά mm.

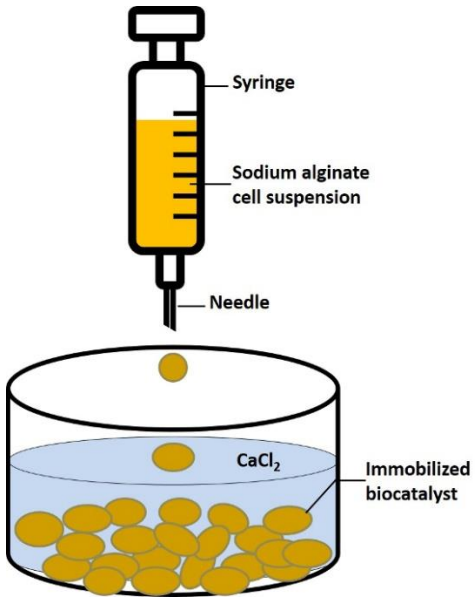
Η μέθοδος του εγκλεισμού παρέχει πολλά οφέλη στα υλικά που εγκλείονται και γι' αυτόν το λόγο, εφαρμόζεται συχνά στη βιομηχανία των τροφίμων. Ειδικότερα, τα πλεονεκτήματα που προσφέρει είναι τα ακόλουθα:

- Προστασία του υλικού από την αποικοδόμηση, μειώνοντας την αλληλεπίδραση με το εξωτερικό περιβάλλον (θερμοκρασιακές αυξομειώσεις, υγρασία, αέρας, ακτινοβολίες)
- Επιβράδυνση του ρυθμού εξάτμισης ή μεταφοράς του δραστικού υλικού στο περιβάλλον
- Διαμόρφωση των φυσικών χαρακτηριστικών του δραστικού υλικού προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απορρόφηση από τον οργανισμό του ξενιστή
- Κάλυψη της γεύσης του δραστικού υλικού, σε περίπτωση που δεν είναι αποδεκτή από τους καταναλωτές
- Δυνατότητα αραίωσης του δραστικού υλικού.

Η τεχνική του εγκλεισμού περιλαμβάνει τρία στάδια. Αρχικά, το δραστικό υλικό ενσωματώνεται σε μία μήτρα και αναλόγως της φύσης της, στερεής ή υγρής, μπορεί να συσσωματωθεί/προσροφηθεί ή να διαλυθεί σε αυτή. Ως δεύτερο στάδιο, χαρακτηρίζεται η κονιοποίηση της μήτρας (στερεή μορφή) ή η διασπορά της (υγρή μορφή). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει τη σταθεροποίηση του σωματιδίου που προκύπτει με χημικές (πολυμερισμός), φυσικοχημικές (ζελατινοποίηση) ή φυσικές διαδικασίες (εξάτμιση, στερεοποίηση).[16]

Υπάρχει μία πληθώρα τεχνικών εγκλεισμού, όμως, οι κυριότερες που εφαρμόζονται για τα προβιοτικά είναι ο σχηματισμός ζελατινωδών σωματιδίων, η επικάλυψη με ψεκασμό, η ξήρανση με ψεκασμό, η εκβολή, η γαλακτωματοποίηση, καθώς και η ξήρανση υπό κατάψυξη και οι ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι παραπάνω πρακτικές:

- **Σχηματισμός ζελατινωδών σωματιδίων-ζελατινοποίηση (gelatinization):** Τα κύτταρα των προβιοτικών παγιδεύονται σε μία πολυμερική μήτρα, όπως είναι η πηκτίνη και τα αλγινικά άλατα. Σημειώνεται ότι, τα αλγινικά άλατα αποτελούν αποτελεσματικά μέσα ενθυλάκωσης για το *Lactobacillus* και το *Bifidobacterium*. Πλεονεκτήματα της χρήσης των αλγινικών αλάτων αποτελούν η μη τοξικότητά τους, οι ήπιες συνθήκες ενθυλάκωσης και η αναστρεψιμότητα της ακινητοποίησης. Στα μειονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται η μικρή δυνατότητα παραγωγής, η μεγάλη διάμετρος των θυλάκων με κίνδυνο πρόκλησης αλλοιώσεων στην υφή, καθώς και η ευρεία διασπορά τους. Μια εναλλακτική πρόταση είναι η χρήση μήτρας πρωτεϊνικής φύσης.



Εικόνα 5: Εγκλεισμός προβιοτικών σε αλγινικά άλατα.

- **Επικάλυψη με ψεκασμό (spray coating):** Το υλικό που προορίζεται για εγκλεισμό, χρειάζεται να βρίσκεται σε στερεή μορφή, χωρίς να είναι απαραίτητο να έχει προηγηθεί η ξήρανση του. Ένα υγρό υλικό επικάλυψης ψεκάζεται πάνω στο υλικό του πυρήνα και στερεοποιείται για να σχηματίσει ένα στρώμα (μεμβράνη) στην επιφάνεια του. Στις εφαρμογές τροφίμων, η επικάλυψη είναι βασισμένη κυρίως σε λιπίδια, όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία ευρεία ποικιλία ενώσεων όπως η παραφίνη, το παλμιτικό οξύ, το ελαϊκό οξύ, τα φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες (καζεΐνη,γλουτένη) και οι υδατάνθρακες, όπως η κυτταρίνη, η κ-καρραγενάνη, και το αλγινικό άλας. Σημαντική παράμετρος είναι η θερμοκρασία του αέρα, η οποία πρέπει να ελέγχεται συχνά προκειμένου να αποφευχθεί η απότομη αύξησή της. Σημειώνεται ότι η μέθοδος αυτή υπερνικά το πρόβλημα της χαμηλής παραγωγής θυλάκων που παρουσιάζει ο σχηματισμός ζελατινωδών σωματιδίων.
- **Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying):** Χρησιμοποιείται ευρύτατα στη σύνθεση εγκλεισμένων συστατικών. Ειδικότερα, ένα υγρό αιώρημα του βιοδραστικού προϊόντος ψεκάζεται μέσα σε ένα μεγάλο δοχείο, δημιουργώντας νέφος από λεπτά σταγονίδια, σε συνδυασμό με θερμό αέρα. Στη συνέχεια, τα σταγονίδια ξηραίνονται και μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια. Η τεχνική αυτή, έχει μικρή βιομηχανική εφαρμογή για προβιοτικά, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται (120-160°C), με συνέπεια υψηλές απώλειες βιωσιμότητας. Για το λόγο αυτό, αρκετοί ερευνητές προσθέτουν προστατευτικές ουσίες στο μέσο εγκλεισμού, προκειμένου να αυξήσουν τη δυνατότητα επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων.

- **Εκβολή (extrusion):** Αποτελεί την παλαιότερη και συνηθέστερη μέθοδο για τη δημιουργία σφαιριδίων με υδροκολλοειδή και μπορεί να επιτευχθεί με απλή ρίψη σταγονιδίων ενός υδατικού αιωρήματος προβιοτικών-πολυμερούς σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο προστίθενται οι σταγόνες, περιέχει ένα πολυσθενές κατιόν, το οποίο συνήθως είναι το κατιόν ασβεστίου (Ca^{2+}) σε μορφή χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$). Μετά την στερεοποίηση, τα σταγονίδια αποκτούν μία ζελώδη υφή. Τα προβιοτικά βακτήρια εγκλωβίζονται σε ένα τρισδιάστατο, ιοντικό πλέγμα αλγινικών αλάτων. Στις τεχνικές παραγωγής σφαιριδίων εκβολής περιλαμβάνεται η ηλεκτροστατική ροή, η τεχνική ομοαξονικού αέρα, η τεχνική εκβολής με δόνηση και η τεχνική εκβολής με ψεκασμό. Οι παραπάνω πρακτικές στηρίζονται στην εφαρμογή πίεσης για τη δημιουργία μικρότερων σταγονιδίων.
- **Γαλακτωματοποίηση (emulsification):** Ένας μικρός όγκος αιωρήματος κυττάρων πολυμερούς (διεσπαρμένη φάση) προστίθεται σε ένα μεγάλο όγκο φυτικού ελαίου (συνεχής φάση), όπως σογιέλαιο, ηλιέλαιο, κραμβέλαιο ή αραβοσιτέλαιο. Το μίγμα ομογενοποιείται, για να σχηματίσει γαλάκτωμα νερού σε έλαιο. Σημειώνεται ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις προστίθενται γαλακτωματοποιητές για να ενισχύσουν την σταθερότητα των γαλακτωμάτων, εφόσον μειώνουν την επιφανειακή τάση των σταγονιδίων της διασκορπισμένης φάσης που οδηγεί σε μικρότερα εγκλειστικά σφαιρίδια. Μετά τον σχηματισμό του γαλακτώματος, προστίθεται ένας κατάλληλος παράγοντας, οδηγώντας στη στερεοποίηση των μικροσφαιριδίων. Τα συνηθέστερα μέσα εγκλεισμού είναι το αλγινικό άλας, η κ-καραγενάνη και η χιτοζάνη.
- **Ξήρανση υπό κατάψυξη (ή Λυοφιλίωση, freeze drying):** Είναι η αφυδάτωση με κατάψυξη και εξάχνωση των σχηματιζόμενων παγοκρυστάλλων, δηλαδή η άμεση μετάβαση του νερού από τη στερεή στην αέρια κατάσταση. Η διεργασία της ξήρανσης με κατάψυξη είναι μία διαδικασία αφυδάτωσης υγρών ή στερεών με υψηλή υγρασία προϊόντων. Χρησιμοποιείται τα τελευταία 40 χρόνια στην παραγωγή τροφίμων, φαρμάκων και άλλων ευπαθών βιολογικών προϊόντων.
- **Ηλεκτροστατική ινοποίηση και ψεκασμός (electrospinning and electrospraying) :** Με την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης, παράγεται ένας ηλεκτρικά φορτισμένος πίδακας (jet) από πολυμέρες διάλυμα:
  -Οι ηλεκτρικές φορτίσεις προκαλούν την έναρξη του jet
  -Το jet ξεκινά, όταν η ένταση του πεδίου υπερβεί την κρίσιμη τιμή τάσης (V_c)
  -Δημιουργείται ο κώνος Taylor στο jet και παράγονται οι ίνες και τα σωματίδια στη μίκρο- και νάνο-κλίμακα.

1.3.2 Επιλεγμένες τεχνικές εγκλεισμού

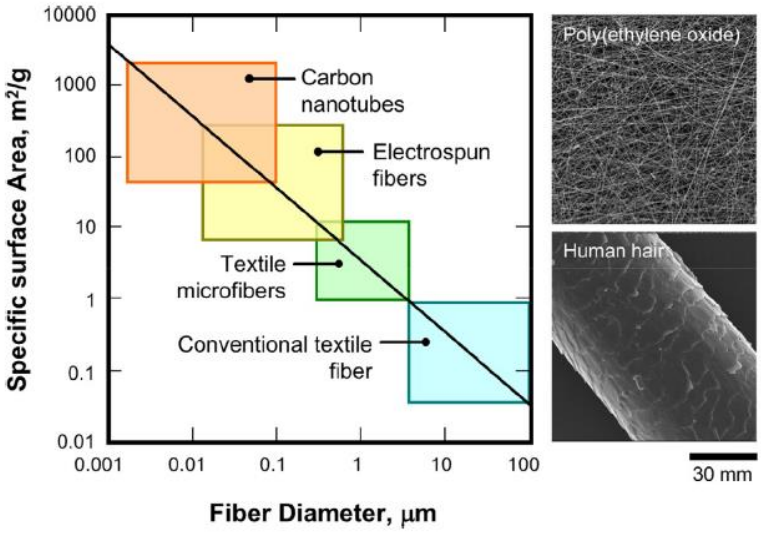
Τόσο για την ενσωμάτωση των βιοδραστικών ενώσεων στα τρόφιμα όσο και για τη διατήρηση τους κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, της αποθήκευσης των τροφίμων και της εισαγωγής

τους στον οργανισμό, χρησιμοποιούνται τεχνικές ενθυλάκωσης που διατηρούν τη βιωσιμότητα και τη σταθερότητα των εγκλεισμένων βιοδραστικών ουσιών, όπως τα προβιοτικά βακτήρια. Τα εγκλειστικά μέσα περιλαμβάνουν κυρίως πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Η ενθυλάκωση βιοδραστικών ενώσεων και προβιοτικών βακτηρίων μέσα σε πρεβιοτικές ουσίες είναι απαραίτητη, ώστε να προστατευθεί ή ακόμη και να ενισχυθεί η επιβίωσή τους κατά τη διέλευση τους από την άνω γαστρεντερική οδό, καθώς και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης των τροφίμων. Έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι για μικρο- και νανο-ενθυλάκωση των βιοενεργών συστατικών με πιο διαδεδομένες τις: ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), λυοφιλίωση/ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze drying), γαλακτωματοποίηση (emulsification), συσσωμάτωση (coacervation), νανο-καταβύθιση (nano-precipitation), εκβολή (extrusion), ηλεκτροστατική ινοποίηση/ηλεκτροστατικό ψεκασμό (electrospinning/electrospraying) και χρήση λιποσωμάτων (liposome preparation). Όλες οι προηγούμενες έχουν προταθεί, εξετασθεί εκτενώς και εφαρμόζονται στην ξήρανση και στον εγκλεισμό των προβιοτικών και βιοενεργών ενώσεων. Κάθε τεχνική έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα βασικότερα μειονεκτήματα της πλειοψηφίας αυτών των τεχνικών είναι η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών και η χρήση οργανικών παραγόντων σε τουλάχιστον ένα από τα στάδια παραγωγής, οδηγώντας έτσι σε σημαντική καταστροφή των ευαίσθητων, εγκλεισμένων θρεπτικών ουσιών ή και ζητήματα τοξικότητας εξαιτίας των οργανικών υπολειμμάτων. Συνεπώς, το τελικό προϊόν δεν εμφανίζει την απαραίτητη θρεπτικότητα ή και δεν αποτελεί ασφαλές προς κατανάλωση. Για παράδειγμα, ο εγκλεισμός διαμέσου ξήρανσης με ψεκασμό ελαττώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των βακτηρίων ή βλάπτει τη δομή των μορίων-στόχων. Οι ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες (ηλεκτροστατική ινοποίηση και ηλεκτροστατικός ψεκασμός) είναι άκρως ελκυστικές μέθοδοι καθώς χαρακτηρίζονται από απλή τεχνολογία που δεν περιλαμβάνει αντίξοες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και χημικών παραγόντων, όντας κατάλληλες για την ενθυλάκωση ευαίσθητων ενώσεων. Οι ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες επιτρέπουν τη χρήση ενός ευρέος φάσματος βιοδιασπώμενων, βιοσυμβατών, κατάλληλων για τρόφιμα και αγώγιμων πολυμερών ουσιών, οι οποίες λειτουργούν ως επικάλυψη-μήτρα κατά την ενθυλάκωση των βιοενεργών ουσιών.

Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη να εξελιχθεί ακόμη περισσότερο η ηλεκτροστατική ινοποίηση, καθώς παρέχει τη δυνατότητα βελτίωσης του σχεδιασμού και της απόδοσης νέων συστημάτων διανομής λειτουργικών προϊόντων. Η ενσωμάτωση βιομορίων ως συμπληρωματικών συνιστωσών μέσα σε μια πολυμερική ίνα, η οποία παράγεται αναμιγνύοντας τα επιμέρους συστατικά (πολυμερική μήτρα, συστατικό προς εγκλεισμό και διαλύτη) σε ένα (απλή ηλεκτροστατική ινοποίηση) ή σε δύο διαλύματα (ομοαξονική ηλεκτροστατική ινοποίηση) θέτοντας σε λειτουργία τη διάταξη της ηλεκτροϊνοποίησης, είναι μια ραγδαία αναδυόμενη τεχνική για την αύξηση της απόδοσης των λειτουργικών συστατικών στα τρόφιμα με την εφαρμογή της νανοτεχνολογίας. Η αριστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας και η μεγιστοποίηση της παραγωγής στο electrospinning εξαρτάται εν πολλοίς από το μελετούμενο σύστημα.[17]

1.3.2.1 Ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες ενθυλάκωσης (ηλεκτροστατική ινοποίηση-ψεκασμός)

Η ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning) συνιστά μια τεχνική σχηματισμού ινών που αξιοποιεί την ηλεκτροστατική δύναμη για να μετατρέψει τα πολυμερή σε συνεχείς ίνες. Η συγκεκριμένη τεχνολογία αναπτύχθηκε γύρω στο 1930 από τους Formhals και Gladding, όμως δε γνώρισε ευρεία εφαρμογή μέχρι πριν από 2 δεκαετίες. Το κυριότερο χαρακτηριστικό των σχηματιζόμενων ινών είναι το εξαιρετικά λεπτό πάχος τους, στην τάξη των εκατοντάδων νανομέτρων, ευρισκόμενο έτσι μεταξύ των διαστάσεων των νανοσωλήνων άνθρακα και των μικροϊνών σε υφάσματα (*Εικόνα 6*). Η διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συνεχών ινών με εξαιρετικά υψηλή ειδική επιφάνεια, η οποία συνεισφέρει σε μοναδικές ιδιότητες, όπως η ενισχυμένη επιφανειακή δραστικότητα, η αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια αυτή, το υψηλό πορώδες κ.α.. Η ηλεκτροστατική ινοποίηση, μαζί με μια άλλη σχετική διαδικασία, γνωστή ως ηλεκτροστατικό ψεκασμό (με την οποία ομαδοποιούνται στον όρο των ηλεκτροϋδροδυναμικών διεργασιών) προσελκύει τόσο το βιομηχανικό όσο και το ακαδημαϊκό ενδιαφέρον για ποικίλες εφαρμογές. Στις εφαρμογές αυτές συμπεριλαμβάνονται η διήθηση, η ιστική μηχανική, η εκλεκτική παράδοση φαρμάκων, η ελεγχόμενη απελευθέρωσης, η ενθυλάκωση, η σύνθεση νανοδομών, η ακινητοποίηση καταλυτών/ενζύμων και η κατασκευή αισθητήρων.



Εικόνα 6: Τυπικές διάμετροι διαφόρων ινών. Η ειδική επιφάνεια αυξάνεται ραγδαία με την αύξηση της διαμέτρου. (Εικόνες από Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης- SEM)

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η ηλεκτροστατική ινοποίηση και ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός έχουν επεκταθεί σημαντικά στους τομείς των τροφίμων και της διατροφής. Οι παραγόμενες ίνες και σωματίδια στη νάνο- και μικρο-κλίμακα αποτελούν ιδανικές μήτρες για την ενθυλάκωση (εγκλεισμό) βιοδραστικών (π.χ. μικροθρεπτικά συστατικά, λειτουργικά τρόφιμα και προβιοτικά). Σε γενικές γραμμές, ο στόχος της ενθυλάκωσης σε αυτές τις μήτρες είναι η προστασία όλων των των παραπάνω συστατικών από επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ., φως, οξυγόνο, υγρασία, όξινο περιβάλλον), ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις

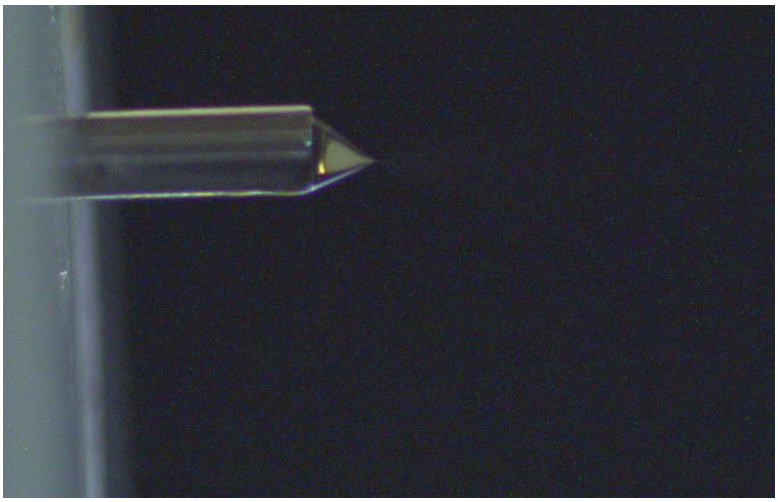
με άλλα συστατικά τροφίμων, ή και η επικάλυψη ανεπιθύμητων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών διαφόρων βιοενεργών ουσιών, όπως η δυσοσμία ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων που προέρχονται από ψάρια. Η επιλογή των μητρών εγκλεισμού (εγκλειστικών μέσων) -τα οποία συνήθως αποτελούνται από ένα ή περισσότερα πολυμερή- οφείλει να εξασφαλίζει ότι τα βιοενεργά συστατικά διατίθενται στο σώμα (π.χ. επαρκής απελευθέρωση στο έντερο). Στις εφαρμογές της ενεργής συσκευασίας, είναι συχνά επιθυμητή η απελευθέρωση των βιοδραστικών (π.χ., αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική ουσία) υπό ειδικές υφιστάμενες συνθήκες για την καλύτερη διατήρηση των τροφίμων. Σε αντίθεση με άλλες τεχνικές σχηματισμού ινών και σωματιδίων (π.χ., ξήρανση με ψεκασμό, κλώση τήγματος), που περιλαμβάνουν σημαντική θέρμανση, οι ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες είναι μη θερμικές, γεγονός ευεργετικό για την ενθυλάκωση των λειτουργικών τροφίμων και των συστατικών που είναι θερμικά ευαίσθητα.

Επιπλέον, η ηλεκτροστατική άπωση που επικρατεί κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού εμποδίζει τη συσσωμάτωση των ψεκασμένων σταγονιδίων, με αποτέλεσμα να καταλήγουν σε κάψουλες οι οποίες είναι τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους μικρότερες συγκριτικά με εκείνες στην τυπική διαδικασία ψεκασμού. Τα σωματίδια και οι ίνες μεγέθους μικρότερου από μm αποδεικνύονται ευεργετικά για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των βιοδραστικών συστατικών και τη διόρθωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των εμπλουτισμένων προϊόντων διατροφής.

Η ηλεκτροϊνοποίηση και ο ηλεκτροψεκασμός εφαρμόζονται για τη σύνθεση πολύπλοκων ινωδών και σωματιδιακών υλικών ξεκινώντας από το μοριακό επίπεδο. Για την επίτευξη των προδιαγραφών του τελικού προϊόντος, η παραγωγή αυτών των υλικών βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμερούς, του διαλύτη και των διαλυμένων ουσιών (όπως το βιοδραστικό, το επιφανειοδραστικό, το βοηθητικό της νηματοποίησης και οι πρόδρομες ουσίες) μέσα στα διαλύματα των ηλεκτροϋδροδυναμικών διεργασιών. Μεταβάλλοντας τις ιδιότητες των συγκεκριμένων διαλυμάτων (π.χ. τη συγκέντρωση, το ιξώδες, την επιφανειακή τάση και την ηλεκτρική αγωγιμότητα) και αριστοποιώντας τις συνθήκες λειτουργίας των διατάξεων ηλεκτροϊνοποίησης και ηλεκτροψεκασμού, η παραγωγή ινών και σωματιδίων με διάμετρο που κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες νανόμετρα (nm) έως μερικές δεκάδες μικρόμετρα (μm) είναι πλέον εφικτή.

Η ηλεκτροστατική ινοποίηση μιας πολυμερικής μήτρας απαιτεί πρώτα τη διαλυτοποίησή του σε ένα συμβατό διαλύτη, μαζί με πρόσθετα, όπου σχηματίζουν ένα ομογενές διάλυμα. Εναλλακτικά, το πολυμερές μπορεί να τηχθεί, χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους θέρμανσης (π.χ. θερμαινόμενο περίβλημα, λέιζερ, θερμαινόμενο εξωθητήρα). Η μέθοδος της τήξης του πολυμερούς είναι λιγότερο συνηθισμένη λόγω της πιο περίπλοκης πειραματικής ρύθμισης και ελέγχου της θερμοκρασίας, αλλά και της πιθανής θερμικής υποβάθμισης των βιοδραστικών παραγόντων. Όσον αφορά στη μέθοδο της διάλυσης του πολυμερούς, η τυπική ρύθμιση περιλαμβάνει την άντληση του διαλύματος με μία σύριγγα, τη σύνδεση της σύριγγας σε ένα περιστρεφόμενο εξάρτημα, συνδεδεμένο με θετικό ή αρνητικό ηλεκτρόδιο συνεχούς ρεύματος και την εκβολή του διαλύματος από μια βελόνα που συνδέεται στη σύριγγα (σπειροειδής απόληξη-spinneret) υπό εφαρμογή τάσης (*Εικόνα 8Α*). Ένας ηλεκτρικά γειωμένος συλλέκτης τοποθετείται σε απόσταση που κυμαίνεται από μερικά έως δεκάδες εκατοστά (π.χ. 0-30 cm)

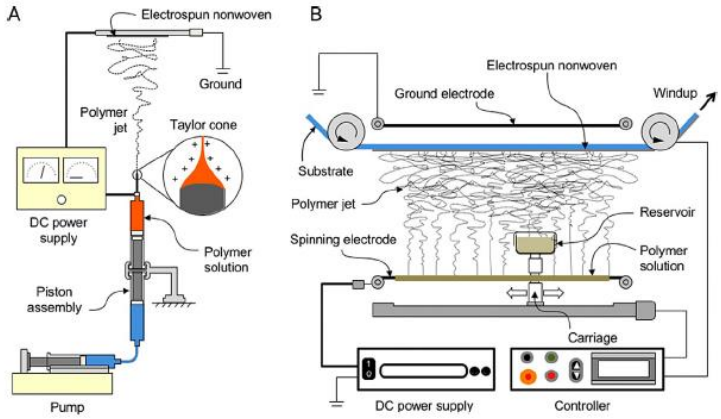
μακριά από την έξοδο του διαλύματος. Έτσι, στο θάλαμο του electrospinning δημιουργείται ένα ηλεκτρικό πεδίο (τυπικά 1-5kV/cm) με συνηθισμένο εύρος λειτουργίας από 0 έως 30 kV, προκαλώντας το διάλυμα στην άκρη της βελόνας εξόδου να επιμηκύνεται προς τον συλλέκτη. Η κωνική γεωμετρία του εξερχόμενου σταγονιδίου είναι γνωστή ως "κώνος Taylor", προς τιμήν του Geoffrey Taylor που μελέτησε ενδελεχώς το ηλεκτροστατικό φαινόμενο των υγρών κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960. Η γεωμετρία του κώνου Taylor εξαρτάται από την εφαρμοζόμενη τάση, το ρυθμό ροής του διαλύματος και τη διαμόρφωση των ηλεκτροδίων. Άλλες συνθήκες που πρέπει να ελέγχονται είναι η σχετική υγρασία και η θερμοκρασία, οι οποίες επίσης επηρεάζουν τη διαμόρφωση του κώνου. Οι ιδιότητες του διερχόμενου υγρού και ειδικά η ηλεκτρική αγωγιμότητα, το ιξώδες, το μοριακό βάρος και η επιφανειακή τάση είναι οι καθοριστικοί παράγοντες που υπαγορεύουν τη δυνατότητα ινοποίησης του. Πάνω από μια κρίσιμη εφαρμοζόμενη τάση, η δημιουργία ηλεκτροστατικής άπωσης υπερνικά την επιφανειακή τάση του διαλύματος, σχηματίζοντας ένα ηλεκτρικά φορτισμένο λεπτό πίδακα που εκπέμπεται από την κορυφή του κώνου Taylor και επιταχύνεται (με ρυθμό έως και 600 $\frac{m}{s^2}$) προς τη γειωμένη επιφάνεια συλλογής. Λόγω της ασταθούς κάμψης του πολυμερικού “πίδακα” και¨της συνακόλουθης ταχείας αύξησης της ελεύθερης επιφάνειας η οποία προάγει την εξάτμιση του διαλύτη, το πολυμερές τεντώνεται σε μια εξαιρετικά λεπτή ίνα που καταλήγει στο συλλέκτη.



Εικόνα 7: Ο σχηματιζόμενος κώνος Taylor κατά τη διαδικασία του ηλεκτροστατικού ψεκασμού.

Η προσέγγιση της εκβολής του πολυμερικού διαλύματος από βελόνα (spinneret) παρέχει συνήθη παραγωγικότητα μερικών χιλιοστόλιτρων (ml) ανά ώρα και εξαρτάται από την παροχή του διαλύματος πολυμερούς. Προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγικότητα, διάφορες μέθοδοι πολλαπλών συστημάτων εκβολής και ηλεκτροϊνοποίησης από ελεύθερη επιφάνεια έχουν αναπτυχθεί. Σε μια παραλλαγή της προσέγγισης ελεύθερης επιφάνειας, το διάλυμα αποτέθηκε πάνω σε ένα σταθερό, θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο σχήματος καλωδίου (με συνεχές ρεύμα τάσης 30-50kV) (*Εικόνα 8Β*). Ένα γειωμένο ηλεκτρόδιο είναι τοποθετημένο σε συγκεκριμένη απόσταση από το παραπάνω ηλεκτρόδιο, ώστε να διατηρηθεί ένα σταθερό ηλεκτρικό πεδίο. Καθώς το διάλυμα είναι ηλεκτρικά φορτισμένο, πολυάριθμοι πίδακες σχηματίζονται και εκτοξεύονται προς ένα υπόστρωμα συλλογής (π.χ. φύλλο αλουμινίου, χαρτί), το οποίο τοποθετείται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων. Τα διαλύματα που αναπτύχθηκαν για την

ηλεκτροϊνοποίηση μέσω εκβολής από μία σύριγγα (*Εικόνα 8Α*) μπορούν να μετατραπούν και σε διαλύματα για ηλεκτροϊνοποίηση ελεύθερης επιφάνειας (*Εικόνα 8Β*), αν και απαιτείται η βελτιστοποίησή τους. Για παράδειγμα, η εκτεταμένη ελεύθερη επιφάνεια του διαλύματος στην τεχνική ηλεκτροϊνοποίησης από ελεύθερη επιφάνεια ενδέχεται να προκαλέσει πρόωρη στερεοποίηση του διαλύματος του πολυμερούς, ειδικά όταν χρησιμοποιείται κάποιος πτητικός διαλύτης. Σε υδατικά διαλύματα των πολυμερών, απαραίτητος είναι ο συχνός έλεγχος της υγρασίας και της θερμοκρασίας, διότι η ανάπτυξη υπερβολικής υγρασίας μπορεί να επηρεάσει την ηλεκτροστατική φόρτιση, εμποδίζοντας έτσι τη διαδικασία εκβολής του υγρού. Επιπλέον, επακόλουθη μείωση του ρυθμού εξάτμισης του νερού σε περιβάλλον υγρού αέρα μπορεί να οδηγήσει σε υγρά και συσσωματωμένα υλικά στην επιφάνεια συλλογής.

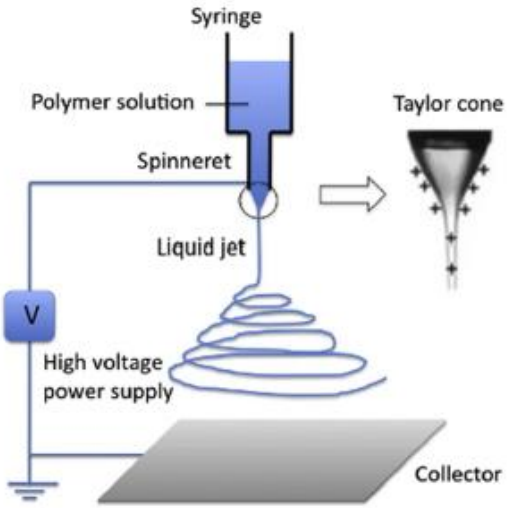


Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροστατικής ινοποίησης ενός διαλύματος πολυμερούς μονής σύριγγας (Α) και ελεύθερης επιφάνειας (Β)

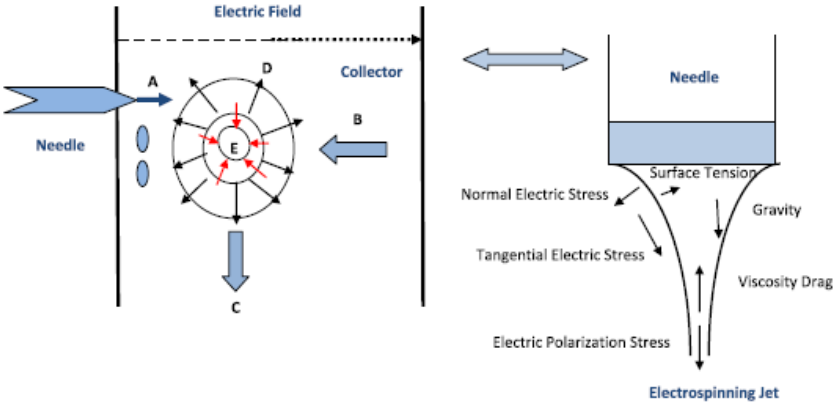
[18]

Η ηλεκτροϊνοποίηση είναι μια διεργασία κατά την οποία εφαρμόζονται ηλεκτροστατικές δυνάμεις για τη διαμόρφωση ενός σταγονιδίου από το διάλυμα πολυμερούς σε μια λεπτή ίνα που τελικά εναποτίθεται σε ένα γειωμένο συλλέκτη. Το πολυμερές εξωθείται σε υγρή κατάσταση από την άκρη της βελόνας είτε με σταθερό ρυθμό μέσω σύριγγας που συνδέεται σε μια αντλία είτε με σταθερή πίεση διαμέσου δεξαμενής, σχηματίζοντας ένα σταγονίδιο στο άκρο της (*Εικόνα 9*). Όταν ένας μικρός όγκος υγρού πολυμερούς εκτίθεται σε ηλεκτρικό πεδίο, το σταγονίδιο εκτείνεται προς το πλησιέστερο σημείο χαμηλού δυναμικού, σχηματίζοντας μια δομή που είναι γνωστή ως κώνος Taylor (*Εικόνα 9*). Όταν η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή, στην οποία οι ηλεκτρικές δυνάμεις υπερνικούν την επιφανειακή τάση του σταγονιδίου που βρίσκεται στην κορυφή του κώνου Taylor, εκτοξεύεται ένα ρεύμα φορτισμένου, υγρού πολυμερούς. Ο πίδακας αυτός επιμηκύνεται εν μέρει ως εκτεινόμενη έλικα, κατά τη διέλευσή του από το σημείο έκχυσης του διαλύματος έως το συλλέκτη. Ο πίδακας υπόκειται επίσης σε οπισθέλκουσες δυνάμεις, οι οποίες επίσης συμβάλλουν στην εξασθένησή του. Η ηλεκτροστατική δύναμη, η οπισθέλκουσα δύναμη, η βαρύτητα, η απωστική δύναμη Coulomb, η επιφανειακή τάση και οι ιξωδοελαστικές δυνάμεις αλληλεπιδρούν με το φορτισμένο πίδακα (*Εικόνα 10*). Η εξασθένηση του πολυμερικού πίδακα συνεχίζεται μέχρι να εξατμιστεί ο διαλύτης και οι συνεχείς ίνες να εναποτεθούν στο γειωμένο συλλέκτη. Όταν το φορτισμένο νήμα

εκτοξεύεται λόγω ηλεκτροστατικής δύναμης από την άκρη της βελόνας έκχυσης του πολυμερικού διαλύματος προς την επιφάνεια συλλογής, επιβάλλεται οπισθέλκουσα δύναμη στον πίδακα υψηλής ταχύτητας, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής του με τον περιβάλλοντα αέρα. Η έκταση/διαστολή του σταγονιδίου αποδίδεται στη δύναμη Coulomb, ενώ η συστολή του αποδίδεται στην επιφανειακή τάση και τις ιξωδοελαστικές δυνάμεις. Η παρουσία του ηλεκτρικού πεδίου επηρεάζει άμεσα τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις και τις απωστικές δυνάμεις Coulomb που παρατηρούνται στη διαδικασία. Το ηλεκτρικό πεδίο επάγει την παραμόρφωση και τη διαστολή του φορτισμένου σταγονιδίου από σφαιρική δομή σε δομή τύπου ατράκτου και καθορίζει τη μετάβαση από τον ηλεκτροψεκασμό (ατομοποίηση υγρού) στην ηλεκτροϊνοποίηση.



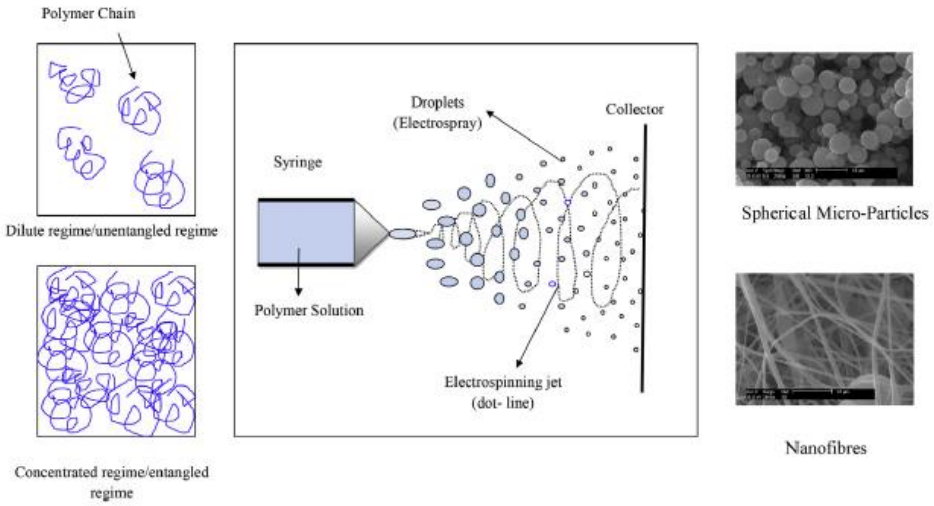
Εικόνα 9: Βασική διεργασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.



Εικόνα 10: Οι ασκούμενες δυνάμεις στη φορτισμένη σταγόνα κατά τη διάρκεια του electrospinning, (A): Ηλεκτροστατική δύναμη, (B): Οπισθέλκουσα δύναμη, (C): Βαρύτητα, (D): Άπωση Coulomb, (E): Επιφανειακή τάση και ιξωδοελαστική δύναμη.

Η διαφορά μεταξύ της ηλεκτροϊνοποίησης και του ηλεκτροψεκασμού (ηλεκτροστατική ινοποίηση και ψεκασμός), που μπορούν να θεωρηθούν ως αδελφές τεχνολογίες, βασίζεται στο επίπεδο της μοριακής συνοχής στην πρώτη ύλη. Η ιδιότητα της μοριακής συνοχής ελέγχεται εύκολα μέσω μεταβολής της συγκέντρωσης του πολυμερικού διαλύματος. Όταν η συγκέντρωση

των πολυμερών στο διάλυμα είναι υψηλή, ο πίδακας από τον κώνο Taylor σταθεροποιείται και λαμβάνει χώρα μια σταδιακή διαδικασία επιμήκυνσης, κατά την οποία η ίνα επιμηκύνεται αρχικά σε μια ευθεία διαδρομή (και μετά λόγω της αστάθειας κτυπήματος). Με άλλα λόγια, ο πίδακας που σχηματίζεται στην ηλεκτροστατική ινοποίησης (electrospinning) δε διασπάται σε σταγονίδια, αλλά παράγει μία μίκρο- ή νάνο-ίνα (*Εικόνα 11*). Αντίθετα, εάν η συγκέντρωση των πολυμερών είναι χαμηλή, ο πίδακας αποσταθεροποιείται (λόγω της κιρσικής αστάθειας) και έτσι, σχηματίζονται μικρά σφαιρικά σώματα και μικρο-σωματίδια. Αυτά τα υψηλά φορτισμένα σταγονίδια αυτοδιασπείρονται στο χώρο λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης, παρεμποδίζοντας έτσι τη συσσωμάτωση και την πήξη των σταγονιδίων. Η κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων είναι συνήθως στενή, με χαμηλή τυπική απόκλιση, ενώ τα σταγονίδια έχουν μέγεθος μικρότερο από αυτά που παράγονται με τους συμβατικούς μηχανικούς ψεκαστήρες, όντας μικρότερα ακόμη και από 1 μm. Η επιρροή της ηλεκτροστατικής δύναμης στα σταγονίδια παρατηρήθηκε πρώτη φορά από τον Rayleigh το 1882. Η εξάτμιση του διαλύτη οδηγεί σε συστολή και στερεοποίηση των σταγονιδίων, τα οποία, με αυτό τον τρόπο, μετατρέπονται σε στερεά πολυμερή σωματίδια καθώς εναποτίθενται στο γειωμένο συλλέκτη. Η εφαρμογή του ηλεκτροψεκασμού στα συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων, στη στρωματική επικάλυψη στα τρόφιμα, στην επεξεργασία της σοκολάτας και στην παρασκευή στερεών λιπαρών νανοσωματιδίων που εμπεριέχουν συγκεκριμένη δραστική ουσία είναι ένας διαρκώς εξελισσόμενος κλάδος. Οι βιοδραστικές ενώσεις, μεταξύ των οποίων και τα προβιοτικά μικρόβια που εγκλείονται μέσα στις ίνες του electrospinning ή στα σωματίδια του electrospraying παρουσιάζουν βελτιωμένη σταθερότητα και λειτουργικότητα, αποτελώντας συστατικά μέρη ποικίλων λειτουργικών τροφίμων. Εφόσον η παραγωγικότητα του electrospinning βελτιωθεί, οι εφαρμογές του θα αυξηθούν ακόμη περισσότερο, ειδικά για την επεξεργασία θερμοευαίσθητων πρώτων υλών.



Εικόνα 11: Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση στο μοριακό επίπεδο για τη συμπεριφορά αραιών και πυκνών πολυμερικών διαλυμάτων.Κέντρο: Διάγραμμα του βασικού σχηματισμού κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση (σχηματισμός πίδακα) και κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό (ατομοποίηση της σταγόνας-σχηματισμός σωματιδίων).Δεξιά: Παραδείγματα απεικόνισης στο μικροσκόπιο SEM των μικροσφαιριδίων του electrospraying και των νανοϊνών του electrospinning.

Η κυριότερη παράμετρος που επηρεάζει τη διάμετρο και τη μορφολογία των παραγόμενων ινών ή σωματιδίων είναι η φύση του πολυμερούς διαλύματος. Η διάμετρος των ινών και η τάση

σχηματισμού σφαιριδίων κατά μήκος των ινών διέπονται από την επιφανειακή τάση και το ιξώδες του διαλύματος. Οι ιδιότητες του διαλύματος περιλαμβάνουν τη συγκέντρωση του πολυμερούς, το μοριακό του βάρος, την επιφανειακή τάση και την αγωγιμότητα του διαλύματος.

Εικόνα 12: Διάταξη του electrospinning.

1.3.2.1.1 Επιρροή των ιδιοτήτων του διαλυμένου πολυμερούς στη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση

Ως γενικός κανόνας, η διαλυτότητα των συνθετικών πολυμερών αυξάνεται καθώς μειώνεται το μοριακό τους βάρος. Ωστόσο, άλλες σημαντικές φυσικές ιδιότητες όπως το ιξώδες, η αντοχή, η ελαστικότητα και ο βαθμός εμπλοκής της μοριακής τους αλυσίδας αυξάνονται με την αύξηση του μοριακού βάρους. Έτσι, όταν ένα πολυμερές διαμορφώνεται με το electrospinning σε ίνες, το πολυμερές διάλυμα οφείλει ιδανικά να αποτελείται από το υψηλότερο δυνατό ποσοστό πολυμερούς, ενώ παράλληλα έχει αρκετά χαμηλό ιξώδες, ώστε να επιτρέπει το σχηματισμό πίδακα. Με άλλα λόγια, απαιτείται το διάλυμα να έχει την ελάχιστη συγκέντρωση πολυμερούς, για να διευκολυνθεί ο σχηματισμός ινών κατά το electrospinning (ηλεκτροϊνοποίηση). Κάτω από αυτή την κρίσιμη τιμή συγκέντρωσης, η εφαρμογή τάσης έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό σωματιδίων μέσω electrospraying (ηλεκτροψεκασμός), κυρίως λόγω της αστάθειας Rayleigh (διάλυση των τριχοειδών κυμάτων). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις πολυμερούς, εντοπίζεται ένα ανεπαρκώς παραμορφώσιμο μπλεγμένο δίκτυο αλυσίδων πολυμερούς, το οποίο δεν μπορεί να υφανθεί σε ίνες. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυμερούς, λαμβάνεται ένα μίγμα από σφαιρίδια και ίνες, ενώ οποιαδήποτε περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς συνεπάγεται το σχηματισμό συνεχών ινών. Ωστόσο, η συγκέντρωση πολυμερούς εμφανίζει άνω φράγμα, διότι το προκύπτον υψηλό ιξώδες του διαλύματος εμποδίζει τη συνεχή ηλεκτροστατική ινοποίηση.

1.3.2.1.2 Επιρροή του διαλύτη στη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση

Η μορφολογία των παραγόμενων ινών επηρεάζεται τόσο από τις φυσικές όσο και από τις ηλεκτρικές ιδιότητες του διαλύματος, οι οποίες με τη σειρά τους καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του διαλύτη. Ένα τυπικό διάλυμα που υπόκειται electrospinning αποτελείται από

80-90% w/w διαλύτη και 10-20% w/w πολυμερές. Τόσο η πυκνότητα των παραγόμενων από το electrospinning ινών, όσο και η παρουσία σφαιριδίων μεταξύ των ινών μπορούν να επηρεαστούν από την επιλογή του διαλύτη. Οι διαφορές στην ξηρότητα των συλλεγόμενων ινών αποδίδονται στην πυκνότητα και στο σημείο βρασμού του διαλύτη. Η ξηρότητα των ινών που τελικά συλλέγονται αυξάνεται, καθώς μειώνεται η πυκνότητα και το σημείο βρασμού του διαλύτη. Ο τύπος του διαλύτη μπορεί, επίσης, να επηρεάσει τη μορφολογία των ινών. Για παράδειγμα, μικρότερες ίνες παράγονται επιλέγοντας ένα σύστημα 2 διαλυτών παρά ένα μοναδικό διαλύτη.

Άλλες σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν τη διαδικασία ηλεκτροστατικής ινοποίησης και ψεκασμού είναι η εφαρμοζόμενη τάση, η απόσταση από τη βελόνα στο συλλέκτη (απόσταση από την άκρη της βελόνας εξόδου έως την επιφάνεια συλλογής), ο ρυθμός ογκομετρικής παροχής, η διάμετρος της βελόνας, αλλά και οι συνθήκες περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η ατμοσφαιρική πίεση.

1.3.2.1.3 Επιρροή της εφαρμοζόμενης τάσης στη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση

Όπως προαναφέρθηκε, καθοριστικό στοιχείο σε οποιαδήποτε ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία είναι η εφαρμογή υψηλής τάσης στο πολυμερές διάλυμα. Η διακύμανση αυτής της τάσης ελέγχει την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ της βελόνας και της επιφάνειας συλλογής, και συνεπώς τη δύναμη εφελκυσμού του διαλύματος. Όταν το ηλεκτρικό φορτίο εφαρμοστεί στο διάλυμα, το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο πυροδοτεί τη διαδικασία ηλεκτροϊνοποίησης, τη στιγμή που η ηλεκτροστατική δύναμη στο διάλυμα υπερνικά την επιφανειακή τάση του διαλύματος. Αυξανόμενου του ρυθμού τροφοδοσίας του διαλύματος, απαιτείται υψηλότερη τάση, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας σταθερός κώνος Taylor. Γενικά, τόσο η αρνητική όσο και η θετική υψηλή τάση (άνω των 6 kV) είναι ικανές να διαμορφώσουν ένα σταγονίδιο πολυμερούς στο σχήμα κώνου Taylor κατά τη δημιουργία του πίδακα. Η ισορροπία μεταξύ επιφανειακής τάσης και ηλεκτρικής δύναμης είναι κρίσιμη για τον προσδιορισμό του αρχικού σχήματος του κώνου που σχηματίζει το διάλυμα του πολυμερούς στο άκρο της βελόνας. Καθώς αυξάνεται η τάση, το μήκος του μονού πίδακα τείνει να μειώνεται ελαφρά, ενώ η γωνία κορυφής του κώνου Taylor αυξάνεται. Εάν η εφαρμοζόμενη τάση είναι υψηλότερη, η μεγαλύτερη ποσότητα ηλεκτρικού φορτίου θα προκαλέσει την επιτάχυνση του πίδακα, οπότε θα αντληθεί μεγαλύτερος όγκος διαλύματος από την άκρη της βελόνας. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα έναν μικρότερο και λιγότερο σταθερό κώνο Taylor. Καθώς το ιξώδες αυξάνεται, απαιτείται περισσότερη δύναμη για να ξεπεραστούν τόσο η επιφανειακή τάση, όσο και η ιξωδοελαστική δύναμη, για να εξασθενήσει ο πίδακας και να παραχθούν ίνες. Το κατώφλι της τάσης που απαιτείται για την επιτυχή εξαγωγή ενός φορτισμένου πίδακα από τη σταγόνα στο ακροφύσιο εξαρτάται πρωτίστως από τη συγκέντρωση του διαλύματος. Δεδομένου ότι τόσο η τάση όσο και το προκύπτον ηλεκτρικό πεδίο επηρεάζουν την τάνυση και την επιτάχυνση του πίδακα, θα επηρεάσουν και τη μορφολογία και τη διάμετρο των παραγόμενων ινών. Υψηλή τάση συνεπάγεται μεγάλη ηλεκτροστατική δύναμη και μεγαλύτερη διαπερατότητα του σταγονιδίου, με αποτέλεσμα τη μείωση της μέσης διαμέτρου των συντιθέμενων ινών.

Η μέση διάμετρος της ίνας προσεγγίζει μια ελάχιστη τιμή μετά από την αρχική αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης, αλλά στη συνέχεια αυξάνεται καθώς αυξάνεται η τάση. Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται στο μικρότερο χρόνο παραμόρφωσης που είναι διαθέσιμος για τη δημιουργία ινών, όσο αυξάνεται η τάση. Ο συγκεκριμένος χρόνος αναφέρεται συχνά ως "χρόνος πτήσης" κατά τη διάρκεια του electrospinning. Σε υψηλότερη τάση, παράγονται ίνες με σχετικά μεγάλες διαμέτρους και υψηλότερη περιεκτικότητα σφαιριδίων. Η διάταξη των ινών και η κρυσταλλικότητα θεωρείται διέπονται επίσης από την εφαρμοζόμενη τάση. Σε υψηλότερη τάση, η διάταξη των ινών καθίσταται πιο ακανόνιστη, λόγω της αστάθειας του πίδακα υπό το ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης. Παρομοίως, η κρυσταλλικότητα των συλλεγόμενων ινών αυξάνεται με την αύξηση της τάσης μέχρι ένα κρίσιμο σημείο, μετά το οποίο η κρυσταλλικότητα μειώνεται με περαιτέρω αύξηση της τάσης.

1.3.2.1.4 Επιρροή της παροχής του διαλύματος στη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση

Ο ρυθμός ροής του διαλύματος του πολυμερούς καθορίζει την ποσότητα διαλύματος που είναι διαθέσιμη στο άκρο της βελόνας κατά τη διάρκεια του electrospinning. Για μια δεδομένη τάση, υπάρχει ένας αντίστοιχος ρυθμός ροής στον οποίο διατηρείται σταθερός ο κώνος Taylor. Έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός ροής είναι ανάλογος προς τον κύβο της παρεχόμενης τάσης. Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε μεταβολή στον ρυθμό ροής σε δεδομένη ένταση ηλεκτρικού πεδίου αναμένεται να επηρεάσει τη μορφολογία των ινών. Συχνά, όμως, η δομή των ινών μεταβλήθηκε ελαφρώς μόνο με μεταβολή του ρυθμού ροής και εμφανίζει τη λιγότερο σημαντική επίδραση μεταξύ των μελετούμενων παραμέτρων της διεργασίας. Οι ίνες με σχετικά μεγάλες διαμέτρους συντίθενται συνήθως σε υψηλές ταχύτητες ροής, ενώ η χαμηλή ταχύτητα ροής συχνά αποδίδει ομοιόμορφες ίνες. Όταν το σταγονίδιο που αιωρείται στο άκρο της βελόνας είναι μεγάλο και υπάρχει υψηλός ρυθμός τροφοδοσίας, μεγαλύτερος όγκος διαλύτη πρέπει να απομακρυνθεί πριν από τη συλλογή ινών και η ταχύτητα του εξερχόμενου πίδακα είναι αυξημένη με συνέπεια ο χρόνος για την εξάτμιση του διαλύτη να είναι πολύ περιορισμένος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγάλων σφαιριδίων και τη συσσωμάτωση μεταξύ των ινών στο συλλέκτη. Η χαμηλή ροή παρέχει περισσότερο χρόνο για την εξάτμιση του διαλύτη, έτσι ώστε να μειωθεί ο σχηματισμός σφαιριδίων. Το μέσο μέγεθος πόρου στις παραγόμενες ίνες ή σωματίδια αυξάνεται, όσο αυξάνεται ο ρυθμός ροής του πολυμερούς, το οποίο πιθανότατα σχετίζεται με τις διαφορές στις διαμέτρους των ινών σε κάθε πλέγμα.

1.3.2.1.5 Επιρροή της διαμέτρου του στομίου της βελόνας στη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση

Στην περίπτωση των συστημάτων των ηλεκτροϋδροδυναμικών διεργασιών που χρησιμοποιούν τη βελόνα για την εξαγωγή του πίδακα, η εσωτερική διάμετρος της βελόνας μπορεί να επηρεάσει τη διαδικασία. Καθώς η διάμετρος της βελόνας αυξάνεται, ενδέχεται να εμφανιστεί φραγή στο άκρο της βελόνας, λόγω της επιφανειακής τάσης. Η μείωση της ακτίνας του σταγονιδίου μέσω της μείωσης της διαμέτρου της βελόνας αυξάνει την επιφανειακή τάση της σταγόνας. Υποθέτοντας ότι η ένταση του ηλεκτροστατικού πεδίου είναι σταθερή, η αρχική επιτάχυνση του πίδακα μειώνεται με την αύξηση της επιφανειακής τάσης του πολυμερούς και

επομένως η μέση ταχύτητα μειώνεται. Αυτό σημαίνει ότι ο χρόνος πτήσης από το άκρο της βελόνας μέχρι το συλλέκτη αυξάνεται, άρα αυξάνεται και ο διαθέσιμος χρόνος για την εξάτμιση του διαλύτη, την εξασθένηση του πίδακα και το διαχωρισμό σε ίνες. Συμπερασματικά, οι ίνες με μικρότερη διάμετρο και μικρότερη κατανομή μεγέθους μπορούν να ληφθούν με χρήση βελόνας μικρής διαμέτρου. Ωστόσο, αν η διάμετρος του στομίου είναι πολύ μικρή, το σταγονίδιο του πολυμερούς μπορεί να είναι δύσκολο να σχηματιστεί, ανάλογα και με την επιφανειακή τάση του διαλύματος.

1.3.2.1.6 Επιρροή της απόστασης ακροφυσίου-συλλέκτη στη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση

Η επιμήκυνση του πίδακα από πολυμερές λαμβάνει χώρα μεταξύ του άκρου της βελόνας, όπου σχηματίζεται ο κώνος Taylor και του συλλέκτη. Η απόσταση μεταξύ του ακροφυσίου και της επιφάνειας συλλογής έχει άμεση επίδραση στον χρόνο πτήσης του πολυμερούς και την ένταση του ηλεκτροστατικού πεδίου. Μικρή απόσταση μεταξύ του άκρου της βελόνας και του συλλέκτη συχνά συνεπάγεται ανεπαρκή ξήρανση της ίνας. Στην περίπτωση αυτή, ο χρόνος ξήρανσης δεν είναι αρκετός, ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης πριν οι ίνες εναποτεθούν στον συλλέκτη και συνεπώς, παρατηρούνται μερικώς ξηρές ίνες μαζί με συντηγμένες ίνες σε μορφή πυκνά πακεταρισμένης δομής. Η αύξηση της συγκεκριμένης απόστασης οδηγεί σε μεγαλύτερους χρόνους πτήσης και περισσότερο διαθέσιμο χρόνο εξάτμισης του διαλύτη, γεγονός που τείνει να μειώσει τον σχηματισμό σφαιριδίων και τη μέση διάμετρο ινών. Ωστόσο, σε σταθερή τάση, η αύξηση της απόστασης συμβάλλει στη μείωση της έντασης του ηλεκτροστατικού πεδίου, ενώ επηρεάζεται και η ινοποίηση ή ο ψεκασμός από τον πίδακα πολυμερούς. Συνεπώς, καθώς η απόσταση αυξάνεται βαθμιαία από το μηδέν, η μέση διάμετρος της ίνας φθάνει σε μια ελάχιστη τιμή πριν αυξηθεί καθώς η απόσταση αυξάνεται περαιτέρω. Η επίδραση της μείωσης της απόστασης μεταξύ βελόνας και συλλέκτη έχει παρόμοια επίδραση στη μορφολογία και στη διάμετρο των ινών όπως η αύξηση της τάσης.

Όταν η υγρασία του περιβάλλοντος είναι χαμηλή, η αύξηση της απόστασης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαμέτρου των ινών, διότι εξατμίζεται περισσότερο ο διαλύτης (χωρίς υψηλή υγρασία). Αντίθετα, όταν η υγρασία περιβάλλοντος είναι υψηλή, η αυξημένη απόσταση δεν αυξάνει την ταχύτητα εξάτμισης, παρά μόνο μειώνει την ένταση του πεδίου.

Επιπρόσθετα, ο τύπος του υλικού που επιλέγεται για τον γειωμένο συλλέκτη επηρεάζει το ποσό επιφανειακού φορτίου που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της ηλεκτροϋδροδυναμικής διαδικασίας. Για να αυξηθεί η πυκνότητα των εναποτιθέμενων ινών/σωματιδίων, προτείνεται η χρήση ενός πιο αγώγιμου συλλέκτη. Αυτό προκύπτει, επειδή η εναπόθεση των ινών/σωματιδίων στον γειωμένο συλλέκτη είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συσσώρευση επιφανειακού φορτίου στην επιφάνεια συλλογής.

1.3.2.1.7 Επιρροή των ατμοσφαιρικών συνθηκών στη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση

Οι παραμέτροι του περιβάλλοντος, ιδιαίτερα η υγρασία και η θερμοκρασία, επηρεάζουν ισχυρά τη μορφολογία των ινών και την παραγωγικότητα των ηλεκτροϋδροδυναμικών διεργασιών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της εξάτμισης του διαλύτη και της

υγρασίας-θερμοκρασίας, καθώς και μεταξύ της αγωγιμότητας του διαλύτη και της θερμοκρασίας. Και οι δύο παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ηλεκτροστατική ινοποίηση/ψεκασμό ενός διαλύματος πολυμερούς. Επιπλέον, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση του πολυμερούς διαλύματος επηρεάζονται από τη θερμοκρασία.

Η μέση διάμετρος των συντιθέμενων ινών επηρεάζεται από την υγρασία, αλλά αυτό δεν μπορεί ακόμη να γενικευθεί, καθώς η αύξηση της ατμοσφαιρικής υγρασίας σε μερικά διαλύματα πολυμερών αυξάνει τη διάμετρο των ινών/σωματιδίων, ενώ σε άλλα την ελαττώνει. Έχει επίσης δειχθεί ότι η αύξηση της υγρασίας μπορεί να επηρεάσει τη διάμετρο των πόρων και την κατανομή του μεγέθους αυτών στις ίνες και στα σωματίδια. Με μεταβολή της θερμοκρασίας παρατηρούνται διαφορές στην ομοιομορφία των διαμέτρων των ινών. Συγκεκριμένα, οι υψηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε βελτιωμένη ομοιομορφία στη διάμετρο, ανεξάρτητα από το εφαρμοζόμενο ηλεκτροστατικό πεδίο.

Πίνακας 3: Οι παράγοντες που επιδρούν στη συμπεριφορά ενός διαλύματος πολυμερούς κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση.

Ιδιότητες του διαλύματος πολυμερούς	**Ιξώδες**
	Συγκέντρωση πολυμερούς
	Μοριακό βάρος πολυμερούς
	Ηλεκτρική αγωγιμότητα
	Ελαστικότητα
	Επιφανειακή τάση
Συνθήκες διεργασίας	Εφαρμοζόμενη τάση
	Απόσταση από την άκρη της βελόνας στην επιφάνεια συλλογής
	Ρυθμός ογκομετρικής παροχής
	Διάμετρος βελόνας
Συνθήκες περιβάλλοντος	Θερμοκρασία
	Υγρασία
	Ατμοσφαιρική πίεση

[17]

1.3.2.2 Ξήρανση υπό κατάψυξη ως μέθοδος εγκλεισμού

Η ξήρανση υπό κατάψυξη ή λυοφιλίωση χρησιμοποιείται ευρέως ως τεχνική μακροπρόθεσμης συντήρησης για βακτήρια και ζύμες. Τα δείγματα προς ξήρανση πρέπει να έχουν καταψυχθεί προηγουμένως, ενώ η ξήρανση πραγματοποιείται ως απομάκρυνση του νερού με εξάχνωση, χωρίς να μεταβεί στην υγρή φάση. Οι χαμηλές θερμοκρασίες και ειδικά χαμηλότερα από το

σημείο πήξης ενδέχεται να προκαλέσουν καταστροφές στα μικροβιακά κύτταρα εξαιτίας του σχηματισμού διακυτταρικών παγοκρυστάλλων. Συνεπώς, η προσθήκη ενός κρυοπροστατευτικού παράγοντα (π.χ. τρεχαλόζη) υποστηρίζει τη διαδικασία, προστατεύοντας και συντηρώντας τους μικροοργανισμούς, τόσο κατά την κατάψυξή τους όσο και κατά τη λυοφιλίωσή τους.[19]

Τέτοιες τεχνικές ξήρανσης εξελίχθηκαν λόγω της επιτακτικής ανάγκης για παραγωγή υψηλής ποιότητας ξηρών προϊόντων, τα οποία είναι ευαίσθητα στη θερμική κατεργασία. Για το λόγο αυτό, τα συστήματα ξήρανσης με κατάψυξη περιλαμβάνουν την εφαρμογή θερμοκρασιών κάτω από το σημείο πήξεως και υπό συνθήκες πίεσης υπό κενό. Η ξήρανση υπό κατάψυξη είναι η διαδικασία ξήρανσης, στην οποία το προϊόν (π.χ. τρόφιμο) πρώτα καταψύχεται και έπειτα ξηραίνεται με άμεση εξάχνωση (δηλ., αλλαγή φάσης της περιεχόμενης υγρασίας του από στερεό σε αέριο) του πάγου υπό μειωμένη πίεση. Το προϊόν θερμαίνεται με αγωγή, εφόσον η επαφή με το κατεψυγμένο ράφι είναι κατάλληλη και με ακτινοβολία από τα υπόλοιπα ράφια και το περιβάλλον. Η μεταφορά θερμότητας με συναγωγή περιορίζεται σε συνθήκες κενού.

Η λυοφιλίωση θεωρείται ως η καλύτερη μέθοδος παραγωγής αποξηραμένων προϊόντων υψηλής ποιότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες από τις αντιδράσεις υποβάθμισης των προϊόντων επιβραδύνονται ή πρακτικά αναστέλλονται (για παράδειγμα, στα τρόφιμα ελαχιστοποιούνται οι απώλειες γεύσης και αρώματος, μεγιστοποιείται η διάθεση και η κατακράτηση των θρεπτικών ουσιών, αλλά και η πορώδης δομή), χάρη στην απουσία νερού σε υγρή μορφή, την απουσίας οξυγόνου υπό κενό και τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών. Ωστόσο, στα μειονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται το υψηλό κόστος παραγωγής, η υψηλή ενεργειακή κατανάλωση και η σχετικά χαμηλή παραγωγικότητα. Το κόστος της επεξεργασίας κενού σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι πολλές φορές υψηλότερο από το κόστος άλλων συμβατικών ξηραντήρων, γεγονός που καθιστά λιγότερο ελκυστική την ξήρανση υπό κατάψυξη για τα περισσότερα προϊόντα και περιορίζει τη χρήση της σε προϊόντα υψηλής αξίας, όπως ο καφές, οι μικροοργανισμοί, οι ενθυλακωμένες αρωματικές ενώσεις κ.α..

Εικόνα 13: Ξηραντήρας με κατάψυξη πιλοτικής κλίμακας.

[20]

Γενικά, ένας κύκλος λυοφιλίωσης αποτελείται από τρία κύρια στάδια: (α) κατάψυξη, όπου το διάλυμα μετατρέπεται σε πάγο και σχηματίζεται συμπυκνωμένο κατεψυγμένο διάλυμα. (β) πρωτογενή ξήρανση, όπου ο κατεψυγμένος διαλύτης από το προϊόν απομακρύνεται με εξάχνωση και (γ) δευτερογενή ξήρανση, όπου το μη καταψυγμένο νερό απομακρύνεται με εκρόφηση. Η διαδικασία της λυοφιλίωσης πρέπει να αποδίδει ένα προϊόν με αποδεκτά χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως η χαμηλή περιεκτικότητα σε υπόλειμμα νερού, ο σύντομος χρόνος ανασύστασης, η διατήρηση των δραστικών ιδιοτήτων του μητρικού διαλύματος, καθώς και τα βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Δεδομένου ότι η λυοφιλίωση είναι μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία, οφείλει -από τεχνική και οικονομική άποψη- να είναι στο μέτρο του δυνατού γρήγορη, αναπαραγωγήσιμη, σταθερή και να παρέχει τη δυνατότητα κλιμάκωσης από εργαστηριακή σε βιομηχανική κλίμακα.

Το πιο εκτεταμένο χρονικά και ενεργειακά στάδιο σε κάθε διεργασία ξήρανσης υπό κατάψυξη είναι η πρωτογενής ξήρανση, η οποία συμβάλλει καθοριστικά στο συνολικό κόστος της διεργασίας. Επιπρόσθετα, το φαινόμενο της μακρο-κατάρρευσης μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς ξήρανσης και συνεπώς, η επιλογή των παραμέτρων της διεργασίας έχει μεγάλη σημασία. Λόγω της σχετικά υψηλής περιεκτικότητας σε υπολειμματικό νερό στο τέλος της πρωτογενούς ξήρανσης και επομένως της χαμηλής θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης (T_g), το φαινόμενο της κατάρρευσης μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί στην αρχή της δευτερογενούς ξήρανσης, εφόσον, η θερμοκρασία ραφιού (του ξηραντήρα) αυξηθεί πολύ απότομα. Ουσιαστικά, η πρωτογενής ξήρανση είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας του ραφιού (T_s) και της πίεσης του θαλάμου. Επομένως, η κατάλληλη επιλογή αυτών των δύο παραμέτρων μπορεί να συντομεύσει την πρώτη φάση ξήρανσης.

Κατά τη βελτιστοποίηση της πρωτογενούς βαθμίδας ξήρανσης, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι κρίσιμες παράμετροι της διαμόρφωσης και οι κρίσιμες παράμετροι της διεργασίας. Η πιο σημαντική παράμετρος διαμόρφωσης είναι η θερμοκρασία κατάρρευσης (T_c). Η συγκεκριμένη θερμοκρασία αντιπροσωπεύει τη μέγιστη επιτρεπόμενη θερμοκρασία του υπό ξήρανση προϊόντος (T_p) κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς ξήρανσης, ώστε να αποφευχθεί η κατάρρευση και ως εκ τούτου να προκύψει μια αποδεκτή εμφάνιση για το τελικό προϊόν. Η T_c είναι στενά συνδεδεμένη με την $T_{g'}$ για την άμορφη μορφή ή την ευτηκτική θερμοκρασία (T_{eu}) για την κρυσταλλική μορφή. Η $T_{g'}$ ορίζεται ως μια θερμικά αντιστρεπτή μετάβαση, στην οποία το κατεψυγμένο παχύρρευστο διάλυμα μεταπίπτει σε υαλώδη κατάσταση. Διαφορετικοί τύποι εκδόχων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνθέσεις πρωτεϊνών για την αύξηση των $T_{g'}$ και T_c. Κατ' αυτό τον τρόπο, μπορεί να επιτευχθεί υψηλότερη θερμοκρασία προϊόντος (T_p) κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς ξήρανσης.

Σε πιο πρόσφατα χρόνια, εφαρμόστηκε η θεωρία της συμβατικής ξήρανσης, η οποία υποθέτει ότι η T_p κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς ξήρανσης θα πρέπει να διατηρείται 2 ° C έως 3 ° C κάτω από την $T_{g'}$, ώστε να αποφευχθεί η μακρο-κατάρρευση και να διατηρηθεί η φυσική σταθερότητα της πρωτεΐνης. Ωστόσο, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η ξήρανση πάνω από την $T_{g'}$ ή ακόμα και πάνω από την T_c (διαδικασία η οποία περιγράφεται ως επιθετική ξήρανση), δεν είναι απαραιτήτως επιβλαβής για τη σταθερότητα των βιολειτουργικών προϊόντων. Αυτό παρέχει λοιπόν μια ελκυστική επιλογή για τη βελτιστοποίηση του κύκλου ξήρανσης με κατάψυξη.

Τα κατάλληλα σχεδιασμένα σκευάσματα συνιστούν προϋπόθεση για την εφαρμογή και ολοκλήρωση των επιθετικών κύκλων ξήρανσης με κατάψυξη. Αυτά τα σκευάσματα πρέπει να περιέχουν άμορφους σταθεροποιητές που δρουν ως κρυοπροστατευτικά και λυοπροστατευτικά. Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται η σακχαρόζη και η τρεχαλόζη, καθώς επίσης και κρυσταλλικοί διογκωτικοί παράγοντες, όπως η γλυκίνη ή η μαννιτόλη. Οι παράγοντες διογκώσεως παρέχουν στο υπό ξήρανση διάλυμα ισχυρότερη δομή και συμβάλλουν στη διατήρηση της φυσικής σταθερότητας των περιεχόμενων πρωτεϊνών, ακόμη και όταν η T_c του άμορφου τμήματος ξεπεραστεί.

Όταν η πρωτογενής ξήρανση πραγματοποιείται στην περιοχή πάνω από την $T_{g'}$ (όπου $T_p > T_{g'}$), το ιξώδες της άμορφης φάσης μειώνεται, γεγονός που προκαλεί κατάρρευση της μήτρας στήριξης των κρυσταλλικών παραγόντων διόγκωσης. Έτσι, εμποδίζεται η εμφάνιση κατάρρευσης σε μακροσκοπικό επίπεδο. Από την άλλη πλευρά, είναι πιθανό να επαχθεί κατάρρευση μικρής κλίμακας, η οποία είναι γνωστή ως μικρο-κατάρρευση. Το φαινόμενο της μικροκάψουλας οδηγεί σε αυξημένο μέγεθος πόρου του υλικού ξήρανσης, το οποίο αυξάνει τον ρυθμό εξάχνωσης και μειώνει το χρόνο πρωτογενούς ξήρανσης. Επομένως, η ξήρανση σε μια περιοχή μικρο-κατάρρευσης αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη βελτιστοποίηση του κύκλου ξήρανσης με κατάψυξη. Αντιθέτως, η μακρο-κατάρρευση μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την πορεία της πρωτογενούς ξήρανσης, καθώς ο ρυθμός εξάχνωσης περιορίζεται, αν και έχει αναφερθεί ότι, ακόμη και όταν συμβαίνει μακρο-κατάρρευση, η σταθερότητα της πρωτεΐνης ενδεχόμενα δε διακινδυνεύεται.[21]

1.3.3 Φορείς – Μέσα εγκλεισμού

Τα βιοπολυμερή είναι εναλλακτικά προς τα συνθετικά πολυμερή, ωστόσο αντιμετωπίζουν δύο βασικά προβλήματα, μεταξύ των οποίων οι χαμηλές θερμοκρασίες υποβάθμισης και η υψηλή διαπερατότητα σε υδρατμούς. Υπάρχει η δυνατότητα να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, εφαρμόζοντας συνδυαστικά τη χρήση προσθέτων και την εφαρμογή της νανοτεχνολογίας για τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Οι ιδιότητες (χημικές, βιολογικές, ηλεκτρικές, θερμικές, μηχανικές, οπτικές και μαγνητικές) των νανοϋλικών διαφέρουν από τα συμβατικά υλικά. Οι αλλαγές στις ιδιότητες των υλικών στη νανοκλίμακα ευθύνονται για τα μοναδικά χαρακτηριστικά των νανο-υλικών στις νέες τεχνολογίες. Εισάγοντας τη νανοτεχνολογία στις βιομηχανίες τροφίμων, μπορεί να εξασφαλιστεί υψηλή ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Έχουν κατασκευαστεί βιοσύνθετα υλικά με τη χρήση της νανοτεχνολογίας, προκειμένου να βελτιωθεί η οξειδωτική σταθερότητα των συμβατικών πολυμερικών τροφίμων, να επιτευχθεί η ελεγχόμενη απελευθέρωση ουσιών σε διάφορους κλάδους της τεχνολογίας τροφίμων και η βέλτιστη απορρόφηση τους από τον οργανισμό. Τα υλικά με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: είτε μία διάσταση στην κλίμακα του νανομέτρου (1-100 nm) είτε μεγάλη επιφάνεια είτε μεγάλη επιφάνεια ανά όγκο και τουλάχιστον μία ιδιότητα που αποκλίνει από την αντίστοιχη ιδιότητα του ισοδύναμου συμβατικού υλικού με την ίδια σύνθεση εμφανίζουν νέες ιδιότητες και φαινόμενα.

Υπάρχει μια πληθώρα φυσικών πολυμερών που δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως μέσα ενθυλάκωσης λειτουργικών συστατικών, όπως τα προβιοτικά βακτήρια. Τα κυριότερα εξ αυτών είναι είτε πολυσακχαρίτες είτε πρωτεΐνες. Στους πολυσακχαρίτες συμπεριλαμβάνονται η

αγαρόζη, η οποία απομονώνεται από κόκκινα φύκη, η καραγενάνη που επίσης εξάγεται από κόκκινα φύκη με αλκαλική εκχύλιση, το αλγινικό που εκχυλίζεται από θαλάσσια φύκη, αλλά και παράγεται από τα βακτήρια *Pseudomonas* και *Azotobacter*, η χιτοζάνη, η οποία απομονώνεται τη χιτίνη (πολυμερές που απαντάται σε κελύφη γαρίδων και αστακών), το κόμμι τζελάν που αποτελεί προϊόν της μικροβιακής ζύμωσης του *Sphingomonas elodea* και το υαλουρονικό οξύ που βρίσκεται στους συνδετικούς ιστούς των περισσότερων οργανισμών. Μεταξύ των πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται ως μέσα εγκλεισμού το κολλαγόνο που συνιστά βασικό συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας πολλών ιστών στα θηλαστικά, η ζελατίνη η οποία παράγεται από την επεξεργασία της τριπλής έλικας του κολλαγόνου σε απλά μόρια, η λευκή ινώδης ουσία που περιέχεται στους θρόμβους του αίματος, η ελαστίνη που βρίσκεται σε ιστούς με απαίτηση ελαστικότητας και η ίνα του μεταξιού που παράγεται από τον οργανισμό *Bombyx mori*. [22]Επιπλέον, συνήθεις μήτρες εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροστατική ινοποίηση είναι η ξανθάνη, το άμυλο, η κυκλοδεξτρίνη, η πουλουλάνη, η δεξτράνη, οι τροποποιημένες κυτταρινάσες, η γλουτένη σίτου και οι πρωτεΐνες σόγιας. Επιπρόσθετα, η ινουλίνη, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, η ζεΐνη και η ολιγοφρουκτόζη αποτελούν πολλά υποσχόμενες ενώσεις για τη διανομή φαρμάκων και τον εγκλεισμό λειτουργικών τροφίμων και θρεπτικών συστατικών.[23]

1.3.3.1 Πρεβιοτικά υλικά

1.3.3.1.1 Ινουλίνη

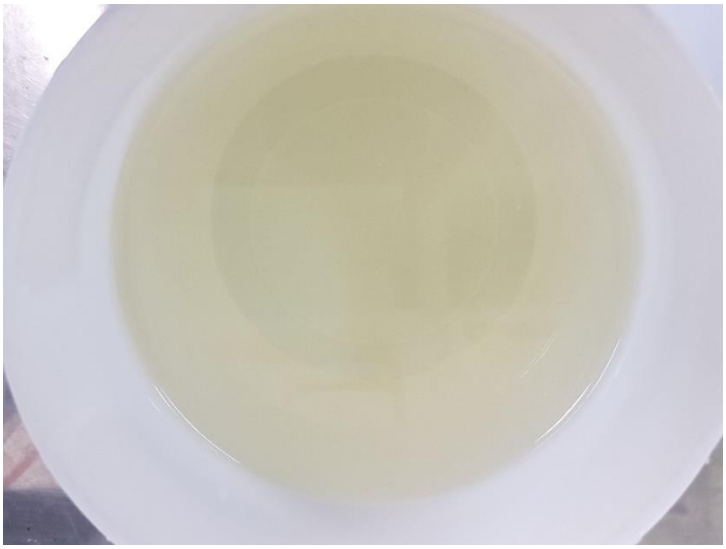
Η ινουλίνη (inulin) είναι ένας πολυσακχαρίτης, γραμμικό πολυμερές της D-φρουκτοφουρανόζης στο οποίο τα μονομερή συνδέονται με β-(2,1)-γλυκοζιδικό δεσμό με ένα υπόλειμμα D-γλυκόζης στο αναγωγικό άκρο. Πρόκειται για πολυσακχαρίτη αποθήκευσης ενέργειας που απαντάται στις ρίζες και στους κόνδυλους φυτών, όπως η ντάλια, το ραδίκι, η αγκινάρα της Ιερουσαλήμ και τα μέλη της οικογένειας *Compositae*. Η ινουλίνη χρησιμοποιείται συχνά ως φθηνή πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η ενδο-ινουλινάση (φρουκτανοϋδρολάση β-2,1-D-φρουκτάνης) καταλύει την ενδοϋδρολύση της ινουλίνης προς παραγωγή ινουλινο-ολιγοσακχαριτών, που έχουν γίνει αποδεκτοί ως λειτουργικά γλυκαντικά συστατικά, όμοια με άλλους λειτουργικούς ολιγοσακχαρίτες. Η ενδο-ινουλινάση υδρολύει την εσωτερική β-(2,1)-σύνδεση της D-φρουκτοφουρανόζη από το μόριο της ινουλίνης, για να αποδώσει μια σειρά ολιγοσακχαριτών. Από τους συγκεκριμένους ολιγοσακχαρίτες, κύρια προϊόντα συνιστούν η ινουλοτριόζη, η ινουλοτετραόζη και η ινουλοπενταόζη.[24]

1.3.3.1.2 Ολιγοφρουκτόζη

Οι ολιγοφρουκτόζες (ή φρουκτοολιγοσακχαρίτες/ fructooligosaccharides-FOS) συνιστούν ένα καινοτόμο λειτουργικό συστατικό, που περιλαμβάνουν ποικίλους ολιγοσακχαρίτες. Τα FOS συνιστούν μίγμα της 1-κεστόζης (1-κεστοτριόζη), της νυστόζης (1,1-κεστοτετραόζη) και της 1-β-φρουκτοφουρανοσυλνυστόζης (1,1,1-κεστοπενταόζη). Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες αποτελούνται από βραχείες αλυσίδες μονάδων D-φρουκτόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β-(2→1)-γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ τερματίζονται με D-γλυκόζη ενωμένη με α(1→2)-γλυκοζιτικό δεσμό. Τα FOS παράγονται τεχνητά με ενζυμική ή χημική υδρόλυση της ινουλίνης (ή πολυφρουκτόζης), ενώ απαντώνται φυσικά σε πολλά φυτά, συμπεριλαμβανομένων της

μπανάνας, του κρεμμυδιού, του σιταριού, του κριθαριού, των σπαραγγιών και της αγκινάρας Ιερουσαλήμ.

Έχει αποδειχθεί ότι οι ολιγοφρουκτόζες (ή φρουκτοολιγοσακχαρίτες/ fructooligosaccharides-FOS) αποτελούν πρεβιοτικά συστατικά, αφού παρουσιάζουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία μέσω της διέγερσης της ανάπτυξης των bifidobacteria στο ανθρώπινο έντερο, μέσω της καταστολής των σηπτικών παθογόνων και μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης χοληστερόλης στον ορό. Χάρη στις φυσικοχημικές ιδιότητές τους, τη γλυκαντική ισχύ και τη χαμηλή θερμιδική αξία, τα FOS έχουν προστεθεί στα είδη ζαχαροπλαστικής και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η ενεργειακή τους αξία είναι θεωρητικά χαμηλότερη από εκείνη της σακχαρόζης, καθώς η ενεργειακή αξία εξαρτάται από το βαθμό της απορρόφησης της ουσίας στο λεπτό έντερο και τη ζύμωσή της στο έντερο. Το ανθρώπινο λεπτό έντερο δε διαθέτει ένζυμο για την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών, συνεπώς τα FOS είναι δύσπεπτα στο λεπτό έντερο του ανθρώπου. Για να εισαχθεί σε τρόφιμο ένα πρόσθετο λειτουργικό συστατικό, πρέπει να αξιολογηθεί η ασφάλεια του. Η ασφάλεια του FOS έχει τεκμηριωθεί σε διάφορες μελέτες, καθώς δεν επέδειξαν ανεπιθύμητες ενέργειες σε αρουραίους σε δόσεις μέχρι 1.67 g/ημέρα. [25]



Εικόνα 14: Σιρόπι φρουκτοολιγοσακχαριτών.

1.3.3.2 Πρωτεϊνικά υλικά

1.3.3.2.1 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος

Η βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων κατέχει εξέχουσα θέση στην οικονομική δραστηριότητα πολλών χωρών. Για παράδειγμα, το 2016 παρήχθησαν περίπου 10 δισεκατομμύρια λίτρα γάλακτος στην Αργεντινή. Πάνω από το 40% της συνολικής παραγωγής γάλακτος προορίζεται για την παρασκευή τυριού. Από αυτή τη διαδικασία, ο ορός γάλακτος (cheese whey-CW) προκύπτει ως ογκώδες απόβλητο αποτελούμενο από πρωτεΐνες, λακτόζη, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Περίπου 0.9 λίτρα ορού γάλακτος παράγονται ανά λίτρο γάλακτος. Το CW είναι ένα μεγάλο απόθεμα διατροφικών πρωτεϊνών που συχνά δεν εντάσσεται στην ανθρώπινη διατροφική αλυσίδα, διότι δεν εφαρμόζονται διαδικασίες ανάκτησης και

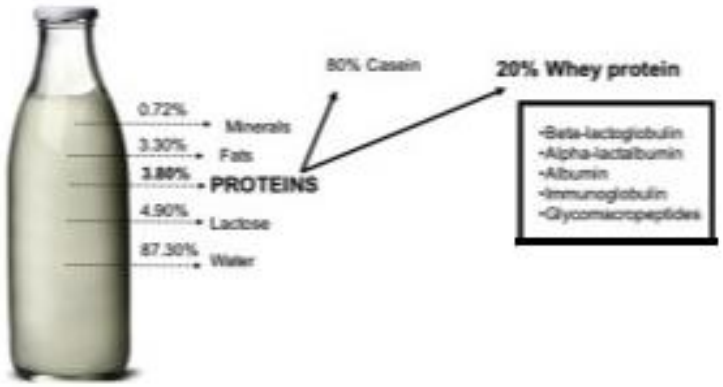
επαναχρησιμοποίησης. Αποτελεί μια ουσία με υψηλή θρεπτική αξία, αλλά πολύ ρυπογόνα στην επαφή με τα φυσικά ύδατα και με ιδιαίτερα κοστοβόρα επεξεργασία. Η περιορισμένη διαχείριση της CW φέρνει ένα μεγάλο έμμεσο περιβαλλοντικό πρόβλημα. Πολλοί ερευνητές επισημαίνουν πόσο ρυπογόνος είναι ο ακατέργαστος ορός γάλακτος, εξαιτίας της υψηλής βιοχημικής και χημικής επίδραση της απαίτησης οξυγόνου. Καταβάλλονται προσπάθειες για τον καθαρισμό του ορού γάλακτος και την ασφαλή απόρριψη του, ενώ η ενσωμάτωση των πρωτεϊνών στο τυρί αναδύεται ως μία από τις βιώσιμες και συμφέρουσες επιλογές.[26]

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος (whey protein) είναι ένα μείγμα σφαιρικών πρωτεϊνών που απομονώνονται από ορό γάλακτος ως παραπροϊόν στην παραγωγή τυριού. Το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος αποτελείται κυρίως από α-λακταλβουμίνη, β-λακτοσφαιρίνη, λευκωματίνη ορού και ανοσοσφαιρίνες. Η ικανότητα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος να σχηματίζουν πηκτές και μικροκάψουλες, χωρίς έντονη θερμική επεξεργασία και χωρίς τη χρήση χημικών ουσιών τις καθιστά ελκυστική πρώτη ύλη για εφαρμογές ελεγχόμενης διανομής θρεπτικών συστατικών στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς και έναν αποτελεσματικό φορέα για την προστασία προβιοτικών μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται σε λειτουργικά τρόφιμα. Επίσης, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι μη τοξική και κατάλληλη για εφαρμογή των ενθυλακωμένων προβιοτικών στελεχών σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γιαούρτι. Οι τεχνικές εγκλεισμού σε πρωτεϊνικές μήτρες παρέχουν μια εναλλακτική λύση στην αποκλειστική ενθυλάκωση με πηκτές αλγινικού και στην επικάλυψη ψεκασμού με λίπη, οι οποίες αποτελούν τις δύο ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους προβιοτικής ενθυλάκωσης. Επιπλέον, η ικανότητα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος να σχηματίζουν πηκτές και να συνδέονται με ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) επιτρέπει την εφαρμογή τους στην τεχνική εκβολής. Διαθέτουν, επίσης, διακεκριμένες τεχνολογικές και χημικές ιδιότητες ανάλογα με την πηγή, τη μέθοδο ανάκτησης και άλλους παράγοντες. Ωστόσο, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε συμπληρωματικού παράγοντα δημιουργεί ασθενείς και ασταθείς μηχανικά μήτρες. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε καθαρή καθώς και σε υδρολυμένη μορφή (δηλαδή τα πεπτίδια της πρωτεΐνης) εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες και ενεργούν με παρόμοιο τρόπο. Η ελεγχόμενη ενζυμική υδρόλυση είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για να βελτιωθούν οι πρωτεϊνικές ιδιότητες (διαλυτότητα, υδροφοβικότητα, ικανότητα συγκράτησης λιπών), προκειμένου να δημιουργηθούν καλύτεροι φορείς για τα χρησιμοποιούμενα προβιοτικά βακτήρια.[27]

Εικόνα 15: Σκόνη της πρωτεΐνης ορού γάλακτος.

Η β-λακτοσφαιρίνη και η α-λακτοαλβουμίνη παρουσιάζουν καλή συμπεριφορά σε διεργασίες ενθυλάκωσης, όπως η ξήρανση υπό κατάψυξη, η ξήρανση με ψεκασμό και οι ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες. Ομοίως με άλλες πρωτεΐνες, η ηλεκτροϊνοποίηση της απομονωμένης πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein isolate-WPI) και του συμπυκνώματος της πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein concentrate-WPC) αποτελεί πρόκληση, λόγω της σφαιρικής δομής των πρωτεϊνών και της υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας τους. Προκειμένου να συντεθούν συνεχείς ίνες μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, οι πρωτεΐνες του ορού πρέπει να μετουσιωθούν και να ξεδιπλωθούν. Επιπλέον, η προσθήκη βοηθητικών πολυμερών, όπως η PEO (polyethylene oxide) ή η FOS (fructooligosaccharide) είναι συχνά απαραίτητη για την εκκίνηση της εκβολής από τον κώνο Taylor. Παρατηρείται ότι σε χαμηλά pH του διαλύματος της πρωτεΐνης whey που χρησιμοποιείται στο electrospinning παράγονται περισσότερο ίνες (fibers), ενώ σε υψηλά pH παράγονται κυρίως σφαιρίδια (beads). Σε χαμηλά pH, η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης μετατρέπεται σε σπείρα τυχαίας διαμόρφωσης ή σε α-έλικα, οι οποίες συνεισφέρουν στη δημιουργία ινών.

Ο ηλεκτροψεκασμός του υδατικού διαλύματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε σωματίδια μεγέθους μικρότερου των μm επιτυγχάνεται με προσθήκη ισχυρού πολικού συν-διαλύτη χαμηλού μοριακού βάρους. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος εμφανίζει υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού και ισχυρότερη προστασία από την υγρασία και τη θερμική υποβάθμιση διαφόρων εγκλεισμένων ενώσεων, όπως το λυκοπένιο και το φολικό οξύ έναντι άλλων βιοπολυμερών, όπως η χιτοζάνη, η δεξτράνη και το άμυλο χάρη στη διαδραστικότητα της πρωτεΐνης με το εγκλεισμένο υλικό. Σε χαμηλή συγκέντρωση των ολικών διαλυμένων πολυμερών (π.χ. πρωτεΐνης ορού γάλακτος και ολιγοφρουκτόζης), η ηλεκτροϊνοποίηση των διαλυμάτων παράγει κυρίως σφαιρίδια, ενώ με αύξηση της ολικής συγκέντρωσης σχηματίζονται ίνες ολοένα και αυξανόμενης διαμέτρου.[18]



Εικόνα 16: Απομόνωση της πρωτεΐνης από τον ορό γάλακτος.

1.3.3.2.2 Ζεΐνη

Η ζεΐνη (zein) είναι η κύρια αποθηκευτική πρωτεΐνη στο καλαμπόκι. Παράγεται ως παραπροϊόν, όταν οι σπόροι του καλαμποκιού υφίστανται επεξεργασία σε τρόφιμα, ζωοτροφές, γεωργικά προϊόντα και βιοκαύσιμα. Αποτελείται από τέσσερα επιμέρους συστατικά (άλφα, βήτα, γάμα και δέλτα) που έχουν διαφορετικές πεπτιδικές αλυσίδες, μοριακά μεγέθη και διαλυτότητες. Η

πλέον άφθονη πρωτεΐνη στις εμπορικές ζεϊνες είναι η άλφα που περιέχει σύνθετες ομάδες προλαμινών με μοριακά βάρη 19 και 22 kDa και συνιστούν το 70-85% της συνολικής ζεΐνης. Η α-ζεϊνη αποτελείται από έξι κλάσματα με μοριακά βάρη από 10 έως 27 kDa. Το κλάσμα β είναι πρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους που σχηματίζεται από συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς μόρια α-ζεΐνης.

Εικόνα 17: Ζεΐνη.

Η α-ζεΐνη είναι διαλυτή σε 70-95% αιθανόλη. Το κλάσμα της β-ζεΐνης είναι διαλυτό σε αιθανόλη 60% και αδιάλυτο σε αιθανόλη 95%. Το κλάσμα της γ-ζεΐνης είναι διαλυτό σε αιθανόλη με κάποιον αναγωγικό παράγοντα. Οι εμπορικές ζεΐνες είναι ελάχιστα διαλυτές σε καθαρό νερό, αλλά διαλυτές σε υδατικά διαλύματα αιθανόλης, ακετόνης και υδατικά αλκαλικά διαλύματα με pH>11,5. Η ζεΐνη -λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας στους περισσότερους διαλύτες- συνιστά δύσχρηστη πρώτη ύλη για την παρασκευή βιοϋλικών.

Η ζεΐνη περιέχει σημαντική ποσότητα μη πολικών αμινοξέων (τα μη πολικά αμινοξέα αποτελούν περίπου το 50% των ολικών υπολειμμάτων αμινοξέων στη ζεΐνη: συμπεριλαμβανομένης της λευκίνης, της αλανίνης και της προλίνης αποτελώντας για το λόγο αυτό μια ισχυρά υδρόφοβη πρωτεΐνη. Μεταξύ των βιοπολυμερών, η ζεΐνη διαθέτει ένα αξιοσημείωτο υδρόφοβο χαρακτήρα. Πράγματι, η ζεΐνη με υδρόφοβες και υδρόφιλες ομάδες στη δομή της έχει αμφίφιλο χαρακτήρα με υψηλή εμπορική αξία, καθώς συνιστά ιδανική εναλλακτική στα συνθετικά πολυμερή. Επιπρόσθετα, η ζεΐνη είναι φιλική προς το περιβάλλον και ασφαλής για εφαρμογή σε τρόφιμα (Generally Recognised As Safe-GRAS). Επιπλέον, η ζεΐνη εμφανίζει καλή δομή σχηματιζόμενων σωματιδίων κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό.

Η ζεΐνη παρουσιάζει ιδιότητες σχηματισμού λεπτής μεμβράνης, με σκληρή και εύθραυστη όμως επιφάνεια. Επίσης, η ζεΐνη επιδεικνύει εγγενή ικανότητα απομάκρυνσης ελεύθερων ριζών. Η ζεΐνη μπορεί να συνδεθεί και να προστατεύσει τα λιπίδια από την υποβάθμιση. Οι ζεΐνες ως μεμβράνες και βρώσιμες επικαλύψεις στα τρόφιμα αποτρέπουν την απώλεια ποιότητάς τους, λειτουργώντας ως φραγμοί οξυγόνου. Οι ιδιότητες της ζεΐνης εξαρτώνται τόσο από τη σύνθεση των αμινοξέων της όσο και από τις μοριακές δομές της στο επίπεδο της νανο-κλίμακας. Οι

ανανεώσιμες πηγές της ζεΐνης, η αφθονία, η βιοαποικοδομησιμότητα, η βιοσυμβατότητα, ο υδρόφοβος χαρακτήρας και οι ιδιότητες σχηματισμού φιλμ και ινών καθιστούν τη ζεΐνη ως ένα πολλά υποσχόμενο βιοπολυμερές για την βιομηχανία τροφίμων. Το μεγάλο εύρος του ισοηλεκτρικού σημείου της ζεΐνης την καθιστά κατάλληλη για τη διανομή πολυάριθμων θρεπτικών συστατικών στον οργανισμό, ενώ το θετικό της φορτίο συνεισφέρει στην παράδοση αρνητικά φορτισμένων φαρμάκων.[23]

Βάσει ταξινόμησης, οι προλαμίνες είναι φυτικές πρωτεΐνες που είναι διαλυτές σε 70% αιθανόλη. Μαζί με τις γλουτελίνες (οι οποίες είναι διαλυτές σε αραιό οξύ και βάση), οι προλαμίνες είναι σημαντικές πρωτεΐνες αποθήκευσης απαραίτητες για τη βλάστηση των σπόρων. Η προλαμίνη ζεΐνη είναι αδιάλυτη στο νερό λόγω της παρουσίας μεγάλων κλασμάτων υπολειμμάτων υδρόφοβων αμινοξέων (π.χ. προλίνης, γλουταμίνης, λευκίνης και αλανίνης), αλλά παράλληλα έχει χαμηλή περιεκτικότητα φορτισμένων αμινοξέων. Υπάρχουν διάφορα κλάσματα προλαμινών στο καλαμπόκι (δηλ. α, β, γ ή δ), εκ των οποίων η α-ζεΐνη αντιπροσωπεύει περίπου το 80% της συνολικής περιεκτικότητας σε προλαμίνη. Η υδρόφοβη ιδιότητα της ζεΐνης είναι επιθυμητή για την ενθυλάκωση και την ελεγχόμενη απελευθέρωση των βιοδραστικών ουσιών σε υδατικό περιβάλλον.

Ο τυπικός διαλύτης που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροϊνοποίηση της ζεΐνης είναι το υδατικό διάλυμα αλκοόλης. Παρόμοια με άλλα βιοπολυμερή, η σύνθεση του διαλύτη υπαγορεύει την τελική μορφολογία των υλικών. Η συμπεριφορά του διαλύματος της ζεΐνης κατά τη διεργασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης διαφέρει αν ο διαλύτης αποτελείται κατά 70% κατά βάρος (% w/w) από αιθανόλη ή από ισοπροπανόλη. Και τα δύο διαλύματα επιδεικνύουν ιξωδοελαστική συμπεριφορά με το διάλυμα ζεΐνης σε νερό-αιθανόλη 30-70 % w/w να έχει υψηλότερο φαινόμενο ιξώδες από το διάλυμα ζεΐνης σε νερό-ισοπροπανόλη 30-70 % w/w, το οποίο συσχετίζεται με τις συνεχείς ίνες σε σχήμα κορδέλας και με τα σφαιρίδια, αντίστοιχα. Η ανάλυση FTIR αποκαλύπτει ότι το υδατικό διάλυμα αιθανόλης προάγει το σχηματισμό δευτεροταγούς δομής α-έλικας για τη ζεΐνη, ενώ εκείνο της ισοπροπανόλης αυξάνει την ενδομοριακή και τη διαμοριακή δομή πρωτεϊνών β-πτυχωτών φύλλων για τη ζεΐνη. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα, η αναλογία αιθανόλης/νερού και το pH είναι οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στη μορφολογία της ζεΐνης κατά τη διάρκεια της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας. Σε σταθερή συγκέντρωση ζεΐνης, η αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης (π.χ. από 60 σε 80% w/w) επιφέρει αύξηση της διαμέτρου των ινών έως το σχηματισμό σφαιριδίων σε συγκέντρωση αιθανόλης άνω του 80% w/w. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη πτητικότητα του διαλύτη, λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης της πτητικής αιθανόλης έναντι του νερού, προκαλώντας τη γρηγορότερη στερεοποίηση του πολυμερούς και την επακόλουθη παρεμπόδιση σχηματισμού ινών. Επιπρόσθετα, σε χαμηλό pH, όπου παρατηρείται σχετικά υψηλό ιξώδες του διαλύματος ηλεκτροϊνοποίησης προκύπτει μορφολογία ινών, αντίθετα με τις τιμές υψηλού pH και σχετικά χαμηλού ιξώδους, όπου παρατηρείται μορφολογία σωματιδίων. Τα διαλύματα ζεΐνης σε αιθανόλη-νερό είναι επιρρεπή σε στερεοποίηση, εξαιτίας της εξάτμισης του διαλύτη, η οποία μπορεί να φράξει τη σπειροειδή απόληξη της διάταξης. Για την υπέρβαση αυτού του προβλήματος, η πλήρωση του κώνου Taylor με ατμό του διαλύτη (π.χ. της αιθανόλης) μπορεί να αποτρέψει την πρόωρη στερεοποίηση του διαλύματος στην απόληξη (spinneret), που διακόπτει τη διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης. Παρά το γεγονός ότι η ζεΐνη δεν είναι διαλυτή στο νερό,

η μακροχρόνια έκθεση της συντιθέμενης ζεΐνης σε υδατικό περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει σημαντική διόγκωση.

Οι ίνες και τα σωματίδια της ζεΐνης χρησιμοποιούνται ως φορείς για ποικίλες βιοενεργές ενώσεις. Για παράδειγμα, στη ζεΐνη εγκλείονται ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα, β-καροτένιο, α-τοκοφερόλη και γαλλικό οξύ. Ο εγκλεισμός των ενώσεων αυτών στη ζεΐνη εξασφαλίζει την οξειδωτική τους σταθερότητα, τη διατήρηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας υπό δριμείες συνθήκες, όπως η έκθεση σε χαμηλό pH, σε ακτινοβολία UV, σε υψηλή θερμοκρασία, σε ενζυμική δραστηριότητα και την αύξηση της διατηρησιμότητάς τους κατά την αποθήκευση. Συχνά, πέρα από τη ζεΐνη προστίθεται στο διάλυμα του electrospinning και κάποια άλλη πολυμερική μήτρα (όπως η ολιγοφρουκτόζη) για την ενίσχυση των παραγόμενων ινών. Η ζεΐνη έχει χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροϊνοποίηση και σε μη εδώδιμες εφαρμογές. Για παράδειγμα, έχει αξιοποιηθεί ως φορέας των ανθοκυανινών (χρωστικές που απομονώνονται από το κόκκινο λάχανο) ως πεχαμετρικός παράγοντας από βιολογικές πρώτες ύλες. Οι εφαρμογές σε ανιχνευτές και δείκτες είναι πολλά υποσχόμενες για την έξυπνη συσκευασία τροφίμων, καθώς προσφέρουν ένδειξη της ποιότητας του τροφίμου.[18]

1.4 Χαρακτηρισμός τελικού προϊόντος εγκλεισμού

1.4.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry-DSC)

Κατά την ανάλυση με τη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, το εξεταζόμενο δείγμα και το δείγμα αναφοράς θερμαίνονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες και καταγράφεται συνεχώς ο χρόνος ανάλυσης, η θερμοκρασία και το θερμικό περιεχόμενο (η ενέργεια) που απαιτείται για να κρατηθούν το δείγμα υπό ανάλυση και το δείγμα αναφοράς στην ίδια θερμοκρασία. Η μείωση ή η αύξηση της συγκεκριμένης ενέργειας εξηγείται από την εμφάνιση φυσικών ή χημικών φαινομένων.

Τα κύρια χαρακτηριτικά της θερμικής ανάλυσης που την καθιστούν άκρως σημαντική και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική φυσικοχημικών αναλύσεων είναι η απλότητά της, η ταχύτητά της και η ικανότητά της για άμεση ταυτοποίηση των ενώσεων. Συχνά, συνδυάζεται με συμπληρωματικές τεχνικές, όπως η περίθλαση ακτίνων Χ και η μικροσκοπία. Οι τεχνικές προσδιορισμού των θερμικών σταθερών με θερμικές μεθόδους διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

1. Κλασική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (DTA)
2. Μέθοδοι Ροής Θερμότητας (Heat Flux Methods)
3. Θερμιδομετρικές Μέθοδοι (Calorimetric Methods).

Με τον όρο «θερμικές σταθερές» εννοείται ένα πλήθος παραμέτρων, οι οποίες χαρακτηρίζουν τη θερμική συμπεριφορά ενός στοιχείου ή συστήματος. Οι κυριότερες εξ αυτών είναι η θερμική αγωγιμότητα-λ, η ειδική θερμότητα-C και ο συντελεστής θερμικής διαχυτότητας-α. Οι σταθερές αυτές εξαρτώνται από ποικίλες συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, η πίεση κ.α.. Η σχέση μεταξύ των τριών παραπάνω σταθερών είναι η εξής: $\alpha = \frac{\lambda}{\rho \cdot c}$, όπου π=πυκνότητα του δείγματος. Η κλασική διαφορική θερμική ανάλυση προσδιορίζει το συντελεστή διαχυτότητας. Μέσω των μεθόδων ροής θερμότητας, μπορούν να υπολογισθούν και οι τρεις σταθερές. Οι θερμιδομετρικές μέθοδοι προσδιορίζουν άμεσα τις θερμότητες μετασχηματισμού και τις ειδικές

θερμότητες. Εν αντιθέσει με την κλασική DTA, στις θερμιδομετρικές μεθόδους, οι μετρητές της θερμοκρασίας (θερμοζεύγη ή θερμόμετρα αντίστασης) βρίσκονται εκτός του δείγματος, ενώ τα βάρη του δείγματος που αναλύεται και του δείγματος αναφοράς είναι μικρότερα, καθώς κυμαίνονται από 0.1 έως 50 mg.

Στην DTA οι μεταβολές της ενθαλπίας προσδιορίζονται μέσω υπολογισμού των επιφανειών κάτω από τις κορυφές της καμπύλης DTA.Όμως, το μέγεθος των κορυφών μεταβάλλεται με μη γραμμικό τρόπο συναρτήσει της θερμοκρασίας στην οποία λαμβάνονται οι μετρήσεις. Για την υπέρβαση της συγκεκριμένης δυσκολίας, ο γραμμικοποιητής προγραμματίζεται με τους παράγοντες βαθμονόμησης σε όλο το εύρος πιθανών θερμοκρασιών του δείγματος. Έπειτα από την ανίχνευση της θερμοκρασίας του δείγματος (T_s), παράγεται μια γραμμικά ανάλογη έξοδος, σε mV, η οποία εισάγεται στο καταγραφικό. Κατά συνέπεια αυτής της γραμμικοποίησης, το μέγεθος της κορυφής είναι ευθέως ανάλογο προς την ενέργεια της αντίδρασης, ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας. Συμπερασματικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεση οπτική σύγκριση μεταξύ κορυφών που εμφανίζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Μια περίπτωση θερμιδομετρικής σάρωσης είναι και η διαφορική θερμιδομετρική σάρωση (DSC), η αρχή της οποίας βασίζεται στην καταγραφή της διαφοράς μεταξύ των ενεργειών που απαιτούνται, ώστε να διατηρηθούν στην ίδια θερμοκρασία το εξεταζόμενο δείγμα και το δείγμα αναφοράς.[28]

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης είναι μια τεχνική στην οποία η ροή θερμότητας (ισχύς) που προσφέρεται στο εξεταζόμενο δείγμα παρακολουθείται σε σχέση με το χρόνο ή τη θερμοκρασία, ενώ η θερμοκρασία του δείγματος προγραμματίζεται σε συγκεκριμένη ατμόσφαιρα. Στην πράξη, παρακολουθείται η διαφορά στη ροή θερμότητας μεταξύ ενός δισκίου που περιέχει το δείγμα και ενός κενού δισκίου. Το όργανο που χρησιμοποιείται ονομάζεται διαφορικό θερμιδόμετρο σάρωσης ή DSC. Το DSC διατίθεται στο εμπόριο ως DSC αντιστάθμισης ισχύος ή ως DSC ροής θερμότητας.

Το DSC με αντιστάθμιση ισχύος έχει δύο σχεδόν ταυτόσημα (σε όρους θερμικών απωλειών) κελιά καταμέτρησης, ένα για το υπό ανάλυση δείγμα και ένα για το δείγμα αναφοράς. Και τα δύο κελιά θερμαίνονται με ξεχωριστές συσκευές θέρμανσης, ενώ οι θερμοκρασίες τους μετρώνται με διακριτούς αισθητήρες. Η θερμοκρασία και των δύο κελιών μπορεί να μεταβάλλεται γραμμικά ως συνάρτηση του χρόνου και ελέγχεται από έναν βρόχο ελέγχου της μέσης θερμοκρασίας. Ένας δεύτερος βρόχος διαφορικής ρύθμισης ελέγχει την παροχή ισχύος, μόλις αρχίσει να εμφανίζεται διαφορά θερμοκρασίας λόγω κάποιας εξώθερμης ή ενδόθερμης διεργασίας στο δείγμα. Το διαφορικό σήμα ισχύος καταγράφεται ως συνάρτηση της πραγματικής θερμοκρασίας του υπό ανάλυση δείγματος.

Στο DSC με ροή θερμότητας χρησιμοποιείται ένας μόνο θερμαντήρας για να αυξήσει τη θερμοκρασία τόσο του κελιού με το εξεταζόμενο δείγμα όσο και του κελιού με το δείγμα αναφοράς. Παρατηρούνται μικρές διαφορές θερμοκρασίας λόγω εξώθερμων/ενδόθερμων διεργασιών στο δείγμα και καταγράφονται συναρτήσει της προγραμματισμένης θερμοκρασίας.

Το DSC χρησιμοποιείται έπειτα από σωστή βαθμονόμηση στην ανάλυση πολυμερών για τρεις κυρίως διαφορετικούς τύπους πειραμάτων.

α) προσδιορισμός της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης(τιμή T_g)

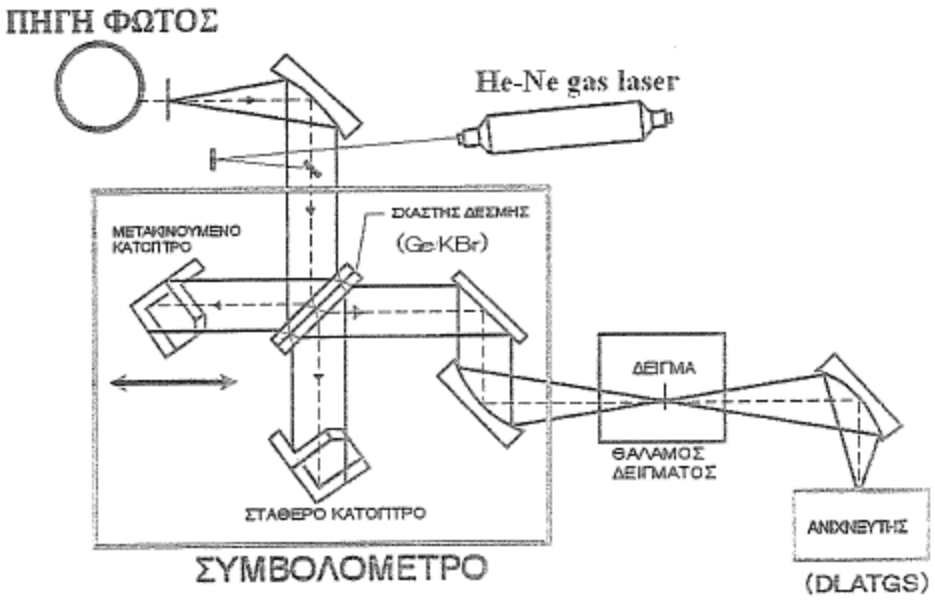
β) προσδιορισμοί θερμοκρασίας τήξης/ανακρυστάλλωσης και θερμότητας (τιμές T_m / T_c και H_f / H_c)

γ) μετρήσεις σε αντιδρώντα συστήματα.[29]

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, που συμβολίζεται ως T_g, είναι μία άκρως σημαντική ιδιότητα, όταν εξετάζεται ένα πολυμερές για συγκεκριμένη τελική χρήση. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης είναι η θερμοκρασία, κάτω από την οποία οι φυσικές ιδιότητες των πλαστικών μεταβάλλονται σε εκείνες της υαλώδους ή κρυσταλλικής κατάστασης. Πάνω από την T_g συμπεριφέρονται σαν ελαστικά υλικά, ενώ κάτω από την T_g τα μόρια ενός πλαστικού έχουν σχετικά μικρή κινητικότητα. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης είναι συνήθως εφαρμόσιμη σε πλήρως ή εν μέρει άμορφα πλαστικά. Οι ιδιότητες ενός πλαστικού μπορεί να είναι δραματικά διαφορετικές πάνω και κάτω από την T_g του. Η τιμή της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης εξαρτάται από το ρυθμό καταπόνησης και το ρυθμό ψύξης ή θέρμανσης, επομένως δεν υπάρχει ακριβής τιμή για την Tg ενός υλικού.[30]

1.4.2 Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR)

Το συμβολόμετρο Μίκελσον αποτελεί το σημαντικότερο στοιχείο ενός φασματομέτρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Το φως διέρχεται μέσω ενός σχάστη δέσμης, ο οποίος διαχωρίζει το φως σε δύο δέσμες προς διαφορετικές κατευθύνσεις, οι οποίες σχηματίζουν μεταξύ τους ορθή γωνία. Η μία δέσμη κατευθύνεται σε σταθερό κάτοπτρο και ανακλάται πίσω στο σχάστη δέσμης, ενώ η άλλη κατευθύνεται προς ένα κινούμενο κάτοπτρο, το οποίο κινείται συνεχώς πάνω σε διαδρομή μήκους 2.5 μm. Η κίνηση του κατόπτρου καθιστά το συνολικό μήκος διαδρομής της ακτίνας μεταβαλλόμενο σχετικά με εκείνη από το σταθερό κάτοπτρο. Όταν οι δύο δέσμες συναντώνται πάλι στο σχάστη δέσμης, επανασυνδυάζονται, αλλά αυτή η διαφορά μήκους των διαδρομών δημιουργεί μια διάταξη παρεμβολών, το συμβολόγραμμα. Η επανασυνδυασμένη ακτίνα διαπερνά το δείγμα και το δείγμα απορροφά όλα τα διαφορετικά μήκη κύματος, τα οποία χαρακτηρίζουν το φάσμα του και αφαιρούνται από το συμβολόγραμμα. Τελικά, ο ανιχνευτής μετρά τη διακύμανση ενέργειας ως προς το χρόνο για όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα. Μία σάρωση απαιτεί μόνο μερικά δευτερόλεπτα και αποθηκεύεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για να προστεθούν κι άλλες σαρώσεις, θα πρέπει να συμπίπτουν με την αρχική. Αυτό είναι εν γένει αδύνατον, λόγω των θερμικών διακυμάνσεων και δονήσεων στο εργαστήριο. Για την επίλυση του προβλήματος αυτού, χρησιμοποιείται ένα λέιζερ ηλίου-νέου, το οποίο εκπέμπει ακτίνα εντός του συμβολομέτρου και η παρεμβολή που δημιουργεί χρησιμοποιείται ως συχνότητα αναφοράς.



Εικόνα 18: Η τυπική διάταξη του υπέρυθρου φασματομέτρου με μετασχηματισμό Fourier.

Παρά το γεγονός ότι η ενέργεια ως προς το χρόνο αποτελεί έναν ασυνήθιστο τρόπο καταγραφής ενός φάσματος, ο μετασχηματισμός Fourier επιτρέπει τη μετατροπή ενός φάσματος «έντασης προς χρόνο» σε φάσμα «έντασης προς συχνότητα», όπως και στη συμβατική υπέρυθρη φασματοσκοπία. Μέσω της φασματομετρίας IR και FTIR μπορεί να ταυτοποιηθεί μια ουσία και να ελεγχθεί η καθαρότητά της. Οι υπέρυθροι φασματογράφοι χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο σε βιομηχανική όσο και σε εργαστηριακή κλίμακα, ενώ υπάρχουν και φορητές εκδόσεις αυτών για αναλύσεις πεδίου.[31] Η ανάλυση των φασμάτων υπερύθρου φανερώνει ποια μόρια υπάρχουν σε ένα δείγμα και σε τι συγκεντρώσεις, συνεπώς προσφέρει τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά αποτελέσματα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι υπέρυθρων φασματόμετρων, αλλά τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι τα φασματόμετρα FTIR.[32]

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

2.1.1 Καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους *Streptococcus thermophilus*

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του στελέχους βακτηρίων *S.thermophilus* είναι τα παρακάτω:

για τα 2 L θρεπτικού υλικού:

- 20 g πεπτόνη, από ενζυμική πέψη κρέατος
- 5 g μαγιά
- 1.2 g K_2HPO_4
- 0.5 g $MgSO_4$ ή 1.02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 10 g λακτόζη ή σε ένυδρη μορφή 10.52 g (λακτόζη$\cdot H_2O$)
- 1 g ασκορβικό οξύ
- 2 L υπερκάθαρου νερού
- 5 g άγαρ-άγαρ για τα τρυβλία
- και HCl για τη μείωση του pH.

για το 1 L διαλύματος PBS (Phospate-Buffered Saline, μετρούμενο pH=6.82):

- 8 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1.44 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
- 0.24 g KH_2PO_4
- 1 L υπερκάθαρο νερό.

και εμπορική σκόνη *Streptococcus thermophilus* που έχει υποστεί ξήρανση υπό κατάψυξη, απλό στέλεχος που αποθηκεύεται σε καταψύκτη (SANYO BIOMEDICAL FREEZER MDF-436) στους -30°C.

Εικόνα 19:Ο καταψύκτης (SANYO BIOMEDICAL FREEZER MDF-436).

2.1.2 Εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων

Τα υλικά που απαιτήθηκαν για την ενθυλάκωση των βακτηρίων σε πολυμερικές μήτρες είναι τα εξής:

- ζεΐνη
- ολιγοφρουκτόζη «frutalose L92»
- πρωτεΐνη ορού γάλακτος
- αιθανόλη
- εμφιαλωμένο νερό «Βίκος»
- και η παραχθείσα σκόνη του στελέχους *Streptococcus thermophilus*, η οποία έχει ξηρανθεί με κατάψυξη.

2.1.3 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού

2.1.3.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της απόδοσης εγκλεισμού των βακτηρίων σε πολυμερικές μήτρες είναι:

- αιθανόλη
- και τα εγκλεισμένα βακτήρια.

2.1.3.2 Υπόλοιπες τεχνικές (DSC, ATR-FTIR)

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των αναλύσεων της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης και της Φασματομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier είναι:

- ακετόνη και αιθανόλη για καθαρισμό των οργάνων πριν από κάθε μέτρηση

- και τα εγκλεισμένα βακτήρια ως προς ανάλυση δείγματα.

2.1.3.3 Μελέτη βιωσιμότητας των παραγόμενων ενθυλακωμένων βακτηρίων

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της βιωσιμότητας των παραγόμενων ενθυλακωμένων βακτηρίων σε πολυμερικές μήτρες είναι:

- διάλυμα HCl με περιεκτικότητα 32% v/v σε HCl
- και στερεό NaCl.

2.2 Μέθοδοι, όργανα και συσκευές

2.2.1 Καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους *Streptococcus thermophilus*

Για την καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Streptococcus thermophilus* ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1. Οι ποσότητες των υλικών που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας 4 δεκαδικών (KERN ABS 220) και ακολούθως διαλύονται σε 800 ml νερό σε ποτήρι ζέσης των 2 L, το οποίο τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα (SELECTA MULTIMATIC-5N) και αναδεύεται μέχρι την πλήρη διάλυση των συστατικών.

Εικόνα 20: Αναλυτικός Ζυγός, ακρίβειας 4 δεκαδικών (KERN ABS 220).

Εικόνα 21: Μαγνητικός Αναδευτήρας (SELECTA MULTIMATIC-5N).

2. Μεταφέρεται το μίγμα σε ογκομετρικό κύλινδρο των 2 L και συμπληρώνεται με νερό ως τη χαραγή των 2 L και αναδεύεται. Το pH ρυθμίζεται στο 6.5 προσθέτοντας στάγδην HCl στον κύλινδρο και παρακολουθώντας το pH με το ηλεκτρονικό πεχάμετρο(MARTINI Instruments 180 Bench Meter).

Εικόνα 22: Ηλεκτρονικό πεχάμετρο (MARTINI Instruments 180 Bench Meter).

3. Έπειτα, το μίγμα μοιράζεται σε κωνικές φιάλες των 1 και 2 L (π.χ. σε 3 των 2 L μεταφέρονται από 400-450 mL υγρό θρεπτικό υλικό και σε 2 των 2 L μεταφέρονται από 200 mL θρεπτικό υλικό), έτσι ώστε να μην πληρώνονται με υγρό πέρα από το 25% του

όγκου της φιάλης, ενώ διατηρείται μια ποσότητα 250 mL του υγρού θρεπτικού υλικού σε πωματισμένη φιάλη για παραγωγή των τρυβλίων.

4. Κάθε τρυβλίο πληρώνεται με 25 mL θρεπτικού υλικού.
5. Στην ποσότητα αυτή, προστίθεται 2% w/v, δηλαδή 5 gr, σκόνης άγαρ, χωρίς να αναδευτεί η φιάλη.
6. Στη συνέχεια, οι φιάλες πωματίζονται με υδρόφοβο βαμβάκι και μεταφέρονται μέσα σε μεταλλικό κάδο στο εργαστηριακό αυτόκλειστο (SANYO Labo Autoclave MLS 2420) για αποστείρωση στους 121^{o} C επί 20 λεπτά. Παράλληλα αποστειρώνονται φιαλίδια Eppendorf, tips για τις αυτόματες πιπέτες (όγκων 20-200 μL και 100-1000 μL) και PTFE φίλτρα των 0.22 μm.

Εικόνα 23: Εργαστηριακό αυτόκλειστο για αποστείρωση (SANYO Labo Autoclave MLS 2420).

Τα βήματα 7.-9. πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες (αναμμένη φλόγα και χρήση αιθανόλης), μέσα σε απαγωγό μικροβιολογίας-το λεγόμενο hood (NÜVE MN 090 microbiological safety cabinet).

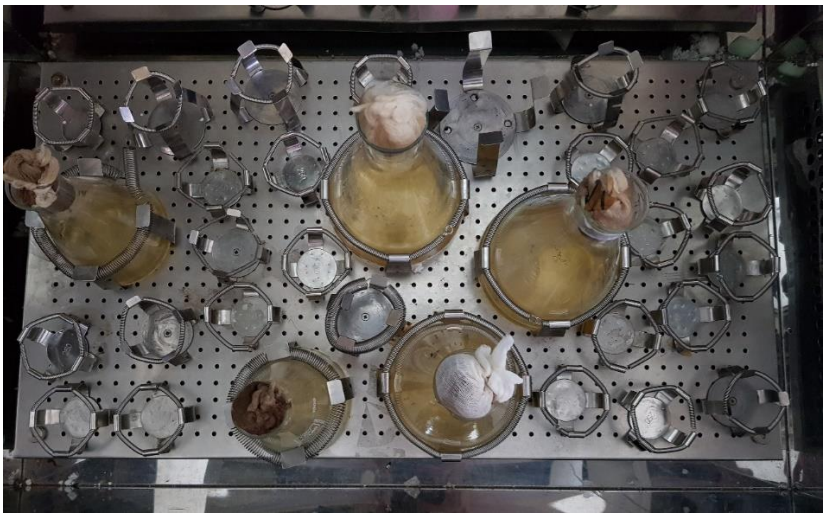
7. Το 1 g ασκορβικού οξέος διαλύεται σε 10 mL υπερκάθαρου νερού, συνεπώς παρασκευάζεται διάλυμα συγκέντρωσης 100 g/L. Αφού οι φιάλες απομακρυνθούν από τον αποστειρωτήρα και φθάσουν σε θερμοκρασία ≈40^{o}C, ώστε να μην απενεργοποιηθεί το ασκορβικό οξύ, αλλά και να μη στερεοποιηθεί το θρεπτικό υλικό που περιέχει άγαρ, διαλύεται η αντίστοιχη ποσότητα διαλύματος ασκορβικού οξέος διαβιβάζοντάς το με σύριγγα μέσα από τα φίλτρα 0.22 μm για αποστείρωση (ώστε να κατακρατηθούν από τους πόρους διαμέτρου μικρότερης από το μέγεθος του κυττάρου άλλα μικρόβια) σε

κάθε φιάλη και συγκεκριμένα $V_{ασκορβικού} = \frac{0.5\,\frac{g}{L} \cdot V_{φιάλης}}{100\frac{g}{L}}$, αφού το διάλυμα ασκορβικού έχει συγκέντρωση 100 g/L και πρέπει να διαλύονται 0.5 g ασκορβικού ανά L διαλύματος.

8. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό με άγαρ μεταφέρεται γρήγορα σε 10 τρυβλία, τα οποία αφήνονται να πήξουν με κλειστά καπάκια. Τα τρυβλία μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για καταμέτρηση αποικιών ή μέχρι και 2 μέρες αργότερα, εφόσον συντηρηθούν σε ψύξη.
9. Από κάθε κωνική φιάλη αφαιρείται με αυτόματη πιπέτα 1 mL θρεπτικού υλικού για κάθε 250 mL του περιεχομένου θρεπτικού υλικού της φιάλης, τα οποία αναμιγνύονται σε αποστειρωμένο σωλήνα Falcon με πιπέτα. Στο σωλήνα αυτό, διαλύεται μια ποσότητα (περίπου 2 κουταλιές με αποστειρωμένη σπαθίδα) της εμπορικής, λυοφιλιωμένης σκόνης βακτηρίων S. thermophilus, αναδεύεται προσεκτικά και σε κάθε φιάλη μεταφέρεται με αυτόματη πιπέτα 1 mL υγρού για κάθε 250 mL του περιεχομένου θρεπτικού υλικού της φιάλης.

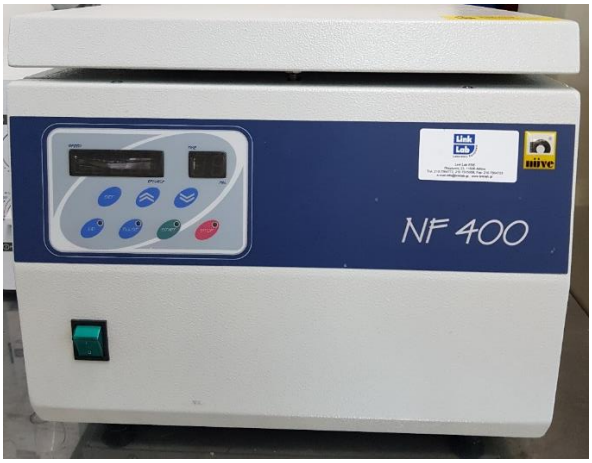
Εικόνα 24: Απαγωγός μικροβιολογίας (NÜVE MN 090 Microbiological Safety Cabinet).

10. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρα (Zhicheng ZHWY-211C Incubator Shaker) για 48 h, σε θερμοκρασία 37 °C, υπό ανάδευση 180 rpm, παρακολουθώντας την οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών στις 24 και 48 h με φασματοφωτόμετρο, ώστε να τερματιστεί η καλλιέργεια στην εκθετική φάση.



Εικόνα 25: Οι κωνικές φιάλες στο εσωτερικό του επωαστήρα (Zhicheng ZHWY-211C Incubator Shaker).

11. Μόλις αφαιρεθούν οι κωνικές φιάλες από τον επωαστήρα, μεταφέρεται το περιεχόμενο τους σε καθαρά δοχεία των 250 mL (γεμίζοντάς τα μέχρι τα 200-220 mL), τα οποία ισοζυγίζονται ανά 2 (με μέγιστη αποδεκτή απόκλιση ±0.5 g).
12. Τα δοχεία τοποθετούνται στη φυγόκεντρο (NÜVE NF 400 Centrifuge), σε αντιδιαμετρικές θέσεις τα ισοβαρή, για 10 min, στις 8000 rpm. Απομακρύνονται από τη φυγόκεντρο με προσοχή, ώστε να μην ξαναδιαλυθεί η βιομάζα στο θρεπτικό υλικό, απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό, ενώ το ίζημα (κύτταρα) αποπλένεται με ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα PBS και αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης.
13. Ακολούθως, το διάλυμα κυττάρων σε PBS μεταφέρεται σε σωλήνες Falcon που ισοζυγίζονται και φυγοκεντρούνται ξανά, για 10 min στις 6000 rpm.



Εικόνα 26: Η χρησιμοποιούμενη φυγόκεντρος (NÜVE NF 400 Centrifuge).

14. Το υπερκείμενο υγρό (που οφείλει να είναι διαφανές) απορρίπτεται, τα κύτταρα (που εντοπίζονται αποκλειστικά στο ίζημα) καταψύχονται και ακολούθως τοποθετούνται στη συσκευή της ξήρανσης υπό κατάψυξη μέχρι να εξαχνωθεί όλο το περιεχόμενο νερό. Μόλις

αφαιρεθούν οι σωλήνες Falcon από την ξήρανση υπό κατάψυξη, αναμιγνύεται η περιεχόμενη βακτηριακή σκόνη τους σε έναν μόνο σωλήνα και κονιορτοποιείται.

15. Τα κύτταρα αυτά (στη freeze dried μορφή τους) μπορούν να επανακαλλιεργηθούν ή να εγκλειστούν στις επιλεγμένες μήτρες.

2.2.2 Εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων

2.2.2.1 Εγκλεισμός μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospinning/electrospraying)

Για την παραγωγή σωματιδίων πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης με ή χωρίς εγκλεισμένα βακτήρια και σωματιδίων ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης με ή χωρίς εγκλεισμένα βακτήρια στη μίκρο- και νάνο- κλίμακα μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης/ψεκασμού ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1. Για το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης με αναλογία 80:20 και συνολική συγκέντρωση πολυμερών 40%w/w παρασκευάζονται κάθε φορά 30 g διαλύματος, τα οποία αποθηκεύονται σε σωλήνα Falcon των 50 mL και συντηρούνται σε ψύξη 4°C, εφόσον χρειάζεται (για χρήση κάποια επόμενη μέρα). Συνεπώς, απαιτούνται $0.4 \cdot 30 = 12\ g$ συνολικών πολυμερών, δηλαδή του αθροίσματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης. Στα 12 g συνολικών πολυμερών, η μάζα της πρωτεΐνης ορού είναι $0.8 \cdot 12 = 9.6\ g$, ενώ η μάζα της καθαρής ολιγοφρουκτόζης είναι $0.2 \cdot 12 = 2.4\ g$. Ωστόσο, 100 g του μίγματος (σιροπιού) ολιγοφρουκτόζης περιέχουν 69 g ολιγοφρουκτόζης, 6 σακχάρων και 25 g υγρασίας. Άρα, απαιτούνται $\frac{100}{69} \cdot 2.4 = 3.48g$ του μίγματος FOS. Τα 12 g ολικών πολυμερών διαλύονται σε 18 g νερού, εντός του πλαστικού σωλήνα.
2. Για το υδατικό διάλυμα ολιγοφρουκτόζης 3%w/w παρασκευάζονται κάθε φορά 30 g διαλύματος, τα οποία αποθηκεύονται σε σωλήνα Falcon των 50 mL και συντηρούνται σε ψύξη 4°C, εφόσον χρειάζεται . Συνεπώς, απαιτούνται $0.03 \cdot 30 = 0.9\ g$ καθαρής ολιγοφρουκτόζης, όμως 100 g του μίγματος (σιροπιού) ολιγοφρουκτόζης περιέχουν 69 g ολιγοφρουκτόζης, 6 σακχάρων και 25 g υγρασίας. Άρα, απαιτούνται $\frac{100}{69} \cdot 0.9 = 1.3g$ του μίγματος FOS, τα οποία διαλύονται σε 28.7 g νερού, εντός του πλαστικού σωλήνα.
3. Για το διάλυμα 5 %w/w ζεΐνης σε αιθανόλη-νερό αναλογίας 80:20 v/v παρασκευάζονται κάθε φορά 30 g διαλύματος, τα οποία αποθηκεύονται σε σωλήνα Falcon των 50 mL και συντηρούνται σε ψύξη 4°C, εφόσον χρειάζεται . Συνεπώς, απαιτούνται $0.05 \cdot 30 = 1.5\ g$ ζεΐνης, τα οποία διαλύονται σε 28.5 g μίγματος αιθανόλης-νερού «Βίκος» αναλογίας 80:20 v/v (δηλαδή αναμιγνύονται 20 mL νερού σε 80 mL αιθανόλης και από το μίγμα αυτό ζυγίζονται κάθε φορά τα απαιτούμενα 28.5 g), εντός του πλαστικού σωλήνα.
4. Μετά την παρασκευή κάθε διαλύματος από τα παραπάνω, τοποθετείται μαγνήτης εντός του σωλήνα Falcon και το διάλυμα αναδεύεται τόσο στο μαγνητικό αναδευτήρα όσο και στη συσκευή ανάδευσης Vortex (VORTEX-GENIE 2).

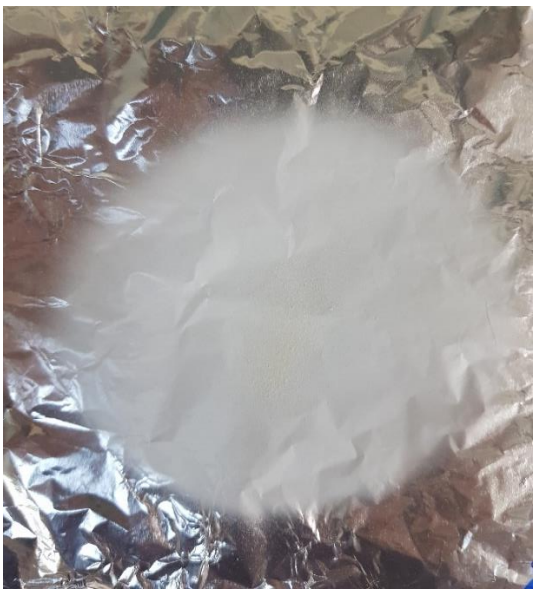
Με όμοιους υπολογισμούς παρασκευάζονται και τα διαλύματα των υπόλοιπων συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν, αλλά δεν παρουσίασαν ικανοποιητική συμπεριφορά κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό. Όλες οι ποσότητες των βημάτων 1.-3. ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας 4 δεκαδικών (KERN ABS 220).

Εικόνα 27: Η διάταξη ανάδευσης του Vortex (VORTEX-GENIE 2).

1. Σε μία σύριγγα των 10 mL αντλείται η αντίστοιχη ποσότητα από το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης του βήματος 1. και συναρμολογείται η διάταξη της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, ώστε να εκκινήσει η διεργασία σχηματισμού μίκρο- και νάνο- σωματιδίων πρωτεΐνης ορού γάλακτος και ολιγοφρουκτόζης και να ελεγχθεί η συμπεριφορά της συσκευής ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες.
2. Σε δύο σύριγγες των 10 mL αντλείται η αντίστοιχη ποσότητα από τα διαλύματα ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης των βημάτων 2., 3. και συναρμολογείται η διάταξη της ομοαξονικής ηλεκτροστατικής ινοποίησης, ώστε να εκκινήσει η διεργασία σχηματισμού μίκρο- και νάνο- σωματιδίων ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης και να ελεγχθεί η συμπεριφορά της συσκευής ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες. Το διάλυμα της ζεΐνης κατά την ομοαξονική ηλεκτροστατική ινοποίηση/ψεκασμό χαρακτηρίζεται ως διάλυμα κελύφους (shell solution), διότι ρέει εξωτερικά, ενώ το διάλυμα της ολιγοφρουκτόζης χαρακτηρίζεται ως διάλυμα πυρήνα (core solution), καθώς ρέει εσωτερικά και εγκλείεται.
3. Για τη διαδικασία του εγκλεισμού των βακτηρίων με το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού, λαμβάνονται 3 mL από το διάλυμα με αυτόματη πιπέτα (αφού τυπική εφαρμοζόμενη ροή του διαλύματος=600 μL/h και το electrospraying αφήνεται να τρέξει για περίπου 5h, άρα απαιτούνται 600·5=3000μL=3 mL, άρα αντλούνται για ασφάλεια 4 mL, διότι δεν είναι δυνατή η συντήρηση του διαλύματος σε ψύξη λόγω της παρουσίας των μικροβίων). Τα 3 mL μεταφέρονται σε στείρο σωλήνα Falcon των 15 mL (για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις), αποστειρώνονται με φίλτρο PTFE 0.22 μm, για να απομακρυνθούν

μικροοργανισμοί που έχουν ενδεχομένως αναπτυχθεί και διαλύονται επί τόπου 0.02 $\frac{g\ βακτηριακής\ σκόνης}{mL\ διαλύματος}$, δηλαδή $0.02\frac{g}{mL} \cdot 4mL = 0.08g\ βακτηρίων$, τα οποία είναι καλά κονιορτοποιημένα και αναδεύονται ισχυρά, ώστε να διαλυθούν πλήρως. Ακολούθως, αντλείται το διάλυμα που περιέχει τα βακτήρια με αποστειρωμένη σύριγγα των 10 mL, συναρμολογείται και ξεκινά η διαδικασία του electrospraying, όπως και στο βήμα 4..

4. Για τη διαδικασία του εγκλεισμού των βακτηρίων με τα διαλύματα ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης μέσω ομοαξονικού ηλεκτροστατικού ψεκασμού, αντλούνται 5 mL από το διάλυμα ζεΐνης με αποστειρωμένη σύριγγα των 10 mL (αφού τυπική εφαρμοζόμενη ροή του διαλύματος=700 μL/h και το electrospraying αφήνεται να τρέξει για περίπου 5h, άρα απαιτούνται 700·5=3500μL=3.5 mL, άρα αντλούνται για ασφάλεια 5 mL) και 1 mL από το διάλυμα ολιγοφρουκτόζης με αυτόματη πιπέτα (αφού τυπική εφαρμοζόμενη ροή του διαλύματος=100 μL/h και το electrospraying αφήνεται να τρέξει για περίπου 5h, άρα απαιτούνται 100·5=500μL=0.5 mL, άρα αντλείται για ασφάλεια 1 mL, διότι δεν είναι δυνατή η συντήρηση του διαλύματος σε ψύξη λόγω της παρουσίας των μικροβίων). Το 1 mL μεταφέρεται σε στείρο σωλήνα Falcon των 15 mL (για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις), αποστειρώνονται με φίλτρο PTFE 0.22 μm, για να απομακρυνθούν πιθανοί μικροοργανισμοί που έχουν αναπτυχθεί και διαλύονται επί τόπου 0.02 $\frac{g\ βακτηριακής\ σκόνης}{mL\ διαλύματος}$, δηλαδή $0.02\frac{g}{mL} \cdot 1mL = 0.02g\ βακτηρίων$, τα οποία είναι καλά κονιορτοποιημένα και αναδεύονται ισχυρά, ώστε να διαλυθούν πλήρως. Ακολούθως, συναρμολογείται και ξεκινά η διαδικασία του coaxial electrospraying. Τα βακτήρια διαλύονται στο υδατικό διάλυμα της ολιγοφρουκτόζης, καθώς αποτελεί το διάλυμα που ρέει εσωτερικά, με αποτέλεσμα να ενθυλακώνονται τα βακτήρια, αλλά και επειδή το διάλυμα της ζεΐνης έχει ως διαλύτες αιθανόλη και νερό, συνεπώς θανατώνει τα βακτήρια. Όταν όμως οι διαλύτες εξατμίζονται κατά τη διαδικασία του electrospraying, δεν έρχονται σε επαφή με τα βακτήρια S.thermophilus, ώστε να προκαλέσουν το θάνατό τους.
5. Κατά τη διάρκεια του ηλεκτροστατικού ψεκασμού των διαδικασιών 6. και 7., τα συντιθέμενα σωματίδια συλλέγονται σε αλουμινόφυλλο που καλύπτει την επιφάνεια συλλογής. Η διαδικασία του electrospraying συντελείται κατά το δυνατόν υπό στείρες συνθήκες και ο θάλαμος της συσκευής καθαρίζεται με αιθανόλη. Μετά το πέρας της διεργασίας, η σκόνη που έχει εναποτεθεί στο αλουμινόφυλλο συλλέγεται με αποστειρωμένη σπαθίδα μέσω απόξεσης, ζυγίζεται και αποθηκεύεται στην κατάψυξη σε σκουρόχρωμο, γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο κλείνει με καπάκι.



Εικόνα 28: Η σκόνη των σωματιδίων εγκλεισμού που εναποτίθεται στο αλουμινόφυλλο.

Εικόνα 29: Σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια αποθήκευσης των παραγόμενων εγκλεισμένων βακτηρίων.

Για να περιοριστούν οι επιλογές στις παραπάνω αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε πολλά διαφορετικά διαλύματα, σε διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας του οργάνου.

Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκε διάλυμα ινουλίνης-ολιγοφρουκτόζης (σε αναλογία 50:50) σε νερό με συνολική συγκέντρωση των πολυμερών 10,20,40 και 60 %w/w, καθώς και διάλυμα 10 και 20 %w/w ινουλίνης νερό, για διαφορετικές: παροχές του διαλύματος, αποστάσεις της βελόνας από το συλλέκτη και τάσεις, όμως η συμπεριφορά του κατά το electrospinning δεν ήταν επαρκής (εμφάνιση σταγόνων στο αλουμινόφυλλο που καλύπτει το συλλέκτη, στερεοποίηση σταγόνας στο ακροφύσιο και αργή συλλογή σκόνης).

Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές στο electrospraying των διαλυμάτων ινουλίνης-ολιγοφρουκτόζης φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 4: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα ινουλίνης-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 50:50 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w.

Παροχή διαλύματος (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
100	8	28.8	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων, αργή εναπόθεση σκόνης, αδυναμία σχηματισμού του κώνου Taylor
200	5	23.9	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων, αργή εναπόθεση σκόνης, αδυναμία σχηματισμού του κώνου Taylor
200	5	28.8	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων, αργή εναπόθεση σκόνης, αδυναμία σχηματισμού του κώνου Taylor
200	8	19.8-27.8	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων, αργή εναπόθεση σκόνης, αδυναμία σχηματισμού του κώνου Taylor
200	10	23.8-28.8	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων, αργή εναπόθεση σκόνης, αδυναμία σχηματισμού του κώνου Taylor
200	14	28.8	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων, αργή εναπόθεση σκόνης, αδυναμία σχηματισμού του κώνου Taylor
200	16	28.8	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων, αργή εναπόθεση σκόνης, αδυναμία σχηματισμού του κώνου Taylor

Επιπλέον, δοκιμάστηκαν υδατικά διαλύματα 20 και 40 %w/w πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (σε αναλογίες 50:50 και 80:20).

Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές στο electrospraying των διαλυμάτων πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης φαίνονται στους *Πίνακες 5-8*.

Πίνακας 5: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 20%w/w.

Παροχή διαλύματος (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
200	4	26.4	έκκριση μερικών σταγόνων αρχικά, δε στερεοποιείται η σταγόνα στο ακροφύσιο, αργή εναπόθεση σκόνης (εξαιτίας μικρής ροής και χαμηλής συγκέντρωσης του διαλύματος)
300	4	27.4	καμία σταθεροποίηση της ροής
300	6	27.4	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων
300	8	28.4-28.9	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων
300	4	27.4	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων

Πίνακας 6: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 50:50 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w.

Παροχή διαλύματος (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
200	4	26.4	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού
200	7	27.4-28.9	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο
300	4	25.4	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο
300	6	27.4-28.9	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο
300	10	28.4	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο

Πίνακας 7: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 50:50 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 50%w/w.

Παροχή διαλύματος (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
300	4	25.4-28.4	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού
300	5	28.4	βελτίωση συμπεριφοράς αλλά και πάλι εμφάνιση σταγονιδίων
300	7	28.4	επαρκής συλλογή σκόνης στο συλλέκτη, χωρίς υγρασία
300	9	28.4-28.9	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού
300	11	28.9	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο

Πίνακας 8: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w.

Παροχή διαλύματος (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
300	4,6	27.1-28.9	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού
300	5	26.4	στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο, εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor
300	8	26.4	στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο, εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor
300	9	27.4-28.9	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού

300	10	27.4	στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο εντός 5 min, εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor
300	12	26.7	στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο εντός 10 min, εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor
300	13	28.4-28.9	έκκριση πολλών σταγόνων αλλά χαμηλή παραγωγή σκόνης
300	15	28.4-28.9	έκκριση πολλών σταγόνων αλλά χαμηλή παραγωγή σκόνης
400	8	28.4-28.7	στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο εντός 15 min, εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor, καλή παραγωγή σκόνης
400	10	28.4	στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο εντός 20 min, εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor, καλή παραγωγή σκόνης
400	12,14	28.4	έκκριση πολλών σταγόνων
500	4	23.4-24.4	στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο, εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor
500	4	25.8-28.4	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων
500	6	24.4	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων
500	6	25.9-26.1	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor, αφού σταθεροποιηθεί για 5-10 min
500	7	27.4-27.8	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
500	8	27.4-28.7	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
500	9	27.8-28.4	εμφάνιση σταγόνων μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor
500	9	28.7-29.1	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
500	11,13	26.4-29.1	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων

600	6	26.4-27.7	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor (ιδανική τάση τα 27.7 kV)
600	7	27.2-29.2	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor (ιδανική τάση τα 27.7 kV), αφού σταθεροποιηθεί για 5-10 min (διασφάλιση της μη στερεοποίησης της σταγόνας στο ακροφύσιο)
600	8	28.9	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
600	10	28.9-29.4	έκκριση ολοένα περισσότερων σταγονιδίων, με την απομάκρυνση του συλλέκτη
700	6	26.9-27.4	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
700	7	28.7	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
700	8	27.7	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων
700	8	29.2	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
700	10	29.4	έκκριση ολοένα περισσότερων σταγονιδίων, με την απομάκρυνση του συλλέκτη

Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκαν διαλύματα 5,10 και 15 %w/w ζεΐνης σε διάλυμα αιθανόλης-νερού 80:20 v/v μαζί με διάλυμα 3 %w/w ολιγοφρουκτόζης σε νερό (ομοαξονικός ηλεκτροστατικός ψεκασμός/coaxial electrospraying), ώστε να αναπτυχθούν σωματίδια (electrospraying) και όχι ίνες, όπως σχηματίζονται σε συγκεντρώσεις ζεΐνης πάνω από 35% w/w. Στις συγκεντρώσεις ζεΐνης 5 και 10 % w/w το διάλυμα στο ακροφύσιο στερεοποιείται πολύ γρήγορα, καθιστώντας αδύνατη τη ροή και το σχηματισμό του κώνου Taylor. Για να τρέξουν επιτυχώς τα διαλύματα των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων, θα έπρεπε να διοχετεύεται οξικό οξύ σαν δεύτερο υγρό από τη δεύτερη σύριγγα, πράγμα αδύνατο διότι η δεύτερη σύριγγα χρησιμοποιείται για τη ροή του διαλύματος ολιγοφρουκτόζης κατά τον ομοαξονικό ηλεκτροστατικό ψεκασμό.

Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές στο electrospraying των διαλυμάτων ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης φαίνονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Δοκιμή επιβαλλόμενων συνθηκών για διάλυμα ζεΐνης συγκέντρωσης 5%w/w σε αιθανόλη-νερό (αναλογίας 80:20 v/v) και υδατικό διάλυμα ολιγοφρουκτόζης συγκέντρωσης 3%w/w.

Παροχή διαλύματος ζεΐνης (μL/h)	Παροχή διαλύματος ολιγοφρουκτόζης (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
300	50	οποιαδήποτε	οποιαδήποτε	βραδεία ροή ζεΐνης και άρα ανεπαρκής συλλογή σκόνης
600	50	8	25.4	επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
600	50	10	25.4	επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
600	50	10	27.4	έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο προς το συλλέκτη
600	50	12	26.4	επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor, επαρκής συλλογή σκόνης
600	50	15	26.4	έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο προς το συλλέκτη
600	50	15	28.4	έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο προς το συλλέκτη
600	100	4	25.9-26.9	αυξανόμενη έκκριση σταγονιδίων και αστάθεια του κώνου Taylor με αύξηση της τάσης, ιδανική τάση τα 25.2 kV, όπου συλλέγεται συμπαγής σκόνη
600	100	5	25.9	απαιτείται χρόνος για τη σταθεροποίηση του κώνου Taylor, ώστε να λαμβάνεται συμπαγής σκόνη
600	100	6	26.9	απαιτείται χρόνος για τη σταθεροποίηση του κώνου

				Taylor, σχηματίζεται παχύ στρώμα σκόνης, επιτυχής συλλογή σκόνης
600	100	8	26.9-27.9	έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο προς το συλλέκτη
600	100	10	25.4-26.9	έκκριση περισσότερων σταγονιδίων από το ακροφύσιο προς το συλλέκτη
700	100	4	25.2-27.4	σχηματισμός συμπαγούς σκόνης (ιδανική τάση τα 25.2 kV)
700	100	5	25.2-28.2	αποσταθεροποίηση του κώνου Taylor και έκκριση σταγόνων μετά από 1 h και με αύξηση της τάσης (ιδανική τάση τα 26.4-27.2 kV), αλλά γενικά σχηματισμός συμπαγούς σκόνης
700	100	6	25.2-27.4	έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο προς το συλλέκτη
700	100	6	28.4	σχηματισμός συμπαγούς σκόνης
700	100	8	28.4	σχηματισμός συμπαγούς σκόνης
700	100	10	27.7-29.4	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο
700	100	12	27.7-29.4	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο κάτω τμήμα του συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο
800	100	4	24.7-25.7	σταδιακή σταθεροποίηση του κώνου Taylor και παραγωγή συμπαγούς σκόνης
800	100	4	25.7-27.4	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο κάτω τμήμα του συλλέκτη,

				συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο
800	100	4	27.4-28.9	μη επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, σχηματισμός υγρού στο κάτω τμήμα του συλλέκτη, συνεπώς αποτυχία εγκλεισμού, έκκριση σταγονιδίων από το ακροφύσιο
800	100	5	24.4-26.3	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων
800	100	5	26.4-26.5	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
800	100	5	26.6-28.4	έκκριση πολυάριθμων σταγόνων
800	100	6	25.2-27.4	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
800	100	7	28.2	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor

Οι δοκιμές για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας της συσκευής του electrospinning/electrospraying (BioInicia FLUIDNATEK LE-10) πραγματοποιήθηκαν χωρίς να διαλυθούν τα βακτήρια στα αντίστοιχα διαλύματα. Μόλις διαπιστώθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες, τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* ενθυλακώθηκαν στη μήτρα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης, αφού διαλύθηκαν στο διάλυμα της ολιγοφρουκτόζης και στη μήτρα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης, μετά τη διάλυση τους στο αντίστοιχο διάλυμα.

Οι συνθήκες εξ αυτών που μελετήθηκαν και συνοψίζονται στους Πίνακες 10, 11 αποτελούν τις άριστες συνθήκες, στις οποίες αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν οι εγκλεισμοί των βακτηρίων στις αντίστοιχες μήτρες, διότι το electrospinning παρουσίαζε βελτιωμένη συμπεριφορά στις συγκεκριμένες συνθήκες. Οι βέλτιστες συνθήκες για το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w παρουσιάζονται για ροή διαλύματος 500, 600, 700 μL/h και απόσταση του ακροφυσίου από το συλλέκτη 6, 7, 8 cm (Πίνακας 10). Επιπλέον, οι βέλτιστες συνθήκες για τα διαλύματα ζεΐνης συγκέντρωσης 5%w/w σε αιθανόλη-νερό (αναλογίας 80:20 v/v) και ολιγοφρουκτόζης συγκέντρωσης 3%w/w σε νερό εμφανίζονται για ροή διαλύματος 600, 700, 800 μL/h και απόσταση του ακροφυσίου από το συλλέκτη 4, 5, 6 cm (*Πίνακας 11*).

Πίνακας 10: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης (αναλογίας 80:20 w/w) συνολικής συγκέντρωσης 40%w/w.

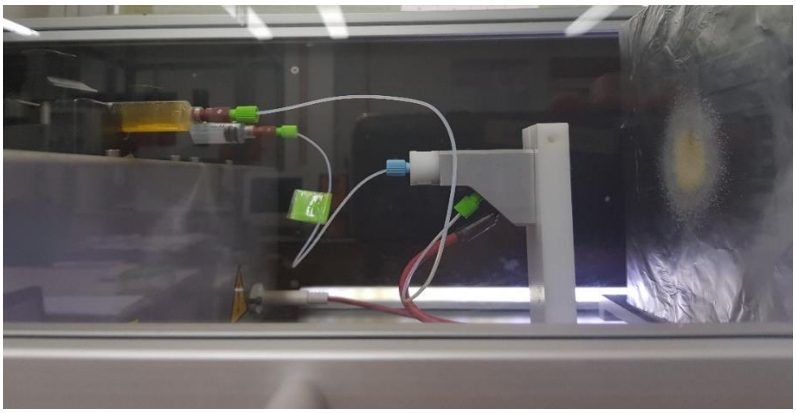
Παροχή διαλύματος (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
500	6	25.9-26.1	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor, αφού σταθεροποιηθεί για 5-10 min
500	7	27.4-27.8	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
500	8	27.4-28.7	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
600	6	26.4-27.7	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor (ιδανική τάση τα 27.7 kV)
600	7	27.2-29.2	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor (ιδανική τάση τα 27.7 kV), αφού σταθεροποιηθεί για 5-10 min (διασφάλιση της μη στερεοποίησης της σταγόνας στο ακροφύσιο)
600	8	28.9	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
700	6	26.9-27.4	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
700	7	28.7	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor
700	8	29.2	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor

Πίνακας 11: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για διάλυμα ζεΐνης συγκέντρωσης 5%w/w σε αιθανόλη-νερό (αναλογίας 80:20 v/v) και υδατικό διάλυμα ολιγοφρουκτόζης συγκέντρωσης 3%w/w.

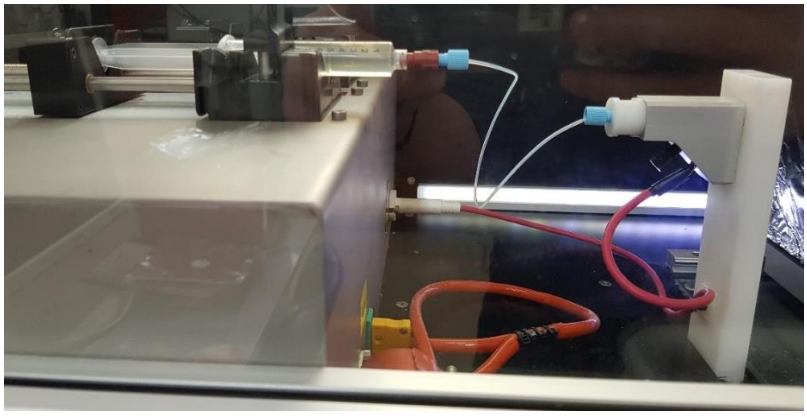
Παροχή διαλύματος ζεΐνης (μL/h)	Παροχή διαλύματος ολιγοφρουκτόζης (μL/h)	Απόσταση βελόνας από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Παρατηρήσεις-Σχόλια
600	100	4	25.9-26.9	αυξανόμενη έκκριση σταγονιδίων και αστάθεια του κώνου Taylor με αύξηση της τάσης, ιδανική τάση τα 25.2 kV, όπου συλλέγεται συμπαγής σκόνη
600	100	5	25.9	απαιτείται χρόνος για τη σταθεροποίηση του κώνου Taylor, ώστε να λαμβάνεται συμπαγής σκόνη
600	100	6	26.9	απαιτείται χρόνος για τη σταθεροποίηση του κώνου Taylor, σχηματίζεται παχύ στρώμα σκόνης, επιτυχής συλλογή σκόνης
700	100	4	25.2-27.4	σχηματισμός συμπαγούς σκόνης (ιδανική τάση τα 25.2 kV)
700	100	5	25.2-28.2	αποσταθεροποίηση του κώνου Taylor και έκκριση σταγόνων μετά από 1 h και με αύξηση της τάσης (ιδανική τάση τα 26.4-27.2 kV), αλλά γενικά σχηματισμός συμπαγούς σκόνης
700	100	6	28.4	σχηματισμός συμπαγούς σκόνης
800	100	4	24.7-25.7	σταδιακή σταθεροποίηση του κώνου Taylor και παραγωγή συμπαγούς σκόνης
800	100	5	26.4-26.5	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor

800	100	6	25.2-27.4	επιτυχής συλλογή σκόνης, καλοσχηματισμένος κώνος Taylor

Σύμφωνα με το θεώρημα του κεντρικού σημείου για το σχεδιασμό πειραμάτων, επιλέχθηκε για κάθε διάλυμα η ενδιάμεση εκ των 3 ροών και η ενδιάμεση εκ των 3 αποστάσεων, δηλαδή οι συνθήκες [600 μL/h, 7 cm] για το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και [700 μL/h, 100 μL/h, 5 cm] για τα διαλύματα ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης, στις οποίες παρήχθησαν οι ποσότητες σωματιδίων πρωτεΐνης ορού γάλακτος και ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης με και χωρίς εγκλεισμένα τα προβιοτικά βακτήρια.



Εικόνα 30: Η διάταξη του electrospinning (BioInicia FLUIDNATEK LE-10) σε λειτουργία με τα διαλύματα ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης.



Εικόνα 31: Η διάταξη του electrospinning σε λειτουργία με το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης.

2.2.2.2 Εγκλεισμός μέσω ξήρανσης υπό κατάψυξη (freeze drying)

Για την παραγωγή σωματιδίων πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης με ή χωρίς εγκλεισμένα βακτήρια μέσω της ξήρανσης με κατάψυξη ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1. Για το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης με αναλογία 80:20 και συνολική συγκέντρωση πολυμερών 40%w/w παρασκευάζονται κάθε φορά 30 g διαλύματος, τα οποία αποθηκεύονται σε σωλήνα Falcon των 50 mL και συντηρούνται σε ψύξη 4°C, εφόσον χρειάζεται. Συνεπώς, απαιτούνται $0.4 \cdot 30 = 12\ g$ συνολικών πολυμερών, δηλαδή του αθροίσματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης. Στα 12 g συνολικών πολυμερών, η μάζα της πρωτεΐνης ορού είναι $0.8 \cdot 12 = 9.6\ g$, ενώ η μάζα της καθαρής ολιγοφρουκτόζης είναι $0.2 \cdot 12 = 2.4\ g$. Ωστόσο, 100 g του μίγματος (σιροπιού) ολιγοφρουκτόζης περιέχουν 69 g ολιγοφρουκτόζης, 6 σακχάρων και 25 g υγρασίας. Άρα, απαιτούνται $\frac{100}{69} \cdot 2.4 = 3.48g$ του μίγματος FOS. Τα 12 g ολικών πολυμερών διαλύονται σε 18 g νερού, εντός του πλαστικού σωλήνα.
2. Μετά την παρασκευή του διαλύματος, τοποθετείται μαγνήτης εντός του σωλήνα Falcon και το διάλυμα αναδεύεται τόσο στο μαγνητικό αναδευτήρα όσο και στη συσκευή ανάδευσης Vortex. Ακολούθως, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε γυάλινα δοχεία με ευρεία ανοικτή επιφάνεια και λεπτό στρώμα διαλύματος (μεταφέρονται 15 mL διαλύματος σε κάθε δοχείο με σιφόνι), ώστε να επιταχύνεται η εξάχνωση του νερού κατά τη διεργασία της ξήρανσης.
3. Τα δοχεία καταψύχονται στους -30°C για τουλάχιστον 2h, έπειτα τοποθετούνται εντός του θαλάμου του ξηραντήρα κατάψυξης, εκκινείται η συσκευή και αφήνεται σε λειτουργία μέχρι τα δείγματα να απωλέσουν πλήρως το περιεχόμενο νερό τους.

Εικόνα 32: Η διάταξη της ξήρανσης με κατάψυξη (LEYBOLD-HERAEUS GT2).

4. Για τη διαδικασία του εγκλεισμού των βακτηρίων με το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης μέσω ξήρανσης με κατάψυξη, λαμβάνονται 15 mL από το διάλυμα με σιφόνι (και τώρα, σε κάθε δοχείο προστίθενται από 15 mL, ώστε να επιταχυνθεί η ξήρανση). Τα 15 mL αποστειρώνονται με φίλτρο PTFE 0.22 μm, για να απομακρυνθούν πιθανοί μικροοργανισμοί που έχουν αναπτυχθεί, μεταφέρονται σε στείρο σωλήνα Falcon των 15 mL (για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις) και διαλύονται επί τόπου 0.02 $\frac{g\ βακτηριακής\ σκόνης}{mL\ διαλύματος}$, δηλαδή $0.02\frac{g}{mL}\cdot 15mL = 0.3g\ βακτηρίων$, τα οποία είναι καλά κονιορτοποιημένα και αναδεύονται ισχυρά, ώστε να διαλυθούν πλήρως. Ακολούθως, το δείγμα μεταφέρεται σε ανοικτό, καθαρό δοχείο, καταψύχεται στους -30^{o}C για τουλάχιστον 2h, έπειτα τοποθετείται εντός του θαλάμου του ξηραντήρα κατάψυξης, εκκινείται η συσκευή και αφήνεται σε λειτουργία μέχρι τα δείγματα να απωλέσουν πλήρως το περιεχόμενο νερό τους (απαιτούνται 7 h για να ξηρανθούν πολυάριθμα δοχεία, από τα οποία το καθένα περιέχει διαλύματα βακτηρίων όγκου 15 mL).
5. Μετά το πέρας της διεργασίας, η σκόνη που έχει ξηρανθεί στο δοχείο κονιορτοποιείται με αποστειρωμένη σπαθίδα, ζυγίζεται και αποθηκεύεται σε κλειστό με ταινία Parafilm δοχείο ή ποτήρι ζέσεως.

2.2.3 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού

2.2.3.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού

Ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού των παραγόμενων εγκλεισμένων κυττάρων μέσω των μεθόδων του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης με κατάψυξη διενεργείται, ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός αποτελεσματικότητας των συγκεκριμένων τεχνικών στην ενθυλάκωση των μικροβίων. Αναμιγνύοντας τα δείγματα με αιθανόλη, θανατώνονται τα βακτήρια που δεν έχουν εγκλειστεί σε κάποια μήτρα και συνεπώς, δεν προστατεύονται. Έτσι, διαλύοντας όσα κύτταρα επιβιώνουν σε νερό και αναπτύσσοντάς τα σε τρυβλία, καταμετρούνται οι αποικίες των ζωντανών κυττάρων και συγκρίνονται με τις αποικίες των κυττάρων που δεν υπέστησαν επεξεργασία με αιθανόλη, οι οποίες καταμετρήθηκαν στα εγκλεισμένα βακτήρια των τριών κατηγοριών που δεν έχουν εκτεθεί σε όξινο περιβάλλον. Εφαρμόζεται η ακόλουθη πειραματική μέθοδος:

1. Για τα ελεύθερα βακτήρια ζυγίζονται 0.004 g, για τα εγκλεισμένα σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη βακτήρια μέσω ξήρανσης με κατάψυξη ζυγίζονται 0.084 g, για τα εγκλεισμένα σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη βακτήρια μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού ζυγίζονται 0.084 g, ενώ για τα εγκλεισμένα σε ζεΐνη-ολιγοφρουκτόζη βακτήρια μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού ζυγίζονται 0.068 g σε 4 σωλήνες Falcon των 15 mL, ώστε σε καθεμία από τις παραπάνω ποσότητες (των κατηγοριών (r), (a), (b), (c)) να περιέχονται 0.004 g καθαρών βακτηρίων.
2. Σε όλους τους σωλήνες εκτός εκείνου που περιέχει τα ελεύθερα βακτήρια προστίθενται από 2 mL αιθανόλης.
3. Οι σωλήνες ανακινούνται στη συσκευή Vortex για 30 s και ακολούθως φυγοκεντρούνται για 3 min στις 3000 rpm.
4. Απορρίπτεται η υπερκείμενη αιθανόλη, ενώ το ίζημα (βιομάζα) διαλύεται σε 2 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο με φίλτρο νερό για έκπλυση της περισσευούμενης αιθανόλης και για διάλυση της υδατοδιαλυτής μήτρας της πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης.
5. Οι 3 σωλήνες φυγοκεντρούνται εκ νέου για 5 min στις 3000 rpm.
6. Το υπερκείμενο υγρό (περιέχει νερό και διαλυμένη μήτρα) από κάθε σωλήνα απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται με ανάδευση σε 2 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο με φίλτρο νερό. Επίσης, τα ελεύθερα βακτήρια διαλύονται σε 2 mL νερό.
7. Για την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία, χρησιμοποιώ ένα τρυβλίο για κάθε κατηγορία βακτηρίων, δηλαδή για τις κατηγορίες (r), (a), (b) και (c) , συνεπώς χρειάζονται 4, τα οποία παράγονται όπως περιγράφεται στην *ενότητα 2.2.1*. Κάθε τρυβλίο διαιρείται σε 8 χωρία, τα οποία αριθμούνται από εκείνο που είναι πυκνότερο ως προς τα διαλυμένα βακτήρια (ελεύθερα ή εγκλεισμένα) προς το αραιότερο (1-12). Οι διαδοχικές αραιώσεις 1:10 («1 προς 10») πραγματοποιούνται ως εξής:

-σε 1 πλάκα Microplate (8 σειρών και 12 στηλών, 8·12=96 θέσεις σε κάθε πλάκα) πληρώνονται με αυτόματη πιπέτα των 20-200 μL οι 8 πρώτες θέσεις καθεμίας από τις 4 πρώτες σειρές με 100 μL αποστειρωμένο με φίλτρο, υπερκάθαρο νερό.

-λαμβάνονται 100 μL από τα διάφορα διαλύματα βακτηρίων σε 1 mL νερού (διαφορετικών κατηγοριών βακτηρίων και διαφορετικών χρόνων όξινης επεξεργασίας) με αυτόματη πιπέτα των 20-200 μL και προστίθενται στην πρώτη ($1^{η}$) θέση κάθε σειράς.

-αναδεύεται καλά το περιεχόμενο της πρώτης θέσης με την πιπέτα και λαμβάνονται 100 μL από αυτό και προστίθενται στη δεύτερη ($2^{η}$) θέση, ενώ με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιείται και η αραίωση στην τρίτη ($3^{η}$) θέση έως και την όγδοη ($8^{η}$)θέση κάθε σειράς.

Πραγματοποιούνται οι αραιώσεις ανά κάθε σειρά και κατά τη μετάβαση από μια σειρά σε μια άλλη, αντικαθίσταται το tip της πιπέτας, για να αποφευχθούν επιμολύνσεις από την κάθε κατηγορία βακτηρίου.

8. Από κάθε θέση των δύο Microplate λαμβάνονται 10 μL δείγμα με αυτόματη πιπέτα των 10-100 μL και προστίθενται στο κέντρο του αντίστοιχου χωρίου (σημειωμένο ανάλογα με την αραίωση), στο αντίστοιχο τρυβλίο (συγκεκριμένης κατηγορίας βακτηρίων), με προσοχή να μην έρθει σε επαφή το tip της πιπέτας με το θρεπτικό υλικό του τρυβλίου, ώστε να μην προκαλέσει φθορά και επιμολύνσεις του.
9. Ακολούθως, τα τρυβλία αποθηκεύονται στο θάλαμο επώασης στους 37° C (βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του Streptococcus thermophilus) για 24 ώρες, έτσι ώστε την επόμενη μέρα μετριέται ο αριθμός των αποικιών στο χωρίο κάθε τρυβλίου, όπου η ανάπτυξη των βακτηρίων εμφανίζεται πιο ευδιάκριτα και με ασφαλέστερη στατιστική επεξεργασία (θεωρητικά 30-300 αποικίες).

2.2.3.2 Υπόλοιπες τεχνικές (DSC, ATR-FTIR)

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, ακολουθείται η παρακάτω πειραματική μέθοδος:

1. Ζυγίζονται 5-10 mg από κάθε δείγμα (σκόνη πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης από ηλεκτροστατικό ψεκασμό και ξήρανση υπό κατάψυξη και σκόνη ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης από ηλεκτροστατικό ψεκασμό) σε δισκία αλουμινίου και σημειώνεται η ακριβής μάζα του κάθε δείγματος.
2. Τα δισκία κλείνονται ερμητικά, ενώ κατά την ανάλυση κάθε δείγματος χρησιμοποιείται ένα κενό, κλειστό δισκίο, ως δείγμα αναφοράς. Το δείγμα προς ανάλυση και το δείγμα αναφοράς εισάγονται στις δύο ειδικές θέσεις στη Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (PERKIN ELMER DSC 6).
3. Ξεκινά η κυκλοφορία του αερίου καθαρισμού (άζωτο) και του ψυκτικού μέσου και ακολούθως, εφαρμόζεται το ακόλουθο θερμοκρασιακό πρόγραμμα:

a. Διατήρηση της θερμοκρασίας του δείγματος στους 0°C επί 1 λεπτό
b. Θέρμανση από τους 0°C μέχρι τους 200°C, με ρυθμό $\frac{5^{o}\mathrm{C}}{min}$
c. Ψύξη από τους τους 200°C μέχρι τους 0°C, με ρυθμό $\frac{20^{o}\mathrm{C}}{min}$
d. Θέρμανση από τους 0°C μέχρι τους 250°C, με ρυθμό $\frac{5^{o}\mathrm{C}}{min}$.

Εικόνα 33: Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (PERKIN ELMER DSC 6).

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης με Φασματομετρία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, ακολουθείται η παρακάτω πειραματική μέθοδος:

1. Τα δείγματα που αναλύονται είναι τα ελεύθερα βακτήρια, η σκόνη πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης από ηλεκτροστατικό ψεκασμό και από ξήρανση υπό κατάψυξη, η σκόνη ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης από ηλεκτροστατικό ψεκασμό, τα εγκλεισμένα βακτήρια σε μήτρα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού και μέσω ξήρανσης υπό κατάψυξη, καθώς και τα εγκλεισμένα βακτήρια σε μήτρα ζεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού.
2. Πριν τη φωτομέτρηση κάθε δείγματος πραγματοποιείται μία σάρωση χωρίς δείγμα με το φασματόμετρο υπερύθρου που χρησιμοποιείται ως μηδενισμός του θορύβου (καθώς το φασματογράφημα επηρεάζεται ακόμη και από την παρουσία CO_2).
3. Στη συνέχεια, εισάγεται επαρκής ποσότητα σκόνης από ένα δείγμα κάθε φορά, με σπαθίδα στο κέντρο της επιφάνειας μέτρησης του οργάνου, κλείνεται το καπάκι του και πραγματοποιείται η σάρωση.

Εικόνα 34: Φασματόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (JASCO FT/IR-4200).

2.2.3.3 Μελέτη βιωσιμότητας των παραγόμενων ενθυλακωμένων βακτηρίων

Η μελέτη της βιωσιμότητας των παραγόμενων εγκλεισμένων κυττάρων μέσω των μεθόδων του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης με κατάψυξη πραγματοποιείται με έκθεσή τους σε όξινο διάλυμα που προσομοιώνει τα γαστρικά υγρά. Η μελέτη αυτή κρίνεται σκόπιμη, ώστε να διασφαλιστεί ότι τα προβιοτικά στελέχη, μετά την κατανάλωση, επιβιώνουν από τις δυσμενείς συνθήκες που επικρατούν στο στόμαχο (τόσο ενζυμική όσο και χημική δράση) και απελευθερώνονται με ασφάλεια στο έντερο, όπου ασκούν την ευεργετική τους δράση. Επιλέγεται να μελετηθεί η έκθεση των προβιοτικών σε όξινο διάλυμα για 1.5 ώρα, διότι αυτής της διάρκειας θεωρείται το μέγιστο χρονικό διάστημα πέψης της τροφής στο στόμαχο.

Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα προσομοίωσης των γαστρικών υγρών του στομάχου που περιέχει HCl και NaCl. Το γαστρικό υγρό εμφανίζει όξινο pH μεταξύ του 1.5 και του 3.5. Λαμβάνεται η χειρότερη περίπτωση (οι δυσμενέστερες συνθήκες) για τη διασφάλιση της ποιότητας του τελικού προϊόντος, δηλαδή:

pH=1.5⇒-log[H_3O^+]=1.5⇒[H_3O^+]=$10^{-1.5} = 0.0316$ ⇒[HCl]=$0.0316M$.

$$HCl + H_2O \rightarrow H_3O^+ + Cl^-$$

Απαιτούνται, λοιπόν, συγκεντρώσεις 0.0316 M HCl και 0.2% w/v NaCl σε υδατικό διάλυμα. Για το 1 L διαλύματος που παρασκευάστηκε, προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη του 1 L:

- ✓ 0.0316 mol HCl (Mr=36.5), άρα $n = \frac{m}{Mr} \Rightarrow m = n \cdot Mr \Rightarrow m = 0.0316 \cdot 36.5 = 1.1534\ g\ HCl$. Το διαθέσιμο διάλυμα HCl έχει πυκνότητα d=1.2 $\frac{g}{mL}$ και περιεκτικότητα 32% v/v σε HCl, άρα σε 100 mL αντιδραστηρίου υπάρχουν 32 mL HCl ή m=d·V⇒m=1.2·32=38.4 g. Αφού σε 100 mL αντιδραστηρίου περιέχονται 38.4 g HCl, τα

1.1534 g HCl θα περιέχονται σε 3.004≈3 mL, συνεπώς προστίθενται 3 mL του διαθέσιμου διαλύματος HCl

- ✓ 2 g NaCl
- ✓ και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό, ανακινώντας ισχυρά.

Το pH στο παραπάνω διάλυμα ελέγχεται με ηλεκτρονικό πεχάμετρο και πράγματι ισούται με 1.54. Η ογκομετρική φιάλη πωματίζεται και φυλάσσεται για επόμενη χρήση σε σκοτεινό και δροσερό μέρος.

- Για τα εγκλεισμένα σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη βακτήρια μέσω ξήρανσης με κατάψυξη:

30 g διαλύματος πολυμερών + 0.6 g λυοφιλιωμένης σκόνης βακτηρίων=30.6 g διαλύματος που ξηραίνεται με κατάψυξη περιέχουν 18 g H_2O, 12 g ολικών πολυμερών και 0.6 g βακτηρίων. Μέσω της ξήρανσης με κατάψυξη, απομακρύνεται ολόκληρη η ποσότητα νερού, συνεπώς στα 30.6-18=12.6 g δείγματος περιέχονται 12 g ολικών πολυμερών και 0.6 g βακτηρίων. Για να παραλάβω 0.004 g καθαρών βακτηρίων, θα πρέπει να ζυγιστούν 0.084 g της σκόνης που αποτελεί προϊόν της ξήρανσης με κατάψυξη.

- Για τα εγκλεισμένα σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη βακτήρια μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού:

Σε 100 g του υδατικού διαλύματος πολυμερών ή 100 mL (πράγματι, τα 30 g που παρασκευάζονται κάθε φορά ογκομετρούνται σε 30 mL, άρα το υδατικό διάλυμα των πολυμερών έχει πυκνότητα περίπου ίση με του νερού, δηλαδή ρ=1 g/mL) περιέχονται $0.02\frac{g}{mL}\cdot 100mL = 2g$ καθαρών βακτηρίων και 40 %w/w · 100 g=40 g πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης.

Συνεπώς, υποθέτοντας ότι ο διαλύτης, δηλαδή το νερό, εξατμίζεται πλήρως, όταν ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός τρέχει για 5 ώρες και η εφαρμοζόμενη ροή του διαλύματος ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης είναι 600 μL/h, εξάγονται (600 μL/h)· 5 h=3000μL=3 mL=3 mL · 1 g/mL =3 g του διαλύματος, τα οποία περιέχουν $\frac{3\cdot 40}{100} = 1.2\ g$ πρωτεΐνης ορού και ολιγοφρουκτόζης και $0.02\frac{g}{mL}\cdot 3mL = 0.06g$ καθαρών βακτηρίων άρα ανά 5 ώρες λειτουργίας της διάταξης ηλεκτροστατικού ψεκασμού παράγεται σκόνη συνολικής μάζας $1.2 + 0.06 = 1.26\ g$ που περιέχει 0.06 g καθαρών βακτηρίων. Για να παραλάβω 0.004 g καθαρών βακτηρίων, θα πρέπει να ζυγιστούν $\frac{0.004\cdot 1.26}{0.06} = 0.084\ g$ της σκόνης που αποτελεί προϊόν του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (ομοίως με τη σκόνη από την ξήρανση υπό κατάψυξη, αφού και στις δύο διεργασίες απομακρύνεται πλήρως ο διαλύτης).

- Για τα εγκλεισμένα σε ζεΐνη-ολιγοφρουκτόζη βακτήρια μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού:

Σε 100 g διαλύματος πυρήνα ή 100 mL (υποτίθεται ότι το υδατικό διάλυμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε ολιγοφρουκτόζη έχει πυκνότητα περίπου ίση με του νερού, δηλαδή ρ=1 g/mL

και πράγματι, τα 30 g που παρασκευάζονται κάθε φορά ογκομετρούνται σε 30 mL) περιέχονται $0.02\,\frac{g}{mL}\cdot 100mL = 2g$ καθαρών βακτηρίων και 3 %w/w · 100 g=3 g ολιγοφρουκτόζης.

Η πυκνότητα διαλύματος αιθανόλης-νερού αναλογίας 80:20 υπολογίζεται ως εξής:

100 mL διαλύματος περιέχουν 80 mL αιθανόλης και 20 mL νερού

x g διαλύματος περιέχουν m=ρ·V=0.79 $\frac{g}{mL}$ · 80 mL=63.2 g αιθανόλης και m=ρ·V=1 $\frac{g}{mL}$ · 20 mL=20 g νερού, άρα τα 100 mL διαλύματος περιέχουν 63.2+20=83.2 g, συνεπώς η πυκνότητα διαλύματος αιθανόλης-νερού αναλογίας 80:20 είναι ίση με $\frac{83.2}{100} = 0.832\,\frac{g}{mL}$.

Σε 100 g διαλύματος κελύφους ή $V = \frac{m}{\rho} = \frac{100g}{0.832\frac{g}{mL}} = 120.19\,mL$ (θεωρείται ότι το διάλυμα αιθανόλης-νερού με χαμηλή περιεκτικότητα σε ζεΐνη έχει πυκνότητα περίπου ίση με την πυκνότητα του καθαρού διαλύματος αιθανόλης-νερού, δηλαδή ρ= 0.832 g/mL) περιέχονται 5 %w/w · 100 g=5 g ζεΐνης.

Συνεπώς, υποθέτοντας ότι οι διαλύτες (νερό και αιθανόλη) εξατμίζονται πλήρως, όταν ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός τρέχει για 5 ώρες και η εφαρμοζόμενη ροή του διαλύματος ολιγοφρουκτόζης είναι 100 μL/h, εξάγεται (100 μL/h)· 5 h=500μL=0.5 mL=0.5 g του διαλύματος ολιγοφρουκτόζης, τα οποία περιέχουν 0.015 g ολιγοφρουκτόζης και 0.01 g βακτηρίων, ενώ παράλληλα η εφαρμοζόμενη ροή του διαλύματος ζεΐνης είναι 700 μL/h, εξάγονται (700 μL/h)· 5 h=3500μL=3.5 mL=3.5 mL·0.832 g/mL =2.912 g του διαλύματος ζεΐνης, τα οποία περιέχουν $\frac{2.912\cdot 5}{100} = 0.1456\,g$ ολιγοφρουκτόζης, άρα ανά 5 ώρες λειτουργίας της διάταξης ηλεκτροστατικού ψεκασμού παράγεται σκόνη συνολικής μάζας $0.1456 + 0.015 + 0.01 = 0.1706\,g$ που περιέχει 0.01 g βακτηρίων. Για να παραλάβω 0.004 g καθαρών βακτηρίων, θα πρέπει να ζυγιστούν $\frac{0.004\cdot 0.1706}{0.01} = 0.06824 \approx 0.068\,g$ της σκόνης που αποτελεί προϊόν της ξήρανσης με κατάψυξη.

Για τη διερεύνηση τόσο των αποικιών των ελεύθερων (μη εγκλεισμένων) βακτηρίων όσο και της βιωσιμότητας των διαφόρων ενθυλακωμένων βακτηρίων ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Δώδεκα σωλήνες Falcon (των 15 mL) πληρώνονται με 10 mL διαλύματος προσομοίωσης των γαστρικών υγρών του στομάχου με χρήση σιφονιού των 10 mL.
2. Ζυγίζονται 0.004 g λυοφιλιωμένης σκόνης (ελεύθερων) βακτηρίων σε καθένα από τέσσερα πλαίσια από αλουμινόχαρτο (r), 0.084 g των εγκλεισμένων βακτηρίων σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη από την ξήρανση υπό κατάψυξη (a) σε καθένα από τέσσερα πλαίσια από αλουμινόχαρτο, 0.084 g των εγκλεισμένων βακτηρίων σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη από τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό (b) σε καθένα από άλλα τέσσερα πλαίσια από αλουμινόχαρτο και 0.068 g των εγκλεισμένων βακτηρίων σε ζεΐνη-ολιγοφρουκτόζη από τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό (c) σε καθένα

από τα τελευταία τέσσερα πλαίσια από αλουμινόχαρτο, ώστε σε κάθε δείγμα να περιέχεται η ίδια ποσότητα ελεύθερων μικροβίων.

3. Τρεις εκ των συνολικά τεσσάρων ζυγισμένων ποσοτήτων από τα ελεύθερα βακτήρια (r) και από κάθε κατηγορία εγκλεισμένων βακτηρίων (a), (b) και (c) μεταφέρονται στους εννέα σωλήνες και αφήνονται στο θάλαμο επώασης (NÜVE Test Cabinet TK 120), όπου ρυθμίζεται σταθερή θερμοκρασία, στους 37^{o}C. Από κάθε τριάδα, αφήνονται οι σωλήνες για 20, 50 και 80 λεπτά, ώστε συνολικά να παραμείνουν στο όξινο διάλυμα 30, 60 και 90 λεπτά (αφού η φυγοκέντρηση διαρκεί επιπλέον 10 λεπτά για κάθε δείγμα).

Εικόνα 35: Θάλαμος επώασης ελεγχόμενης θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτός (NÜVE Test Cabinet TK 120).

4. Μόλις αφαιρεθούν οι σωλήνες (ένας από κάθε κατηγορία σε κάθε χρόνο), φυγοκεντρούνται αμέσως για 10 λεπτά στις 3000 rpm.
5. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, σε κάθε σωλήνα προστίθενται 10 mL διαλύματος PBS και κάθε σωλήνας ανακινείται καλά (με Vortex και σπαθίδα), ώστε να εκπλυθεί η υπολειπόμενη ποσότητα όξινου διαλύματος και να επαναδιαλυθεί το ίζημα στο PBS.

6. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούνται ξανά οι σωλήνες για 5 λεπτά στις 3000 rpm. Απορρίπτονται τα υπερκείμενα των σωλήνων και προστίθενται με αυτόματη πιπέτα σε κάθε σωλήνα 1 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου με φίλτρο νερού.

Τα βήματα 5.-7. επαναλαμβάνονται για χρόνο έκθεσης στα προσομοιωμένα οξέα στομάχου 30, 60 και 90 λεπτά.

7. Επιπλέον, τα 0.004 g των ελεύθερων βακτηρίων (σε 2 επαναλήψεις), καθώς και τα εγκλεισμένα βακτήρια των τριών κατηγοριών που δεν έχουν εκτεθεί σε όξινο περιβάλλον (χρόνος επεξεργασίας 0 λεπτά) αραιώνονται επίσης σε 1 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου με φίλτρο νερού σε περιέκτες Eppendorf ή σε σωλήνες Falcon, για να διαπιστωθεί η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων σε $\frac{\mathrm{CFU}}{g}$ και η βιωσιμότητά τους μετά τις διεργασίες του electrospinning και του freeze drying.
8. Για την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία, χρησιμοποιώ ένα τρυβλίο για κάθε χρόνο κάθε κατηγορίας βακτηρίων, δηλαδή για τις κατηγορίες (r), (a), (b) και (c) σε όλους τους χρόνους (0, 30, 60 και 90 min) έκθεσης σε όξινο περιβάλλον, συνεπώς χρειάζονται 4·4+1(λόγω 2 επαναλήψεων για τα ελεύθερα βακτήρια με χρόνο επεξεργασίας τα 0 min)=16 τρυβλία, τα οποία παράγονται όπως περιγράφεται στην *ενότητα 2.2.1*. Κάθε τρυβλίο διαιρείται σε 12 χωρία, τα οποία αριθμούνται από εκείνο που είναι πυκνότερο ως προς τα διαλυμένα βακτήρια (ελεύθερα ή εγκλεισμένα) προς το αραιότερο (1-12). Οι διαδοχικές αραιώσεις 1:2 («1 προς 2») και 1:10 («1 προς 10») πραγματοποιούνται ως εξής:

   -σε 2 πλάκες Microplate (8 σειρών και 12 στηλών, 8·12=96 θέσεις σε κάθε πλάκα) πληρώνονται με αυτόματη πιπέτα των 20-200 μL οι 3 πρώτες θέσεις κάθε σειράς με 100 μL αποστειρωμένο με φίλτρο, υπερκάθαρο νερό, ενώ όλες οι υπόλοιπες θέσεις κάθε σειράς (4-12) με 180 μL νερό.

   -λαμβάνονται 100 μL από τα διάφορα διαλύματα βακτηρίων σε 1 mL νερού (διαφορετικών κατηγοριών βακτηρίων και διαφορετικών χρόνων όξινης επεξεργασίας) με αυτόματη πιπέτα των 20-200 μL και προστίθενται στην πρώτη ($1^{η}$) θέση κάθε σειράς.

   -αναδεύεται καλά το περιεχόμενο της πρώτης θέσης με την πιπέτα και λαμβάνονται 100 μL από αυτό και προστίθενται στη δεύτερη ($2^{η}$) θέση, ενώ με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιείται και η αραίωση στην τρίτη ($3^{η}$) θέση.

   -αναδεύεται καλά το περιεχόμενο της τρίτης ($3^{ης}$) θέσης με την αυτόματη πιπέτα και λαμβάνονται 20 μL από αυτό, τα οποία προστίθενται στην τέταρτη ($4^{η}$) θέση.

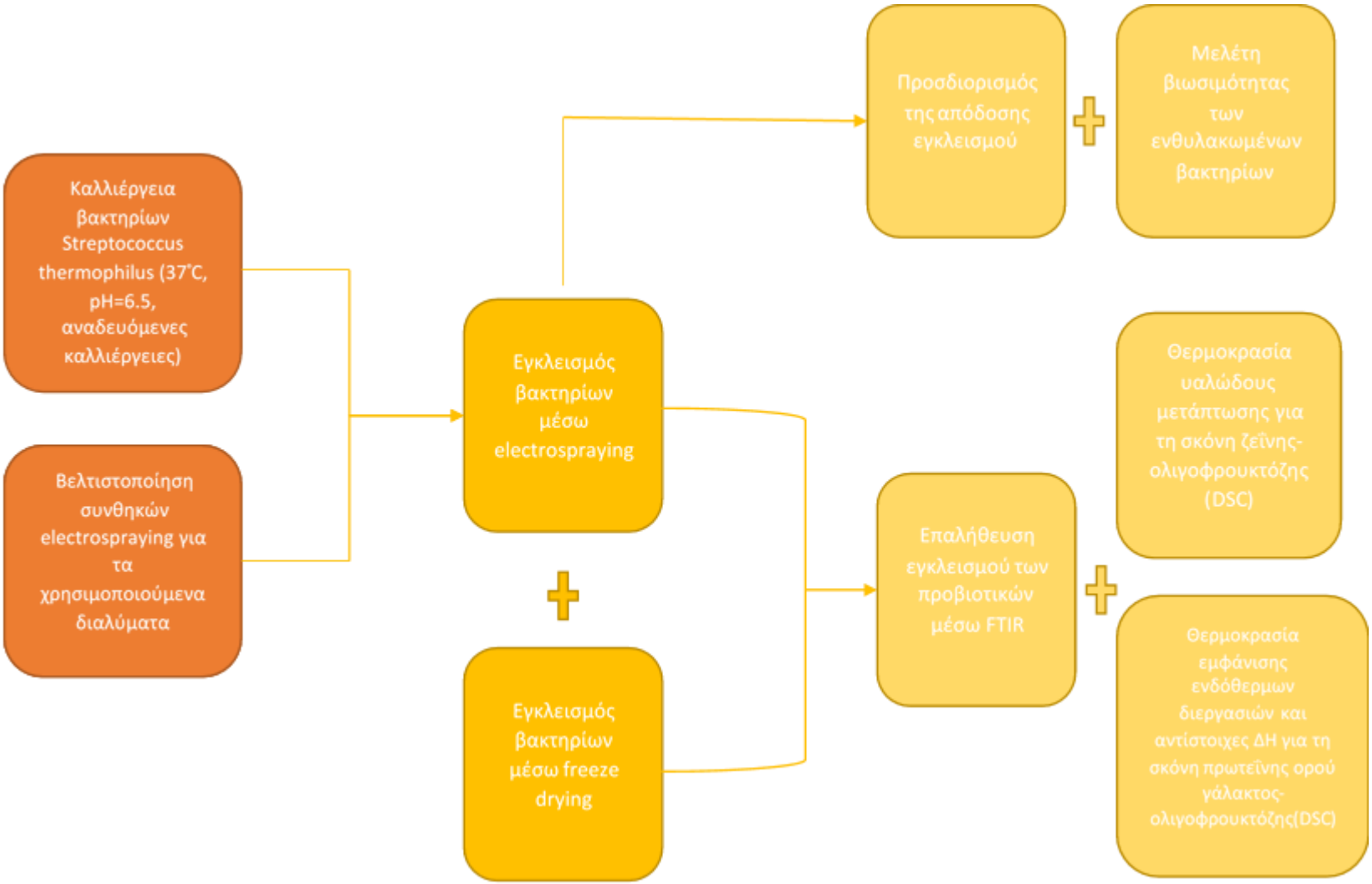
   -το περιεχόμενο της τέταρτης ($4^{ης}$) θέσης αναδεύεται και αντλούνται 20 μL με την αυτόματη πιπέτα τα οποία προστίθενται στην πέμπτη ($5^{η}$) θέση.

   -ομοίως, πληρώνονται όλες οι θέσεις μέχρι και τη δωδέκατη ($12^{η}$).

Πραγματοποιούνται οι αραιώσεις ανά κάθε σειρά και κατά τη μετάβαση από μια σειρά σε μια άλλη, αντικαθίσταται το tip της πιπέτας, για να αποφευχθούν επιμολύνσεις από την κάθε κατηγορία βακτηρίου.

9. Από κάθε θέση των δύο Microplate λαμβάνονται 10 μL δείγμα με αυτόματη πιπέτα των 10-100 μL και προστίθενται στο κέντρο του αντίστοιχου χωρίου (σημειωμένο ανάλογα με την αραίωση), στο αντίστοιχο τρυβλίο (συγκεκριμένης κατηγορίας βακτηρίων και χρόνου όξινης επεξεργασίας), με προσοχή να μην έρθει σε επαφή το tip της πιπέτας με το θρεπτικό υλικό του τρυβλίου, ώστε να μην προκαλέσει φθορά και επιμολύνσεις του.
10. Ακολούθως, τα τρυβλία αποθηκεύονται στο θάλαμο επώασης στους 37^{o} C (βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του Streptococcus thermophilus) για 24 ώρες, έτσι ώστε την επόμενη μέρα μετριέται ο αριθμός των αποικιών στο χωρίο κάθε τρυβλίου, όπου η ανάπτυξη των βακτηρίων εμφανίζεται πιο ευδιάκριτα και με ασφαλέστερη στατιστική επεξεργασία (θεωρητικά 30-300 αποικίες).

Εικόνα 36: Αριστερά: η πλάκα Microplate, Κέντρο: η αυτόματη πιπέτα των 100-1000 μL, Δεξιά: η αυτόματη πιπέτα των 20-200 μL.



Σχήμα 4: Συνοπτικό διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Παραγωγικότητα της καλλιέργειας του βακτηριακού στελέχους *Streptococcus thermophilus*

Το βακτήριο *Streptococcus thermophilus* αναπτύσσεται σε 1.75 L υγρού θρεπτικού υλικού, σε αναδευόμενες καλλιέργειες και στους 37° C για 48 ώρες, αφού εμβολιαστεί η καλλιέργεια με το freeze dried εμπορικό στέλεχος. Η κυτταρική βιομάζα που παράγεται υφίσταται ξήρανση υπό κατάψυξη και έπειτα ζυγίζεται. Στις συγκεκριμένες συνθήκες, παράγεται κάθε φορά 1 g βακτηρίων.

3.2 Παραγωγικότητα της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού

Στον παρακάτω Πίνακα παρατίθενται οι ποσότητες σκόνης (χωρίς εγκλεισμένα βακτήρια) που παράγονται κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό (electrospraying) και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα για τα οποία λειτούργησε η διάταξη του electrospraying. Οι ποσότητες αυτές ζυγίστηκαν σε ζυγό ακρίβειας 4 δεκαδικών και μετρήθηκε ο χρόνος κατά τον οποίο παρήχθησαν, ώστε να προσδιοριστεί η παραγωγικότητα της διεργασίας του electrospraying για τα διαλύματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης.

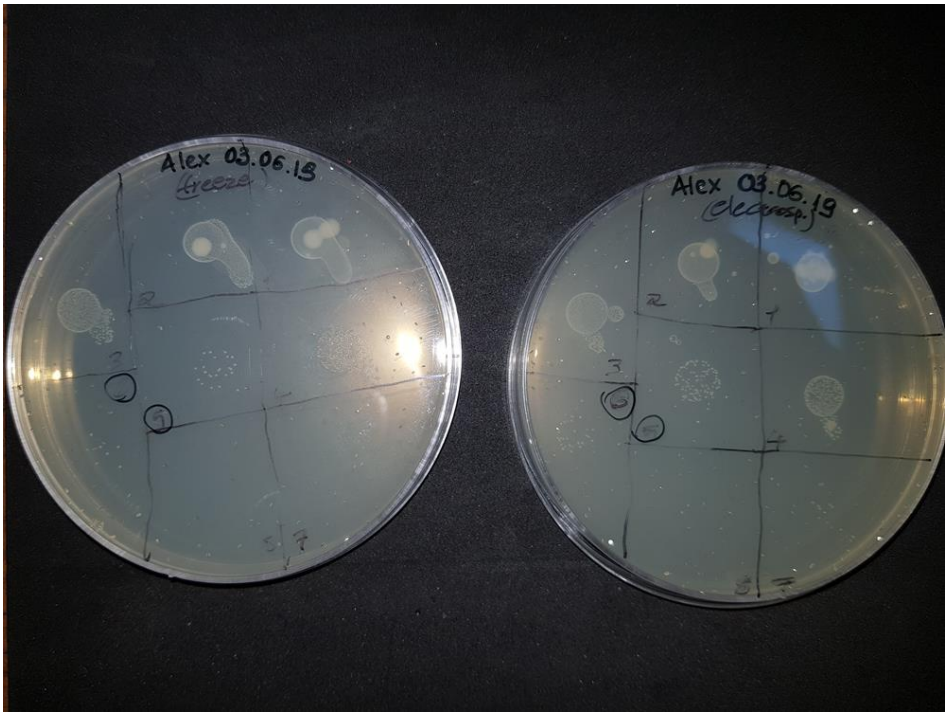
Πίνακας 12: Παραγωγικότητα της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για τα διαλύματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης.

Είδος πολυμερικού διαλύματος	Μάζα παραγόμενης σκόνης(g)	Χρόνος λειτουργίας της διάταξης του electrospraying (min)	Παραγωγικότητα της διεργασίας (g/h)	Μέση παραγωγικότητα διεργασίας (g/h)
Σκόνη από διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης	0.4109	165	0.1494	0.1503
	0.3602	135	0.1601	
	0.4246	180	0.1415	
Σκόνη από διάλυμα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης	0.1087	240	0.0272	0.024
	0.1041	300	0.0208	
	0.0482	120	0.0241	

Συνεπώς, ο μέσος ρυθμός παραγωγής σκόνης μέσω της διεργασίας του electrospraying από το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης μετρήθηκε περίπου ίσος με 0.1503 g/h, ενώ από τα διαλύματα ζεΐνης και ολιγοφρουκτόζης μετρήθηκε 0.024 g/h.

3.3 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού

Τόσο για τα ενθυλακωμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτήρια όσο και για τα ενθυλακωμένα με ηλεκτροστατικό ψεκασμό, μετά από την κατεργασία τους με αιθανόλη, πραγματοποιήθηκαν 8 διαδοχικές αραιώσεις 1:10, με τρόπο ανάλογο όπως περιγράφεται στην *ενότητα 2.2.3.3.*



Εικόνα 37: Απόδοση εγκλεισμού με ξήρανση υπό κατάψυξη (αριστερά) και ξήρανση με ηλεκτροστατικό ψεκασμό (δεξιά), μέσω μελέτης της βιωσιμότητας των αντίστοιχων εγκλεισμένων βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε αιθανόλη.

Τα αποτελέσματα από την καταμέτρηση αποικιών στα δείγματα των εγκλεισμένων βακτηρίων μετά την επεξεργασία με αιθανόλη (για θανάτωση των μη εγκλεισμένων και ακόλουθη διάλυση σε νερό με στόχο την καταμέτρηση των ζωντανών και τον προσδιορισμό της απόδοσης του εγκλεισμού) διακρίνονται στον παρακάτω *Πίνακα.*

Πίνακας 13: Σχηματιζόμενες αποικίες από τα εγκλεισμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη και με ηλεκτροστατικό ψεκασμό βακτήρια, μετά την επεξεργασία τους με αιθανόλη(για θανάτωση των μη εγκλεισμένων).

Τεχνικές εγκλεισμού	αριθμός αποικιών στην 6η αραίωση
Ξήρανση υπό κατάψυξη	7 αποικίες
Ηλεκτροστατικός ψεκασμός	27 αποικίες

Οι $\frac{αποικίες}{g}$ των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων πριν την επεξεργασία με αιθανόλη μετρήθηκαν για τη χρησιμοποιούμενη στους εγκλεισμούς παρτίδα βακτηρίων ίσες με $7.1 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$, ενώ για τα εγκλεισμένα με ηλεκτροστατικό ψεκασμό βακτήρια βρέθηκαν ίσες με $7.8 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$. Έπειτα, στη θέση του τρυβλίου που αντιστοιχεί στην 6η αραίωση μετρήθηκαν 7 αποικίες για τα εγκλεισμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτήρια, άρα αρχικά υπήρχαν $7 \cdot 10^6 CFU$ στα 20 μL διαλύματος βακτηρίων συγκέντρωσης $\frac{0.002\ g\ βακτηρίων}{1mL\ διαλύματος}$, άρα $0.02mL \cdot \frac{0.002\ g\ βακτηρίων}{1mL\ διαλύματος} = 4 \cdot 10^{-5} g\ βακτηρίων$, συνεπώς οι $\frac{αποικίες}{g}$ των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων μετά την επεξεργασία με αιθανόλη μετρήθηκαν ίσες με $\frac{7 \cdot 10^6 CFU}{4 \cdot 10^{-5} g}$=$2.75 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$, ενώ για τα εγκλεισμένα με ηλεκτροστατικό ψεκασμό βακτήρια ομοίως βρέθηκαν ίσες με $6.75 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$.

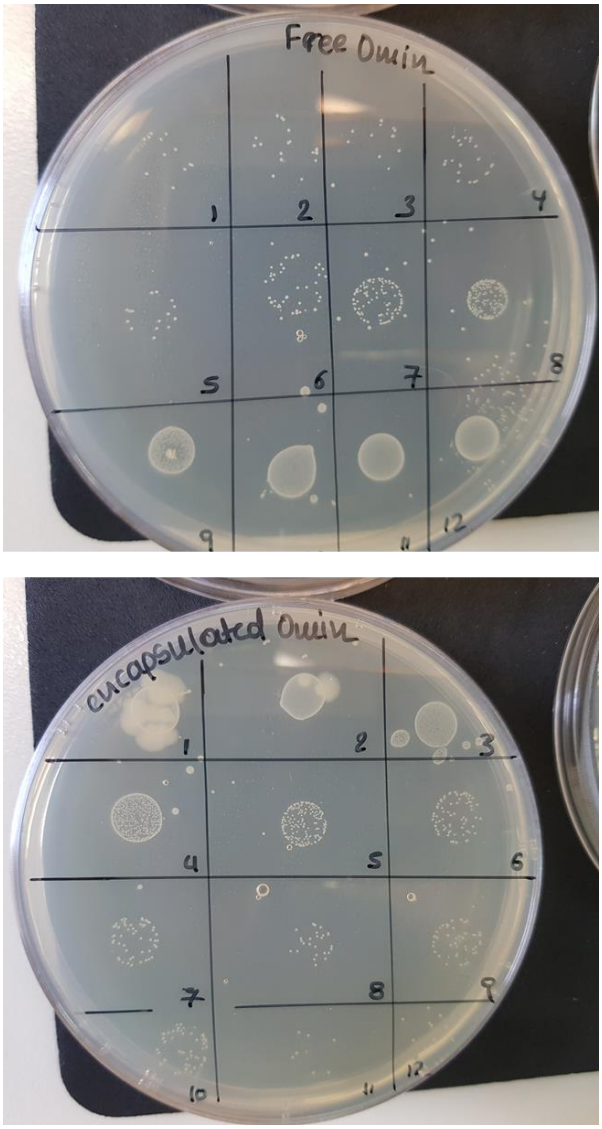
Η απόδοση εγκλεισμού (encapsulation efficiency-EE%) υπολογίζεται ως εξής: $απόδοση\ εγκλεισμού = \frac{\frac{CFU}{g}\ των\ εγκλεισμένων\ με\ κάθε\ τεχνική\ βακτηρίων\ έπειτα\ από\ επεξεργασία\ με\ αιθανόλη}{\frac{CFU}{g}\ των\ εγκλεισμένων\ με\ κάθε\ τεχνική\ βακτηρίων\ χωρίς\ επεξεργασία\ με\ αιθανόλη}$ και φαίνεται στον *Πίνακα 14*.

Πίνακας 14: Απόδοση εγκλεισμού με ξήρανση υπό κατάψυξη και ηλεκτροστατικό ψεκασμό.

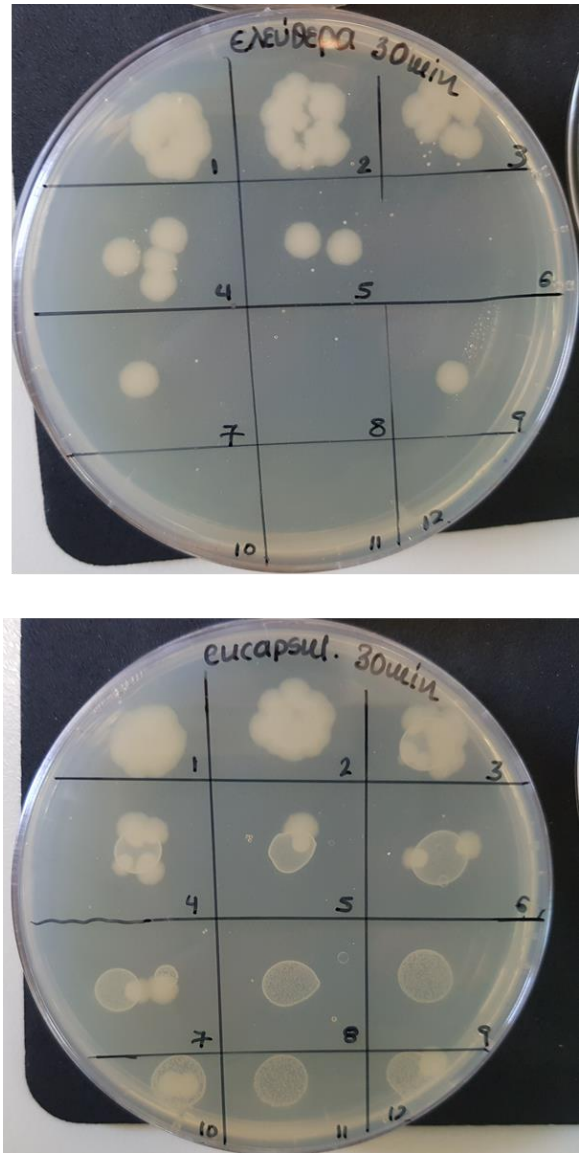
Τεχνικές εγκλεισμού	Αριθμός αποικιών πριν την επεξεργασία με αιθανόλη	Αριθμός αποικιών μετά την επεξεργασία με αιθανόλη	Απόδοση εγκλεισμού (EE%)
Ξήρανση υπό κατάψυξη	$7.1 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$	$2.75 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$	38.7%
Ηλεκτροστατικός ψεκασμός	$7.8 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$	$6.75 \cdot 10^{11} \frac{CFU}{g}$	86.5%

3.4 Μελέτη βιωσιμότητας των παραγόμενων ενθυλακωμένων βακτηρίων

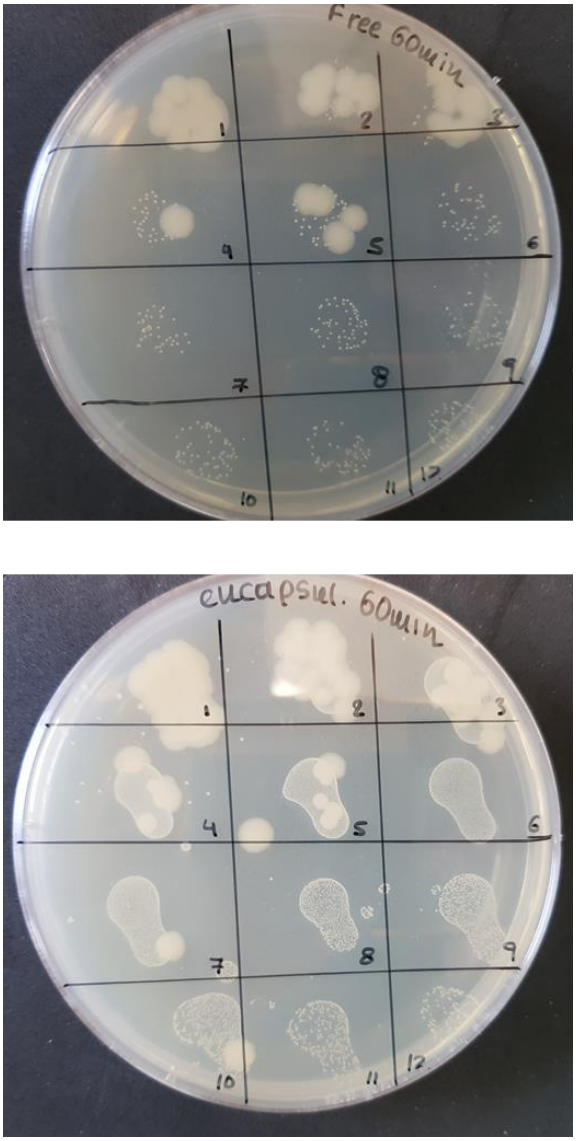
Τόσο για τα ελεύθερα όσο και για τα ενθυλακωμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτήρια στο χρόνο 0 min πραγματοποιήθηκαν 12 διαδοχικές αραιώσεις 1:10, ενώ στους χρόνους 30, 60 και 90 min πραγματοποιήθηκαν 12 διαδοχικές αραιώσεις 1:2, με τρόπο ανάλογο όπως περιγράφεται στην *ενότητα 2.2.3.3.*



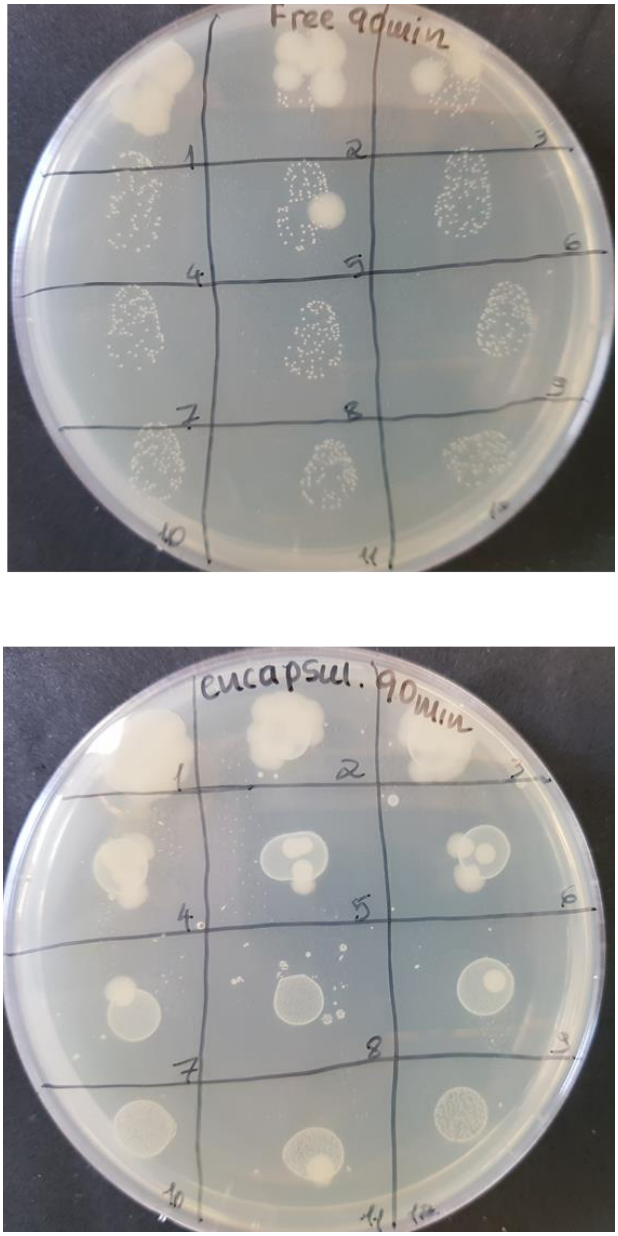
Εικόνα 38: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω).



Εικόνα 39: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω) μετά από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 30 min.



Εικόνα 40: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω) μετά από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 60 min.



Εικόνα 41: Μέτρηση βιωσιμότητας των ελεύθερων (επάνω) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω) μετά από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 90 min.

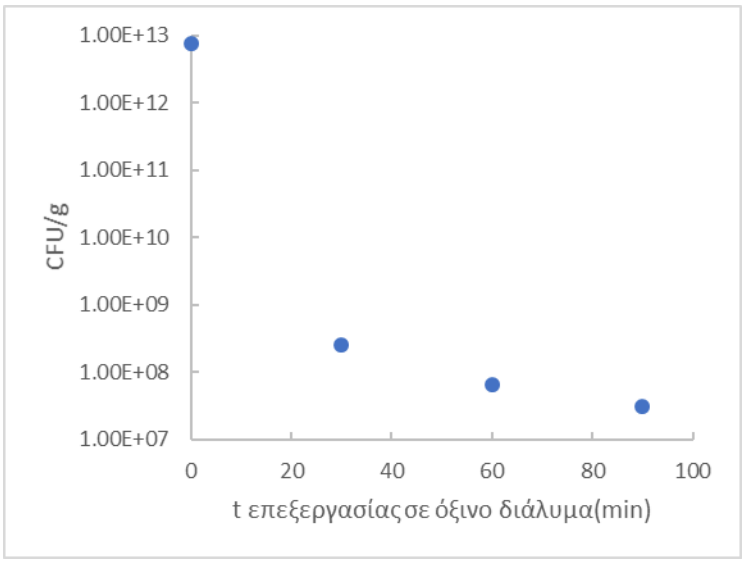
Πίνακας 15: Καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία για ελεύθερα και εγκλεισμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτήρια που έχουν εκτεθεί σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά.

	0 min	30 min	60 min	90 min
ελεύθερα βακτήρια	15 αποικίες, μετρημένες στην 8η αραίωση	97 αποικίες, μετρημένες στην 9η αραίωση	50 αποικίες, μετρημένες στην 8η αραίωση	24 αποικίες, μετρημένες στην 8η αραίωση
ενθυλακωμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη	60 αποικίες, μετρημένες στην 6η αραίωση	380 αποικίες, μετρημένες στην 12η αραίωση	50 αποικίες, μετρημένες στην 12η αραίωση	22 αποικίες, μετρημένες στην 12η αραίωση

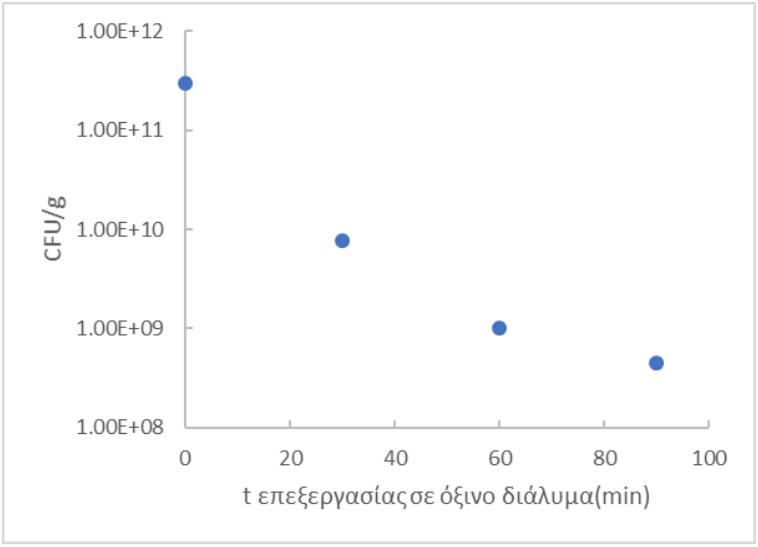
Στην 1η θέση των αραιώσεων στα ελεύθερα βακτήρια, 0 min εισάγονται 20 μL διαλύματος μικροβίων που περιέχουν $\frac{0.01\ g\ \beta\alpha\kappa\tau\eta\rho\acute{\iota}\omega\nu}{1mL\ \delta\iota\alpha\lambda\acute{\upsilon}\mu\alpha\tau\circ\varsigma}$, άρα $0.02mL \cdot \frac{0.01\ g\ \beta\alpha\kappa\tau\eta\rho\acute{\iota}\omega\nu}{1mL\ \delta\iota\alpha\lambda\acute{\upsilon}\mu\alpha\tau\circ\varsigma} = 2 \cdot 10^{-4} g\ \beta\alpha\kappa\tau\eta\rho\acute{\iota}\omega\nu$, τα οποία αραιώνονται 10 φορές στην πρώτη θέση, 100 φορές στη δεύτερη κ.ο.κ.. Αφού για τα ελεύθερα βακτήρια, 0 min παρατηρούνται 15 αποικίες στην 8η αραίωση (1:10), στην αρχική ποσότητα θα υπήρχαν $15 \cdot 10^8\ \alpha\pi\circ\iota\kappa\acute{\iota}\varepsilon\varsigma$ (CFU) σε $2 \cdot 10^{-4} g\ \beta\alpha\kappa\tau\eta\rho\acute{\iota}\omega\nu$, άρα $\frac{15 \cdot 10^8 CFU}{2 \cdot 10^{-4} g} = 7.5 \cdot 10^{12}\ \frac{CFU}{g}$. Ομοίως, υπολογίζονται τα $\frac{CFU}{g}$ και για τα υπόλοιπα δείγματα βακτηρίων, τα οποία παρουσιάζονται στον *Πίνακα 16*. Για παράδειγμα, αφού για τα ελεύθερα βακτήρια, 30 min παρατηρούνται 97 αποικίες στην 9η αραίωση (1:2), στην αρχική ποσότητα θα υπήρχαν $97 \cdot 2^9\ \alpha\pi\circ\iota\kappa\acute{\iota}\varepsilon\varsigma$ (CFU) σε $2 \cdot 10^{-4} g\ \beta\alpha\kappa\tau\eta\rho\acute{\iota}\omega\nu$, άρα $\frac{97 \cdot 2^9 CFU}{2 \cdot 10^{-4} g} = 2.48 \cdot 10^8\ \frac{CFU}{g}$.

Πίνακας 16: Αναπτυσσόμενες αποικίες/g (CFU/g) για ελεύθερα και εγκλεισμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτήρια που έχουν εκτεθεί σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά.

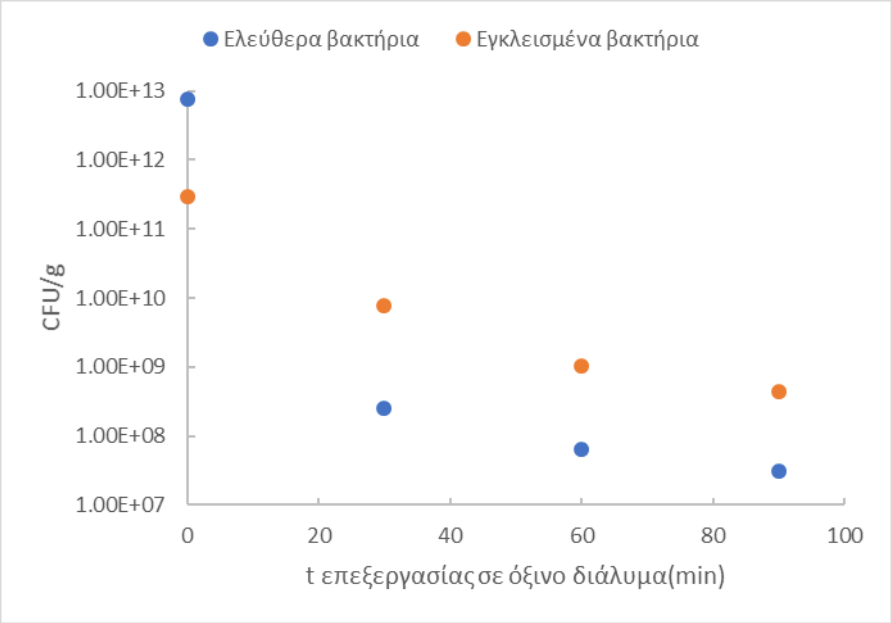
	0 min	30 min	60 min	90 min
ελεύθερα βακτήρια	$7.5 \cdot 10^{12}\ \frac{CFU}{g}$	$2.48 \cdot 10^8\ \frac{CFU}{g}$	$6.40 \cdot 10^7\ \frac{CFU}{g}$	$3.07 \cdot 10^7\ \frac{CFU}{g}$
ενθυλακωμένα με ξήρανση υπό κατάψυξη	$3 \cdot 10^{11}\ \frac{CFU}{g}$	$7.78 \cdot 10^9\ \frac{CFU}{g}$	$1.02 \cdot 10^9\ \frac{CFU}{g}$	$4.51 \cdot 10^8\ \frac{CFU}{g}$



Διάγραμμα 1: Υποβάθμιση της βιωσιμότητας των ελεύθερων βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά.



Διάγραμμα 2: Υποβάθμιση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά.

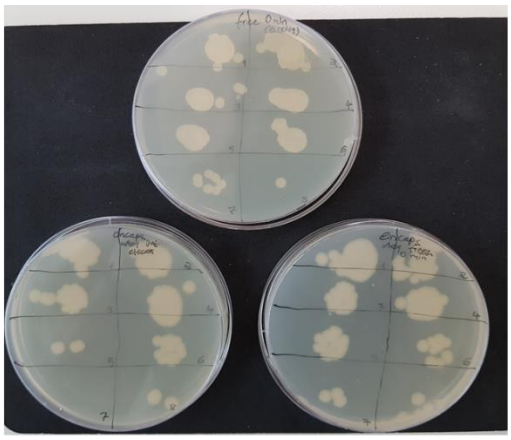


Διάγραμμα 3: Συγκριτικό διάγραμμα της υποβάθμισης βιωσιμότητας των ελεύθερων και των εγκελισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε προσομοιωμένο διάλυμα στομάχου για 0, 30, 60 και 90 λεπτά.

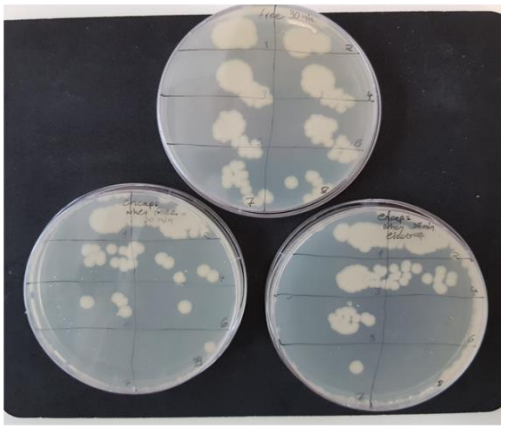
Στο παραπάνω *Διάγραμμα*, επαληθεύεται η προστασία που παρέχει ο εγκλεισμός με ξήρανση υπό κατάψυξη στα βακτήρια, καθώς τα εγκλεισμένα βακτήρια -αν και ξεκινούν από λιγότερα $\frac{CFU}{g}$ στο χρόνο 0 (θανάτωση βακτηρίων λόγω των συνθηκών του freeze drying: κενό και πολύ χαμηλές θερμοκρασίες)- εμφανίζουν αυξημένη βιωσιμότητα, συγκριτικά με τα ελεύθερα βακτήρια για χρόνους επεξεργασίας στα όξινα διαλύματα 30, 60 και 90 λεπτά.

Στην *Εικόνα 42* επιβεβαιώνεται η προστασία που προσφέρει ο εγκλεισμός έναντι της θανάτωσης των βακτηρίων από τα οξέα του στομάχου, καθώς τα εγκλεισμένα βακτήρια (τόσο με freeze drying όσο και με electrospraying) που εκτίθενται σε οξέα στομάχου αναπτύσσουν περισσότερες αποικίες συγκριτικά με τα ελεύθερα που υφίστανται την ίδια επεξεργασία.

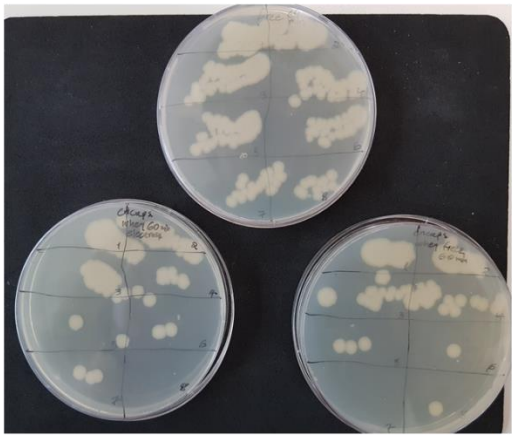
α.



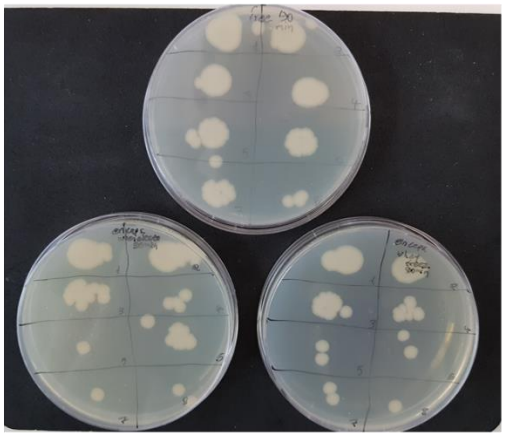
β.



γ.

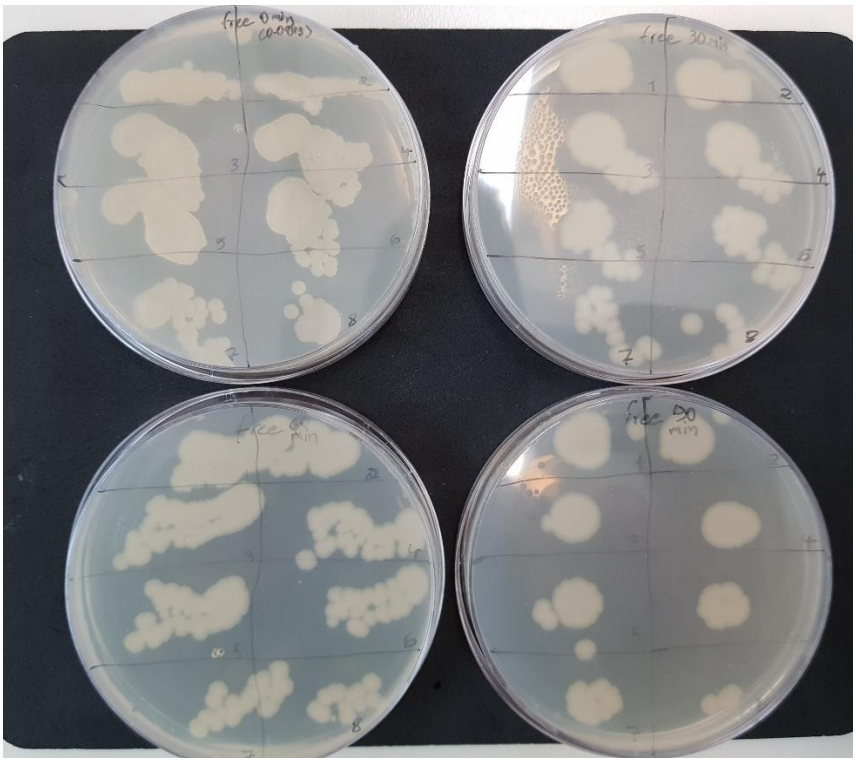


δ.



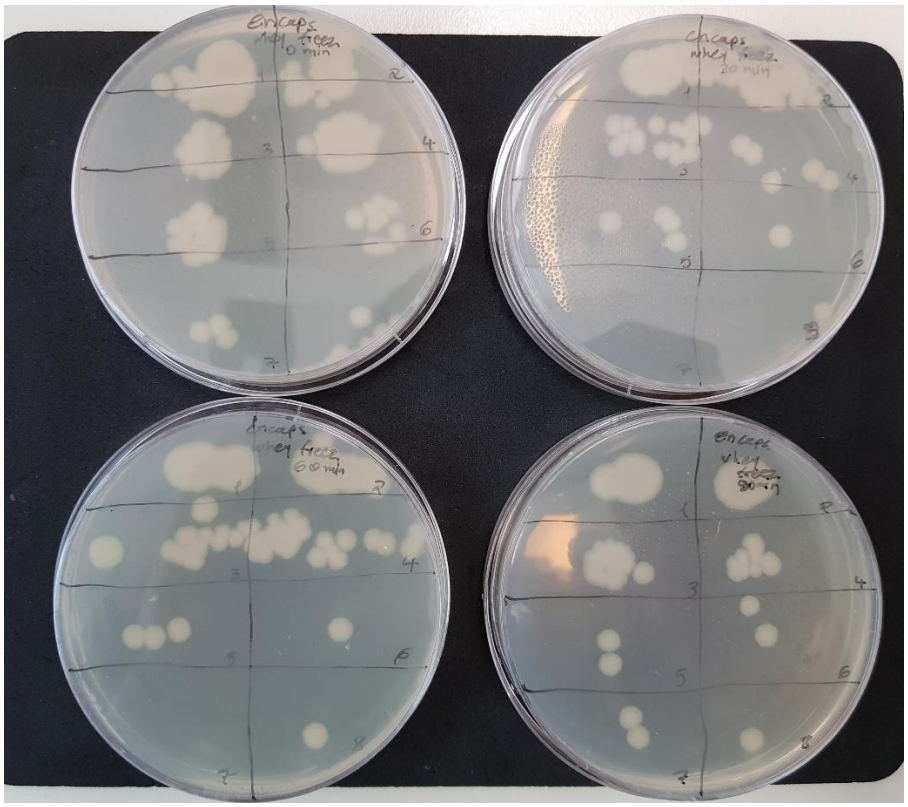
Εικόνα 42:Σύγκριση της βιωσιμότητας μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (α.), 30 (β.), 60 (γ.) και 90(δ.) λεπτά των ελεύθερων (επάνω, σε κάθε φωτογραφία), των εγκλεισμένων με ηλεκτροστατικό ψεκασμό (κάτω αριστερά, σε κάθε φωτογραφία) και των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων (κάτω δεξιά, σε κάθε φωτογραφία).

Στην *Εικόνα 43* διακρίνεται η μείωση της βιωσιμότητας των ελεύθερων βακτηρίων, όσο περισσότερο χρόνο εκτίθενται στο διάλυμα προσομοίωσης των οξέων του στομάχου, καθώς οι αποικίες είναι περισσότερο εκτεταμένες στο χρόνο των 0 λεπτών έκθεσης και φθίνουν μέχρι τα 90 λεπτά.



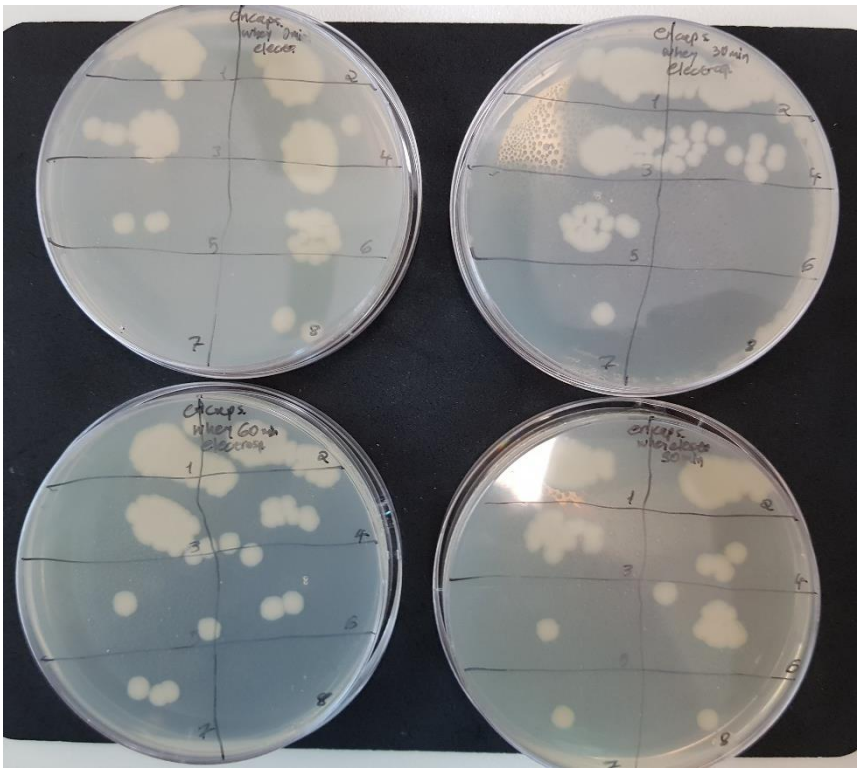
Εικόνα 43:Οι σχηματιζόμενες αποικίες των ελεύθερων (μη εγκλεισμένων) βακτηρίων μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (πάνω αριστερά) , 30 (πάνω δεξιά), 60 (κάτω αριστερά) και 90 (κάτω δεξιά) λεπτά.

Ομοίως, στην *Εικόνα 44* μειώνεται η βιωσιμότητα των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων, όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσής τους στο διάλυμα προσομοίωσης.



Εικόνα 44:Οι σχηματιζόμενες αποικίες των εγκλεισμένων με ξήρανση υπό κατάψυξη βακτηρίων μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (πάνω αριστερά) , 30 (πάνω δεξιά), 60 (κάτω αριστερά) και 90 (κάτω δεξιά) λεπτά.

Αντιστοίχως, στην *Εικόνα 45* επιβεβαιώνεται η ελάττωση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων με ηλεκτροστατικό ψεκασμό βακτηρίων, όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσής τους στο διάλυμα προσομοίωσης.

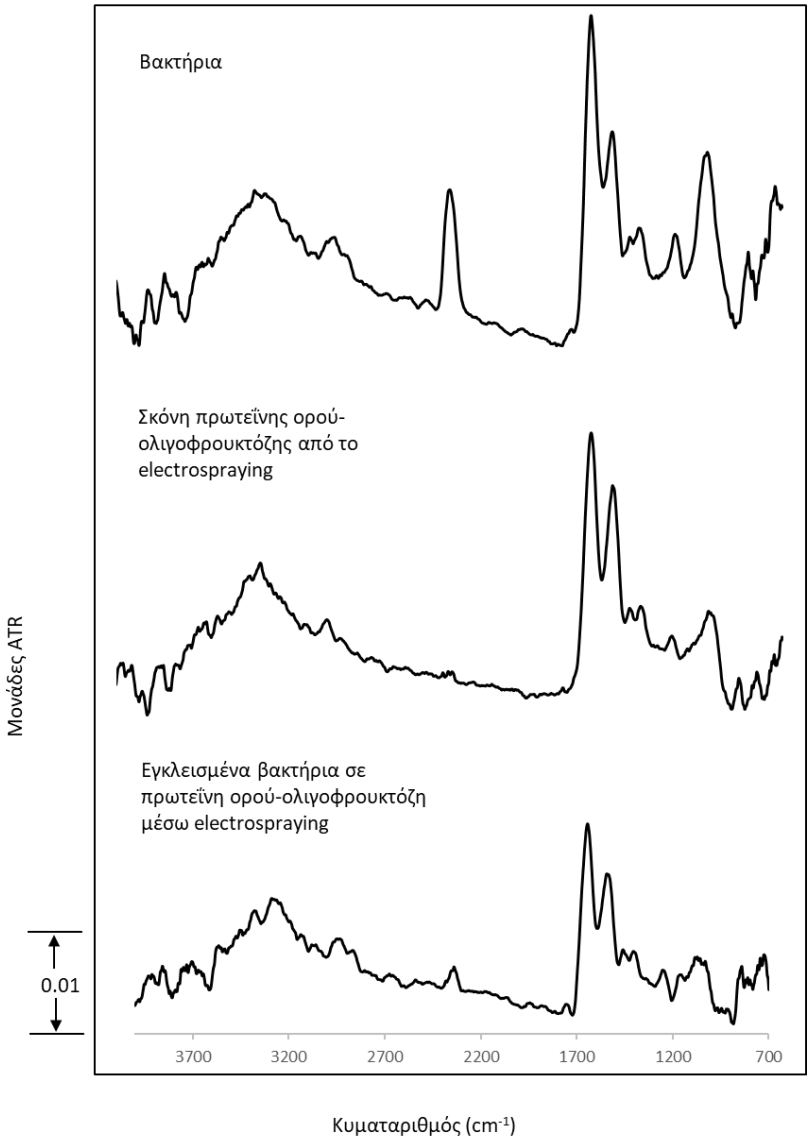


Εικόνα 45: Οι σχηματιζόμενες αποικίες των εγκλεισμένων με ηλεκτροστατικό ψεκασμό βακτηρίων μετά από έκθεση σε προσομοιωμένα οξέα στομάχου για 0 (πάνω αριστερά) , 30 (πάνω δεξιά), 60 (κάτω αριστερά) και 90 (κάτω δεξιά) λεπτά.

Ο εγκλεισμός των προβιοτικών σε μήτρα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης συνιστά ιδανική επιλογή, διότι η ζεΐνη είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη και συνεπώς, δε διαλύεται στα οξέα του στομάχου, προστατεύοντας πλήρως τα ενθυλακωμένα βακτήρια.

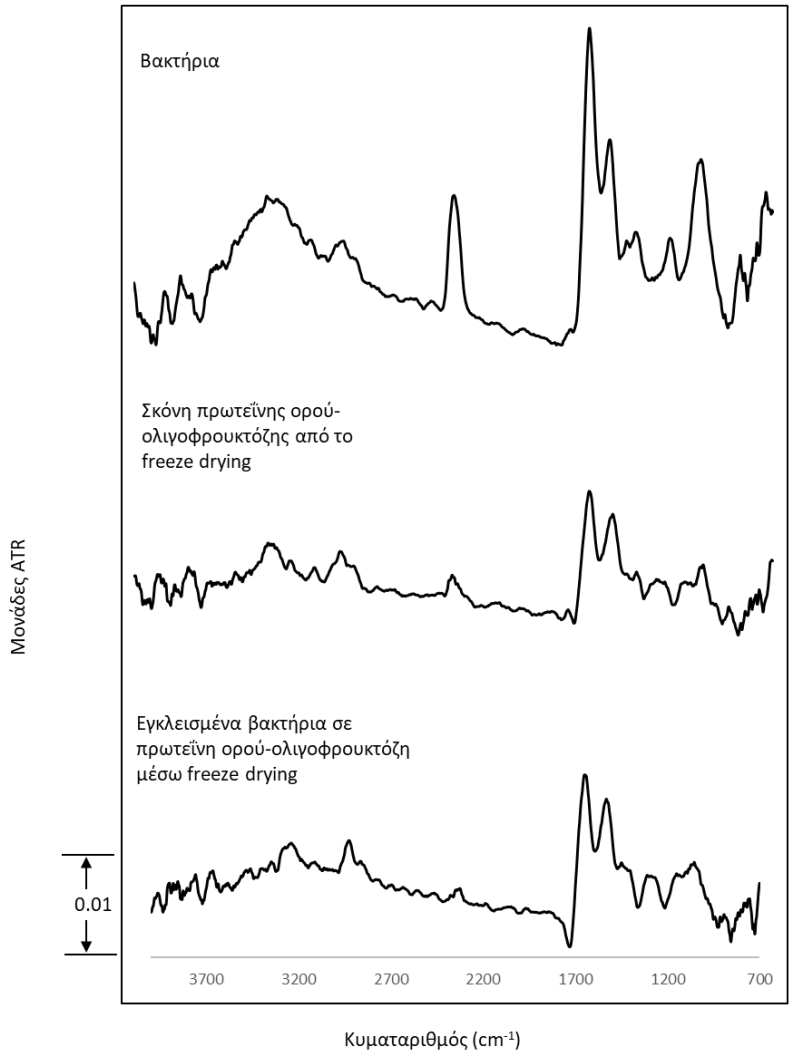
3.5 Υπόλοιπες τεχνικές (DSC, ATR-FTIR)

3.5.1 Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR)



Διάγραμμα 4: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού προβιοτικών σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη μέσω του ηλεκτροστατικού ψεκασμού.

Η χαρακτηριστική κορυφή των ελεύθερων μικροοργανισμών εντοπίζεται στα 2300 cm^{-1}, καθώς στο συγκεκριμένο σημείο δεν παρατηρείται κορυφή στη σκόνη της πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης χωρίς εγκλεισμένα προβιοτικά, αλλά πραγματοποιείται μια ενίσχυση στο φασματογράφημα των εγκλεισμένων προβιοτικών σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη, το οποίο φανερώνει τον επιτυχή εγκλεισμό των βακτηρίων στην πολυμερική μήτρα.

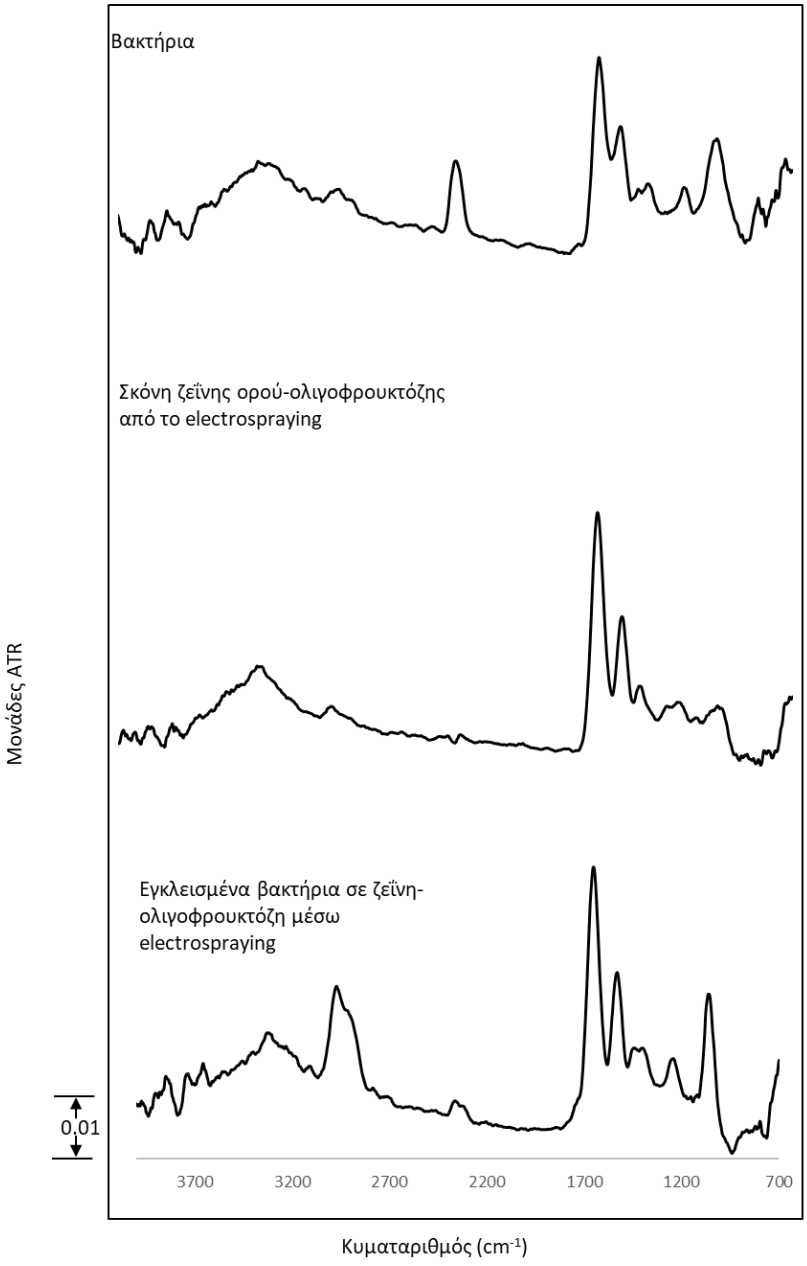


Διάγραμμα 5: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού προβιοτικών σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη μέσω της ξήρανσης υπό κατάψυξη.

Στα παραπάνω διαγράμματα (τόσο για τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό όσο και για την ξήρανση υπό κατάψυξη), δεν παρατηρούνται μετατοπίσεις των κορυφών μεταξύ των φασματογραφημάτων των σωματιδίων πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και των εγκλεισμένων βακτηρίων σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζη σε άλλους κυματαριθμούς, το οποίο σημαίνει πως δεν παρουσιάζεται αλληλεπίδραση μεταξύ των προβιοτικών βακτηρίων και της πολυμερικής μήτρας.

Στο φάσμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης, εμφανίζεται μια κορυφή στα 3300 cm^{-1} περίπου, η οποία αντιστοιχεί στη ζώνη έκτασης της ομάδας NH, ενώ οι χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης περί τα 1600 και 1500 cm^{-1} αποδεικνύουν την παρουσία αμιδίου I και αμιδίου II, αντίστοιχα, οι οποίες είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές της πρωτεΐνης. Η δόνηση του αμιδίου I προέρχεται κυρίως από τη δόνηση του καρβονυλικού δεσμού C=O και χρησιμοποιείται

για την ανίχνευση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών μέσω υπέρυθρης φασματοσκοπίας, ενώ η δόνηση του αμιδίου ΙΙ οφείλεται στο συνδυασμό των δονήσεων κάμψης της αμινομάδας ΝΗ και της δόνησης του CN (το αμίδιο ΙΙ δείχνει πολύ μικρότερη ευαισθησία στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης συγκριτικά με το αμίδιο Ι). Η ζώνη του αμιδίου Ι αντιστοιχεί στο συνδυασμό των διαμορφώσεων β-πτυχωτού φύλλου, α-έλικας και τυχαίας σπείρας, ωστόσο το μέγιστο της συγκεκριμένης ζώνης αποδίδεται στα διαμοριακά β-πτυχωτά φύλλα που προκύπτουν από το σχηματισμό δικτύου στην πρωτεΐνη.



Διάγραμμα 6: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού προβιοτικών σε ζεΐνη-ολιγοφρουκτόζη μέσω του ηλεκτροστατικού ψεκασμού.

3.5.2 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry-DSC)

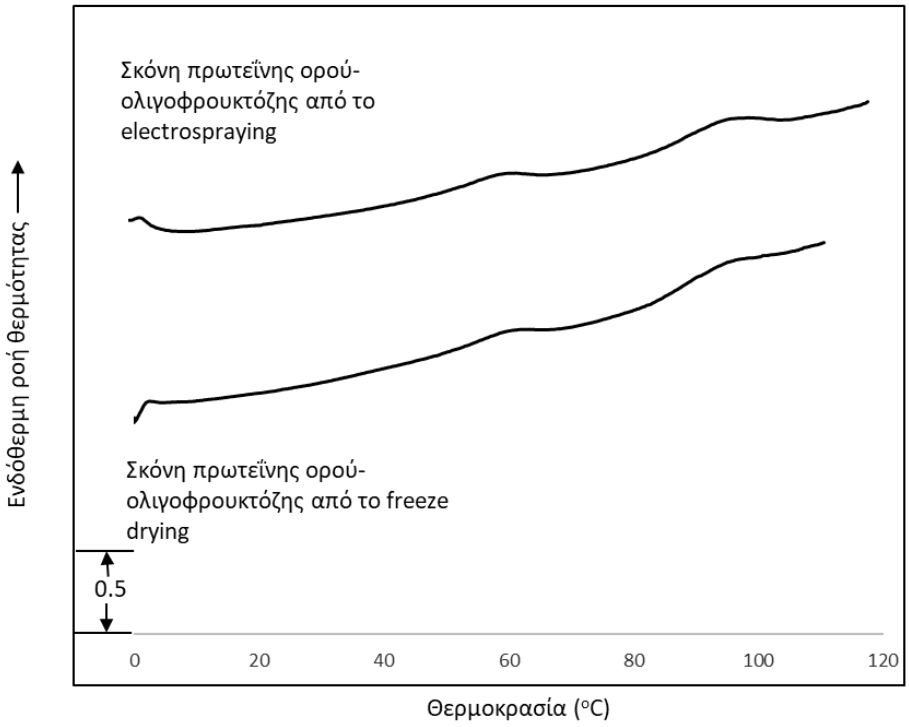
Από τη μελέτη των παρακάτω γραφημάτων DSC για τη σκόνη πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης που παράγεται από το freeze drying και το electrospraying προκύπτουν οι θερμοκρασίες εμφάνισης κορυφών, οι οποίες αντιστοιχούν στην πραγματοποίηση ενδόθερμων διεργασιών στο κάθε δείγμα. Επιπλέον, υπολογίζεται η διαφορά ενθαλπίας ΔΗ που διέπει την κάθε ενδόθερμη διεργασία.

Πίνακας 17: Θερμοκρασία εμφάνισης και διαφορά ενθαλπίας των ενδόθερμων διεργασιών στα δείγματα *σκόνης πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης που παράγονται από το freeze drying και από το electrospraying.*

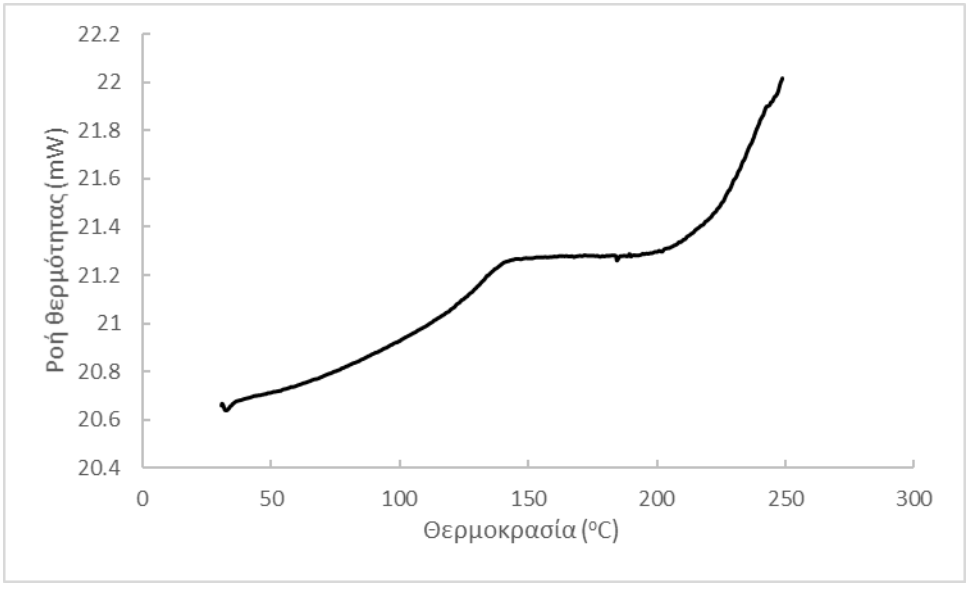
Τεχνική εγκλεισμού	Αριθμός κορυφής	Δείγμα 1		Δείγμα 2	
		Θερμοκρασία(°C)	**ΔΗ(J/g)**	**Θερμοκρασία(°C)**	**ΔΗ(J/g)**
Ξήρανση υπό κατάψυξη	**1η κορυφή**	58.679	0.537	58.259	1.288
	2η κορυφή	93.433	1.166	94.663	1.737
Ηλεκτροστατικός ψεκασμός	**1η κορυφή**	59.092	0.564	59.645	1.118
	2η κορυφή	94.159	1.254	94.916	0.905

Στο διάγραμμα DSC ανιχνεύονται δύο κορυφές που αντιστοιχούν σε δύο ενδόθερμες καμπύλες και φανερώνουν την ύπαρξη δύο φάσεων στην παραγόμενη σκόνη (είτε από το freeze drying είτε από το electrospraying). Οι δύο φάσεις της σκόνης οφείλονται στην ύπαρξη ολιγοφρουκτόζης και πρωτεΐνης ορού γάλακτος, αλλά και στη σύσταση της πρωτεΐνης του ορού, η οποία αποτελείται από μίγμα σφαιρικών πρωτεϊνών.

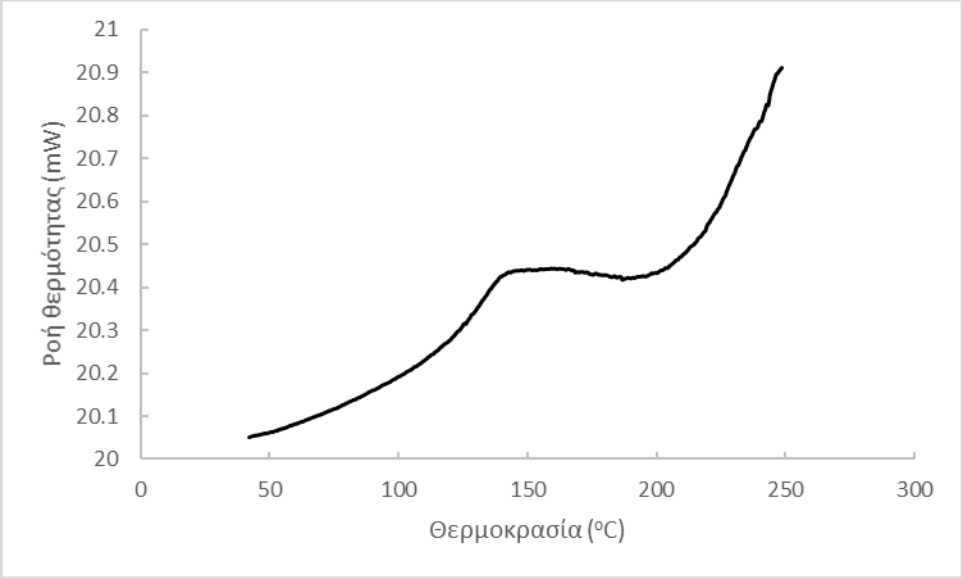
Η παρατήρηση των θερμοκρασιών υαλώδους μετάπτωσης για τα υδρόφιλα μόρια της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και της ολιγοφρουκτόζης απαιτεί την ύπαρξη υψηλού ποσοστού υγρασίας στο δείγμα, γεγονός που αποκλείεται στο συγκεκριμένο πείραμα εξαιτίας της αφυδάτωσης των δειγμάτων μέσω της ξήρανσης υπό κατάψυξη και του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. Επιπλέον, είναι δύσκολο να ανιχνευθεί η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης για τις σφαιρικές πρωτεΐνες, διότι παρουσιάζουν σύνθετη δευτεροταγή (α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα) και τεταρτοταγή δομή, που επιφέρει βαθμιαία αύξηση της θερμοχωρητικότητας κατά τη διάρκεια της υαλώδους μετάπτωσης.



Διάγραμμα 7: Καμπύλες DSC της παραγόμενης σκόνης πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης από την ξήρανση με κατάψυξη κα τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό.



Διάγραμμα 8: Καμπύλη DSC της παραγόμενης σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης από τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό.



Διάγραμμα 9: Καμπύλη DSC της παραγόμενης σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης από τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό.

Από την επεξεργασία των παραπάνω διαγραμμάτων Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) για τα δείγματα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης προκύπτουν δύο θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης για την παραγόμενη από το electrospraying σκόνη ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης. Υπολογίζοντας τον αριθμητικό μέσο των δύο αυτών θερμοκρασιών, προκύπτει η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ίση με 133.423±0.261 °C, στην οποία η σκόνη ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης χάνει την ελαστικότητά της και μεταπίπτει στην υαλώδη κατάσταση.

Πίνακας 18: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης της παραγόμενης από τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης.

	Δείγμα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης 1	Δείγμα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης 2	Αριθμητικός μέσος	Τυπική Απόκλιση	Θερμοκρασία Υαλώδους Μετάπτωσης (T_g)
T_g(°C)	133.607	133.238	133.423	0.261	133.423 ±0.261

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ολοένα αυξανόμενη τάση στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων που εμφανίζουν πολλαπλά οφέλη για την υγεία του καταναλωτή γεννά την ανάγκη να εφαρμοστούν καινοτόμα συστατικά στα τρόφιμα. Τα τρόφιμα ανήκουν στα πλέον ευαίσθητα προϊόντα, με συνέπεια η διάρκεια ζωής τους να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα της επιτυχίας ενός προϊόντος. Ο εγκλεισμός των επιθυμητών θρεπτικών συστατικών των τροφίμων συνιστά σημαντική καινοτομία, καθώς εξασφαλίζει τη διατήρηση της ποιότητας και της βιωσιμότητάς τους. Επιπλέον, συνεισφέρει στη βιοδιαθεσιμότητα και την ελεγχόμενη αποδέσμευση των βιοδραστικών συστατικών στο έντερο, όπου παρουσιάζουν ευεργετική δράση και όχι σε άλλο σημείο του πεπτικού συστήματος (όπως στο στομάχι).

Συνεπώς, οι τεχνικές ενθυλάκωσης ουσιών, όπως ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός κερδίζουν σταδιακά το επιστημονικό ενδιαφέρον. Ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός εμφανίζει πολυάριθμα πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων, καθώς παρουσιάζει αυξημένη αποτελεσματικότητα εγκλεισμού και δεν περιλαμβάνει ακραίες συνθήκες που μπορούν να αλλοιώσουν το τελικό προϊόν.

Οι παράμετροι της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και κυρίως η ροή του διαλύματος, η εφαρμοζόμενη τάση και η απόσταση μεταξύ ακροφυσίου και επιφάνειας συλλογής εξετάστηκαν και αριστοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, διότι καθορίζουν τις σχηματιζόμενες μίκρο- και νάνο-δομές, άρα και τις ιδιότητες του λειτουργικού συστατικού στο τελικό τρόφιμο.

Μεταξύ των διαφόρων λειτουργικών συστατικών που αναδύονται στη βιομηχανία τροφίμων, κυρίαρχη θέση κατέχουν τα προβιοτικά βακτήρια, τα οποία αποτελούν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα στο έντερο του ανθρώπινου οργανισμού και η μείωση του πληθυσμού τους κατηγορείται για πληθώρα προβλημάτων υγείας. Επομένως, η πρόσληψη της απαραίτητης ποσότητας προβιοτικών μέσω της διατροφής συνιστά σημαντική πρόοδο της τεχνολογίας των τροφίμων.

Παρά το γεγονός ότι οι ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες χαρακτηρίζονται ως πολλά υποσχόμενες και καινοτόμες μέθοδοι, απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες και πειράματα για τις συγκεκριμένες διεργασίες, ώστε να αναπτυχθούν πρωτόκολλα που θα καθορίζουν τις εκάστοτε παραμέτρους τους και τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα. Επιπλέον, σημαντική είναι η επέκταση της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού σε λειτουργία υπό στείρες συνθήκες για τον απρόσκοπτο εγκλεισμό ωφέλιμων μικροοργανισμών σε μίκρο- και νάνο-δομές, χωρίς τον κίνδυνο επιμολύνσεων. Η παραγωγικότητα της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και η συλλογή του προϊόντος πρέπει επίσης να βελτιωθούν, με σκοπό την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων του επιθυμητού προϊόντος σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα και την καλύτερη βιομηχανική εφαρμογή της διαδικασίας. Για τους λόγους αυτούς, καθίσταται απαραίτητη η διενέργεια θεωρητικών και πειραματικών μελετών επί της διεργασίας, καθώς και η μαθηματική μοντελοποίησή της.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, διαπιστώθηκε παραγωγικότητα της διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού της τάξης των 0.15 $\frac{g\ \sigma\kappa\acute{o}\nu\eta\varsigma}{h}$ από το διάλυμα πρωτεΐνης ορού

γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και των 0.024 $\frac{g\ σκόνης}{h}$ από το διάλυμα ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης. Οι παραγωγικότητες αυτές χαρακτηρίζονται χαμηλές συγκριτικά με την παραγωγικότητα της διεργασίας της ξήρανσης υπό κατάψυξη. Η απόδοση εγκλεισμού για την ξήρανση υπό κατάψυξη βρέθηκε ίση με 38.7%, ενώ για τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό υπολογίστηκε 86.5%, συνεπώς οι ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες εμφανίζουν αυξημένη αποτελεσματικότητα στον εγκλεισμό, αντισταθμίζοντας έτσι, εν μέρει, τη χαμηλή παραγωγικότητά τους.

Η βιωσιμότητα των ελεύθερων βακτηρίων έπειτα από έκθεση σε διάλυμα προσομοίωσης των οξέων στομάχου βελτιώνεται σημαντικά μέσω της ενθυλάκωσής τους σε μήτρα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης με ηλεκτροστατικό ψεκασμό και με ξήρανση υπό κατάψυξη. Από τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός φαίνεται πως προστατεύει εντονότερα τα βακτήρια και διατηρεί υψηλότερη βιωσιμότητα. Ιδανική μήτρα για τον εγκλεισμό των προβιοτικών αποτελεί η ζεΐνη-ολιγοφρουκτόζη, καθώς, χάρη στον υδρόφοβο χαρακτήρα της ζεΐνης, δε διαλύεται στα οξέα του στομάχου, προστατεύοντας πλήρως τα ενθυλακωμένα βακτήρια.

Η μέθοδος της Φασματομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier απέδειξε ότι τα προβιοτικά βακτήρια εγκλείστηκαν πράγματι στις μήτρες πρωτεΐνης ορού γάλακτος-ολιγοφρουκτόζης και ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης με τις μεθόδους του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης υπό κατάψυξη.

Μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, υπολογίστηκε η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) της σκόνης ζεΐνης-ολιγοφρουκτόζης ίση με 133.423±0.261^oC, στην οποία η σκόνη χάνει την ελαστικότητά της και μεταπίπτει στην υαλώδη κατάσταση.

Δεδομένου ότι η ημερήσια πρόσληψη 10^8-10^9 προβιοτικών μικροοργανισμών είναι απαραίτητη, για να επωφεληθεί ο ανθρώπινος οργανισμός και η επιτυγχανόμενη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων βακτηρίων έπειτα από την πάροδο μέσω του στομάχου είναι περίπου ίση με 10^8 $\frac{CFU}{g}$, θα πρέπει να περιέχεται στο τελικό γαλακτοκομικό προϊόν (π.χ. γιαούρτι 200 g) $\frac{10^8 CFU}{10^8 \frac{CFU}{g}} = 1\ g$ καθαρών βακτηρίων. Η συνήθης μέση τιμή/κιλό του απλού συσκευασμένου στραγγιστού γιαουρτιού είναι 5.7 $\frac{€}{kg}$, ενώ η τιμή/κιλό ενός συσκευασμένου στραγγιστού γιαουρτιού με περιεχόμενα προβιοτικά είναι 6.3 $\frac{€}{kg}$, δηλαδή η παρουσία προβιοτικών στελεχών στο τελικό γαλακτοκομικό προϊόν αυξάνει την τελική τιμή κατά $\frac{6.3-5.7}{6.3} \cdot 100\% = 0.095 \cdot 100\% \approx 10\%$. Σκόπιμη είναι η διενέργεια τεχνικοοικονομικής μελέτης για το προϊόν γιαούρτης με εγκλεισμένα προβιοτικά, στο άμεσο μέλλον, ώστε να διαπιστωθεί η αντίστοιχη αύξηση της τιμής του. Η αύξηση τιμής στο γιαούρτι με εγκλεισμένα προβιοτικά συγκριτικά με το εμπορικά διαθέσιμο γιαούρτι με προβιοτικά θα οφείλεται μεταξύ άλλων στο επιπλέον κόστος εξοπλισμού και λειτουργίας για τις βιομηχανίες που θα αναλάβουν την παραγωγή του.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] FAO / WHO, “Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria,” *Expert Consult. report, Córdoba, Argentina*, 2001.

[2] N. Turkmen, C. Akal, and B. Özer, “Probiotic dairy-based beverages: A review,” *J. Funct. Foods*, 2019.

[3] J. Gu and K. Roberts, “Chapter 6 - Probiotics and Prebiotics,” M. L. Corrigan, K. Roberts, and E. B. T.-A. S. B. S. Steiger, Eds. Academic Press, 2019, pp. 67–80.

[4] R. Valcheva and L. A. Dieleman, “Prebiotics: Definition and protective mechanisms,” *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 2016.

[5] R. George Kerry, J. K. Patra, S. Gouda, Y. Park, H. S. Shin, and G. Das, “Benefaction of probiotics for human health: A review,” *Journal of Food and Drug Analysis*. 2018.

[6] S. Rathore, I. Salmerón, and S. S. Pandiella, “Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures,” *Food Microbiol.*, 2012.

[7] M. K. Tripathi and S. K. Giri, “Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage,” *Journal of Functional Foods*. 2014.

[8] C. Stanton, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and D. Van Sinderen, “Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites,” *Current Opinion in Biotechnology*. 2005.

[9] B. A. Mizock, “Probiotics,” *Disease-a-Month*, vol. 61, no. 7, pp. 259–290, 2015.

[10] B. Senghor, C. Sokhna, R. Ruimy, and J. C. Lagier, “Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance,” *Human Microbiome Journal*. 2018.

[11] M. Bigret and A. Mäyrä-Mäkinen, “Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria,” in *Lactic Acid Bacteria*, 2010.

[12] Α. Κουρελής, “Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός ζυμών με πιθανές προβιοτικές ιδιότητες και προσδιορισμός της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης in vivo,” 2009.

[13] C. Davis, “Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria,” *Journal of Microbiological Methods*. 2014.

[14] J. Gorsuch, D. LeSaint, J. VanderKelen, D. Buckman, and C. L. Kitts, “A comparison of methods for enumerating bacteria in direct fed microbials for animal feed,” *J. Microbiol. Methods*, 2019.

[15] G. V. de Melo Pereira, B. de Oliveira Coelho, A. I. Magalhães Júnior, V. Thomaz-Soccol, and C. R. Soccol, “How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria,” *Biotechnology Advances*. 2018.

[16] J. Burgain, M. Corgneau, J. Scher, and C. Gaiani, “Chapter 20 - Encapsulation of Probiotics

in Milk Protein Microcapsules," L. M. C. B. T.-M. and M. for F. A. Sagis, Ed. San Diego: Academic Press, 2015, pp. 391–406.

[17] B. Ghorani and N. Tucker, "Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology," *Food Hydrocolloids*. 2015.

[18] L. T. Lim, "Encapsulation of bioactive compounds using electrospinning and electrospraying technologies," in *Nanotechnology and Functional Foods: Effective Delivery of Bioactive Ingredients*, 2015.

[19] R. F. Stefanello *et al.*, "Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production," *LWT - Food Sci. Technol.*, 2018.

[20] H. Sabarez, "Drying of Food Materials," in *Reference Module in Food Science*, 2016.

[21] M. Bjelošević, K. B. Seljak, U. Trstenjak, M. Logar, B. Brus, and P. Ahlin Grabnar, "Aggressive conditions during primary drying as a contemporary approach to optimise freeze-drying cycles of biopharmaceuticals," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2018.

[22] L. Gasperini, J. F. Mano, and R. L. Reis, "Natural polymers for the microencapsulation of cells," *Journal of the Royal Society Interface*. 2014.

[23] M. R. Kasaai, "Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review," *Trends in Food Science and Technology*. 2018.

[24] X. Jiang, Y. Zhu, W. Zhang, C. Guang, T. Zhang, and W. Mu, "Efficient production of inulooligosaccharides from inulin by endoinulinase from Aspergillus arachidicola," *Carbohydr. Polym.*, 2019.

[25] J. M. Campbell, L. L. Bauer, G. C. Fahey, A. J. C. L. Hogarth, B. W. Wolf, and D. E. Hunter, "Selected Fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1 ^{F} -β-Fructofuranosylnystose) Composition of Foods and Feeds," *J. Agric. Food Chem.*, 1997.

[26] P. Nicolás, M. L. Ferreira, and V. Lassalle, "A review of magnetic separation of whey proteins and potential application to whey proteins recovery, isolation and utilization," *Journal of Food Engineering*. 2019.

[27] K. T.Ž., O. N.S., and R. M.B., "Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture," *Food Chem.*, 2019.

[28] R. C. Mackenzie, *Differential Thermal Analysis: Applications*. Academic Press, 1972.

[29] W. M. GROENEWOUD, "CHAPTER 1 - DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY," W. M. B. T.-C. of P. by T. A. GROENEWOUD, Ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2001, pp. 10–60.

[30] W. Woishnis and S. Ebnesajjad, *Chemical Resistance of Thermoplastics*. 2012.

[31] L. E. Amand and C. J. Tullin, "The Theory Behind FTIR analysis," 1999.

[32] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition*.

Taylor & Francis, 2011.