



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

Διπλωματική εργασία

*Βελτιστοποίηση καινοτόμων και συμβατικών μεθόδων
εγκλεισμού των γλυκοζιτών της Stevia*

Άρτεμις Πλακίδα

Επιβλέπων: Μαγδαληνή Κροκίδα, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, Ιούλιος 2019

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Βελτιστοποίηση καινοτόμων και συμβατικών μεθόδων εγκλεισμού των γλυκοζιτών της *Stevia*» εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019 στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων εγκλεισμού των γλυκοζιτών στεβιόλης, δηλαδή των βασικών συστατικών του γλυκαντικού που προέρχεται από το φυτό *Stevia*, με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας του και την εξουδετέρωση της πικρής και μεταλλικής του επίγευσης. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η μέθοδος της ξήρανσης με ψεκασμό, αλλά και η καινοτόμος μέθοδος του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. Τα σωματίδια που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, υποβλήθηκαν σε πειράματα ενόργανης χημικής ανάλυσης προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο εγκλεισμός, να υπολογιστεί το ποσοστό της απόδοσης εγκλεισμού, αλλά και να επιλεγούν οι βέλτιστες συνθήκες εγκλεισμού για κάθε μέθοδο.

Για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά, την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Μαγδαληνή Κροκίδα, για την άψογη συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα Βασιλική Οικονομοπούλου και τις υποψήφιες Διδάκτορες Χριστίνα Δρόσου και Μαργαρίτα Παναγιωτοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια τους και τις γνώσεις που μου μετέδωσαν. Η βοήθεια τους ήταν καθοριστικής σημασίας σε όλα τα στάδια της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανάλυσης και Σχεδιασμού Διεργασιών, για την προθυμία τους να βοηθήσουν σε οποιοδήποτε πρόβλημα παρουσιαζόταν, αλλά και για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου, που με την αγάπη τους, την κατανόησή και την στήριξη τους, με βοήθησαν να ξεπερνάω όλες τις δυσκολίες και να ολοκληρώσω τον κύκλο των σπουδών μου.

Αθήνα, 2019

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα εναλλακτικά γλυκαντικά, γλυκαντικά δηλαδή που προσφέρουν γλυκιά γεύση, με πολύ λιγότερες θερμίδες όμως από την γνωστή σε όλους ζάχαρη (σακχαρόζη). Ένα πολλά υποσχόμενο εναλλακτικό γλυκαντικό, είναι το γλυκαντικό που προέρχεται από το φυτό *Stevia*. Με καταγωγή από την Παραγουάη, η *Stevia (Stevia Rebaudiana)* χρησιμοποιείται εδώ και εκατοντάδες χρόνια στην Νότια Αμερική, ενώ πρόσφατα έγινε γνωστή σε Ασία και ΗΠΑ ως το φυσικό γλυκαντικό με μηδενικές θερμίδες. Τα γλυκά συστατικά της *Stevia*, ονομάζονται γλυκοζίτες στεβιόλης και είναι απόλυτα ασφαλή, καθώς πρόσφατα εγκρίθηκαν και από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Χαρακτηρίζονται όμως από πικρή και μεταλλική επίγευση, γεγονός που δρα ως ανασταλτικός παράγοντας για την ευρεία χρήση του γλυκαντικού.

Κατά την παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε προσπάθεια να βελτιωθεί η ποιότητα του γλυκαντικού *Stevia*, να περιοριστεί δηλαδή η δυσάρεστη επίγευση των συστατικών του. Για το λόγο αυτό, εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι εγκλεισμού, η ξήρανση με ψεκασμό και ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός. Ως μήτρες, χρησιμοποιήθηκαν μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης σε αναλογία 50:50, σε συγκεντρώσεις 5 και 10% , όσον αφορά στην ξήρανση και ψεκασμό και ζεΐνη, σε συγκεντρώσεις 10 και 15%, όσον αφορά στον ηλεκτροστατικό ψεκασμό. Οι παράμετροι λειτουργίας που μελετήθηκαν κατά την ξήρανση με ψεκασμό ήταν η ροή (600, 800, 1000 mL/h) και η θερμοκρασία (160, 170, 180°C). Οι παράμετροι λειτουργίας που μελετήθηκαν κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό ήταν η ροή (200, 300, 400 μL/h) και η απόσταση της βελόνας του οργάνου από τον συλλέκτη (8, 10, 12 cm). Στην συνέχεια, τα εγκλεισμένα σωματίδια που προέκυψαν αναλύθηκαν με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης, φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ώστε να επιβεβαιωθεί ο εγκλεισμός αλλά και να υπολογιστεί το ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού.

Το ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού υπολογίστηκε έμμεσα, με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης ως μήτρα, οδήγησε σε ικανοποιητικό εγκλεισμό καθώς το βέλτιστο ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού ήταν 75,87% για ροή 1000 mL/h, θερμοκρασία 160°C και συγκέντρωση μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης 5%. Η ζεΐνη αντιθέτως, δεν φάνηκε να δρα ικανοποιητικά ως μήτρα για τους γλυκοζίτες στεβιόλης, καθώς το μέγιστο ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού ήταν 38,86% για ροή 300 μL/h, απόσταση της βελόνας από τον συλλέκτη 12 cm και συγκέντρωση ζεΐνης 15%. Παρόλα αυτά, ως υδρόφοβο μόριο, μπορεί να εφαρμοστεί για την ενσωμάτωση της *Stevia* σε υδατοδιαλυτά προϊόντα.

Όσον αφορά στον ηλεκτροστατικό ψεκασμό, τα αποτελέσματα της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, έδειξαν ότι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) των εγκλεισμένων σωματιδίων δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες λειτουργίας του οργάνου, αλλά μόνο από την συγκέντρωση της ζεΐνης. Συγκεκριμένα, το T_g της καθαρής ζεΐνης ήταν 139°C, ενώ των εγκλεισμένων σωματιδίων ήταν 133 και 137°C, για συγκέντρωση ζεΐνης 10 και 15%

αντίστοιχα. Όσον αφορά στην ξήρανση με ψεκασμό, παρατηρήθηκε ότι αύξηση της συγκέντρωσης του μίγματος μαλτοδεξτρίνη-ινουλίνη στο πολυμερικό διάλυμα, οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης και άρα σε πιο ανθεκτικές δομές, λόγω της αύξησης των άμορφων περιοχών του τελικού συστήματος. Επίσης παρατηρήθηκε ότι αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης, λόγω του μειωμένου ποσοστού υγρασίας του τελικού συστήματος.

Η ανάλυση της φασματοσκοπίας υπερύθρου, έδειξε και στις δύο περιπτώσεις, ότι οι χαρακτηριστικές κορυφές μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης, της ζεΐνης και της *Stevia*, έμειναν αναλλοίωτες στα φάσματα των εγκλεισμένων σωματιδίων, γεγονός που σημαίνει ότι το ενεργό συστατικό δεν ανέπτυξε χημικούς δεσμούς με τη μήτρα κι άρα ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε επιτυχώς.

Γενικά, οι δύο μήτρες ήταν αρκετά ικανοποιητικές καθώς ο εγκλεισμός ήταν επιτυχής και στις δύο περιπτώσεις. Με αυτόν τον τρόπο, έγινε προσπάθεια κάλυψης της πικρής επίγευσης της *Stevia* με τελικό στόχο την εισαγωγή της σε καινοτόμα προϊόντα.

Abstract

In recent years, there has been an increasing interest in alternative sweeteners, compounds that offer a sweet taste, with much less calories than all-known sugar (sucrose). A promising alternative sweetener is the sweetener from the plant *Stevia*. Originally from Paraguay, *Stevia* (*Stevia Rebaudiana*) has been used for hundreds of years in South America, and has recently been known in Asia and USA as a natural calorie-free sweetener. *Stevia*'s sweet ingredients are called steviol glucosides and are absolutely safe as they have recently been approved by the European Union. They are characterized though, by bitter and metallic aftertaste, which acts as inhibitory agent for the widespread use of the sweetener.

In this diploma thesis, an attempt has been made to improve the quality of the *Stevia* sweetener, in order to limit the unpleasant aftertaste of its ingredients. For this reason, two encapsulation methods, spray drying and electrohydrodynamic method (electrospraying) were applied. As a matrix, a 50:50 mixture of maltodextrin-inulin at concentrations of 5 and 10% for spray drying and zein at concentrations of 10 and 15% for electrospraying were used. The operating parameters studied during spray drying were the flow rate (600, 800, 1000 mL/h) and temperature (160, 170, 180°C). The operating parameters studied during electrospraying were the flow rate (200, 300, 400 µL/h) and distance of the needle from the collector (8, 10, 12 cm). Subsequently, the encapsulated particles were analyzed by differential scanning calorimetry, FTIR and high performance liquid chromatography to confirm encapsulation, to calculate the encapsulation efficiency and to select the optimum conditions for each different method.

The encapsulation efficiency was calculated indirectly by the high performance liquid chromatography method. The results showed that the maltodextrin-inulin mixture as a matrix resulted in satisfactory encapsulation as the optimal encapsulation efficiency was 75.87% for a flow rate of 1000 mL/h, a temperature of 160°C and a 5% maltodextrin-inulin concentration. Zein, on the other hand, did not appear to function satisfactorily as a matrix for steviol glycosides, as optimum encapsulation efficiency was 38.86% for a flow rate of 300 µL/h, a needle distance from the collector 12 cm and a zein concentration of 15%. However, as a hydrophobic molecule, it can be applied to incorporate *Stevia* into water-soluble products.

Regarding electrospraying, the results of differential scanning calorimetry showed that the glass transition temperature (T_g) of the encapsulated particles is not affected by the operating conditions, but only by the concentration of zein. Specifically, T_g of pure zein was 139 °C, while the encapsulated particles were 133 and 137 °C, for zein concentration 10 and 15%, respectively. With regard to spray drying, it is observed that increasing the concentration of the maltodextrin-inulin mixture in the polymer solution leads to an increase of glass transition temperature and hence to more resistant structures due to the increase of the amorphous regions of the final system.

Infrared spectroscopy analysis showed, in both cases, that the characteristic peaks of maltodextrin-inulin, zein and *Stevia* remained unchanged in the spectra of the encapsulated

particles, meaning that the active ingredient did not develop chemical bonds with the matrix and thus the encapsulation process was successful.

Generally, both matrices were quite satisfactory as the encapsulation was successful in both. In this way, an attempt was made to cover Stevia's bitter taste with the ultimate goal of introducing it into innovative products.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος	3
Περίληψη	5
Abstract	7
Περιεχόμενα πινάκων	11
Περιεχόμενα εικόνων	13
Περιεχόμενα γραφημάτων	15
Θεωρητικό μέρος	17
1.1 Εισαγωγή	17
1.2 Γλυκαντικά	17
1.2.1 Αίσθηση της γεύσης	17
1.2.2 Γλυκύτητα	18
1.2.3 Μέτρηση γλυκύτητας	18
1.2.3.1 Γλυκαιμικός δείκτης	18
1.2.3.2 Γλυκαιμικό φορτίο	18
1.2.4 Συμβατικά γλυκαντικά	18
1.2.5 Εναλλακτικά γλυκαντικά	19
1.3 Stevia	22
1.3.1 Ιστορία της Stevia	22
1.3.2 Βοτανική περιγραφή	23
1.3.3 Καλλιέργεια	24
1.3.4 Χημική σύσταση	25
1.3.5 Γλυκοζίτες στεβιόλης	26
1.3.5.1 Σύνθεση στεβιόλης	26
1.3.5.2 Σύνθεση γλυκοζιτών	27
1.3.6 Απομόνωση γλυκοζιτών	30
1.3.7 Φυσικές ιδιότητες	30
1.3.8 Βιολογικές ιδιότητες	31
1.3.9 Μορφές της Stevia	31
1.3.10 Χρήσεις	32
1.3.11 Πικρή επίγευση	33
1.4 Εγκλεισμός	33
1.4.1 Βασικές αρχές	33
1.4.2 Υλικά που χρησιμοποιούνται ως μήτρες κατά τον εγκλεισμό	34
• Ζεΐνη	35
1.4.3 Μέθοδοι εγκλεισμού	35
1.4.4 Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία	38
1.4.4.1 Διάταξη και βασικές αρχές	38

1.4.4.2	Παράμετροι της διεργασίας	39
1.4.4.3	Πλεονεκτήματα της μεθόδου	39
1.4.4.4	Εφαρμογές	39
1.4.5	Ξήρανση με ψεκασμό	40
1.4.5.1	Αρχή της μεθόδου	40
1.4.5.2	Παράμετροι της διεργασίας	42
1.4.5.3	Πλεονεκτήματα της μεθόδου	43
1.4.5.4	Εφαρμογές	43
2	Πειραματικό μέρος	45
2.1	Πειραματικός εξοπλισμός	45
2.1.1	Συσκευές	45
2.1.2	Αντιδραστήρια	45
2.2	Πειραματική διαδικασία	46
2.2.1	Εγκλεισμός	46
2.2.1.1	Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία	46
	Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι οι εξής:	48
2.2.1.2	Ξήρανση με ψεκασμό	48
2.3	Μελέτη των ανεπτυγμένων εγκλεισμένων δομών	50
2.3.1	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)	50
2.3.1.1	Βασικές αρχές	50
2.3.1.2	Συσκευή FTIR	51
2.3.1.3	Αποτελέσματα FTIR	51
2.3.1.4	Μεθοδολογία	51
2.3.2	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC)	52
2.3.2.1	Βασικές αρχές-Λειτουργία συσκευής	52
2.3.2.2	Αποτελέσματα DSC	52
2.3.2.3	Μεθοδολογία	53
2.3.3	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	54
2.3.3.1	Βασικές αρχές χρωματογραφίας	54
2.3.3.2	Οργανολογία HPLC	55
2.3.3.3	Αποτελέσματα HPLC	55
2.3.3.4	Μεθοδολογία	56
3	Αποτελέσματα	57
3.1	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης	57
3.2	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier	61
3.3	Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού, (EE%)	66
4	Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι	71
5	Βιβλιογραφία	73
6	Παράρτημα	79

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1-1: Σχετική γλυκύτητα, γλυκαιμικός δείκτης και θερμιδικό φορτίο των κυριότερων θερμιδικών γλυκαντικών.....	21
Πίνακας 1-2: Σχετική γλυκύτητα, γλυκαιμικός δείκτης και θερμιδικό φορτίο των κυριότερων μη θερμιδικών γλυκαντικών.....	21
Πίνακας 1-3: Βοτανική κατάταξη του φυτού <i>Stevia</i> (21).....	23
Πίνακας 1-4: Σύσταση θρεπτικών συστατικών στα φύλλα <i>Stevia</i> (30).....	26
Πίνακας 1-5: Σύσταση μεταλλικών στοιχείων στα φύλλα <i>Stevia</i> (25)	26
Πίνακας 1-6: Σύσταση βιταμινών στα φύλλα <i>Stevia</i> (25).....	26
Πίνακας 1-7: Η χημική δομή των γλυκοζιτών στεβιόλης (32)	28
Πίνακας 2-1: Συνθήκες λειτουργίας κατά την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία	48
Πίνακας 2-3: Κωδικοποίηση δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού	48
Πίνακας 2-3: Συνθήκες λειτουργίας κατά την ξήρανση με ψεκασμό.....	49
Πίνακας 2-4: Κωδικοποίηση δειγμάτων ξήρανσης με ψεκασμό.....	50
Πίνακας 3-1: T_g δειγμάτων συγκέντρωσης 10% σε ζείνη.....	58
Πίνακας 3-2: T_g δειγμάτων συγκέντρωσης 15% σε ζείνη.....	59
Πίνακας 3-4: Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού	68
Πίνακας 3-3: Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού δειγμάτων ξήρανσης με ψεκασμό.....	69

Περιεχόμενα εικόνων

<i>Εικόνα 1-1: Άνθη του φυτού Stevia Rebaudiana</i>	23
<i>Εικόνα 1-2: Φύλλα του φυτού Stevia Rebaudiana</i>	23
<i>Εικόνα 1-3: Καλλιέργειες Stevia Rebaudiana</i>	24
<i>Εικόνα 1-4: Τα στάδια βιοσύνθεσης της στεβιόλης και των γλυκοζιτών της (16)</i>	29
<i>Εικόνα 1-5: Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία (40)</i>	40
<i>Εικόνα 1-6: Διεργασία της ξήρανσης με ψεκασμό (40)</i>	44
<i>Εικόνα 2-1: Συσκευή Ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας- FLUIDNATEK LE-10, Bioinicia</i>	46
<i>Εικόνα 2-2: Κώνος Taylor</i>	47
<i>Εικόνα 2-3: Προϊόν ηλεκτροστατικού ψεκασμού πολυμερικού διαλύματος ζεΐνης-Stevia</i>	47
<i>Εικόνα 2-4: Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (PerkinElmerDSC 6)</i>	54
<i>Εικόνα 2-5: Διάταξη HPLC Shimadzu HP 1100 Series (USA)</i>	56

Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 3-1: Δεύτερος κύκλος DSC για δείγματα 10% ζεΐνη	57
Γράφημα 3-2: Δεύτερος κύκλος DSC για δείγματα συγκέντρωσης 15% ζεΐνη.	58
Γράφημα 3-3: Αριστερά: απεικόνιση θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της απόστασης της βελόνας από το συλλέκτη για σταθερή ροή 300 μL/h, Δεξιά: : απεικόνιση θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της ροής για σταθερή απόσταση της βελόνας από το συλλέκτη 10 cm	59
Γράφημα 3-4: Απεικόνιση της επίδρασης της συγκέντρωσης της ζεΐνης στην θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης	60
Γράφημα 3-5: απεικόνιση θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της ροής για τους 170 και 180 °C.....	60
Γράφημα 3-6: Ανάλυση FTIR για το δείγμα E000, τη Stevia και τη ζεΐνη	62
Γράφημα 3-7: Ανάλυση FTIR για το δείγμα E001, τη Stevia και τη ζεΐνη	63
Γράφημα 3-8: Ανάλυση FTIR για το δείγμα S000, τη Stevia και το μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης.....	64
Γράφημα 3-9: Ανάλυση FTIR για το δείγμα S000, τη Stevia και το μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης.....	65
Γράφημα 3-10: Καμπύλη αναφοράς Stevia για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1000 ppm	66
Γράφημα 3-11: Καμπύλη αναφοράς Stevia για συγκεντρώσεις μικρότερες των 1000 ppm	67
Γράφημα 3-12: Αριστερά: απεικόνιση ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της απόστασης της βελόνας από το συλλέκτη δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού για σταθερή ροή 300 μL/h. Δεξιά: απεικόνιση ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της ροής δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού για σταθερή απόσταση 10 cm	68
Γράφημα 3-13:Αριστερά: απεικόνιση του ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας για σταθερή ροή 800 mL/h δειγμάτων ξήρανσης με ψεκασμό, Δεξιά: απεικόνιση του ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της ροής για σταθερή θερμοκρασία 170 °C δειγμάτων ξήρανσης με ψεκασμό.....	70
Γράφημα6-1: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-1-10.....	79
Γράφημα6-2: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-100.....	79
Γράφημα6-3: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-110.....	80
Γράφημα6-4: FTIR ανάλυση για το δείγμα E0-10.....	80
Γράφημα6-5: FTIR ανάλυση για το δείγμα E010	81
Γράφημα6-6: FTIR ανάλυση για το δείγμα E1-10.....	81
Γράφημα6-7: FTIR ανάλυση για το δείγμα E110	82
Γράφημα6-8: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-1-11.....	82
Γράφημα6-9: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-111.....	83
Γράφημα6-10: FTIR ανάλυση για το δείγμα E0-11.....	83
Γράφημα6-11: FTIR ανάλυση για το δείγμα E011	84
Γράφημα6-12: FTIR ανάλυση για το δείγμα E101	84
Γράφημα6-13: FTIR ανάλυση για το δείγμα S0-10.....	85
Γράφημα6-14: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-100.....	85

<i>Γράφημα6-15: FTIR ανάλυση για το δείγμα S100</i>	86
<i>Γράφημα6-16: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-110</i>	86
<i>Γράφημα6-17: FTIR ανάλυση για το δείγμα S1-11</i>	87
<i>Γράφημα6-18: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-101</i>	87
<i>Γράφημα6-19: FTIR ανάλυση για το δείγμα S101</i>	88
<i>Γράφημα6-20: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-111</i>	88
<i>Γράφημα6-21: FTIR ανάλυση για το δείγμα S111</i>	89

Θεωρητικό μέρος

1.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία ζαχαροπλαστικής υφίσταται σημαντικές αλλαγές εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης σε υγιεινά προϊόντα (1). Η ζάχαρη που χρησιμοποιείται συχνά στη ζαχαροπλαστική έχει υψηλή θερμιδική αξία (394 kcal/100 g) (2). Για το λόγο αυτό οι καταναλωτές επιθυμούν προϊόντα που περιέχουν μικρή ή καθόλου ποσότητα ζάχαρης ή υποκατάστατα ζάχαρης με λιγότερες θερμίδες. Γλυκαντικές ουσίες χαμηλές σε θερμίδες, ως υποκατάστατα της ζάχαρης, είναι διαθέσιμες στην αγορά (3), παρέχοντας τη γλυκιά γεύση σε τρόφιμα και ποτά, με την προσθήκη λίγων ή μηδενικών θερμίδων (2).

1.2 Γλυκαντικά

1.2.1 Αίσθηση της γεύσης

Η γεύση είναι μία από τις πέντε αισθήσεις του ανθρώπου. Διακρίνεται σε πέντε κύριες γευστικές ποιότητες: το γλυκό, το ξινό, το πικρό, το αλμυρό και το umami. Η διακριτική αυτή δύναμη της γεύσης είναι καθοριστικής σημασίας καθώς παρέχει στον άνθρωπο πολύτιμες πληροφορίες για την ποιότητα των τροφών προκαλώντας αντανάκλαστικές αντιδράσεις αποστροφής ή έλξης προς συγκεκριμένα είδη τροφής (1). Η γλυκιά γεύση επιτρέπει την αναγνώριση τροφών πλούσιων σε θρεπτικά συστατικά, το umami επιτρέπει την αναγνώριση αμινοξέων, η αλμυρή γεύση εξασφαλίζει τη σωστή ισορροπία ηλεκτρολυτών στην διατροφή, ενώ η ξινή και η πικρή γεύση προειδοποιούν για την πρόσληψη δυνητικά επιβλαβών ή και δηλητηριωδών χημικών ουσιών (2).

Η αίσθηση του αλμυρού προκαλείται από ιόντα Na^+ , Li^+ , NH_4^+ και από το KCl . Ο μοριακός της μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, ενώ υποψήφιοι είναι οι επιθηλιακοί διάλυοι Na^+ , ENaC , και ο μη ειδικός κατιονικός διάλυλος TRPV1. Η αίσθηση του ξινού προκαλείται από οξέα και αποσκοπεί στο να προληφθούν ιστικές βλάβες και διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας. Πιθανοί υποδοχείς θεωρούνται οι ιοντικοί διάλυοι TRP (Transient Receptor Potential) και ειδικότερα οι PKD1L3 (Polycystic Kidney Disease 1-Like 3) και PKD2L1, που ανήκουν στην υποοικογένεια PKDL. Οι υποδοχείς του umami (ή γεύση του γλουταμινικού μονοατρίου), όπως και οι υποδοχείς του γλυκού και του πικρού ανήκουν στην κατηγορία των συζευγμένων με την πρωτεΐνη G υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικές έλικες. Βασικός υποδοχέας του umami θεωρείται το ετεροδιμερές σύμπλεγμα T1R1+T1R3. Ο υποδοχέας του γλυκού είναι ετεροδιμερές σύμπλεγμα των T1R2+T1R3 υποδοχέων που θα αναλυθεί λεπτομερέστερα παρακάτω (4).

1.2.2 Γλυκύτητα

Η γλυκιά γεύση προκαλείται από υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (100-500 mM), από τεχνητά γλυκαντικά και από έναν μικρό αριθμό πρωτεϊνών γλυκιάς γεύσης. Η απόκριση του οργανισμού στην γεύση αυτή, πραγματοποιείται από ετερόλογα κύτταρα με την ταυτόχρονη έκφραση των T1R2 και T1R3, το ετεροδιμερές σύμπλεγμα των οποίων αποτελεί των γευστικό υποδοχέα γλυκύτητας. Οι T1Rs αποτελούν την κατηγορία C των GCPRs. Διαφορετικά γλυκαντικά στοχεύουν σε διαφορετικούς τομείς ή διαφορετικές ομάδες των T1R2/T1R3 υποδοχέων (5).

1.2.3 Μέτρηση γλυκύτητας

1.2.3.1 Γλυκαιμικός δείκτης

Ο γλυκαιμικός δείκτης ποσοτικοποιεί την επίδραση διαφόρων τροφίμων υδατανθράκων στην συγκέντρωση της ινσουλίνης και της γλυκόζης στο αίμα (6). Συγκρίνει δηλαδή ίσες ποσότητες υδατανθράκων και παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποιότητά τους (7). Ο γλυκαιμικός δείκτης των τροφίμων επηρεάζεται από την επεξεργασία τους, την ωρίμανσή τους και τον χρόνο μαγειρέματος. Η κλίμακα ταξινόμησης κυμαίνεται από 1 έως 100 και συγκεκριμένα, ο γλυκαιμικός δείκτης μπορεί να χαρακτηριστεί:

Χαμηλός: < 55

Μέτριος: 56-59

Υψηλός >70

Ανώτατη τιμή: 100 (γλυκόζη)

1.2.3.2 Γλυκαιμικό φορτίο

Το 1997, η ιδέα του γλυκαιμικού φορτίου εισήχθη από τους ερευνητές του Πανεπιστημίου του Χάρβαρντ με σκοπό την ποσοτικοποίηση του συνολικού γλυκαιμικού αποτελέσματος μίας ποσότητας τροφής. Όσο μεγαλύτερο είναι το γλυκαιμικό φορτίο, τόσο μεγαλύτερη είναι η αναμενόμενη ανύψωση της γλυκόζης στο αίμα αλλά και η ινσουλινογόνος επίδραση του τροφίμου. Το γλυκαιμικό φορτίο, υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το ποσό των υδατανθράκων που περιέχονται σε μία συγκεκριμένη ποσότητα με την τιμή του γλυκαιμικού δείκτη του τροφίμου αυτού διαιρούμενη με το 100 (7).

1.2.4 Συμβατικά γλυκαντικά

Η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη είναι οι κύριοι μονοσακχαρίτες γλυκιάς γεύσης που εμφανίζονται στα τρόφιμα και τα ποτά. Τα σάκχαρα αυτά, μπορούν να συνδυαστούν χημικά και να συνθέσουν φυσικούς δισακχαρίτες όπως η σακχαρόζη (φρουκτόζη και γλυκόζη),

η λακτόζη (γλυκόζη και γαλακτόζη) και η μαλτόζη (γλυκόζη και γλυκόζη). Τα σάκχαρα αυτά, αποτελούν επίσης δομικά μέρη διάφορων ολιγοσακχαριτών και πολυσακχαριτών όπως το άμυλο, οι μαλτοδεξτρίνες και οι φρουκτάνες. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν τα κύρια συστατικά της “επιτραπέζιας σακχαρόζης” η οποία αποτελεί σήμερα το πλέον κοινό γλυκαντικό. Τα θρεπτικά γλυκαντικά, υδρολύονται σε επιμέρους μονοσακχαρίτες στο λεπτό έντερο και στη συνέχεια, υπό-απορροφούνται και μεταβολίζονται παρέχοντας θερμίδες στον οργανισμό. Τα περισσότερα σάκχαρα θεωρείται ότι παρέχουν 4 kcal/g. Οι λεπτές μεταβολές όμως στη χημική δομή των διαφορετικών ενώσεων σακχάρου, επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο αφομοιώνονται, απορροφώνται και μεταβολίζονται από τον οργανισμό.

Οι πολυόλες δηλαδή οι αλκοόλες σακχάρων είναι παράγωγα σακχαριτών που προκύπτουν από την αντικατάσταση μιας ομάδας αλδεΐδης με μία ομάδα υδροξυλίου (8). Περιέχονται φυσικά σε φρούτα, λαχανικά και μερικώς ζυμωμένα τρόφιμα και μπορούν να παρασκευαστούν χημικά με υδρογόνωση των μονοσακχαριτών και των δισακχαριτών. Σε αντίθεση με τα σάκχαρα, οι πολυόλες (ξυλιτόλη, μαλιτόλη, σορβιτόλη), απορροφώνται ελάχιστα και άρα παρέχουν λιγότερες θερμίδες και χαμηλότερες γλυκαντικές αποκρίσεις. Τα χαρακτηριστικά αυτά, τις καθιστούν δημοφιλείς για χρήση ως γλυκαντικά σε διαιτητικά τρόφιμα και ποτά. Επίσης, οι περισσότερες πολυόλες δεν ζυμώνονται από τα στοματικά βακτήρια και δεν προκαλούν την εμφάνιση τερηδόνας. Όμως, η ποσότητα των πολυολών που πρέπει να καταναλώνεται είναι περιορισμένη καθώς η κακή τους γαστρεντερική ανοχή προκαλεί καθίζηση όταν καταναλώνονται σε υψηλές δόσεις (δηλαδή δόσεις μεγαλύτερες των 20-60 g/γεύμα) (9).

Σε μεγαλύτερο βαθμό τα σάκχαρα και σε μικρότερο βαθμό οι πολυόλες, αποτελούν τα κύρια συστατικά των παραδοσιακών γλυκαντικών. Τα παραδοσιακά γλυκαντικά προέρχονται από τις μέλισσες (μέλι), τα φυτά και το σφρίγος των δέντρων (σιρόπι σφενδάμου, νέκταρ αγάης), τα φρούτα (σιρόπι χαρουπιού), τους σπόρους, τις ρίζες και τα φύλλα. Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνταν ευρέως ως γλυκαντικά σε πολλές χώρες προσφέροντας φυσικές και εύκολα διαθέσιμες πηγές γλυκύτητας. Σε αντίθεση με τα επεξεργασμένα γλυκαντικά, καταναλώνονται στη φυσική τους μορφή, έχοντας υποστεί μία μικρή προ-επεξεργασία (9).

1.2.5 Εναλλακτικά γλυκαντικά

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον προς τα εναλλακτικά γλυκαντικά, ουσίες δηλαδή οι οποίες μπορούν να αντικαταστήσουν τη ζάχαρη έχοντας πολύ μικρότερο θερμιδικό φορτίο. Ως εκ τούτου, τα εναλλακτικά γλυκαντικά ονομάζονται και υποκατάστατα ζάχαρης. Οι καταναλωτές συχνά επιλέγουν εκείνα τα τρόφιμα, τα οποία αποτελούνται από γλυκαντικά χαμηλής θερμιδικής αξίας, επειδή θέλουν τη γεύση της γλυκύτητας χωρίς πρόσθετες θερμίδες. Η διαιτητική επιλογή που παρέχει ένα τέτοιο προϊόν μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη διαχείριση της παχυσαρκίας ή του σακχαρώδη διαβήτη.

Τα εναλλακτικά γλυκαντικά αποτελούνται από ουσίες με πολύ έντονη γλυκιά γεύση και χρησιμοποιούνται σε μικρή ποσότητα ώστε να αντικαταστήσουν τη γλυκύτητα μιας πολύ μεγαλύτερης ποσότητας ζάχαρης. Τα γλυκαντικά αυτού του τύπου είναι τα εξής:

- Ασπαρτάμη

Η ασπαρτάμη είναι ο μεθυλεστέρας του διπεπτιδίου των αμινοξέων ασπαρτικό οξύ και φαινυλαλανίνη (10). Είναι ελαφρώς διαλυτή στο νερό, (11) και ασταθής σε παρατεταμένη θέρμανση γεγονός που εμποδίζει τη χρήση της για το ψήσιμο ή το μαγείρεμα (12). Η ασπαρτάμη έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλής και άρα οι ιθύνοντες οργανισμοί σε περισσότερες από 100 χώρες αναγνωρίζουν εγκεκριμένη τη χρήση ασπαρτάμης ως γλυκαντικό (10).

- Ακεσουλφάμη-Κ

Η ακεσουλφάμη-Κ είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη, σταθερή στη θερμότητα και με υψηλή υδατοδιαλυτότητα (11). Η ακεσουλφάμη-Κ δεν μεταβολίζεται στο ανθρώπινο σώμα και άρα δεν παρέχει θερμίδες, ενώ δεν προάγει τη φθορά των δοντιών (12). Το 1988, χρήση της ακεσουλφάμης-Κ εγκρίθηκε σε μια ποικιλία ξηρών προϊόντων διατροφής άλλα και σε αλκοολούχα ποτά (11).

- Σακχαρίνη

Η σακχαρίνη είναι ένα από τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα τεχνητά γλυκαντικά (13). Διέρχεται από το ανθρώπινο σώμα χωρίς να μεταβολίζεται. Έτσι, το θερμιδικό της περιεχόμενο είναι μηδενικό (12). Η υδατοδιαλυτότητά της είναι χαμηλή, άρα χρησιμοποιείται σε μορφή του άλατος νατρίου ή ασβεστίου. Παρουσιάζει όμως μια δυσάρεστη πικρή και μεταλλική επίγευση ενώ η γλυκιά γεύση εξακολουθεί να ανιχνεύεται ακόμα και σε αραιώση 1:100.000(12). Το 1977 ανακοινώθηκε η πρόθεση να απαγορευτεί η χρήση της, καθώς είχε ενοχοποιηθεί για την πρόκληση καρκίνου. Παρόλα αυτά, το σύνολο των επίσημων στοιχείων που υποστηρίζουν την ασφάλεια της σακχαρίνης είναι εκτεταμένο (12).

- Σουκραλόζη

Η σουκραλόζη έχει μια ευχάριστη γλυκιά γεύση ενώ η ποιότητα και η χρονική διάρκεια της γλυκύτητας είναι πολύ κοντά σε αυτήν της σακχαρόζης. Η συνέργεια της με άλλα θρεπτικά και μη θρεπτικά γλυκαντικά είναι μέτρια (11). Είναι πολύ διαλυτή στο νερό και σταθερή σε ένα ευρύ φάσμα pH και θερμοκρασίας (11). Αν και η σουκραλόζη είναι φτιαγμένη από ζάχαρη, το ανθρώπινο σώμα δεν την αναγνωρίζει ως ζάχαρη και δεν τη μεταβολίζει, άρα, δεν προσφέρει θερμίδες. Επίσης δεν προκαλεί φθορά στα δόντια. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων και ποτών(11).

- Νεοτάμη

Η νεοτάμη είναι ένα νέο μη θερμιδικό γλυκαντικό υψηλής δραστηριότητας που θεωρείται ως ο πιθανός διάδοχος της ασπαρτάμης (14). Είναι παράγωγο ενός διπεπτιδίου που αποτελείται από τα αμινοξέα ασπαρτικό οξύ και φαινυλαλανίνη, δύο από τα ίδια χημικά συστατικά που συνιστούν την ασπαρτάμη (12). Άρα ως παράγωγο της ασπαρτάμης έχει τις εγγενείς ιδιότητες της, όπως η πολύ καθαρή γλυκιά γεύση, χωρίς ανεπιθύμητη την πικρή ή μεταλλική επίγευση που εμφανίζεται σε άλλα γνωστά εναλλακτικά γλυκαντικά (13).

- Κυκλαμικό

Το κυκλαμικό χρησιμοποιείται στη μορφή του άλατος νατρίου ή ασβεστίου (15). Μεταβολίζεται από τα βακτήρια του εντέρου σε κυκλοεξυλαμίνη, η οποία παρουσιάζει τοξικότητα (11). Ως αποτέλεσμα, το 1969 απαγορεύτηκε η χρήση του. Με βάση όμως τις

μετέπειτα έρευνες, οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το κυκλαμικό δεν είναι καρκινογόνο (12).

- Θαυματίνη

Η θαυματίνη προέρχεται από τον καρπό του φυτού *Thaumatococcus denielli Benth* και χαρακτηρίζεται από γλυκιά γεύση με επίγευση γλυκόριζας (15).

- Γλυκοζίτες στεβιόλης

Οι γλυκοζίτες στεβιόλης βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φύλλα του φυτού *Stevia*. Η έντονη γλυκύτητα τους έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πάνω από 100 χρόνια (16).

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται η συγκριτική γλυκύτητα, ο γλυκαιμικός δείκτης και το θερμιδικό φορτίο των κυριότερων θερμιδικών και μη θερμιδικών γλυκαντικών.

Πίνακας 1-1: Σχετική γλυκύτητα, γλυκαιμικός δείκτης και θερμιδικό φορτίο των κυριότερων θερμιδικών γλυκαντικών

Γλυκαντικό	Σχετική Γλυκύτητα	Γλυκαιμικός δείκτης	Θερμιδικό φορτίο
Γλυκόζη	50	100	4,0
Φρουκτόζη	150-180	19-23	4,0
Γαλακτόζη	26	23	4,0
Μαλτόζη	40	105	4,0
Σουκρόζη	100	61-65	4,0
Λακτόζη	20-40	46	4,0
Ερυθριτόλη	60-80	0	0,2
Ισομαλτόλη	45-65	2	2,0
Λακτιόλη	35-40	6	2,4
Μαλτιτόλη	50-90	35-52	3,0
Μανιτόλη	50-72	0	1,6
Σορβιτόλη	50-100	9	2,6
Ξυλιτόλη	100	7-13	3,0
Ασπαρτάμη	18.000-20000	0	4,0

Πίνακας 1-2: Σχετική γλυκύτητα, γλυκαιμικός δείκτης και θερμιδικό φορτίο των κυριότερων μη θερμιδικών γλυκαντικών

Γλυκαντικό	Σχετική Γλυκύτητα	Γλυκαιμικός δείκτης	Θερμιδικό φορτίο
Κυκλαμικό	3000	0	0
Ακεσουλφάμη-Κ	20.000	0	0
Σακχαρίνη	30000-50000	0	0
Σουκραλόζη	60000	0	0
Θαυματίνη	200000-300000	0	0
Νεοτάμη	700000	0	0
Γλυκοζίτες στεβιόλης	1000-1500	0	0

Τα γλυκαντικά συνθετικής προέλευσης όπως η ασπαρτάμη, η σουκραλόζη, κλπ. έχουν συχνά κατηγορηθεί για τοξικότητα. Το γεγονός αυτό προωθεί την αυξανόμενη ανάγκη για κατανάλωση φυσικών γλυκαντικών ουσιών (Weihrauch and Diehl, 2004), όπως τα γλυκαντικά από το φυτό *Stevia rebaudiana Bertoni*, όπως περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο.

1.3 Stevia

1.3.1 Ιστορία της Stevia

Το φυτό *Stevia* είναι ένα ενδημικό αυτοφυές βότανο, με καταγωγή από τα υψίπεδα Αμαμπέι (Amambay) στα βορειοανατολικά της Παραγουάης. Αποτελείται από 154 είδη ποωδών φυτών και θάμνων, το πιο χαρακτηριστικό εκ των οποίων είναι η *Stevia Rebaudiana*, η οποία παράγει γλυκούς γλυκοζίτες στεβιόλης. Η *Stevia Rebaudiana* φυτρώνει στην κοιλάδα του Rio Monday, σε γεωγραφικό πλάτος μεταξύ 25 και 26°, όπου αναπτύσσεται σε αμμώδη εδάφη κοντά σε ρέματα. Σύμφωνα με αναφορές, οι ιδιότητες του φυτού, ήταν γνωστές στους Ινδιάνους Guaraní της περιοχής, οι οποίοι το ονόμαζαν aa-êhê, που σημαίνει "γλυκό βότανο" και χρησιμοποιούνταν ως γλυκαντικό αλλά και φάρμακο(17).

Η *Stevia* έγινε ευρύτερα γνωστή μετά την ανακάλυψή της το 1987 από τον βοτανολόγο Antonio Bertoni (18), ενώ είχε ήδη γίνει γνωστή στους Ισπανούς από τον 16° αιώνα κατά την άφιξή τους στη Λατινική Αμερική(19).

Η χρήση του φυτού και οι ιδιότητες του σχετικά με την αντιδιαβητική του δράση, παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά σε μία ανέκδοτη αναφορά το 1941 απευθυνόμενη στον διευθυντή της Kew Gardens στο Ηνωμένο Βασίλειο, ως απάντηση στο αίτημα του για πληροφορίες σχετικά με πιθανή υποκατάσταση της ζάχαρης και της σακχαρίνης, λόγω της αυξανόμενης σπανιότητας των γλυκαντικών αυτών κατά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο (17).

Μετά την απαγόρευση της σακχαρίνης στην Ιαπωνία το 1970, η *Stevia* άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως στη συγκεκριμένη χώρα, περισσότερο από ότι σε οποιαδήποτε άλλη. Κατά τις δεκαετίες του 1970 και 1980, άρχισε να εμφανίζεται σε καταστήματα βοτάνων και υγιεινής διατροφής στην Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη, ως γλυκαντικό μέσο (18).

Το 1999, ο οργανισμός τροφίμων και γεωργίας (FAO), ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO), η επιτροπή εμπειρογνομόνων σχετικά με τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) και η επιστημονική επιτροπή τροφίμων της Ευρωπαϊκής Ένωσης, εξέτασαν τους γλυκοζίτες στεβιόλης, δηλαδή τα γλυκά συστατικά της *Stevia* και κατέληξαν, σύμφωνα με τα τότε δεδομένα, ότι δεν είναι αποδεκτό να χρησιμοποιείται ως γλυκαντικό.

Το 2004, η JECFA, επανεξέτασε την *Stevia* και επέτρεψε ένα μέγιστο επιτρεπόμενο όριο χρήσης στα 2 mg/kg σωματικού βάρους για τους γλυκοζίτες στεβιόλης. Τον Ιούνιο του 2008, η JECFA κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση γλυκοζιτών στεβιόλης είναι ασφαλής σε τρόφιμα και ποτά και όρισε ως αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη τα 4mg/kg σωματικού βάρους (20).

Σήμερα η Ιαπωνία, είναι ο κύριος παραγωγός και έμπορος του γλυκαντικού. (19) Άλλες χώρες στις οποίες είναι διαδεδομένη η καλλιέργειά της, είναι η Κίνα, η Ταϊβάν, η Ταϊλάνδη, η Κορέα, η Βραζιλία, αλλά και το Ισραήλ, η Ουκρανία, το Ηνωμένο Βασίλειο, ο Καναδάς, η Καλιφόρνια και όλη η Νότια Αμερική (20).

1.3.2 Βοτανική περιγραφή

Το φυτό *Stevia* είναι ένα από τα 950 γένη της οικογένειας Αστεροειδών (*Asteraceae*). Η *Stevia Rebaudiana* είναι το μόνο είδος του γένους το οποίο δίνει γλυκές ουσίες, ενώ άλλα είδη έχουν άλλα βιοχημικά ενδιαφέροντα, όπως η *Stevia eupatoria*, η *Stevia lemmonii* και η *Stevia micrantha*.(23)

Η βοτανική κατάταξη της *Stevia Rebaudiana* φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1-3: Βοτανική κατάταξη του φυτού Stevia (21)

Βασίλειο	Φυτά
Συνομοταξία	Μαγνολιόφυτα
Ομοταξία	Δικοτυλήδονα
Τάξη	Αστερώδη
Οικογένεια	Αστεροειδή
Γένος	Στέβια
Είδος	Ρεμπαουντιάνα

Η ταξιανθία της *Stevia* είναι χαλαρή, με τις κεφαλές να εμφανίζονται σε ακανόνιστα συμπλέγματα ανθών. Τα άνθη είναι μικρά (15-17mm), λευκά με έναν απαλό μωβ λαιμό. Τα μικροσκοπικά λευκά άνθη είναι τέλεια, διαθέτουν δηλαδή και αρσενικά και θηλυκά οργανίδια και διατάσσονται σε μικρούς κορύμβους με 2 έως 6 άνθη. Το φυτό μπορεί να ξεκινήσει την ανθοφορία, μόλις παραχθούν τουλάχιστον τέσσερα πραγματικά φύλλα, ενώ χρειάζεται περισσότερο από ένα μήνα για να περάσει όλα τα στάδια ανάπτυξής του και να αναπτυχθούν όλα τα λουλούδια του. (21) Οι ανθήρες είναι μικροί και πέντε στον αριθμό, ενώ το στίγμα είναι διακλαδισμένο από τη μέση και περιβάλλεται από τους ανθήρες.



Εικόνα 1-1: Άνθη του φυτού Stevia Rebaudiana



Εικόνα 1-2: Φύλλα του φυτού Stevia Rebaudiana

Τα φύλλα έχουν μήκος 3-4 cm και είναι επιμήκη ή στρογγυλά. Η άνω επιφάνειά τους είναι ελαφρώς κοκκώδης (22). Ο καρπός έχει πέντε ραβδώσεις ατρακτοειδούς σχήματος. Το φυτό φτάνει σε ύψος το 1 m (22).

Η ποσότητα των γλυκοζιτών στεβιόλης είναι διαφορετική σε κάθε μέρος του φυτού. Την μεγαλύτερη ποσότητα διαθέτουν τα φύλλα, και ακολουθούν τα λουλούδια, το στέλεχος, οι σπόροι και οι ρίζες. Οι ρίζες είναι το μοναδικό μέρος του φυτού στο οποίο δεν υπάρχει στεβιοσίδη. Η γλυκύτητα στα φύλλα είναι δύο φορές υψηλότερη από ότι στα άνθη (21).

1.3.3 Καλλιέργεια

Η *Stevia* μπορεί να πολλαπλασιαστεί από μοσχεύματα ή σπόρους. Προτιμάται να αναπτύσσεται ως ετήσια ή περιστασιακά μοσχευμένη καλλιέργεια, καθώς τα ποσοστά βλάστησης από σπόρους είναι χαμηλά. Ο κύκλος παραγωγής της ετήσιας *Stevia* ξεκινά με φυτά 6 ή 7 εβδομάδων που καλλιεργούνται από σπόρους σε θερμοκήπια, και μοσχεύονται σε χωράφια μέχρι τα τέλη Μαΐου. Το μεγαλύτερο μέρος της απόδοσης των φύλλων πραγματοποιείται από τον Ιούλιο μέχρι τα τέλη Σεπτεμβρίου (23).

Η συγκομιδή της *Stevia* πραγματοποιείται λίγο πριν την ανθοφορία, όταν η συγκέντρωση των γλυκοζιτών στεβιόλης βρίσκεται στα μέγιστα επίπεδα. Η συγκομιδή του φυτού γίνεται ακριβώς πάνω από το επίπεδο του εδάφους και στη συνέχεια μεταφέρεται σε φορτάμαξες. Τα φύλλα διαχωρίζονται από τα στελέχη, αποθηκεύονται και οδηγούνται προς επεξεργασία (23).

Τα φυτά της *Stevia* ευδοκμούν σε κόκκινα ή αμμώδη εδάφη με pH που κυμαίνεται σε τιμές 5-7,5. Δεδομένου ότι οι ρίζες είναι κοντά στην επιφάνεια, συνίσταται η χρήση λιπασμάτων για την προσθήκη θρεπτικών συστατικών στα αμμώδη εδάφη. Είναι ευαίσθητη σε χαμηλές θερμοκρασίες κυρίως κατά τη φάση της ανάπτυξης, αλλά και στα υψηλά ποσοστά υγρασίας. Επομένως, θα πρέπει να αποφεύγεται το υπερβολικό πότισμα και θα πρέπει το έδαφος στο οποίο καλλιεργείται να χαρακτηρίζεται από κατάλληλο σύστημα αποστράγγισης (25).

Η *Stevia* δεν είναι επιρρεπής στα παράσιτα καθώς η γλυκύτητα λειτουργεί ως απωθητικό (24). Η χρήση εντομοκτόνων δεν είναι απαραίτητη σε ουσιαστική βάση, γεγονός το οποίο βοηθάει στην εύκολη παραγωγή βιολογικής *Stevia* (27).



Εικόνα 1-3: Καλλιέργειες *Stevia Rebaudiana*

1.3.4 Χημική σύσταση

Η *Stevia* περιέχει πάνω από 100 ουσίες, οι πιο γνωστές από τις οποίες είναι οι τερπενοειδείς γλυκοζίτες. Οι δύο κύριοι γλυκοζίτες είναι ο στεβιοσίδης με αναλογία 9,1 % επί ξηρού βάρους και ο ρεμπαουδιοσίδης Α με αναλογία 3,8% (23).

Ο στεβιοσίδης είναι περίπου 300 φορές πιο γλυκός από την σακχαρόζη, χαρακτηρίζεται όμως από πικρή επίγευση. Τα μόριά του είναι εξαιρετικά σταθερά σε υδατικά διαλύματα εντός ευρείας περιοχής pH (1-10) και θερμοκρασίας έως 198°C. Είναι σταθερός σε διάφορες συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης και σε αλληλεπιδράσεις με υδατοδιαλυτές βιταμίνες, οργανικά οξέα και άλλα γλυκαντικά (25).

Ο Ρεμπαουδιοσίδης Α είναι ο πιο σημαντικός ρεμπαουδιοσίδης και είναι 250-450 φορές πιο γλυκός από την σακχαρόζη. Είναι ο πιο σταθερός γλυκοζίτης και σε αντίθεση με τον στεβιοσίδη, δεν έχει πικρή επίγευση. Μεταβολίζεται από τους εντερικούς μικροοργανισμούς σε στεβιοσίδη και στη συνέχεια μετασχηματίζεται σε γλυκόζη και ένα μόριο στεβιόλης (25).

Εκτός από τον Στεβιοσίδη και τον Ρεμπαουδιοσίδη Α, άλλοι γλυκοζίτες της στεβιόλης είναι οι εξής :

- Ρεμπαουδιοσίδης Β
- Ρεμπαουδιοσίδης C
- Ρεμπαουδιοσίδης D
- Ρεμπαουδιοσίδης E
- Ρεμπαουδιοσίδης F
- Δουλκοσίδης Α (29)

Εκτός από τους γλυκούς διτερπενοειδείς γλυκοζίτες, αρκετά άλλα διτερπένια έχουν απομονωθεί από την *Stevia*. Δεδομένου ότι οι ενώσεις αυτές μπορεί να αποτελούν μέρος του ρεύματος αποβλήτων που προκύπτει κατά την διάρκεια επεξεργασίας της, η διαθεσιμότητά τους σε μεγάλες ποσότητες θα μπορούσε να τα καταστήσει σημαντικά συμπληρωματικά προϊόντα. Από τις ενώσεις αυτές, έχουν χαρακτηριστεί η αυστρουινουλίνη και η 6-Ο-ακετυλαυστροϊνουλίνη. Έχουν αναφερθεί επίσης τριτερπένια β-αμιρίνης οξικού οξέος, τρεις εστέρες λουπεόλης, στιγμαστερόλη και β-σιτοστερόλη. Οκτώ ακόμη διτερπένια τα οποία ονομάζονται στερεβίνες Α-Η έχουν απομονωθεί από τα φύλλα της *Stevia*, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί έξι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες (23).

Τα συστατικά τα οποία έχουν προσδιοριστεί στο αιθέριο έλαιο του φυτού είναι τα σесκιτερπένια βαρυοφυλλίνη, trans-β-φρενσένιο, α-βουτυλένιο, δ-καδινένιο, καρυοξειλονοξείδιο και νερολιδόλη και τα μονοτερπένια λιναλόλη, τερπινέλ-4-όλη και α-τερπινεόλη. Αργότερα ταυτοποιήθηκαν 54 συστατικά στο απόσταγμα ατμού αποξηραμένων φύλλων *Stevia*, τα κυριότερα από τα οποία είναι το καρρυοφιλλενοξείδιο και η σπατουλενόλη με συνολικό ποσοστό 43% (23).

Από τις οργανικές ουσίες, οι σπουδαιότερες εκτός των γλυκοζιτών, είναι οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λιπίδια, η περιεκτικότητα των οποίων στα φύλλα της *Stevia* φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1-4: Σύσταση θρεπτικών συστατικών στα φύλλα Stevia(30)

Θρεπτικό συστατικό	(g/100 g ξηρού βάρους)
Υδατάνθρακες	63,1
Πρωτεΐνες	12,0
Λιπίδια	2,7

Όσον αφορά στις ανόργανες ουσίες, η μεταλλική ανάλυση έδειξε ότι στα φύλλα της *Stevia* υπάρχει υψηλό περιεχόμενο νατρίου, καλίου, σιδήρου, ασβεστίου, ψευδαργύρου, θείου, φωσφόρου, και μαγνησίου (31). Επίσης τα φύλλα *Stevia* διαθέτουν ελαφρές ποσότητες βιταμινών Β και άλλες υδατοδιαλυτές βιταμίνες (25). Η περιεκτικότητα των φύλλων σε μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 1-5: Σύσταση μεταλλικών στοιχείων στα φύλλα Stevia (25)

Μεταλλικό στοιχείο	mg/100g ξηρού βάρους
Νάτριο	32,7
Κάλιο	1800,0
Σίδηρος	55,3
Ασβέστιο	464,4
Ψευδάργυρος	1,5
Θείο	190,0
Φώσφορος	11,4
Μαγνήσιο	349,0

Πίνακας 1-6: Σύσταση βιταμινών στα φύλλα Stevia (25)

Βιταμίνη	mg/100g ξηρού βάρους
C	14,98
B2	0,43
B6	0,00
Φολικό οξύ (B9)	52,18
Νιασίνη (B3)	0,00
Θειαμίνη	0,00

1.3.5 Γλυκοζίτες στεβιόλης

1.3.5.1 Σύνθεση στεβιόλης

Η στεβιόλη (steviol) είναι ένα τετρακυκλικό διτερπένιο με σκελετό ent-καουρενίου (ent-kaurene) και αποτελεί το άγλυκο τμήμα των γλυκοζιτών που βρίσκονται στα φύλλα της *Stevia*. Ο μοριακός τύπος της είναι $C_{20}H_{30}O_3$ και η συστηματική ονομασία είναι (4α)-13-υδροξυρ-καουρ16εν-19-οϊκό οξύ.

Όπως τα περισσότερα διτερπένια η σύνθεση της στεβιόλης πραγματοποιείται στα πλαστίδια μέσω της 4-φωσφο-μεθυλερυθριτολικής οδού (Methylerythritol 4-Phosphate-MEP).

Κατά το πρώτο βήμα της οδού, η 5-φωσφορική-δεοξυξυλόζο- συνθάση (DXS), οδηγεί στην σύνθεση της 5-φωσφο- δεοξυξυλόζης (DXP) από πυροσταφυλικό και 3-φωσφορική γλυκεραλδεύδη. Μετά τη σύνθεσή του, η DXP, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιταμινών όπως η θειαμίνη ή στην MEP οδό για την σύνθεση ισοπρενοειδών.

Στο επόμενο στάδιο της οδού, η αναγωγική DXP ισομεράση (DXR) μειώνει και αναδιατάσσει την αλυσίδα DXP για να σχηματίσει 4-φωσφορική 2C-μεθυλο - D-ερυθριτόλη. Τα επόμενα πέντε βήματα της οδού MEP καταλύουν η 4-διφωσφο-κυτιδυλ-2-C-μεθυλ-ερυθριτοσυνθάση (CMS), η 4-διφωσφο-κυτιλ - 2-C-μεθυλ-ερυθριτοκινάση (CMK), η 4 διφωσφοκυτιλ-2 - C-μεθυλ - D-ερυθριτολ 2,4 -κυκλοδιφωσφοσυνθάση (MCS), η 1-υδροξύλ-2(E)βουτενυλ-4-διφωσφοσυνθάση (HDS) και η 1-υδροξύλ-2-2(E)βουτενυλ-4-διφωσφο-αναγωγή (HDR).

Στο τελικό στάδιο, τα προϊόντα που προκύπτουν από τη δράση των παραπάνω, δηλαδή η ισοπεντενελική διφωσφατάση και η διμεθυλαλική διφωσφατάση μετατρέπονται σε διφωσφορικό γερανυλό-γερανύλιο (GGDP), από την συνθάση GGDP της πλασμιδικής πρενιλοτρανφεράσης, μέσω τριών διαδοχικών αντιδράσεων συμπύκνωσης.

Όπως όλα τα διτερπένια, η στεβιόλη συντίθεται από διφωσφορικό γερανυλό-γερανύλιο, αρχικά με την πρωτονιακή κυκλοποίησή του προς κοπαλυλικό διφωσφορικό (CDP) με CDP συνθάση (CDPS). Στη συνέχεια, το καουρένιο παράγεται από CDP μέσω μίας κυκλοποίησης εξαρτώμενη από ιονισμό, καταλυόμενη από συνθάση καουρίνης (KS). Αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης στη *Stevia* έδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης τόσο της CDPS όσο και της KS στα φύλλα του φυτού και ειδικότερα στα πλήρως διογκωμένα. Επί τόπου υβριδισμός χρησιμοποιώντας CDPS και KS ως ανιχνευτές αποκάλυψε ότι οι μεταγραφές των δύο γονιδίων εμφανίζονται μόνο στο παρέγχυμα των φύλλων. Από αυτό εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα πρώτα βήματα της οδού περιορίζονται στον πράσινο ιστό. Άρα, οι στεβιόλη και οι γλυκοζίτες της, βρίσκονται σε ιστούς που είτε έχουν είτε είχαν χλωροπλάστες, όπως φύλλα και στελέχη.

Το καουρένιο στη συνέχεια οξειδώνεται από την καουρενική οξειδάση (KO) σε καουρενικό οξύ, σε μία αντίδραση τριών σταδίων. Η βιοσύνθεση της στεβιόλης τελικά ολοκληρώνεται με την υδροξυλίωση του καουρενικού οξέος από την 13-υδροξυλάση καουρενικού οξέος (KAH)(16).

1.3.5.2 Σύνθεση γλυκοζιτών

Η άγλυκη στεβιόλη διαθέτει δύο υδροξυλομάδες. Η μία συνδέεται με τον C-19 του C-4 του καρβοξυλίου και η άλλη με τον C-13, οι οποίοι θεωρητικά μπορούν να γλυκοζυλιωθούν. Οι Shibata et al. (1991) χρησιμοποίησαν την 13-O- και την 19-O-μεθυλοστεβιόλη σαν υποστρώματα για εκχυλίσματα ενζύμου φύλλων ακατέργαστης *Stevia* ώστε να προσδιοριστεί ποια δραστική ομάδα γλυκοζυλιώνεται πρώτη. Διαπίστωσαν ότι μόνο η 19-O-στεβιόλη θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως υπόστρωμα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η σύνθεση των γλυκοζιτών στεβιόλης ξεκινά με την γλυκοζυλίωση του 13-υδροξυλίου της στεβιόλης, από την οποία προκύπτει ο μονοσίδης στεβιόλης. Το επόμενο στάδιο είναι η γλυκοζυλίωση του C-2' της 13-O-γλυκόζης του μονοσίδη στεβιόλης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή στεβιοβιοσίδη. Ο στεβιοβιοσίδης προκύπτει στη συνέχεια από την γλυκοζυλίωση του

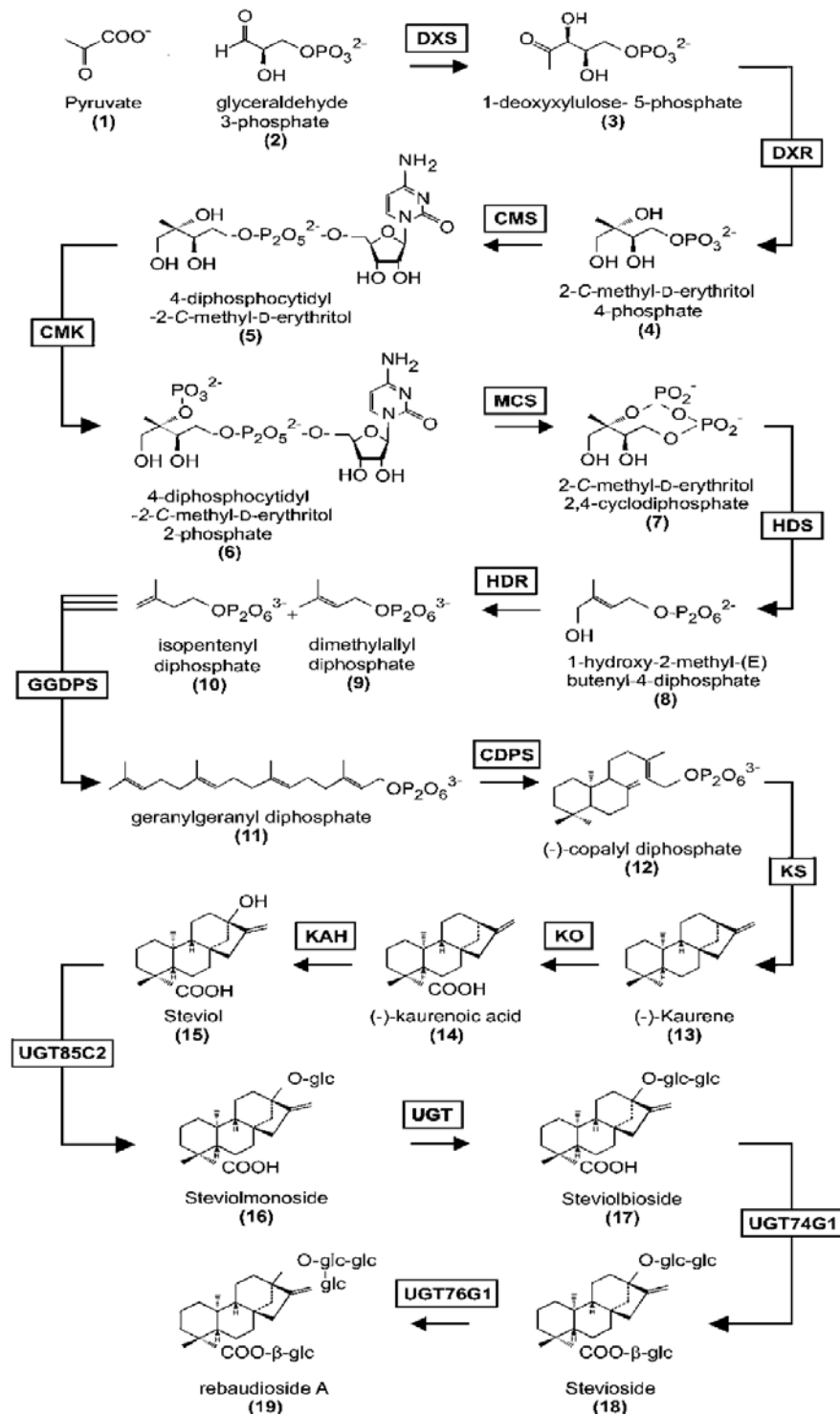
καρβοξυλίου C-19 του στεβιοβιοσίδης. Ο ρεμπαουδιοσίδης A συντίθεται με γλυκοζυλίωση του C-3' της C-13-O-γλυκόζης. Όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα, ο ρεμπαουδιοσίδης A δεν δίνει προϊόν, υποδεικνύοντας ότι είναι το τελικό βήμα της οδού (16).

Η χημική δομή των γλυκοζιτών στεβιόλης φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1-7: Η χημική δομή των γλυκοζιτών στεβιόλης (32)

	R1(C19)	R2(C13)
Steviol	H	H
Steviolbioside(SteB)	H	β -Glc- β -Glc(2->1)
Stevioside(Ste)	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2->1)
Rubusoside(Rub)	β -Glc	β -Glc
Steviolmonoside(SteM)	H	β -Glc
Steviolmonoglucosyl ester(SteE)	β -Glc	H
Rebaudioside A(RebA)	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2->1) β -Glc(3->1)
Rebaudioside B(RebB)	H	β -Glc- β -Glc(2->1) β -Glc(3->1)
Rebaudioside C(dulcoside)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3->1)
Rebaudioside D	β -Glc- β - Glc(2->1)	β -Glc- β -Glc(2->1) β -Glc(3->1)
Rebaudioside E	β -Glc- β - Glc(2->1)	β -Glc- β -Glc(2->1)
Rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2->1) β -Glc(3->1)
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2->1)

Τα στάδια της βιοσύνθεσης της στεβιόλης, αλλά και των γλυκοζιτών της, τα οποία αναφέρθηκαν αναλυτικά παραπάνω, παρατίθενται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 1-4: Τα στάδια βιοσύνθεσης της στεβιόλης και των γλυκοζιτών της (16)

Οι γλυκοζίτες στεβιόλης μεταφέρονται στα κύτταρα όπου αποθηκεύονται στα κεντόπια. Το κεντρικό κεντόπιο των φυτικών κυττάρων είναι σημαντικό για την απομόνωση των τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών και των ξενοβιοτικών, μακριά από ευαίσθητες μεταβολικές διεργασίες εντός του κυττασολίου. Οι γλυκοζίτες συσσωρεύονται στα φύλλα της

Stevia και μπορεί να περιλαμβάνουν το 10-20% του ξηρού βάρους των φύλλων. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από τις καλλιεργητικές τεχνικές και τις συνθήκες κατά την αύξηση των φυτών. Έτσι ένα μεγάλο ποσοστό του συνολικού μεταβολισμού των φυτών δεσμεύεται για τη σύνθεση αυτών των πολύπλοκων δομικά μορίων. Όπως και άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες, έτσι και οι γλυκοζίτες στεβιόλης μπορούν να λειτουργήσουν ως άμυνα, για αποτροπή σίτισης ή έχοντας δράσεις ενάντια σε φυτοφάγα ζώα, παράσιτα ή παθογόνα (16).

1.3.6 Απομόνωση γλυκοζιτών

Οι περισσότερες από τις μεθόδους απομόνωσης των γλυκοζιτών στεβιόλης περιλαμβάνουν τρεις βασικές διεργασίες: εκχύλιση με νερό ή διαλύτη, ανταλλαγή ιόντων και καθίζηση. Στη συνέχεια ακολουθεί κρυστάλλωση και ξήρανση.

Η εκχύλιση αποτελεί τη βασικότερη διεργασία απομόνωσης και πραγματοποιείται με μίγμα βουτανόλης ή ισοβουτανόλης με έναν λιγότερο πολικό διαλύτη όπως το βενζόλιο, το χλωροφόρμιο ή το εξάνιο. Ως διαλύτες χρησιμοποιούνται επίσης η μεθανόλη ή το νερό, με την μεθανόλη να έχει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης (5,2%) συγκριτικά με το νερό (4,7%) σε εύρος θερμοκρασιών 110-160 °C. Το νερό όμως αντιπροσωπεύει μία πιο πράσινη εναλλακτική λύση. Επίσης, ο στεβιοσίδης και ο ρεμπαουδιοσίδης Α θα μπορούσαν να εκχυλιστούν σε αυξημένη θερμοκρασία χρησιμοποιώντας νερό χωρίς την προσθήκη οργανικού διαλύτη, χρησιμοποιώντας εκχύλιση με θερμό νερό υπό πίεση (Pressurized hot water extraction - PWHE) ή εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave-assisted extraction - MAE).

Η ενζυμική εκχύλιση (Enzyme-assisted extraction - EAE), μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη βελτίωση απόδοσης της απομόνωσης των γλυκοζιτών. Διάφορα ένζυμα όπως οι κυτταρινάσες, οι πηκτινάσες και η ημικυτταρίνη χρησιμοποιούνται ώστε να διαταράξουν την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος ενισχύοντας έτσι την εκχύλιση των βιοενεργών συστατικών της *Stevia* (26).

Μία ακόμα μέθοδος απομόνωσης και συμπύκνωσης των γλυκοζιτών στεβιόλης είναι η διεργασία πολλαπλών σταδίων μεμβρανών. Επίσης, τα συστατικά πικρής γεύσης μπορούν να απομονωθούν από το συμπύκνωμα γλυκοζιτών με τη διεργασία νανοφιλτραρίσματος(33).

1.3.7 Φυσικές ιδιότητες

Το ενεργειακό περιεχόμενο των φύλλων *Stevia* ανέρχεται στις 2,7 kcal/g. Άρα το εκχύλισμα *Stevia* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα γλυκαντικό χαμηλής θερμιδικής αξίας, καθώς η γλυκύτητά της είναι έντονη και συγκρίσιμη με εκείνη των άλλων εμπορικών γλυκαντικών, όπως η ακεσουλφάμη Κ (χωρίς θερμίδες), η ασπαρτάμη (4 kcal/g), η σακχαρίνη (χωρίς θερμίδες) και η σουκραλόζη (χωρίς θερμίδες).

Τα φύλλα της *Stevia* παρουσιάζουν τιμές πυκνότητας 0,443 g/ml ικανότητα απορρόφησης νερού 4,7 ml/g, ικανότητα απορρόφησης λίπους 4,5 ml/g, αξία γαλακτωματοποίησης 5,0 ml/g, δείκτη διόγκωσης 5,01 g/g, διαλυτότητα 0,365 g/gνερού και pH 5,95. (34)Η φαινόμενη πυκνότητα της σκόνης από φύλλα *Stevia* φαίνεται να είναι χαμηλή συγκριτικά με άλλους πλούσιους σε πρωτεΐνη σπόρους.

Το αυξημένο πρωτεϊνικό περιεχόμενο της *Stevia*, αυξάνει την ικανότητα συγκράτησης ενισχύοντας έτσι την ικανότητα διόγκωσης, ιδιότητα η οποία είναι σημαντική κατά την παρασκευή παχύρρευστων τροφών όπως σουπές, σάλτσες, ζύμες και ψημένα προϊόντα. Η ικανότητα της πρωτεΐνης να βοηθάει στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του γαλακτώματος είναι επίσης κρίσιμη σε πολλές εφαρμογές σε τρόφιμα, όπως σε κέικ, σε χυλούς, κρέμες γάλακτος για καφέ, γάλατα, παγωμένα επιδόρπια και άλλα. Η ιδιότητα αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση και τις συνθήκες επεξεργασίας του προϊόντος (27).

Η ικανότητα απορρόφησης του λίπους αποδίδεται στη φυσική παγίδευση του ελαίου, κάτι το οποίο είναι σημαντικό καθώς το λίπος δρα επί των γευστικών υποδοχέων ενισχύοντας τη γεύση των τροφίμων στη στοματική κοιλότητα. Ο στεβιοσίδης είναι σταθερός στους 95°C και άρα κατάλληλος ως πρόσθετο σε μαγειρεμένα ή ψημένα τρόφιμα (27).

1.3.8 Βιολογικές ιδιότητες

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες της *Stevia*. Τα αποτελέσματα αφορούσαν στην επίδραση του φυτού στον μεταβολισμό της γλυκόζης, στη διούρηση και στην ενδοκρινική λειτουργία. Εγχύσεις εκχυλισμάτων *Stevia* σε αρουραίους, έδειξαν επίσης αντί-ανδρογονική δραστηριότητα(35).

Πιθανώς, τα εκχυλίσματα *Stevia* έχουν ευεργετικές ιδιότητες και ως αντιοξειδωτικά. Ο στεβιοσίδης, ο στεβιοβιοσίδης, η ισοστεβιόλη και η στεβιόλη, φαίνεται να προκάλεσαν αναχαίτιση της οξειδωτικής φωσφορλίωσης στα μιτοχόνδρια του ήπατος αρουραίων. Το εκχύλισμα *Stevia* επηρεάζει επίσης το καρδιαγγειακό και το νεφρικό σύστημα ρυθμίζοντας την υπέρταση και την υπεργλυκαιμία (33). Παράλληλα οι γλυκοζίτες στεβιόλης, μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή ινσουλίνης από τα β- κύτταρα του παγκρέατος αλλά και να αναστείλουν την ανάπτυξη της οδοντικής πλάκας (36).

Μια ακόμη βιολογική ιδιότητα του υγρού εκχυλίσματος *Stevia*, είναι η προφανής ιδιότητά του να βοηθά στην αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων, όπως η ακμή, η σμηγματόρροια, η δερματίτιδα και το έκζεμα. Επίσης, η απευθείας χρήση της σε περικοπές και πληγές, επιταχύνει την επούλωση και αποτρέπει τον σχηματισμό ουλών, ενώ έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή βακτηρίων και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (28).

1.3.9 Μορφές της Stevia

Η *Stevia* μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές μορφές, η επιλογή των οποίων εξαρτάται από την απαιτούμενη γλυκύτητα (28).

- Φύλλα φρέσκιας Stevia

Τα φύλλα αποτελούν την πιο φυσική και μη επεξεργασμένη μορφή της *Stevia*. Το μάσημα ενός φύλλου το οποίο έχει ληφθεί απευθείας από το φυτό, δίνει μια εξαιρετικά γλυκιά αίσθηση γεύσης που θυμίζει γλυκόριζα, ενώ διαρκεί για αρκετό χρονικό διάστημα. Για

πρακτικές εφαρμογές ως τσάι ή γλυκαντικό, τα φύλλα θα πρέπει να αποξηραθούν ή να υποστούν κάποια διεργασία εκχύλισης, ώστε η γλυκιά γεύση να γίνει ακόμα πιο δυνατή (28).

- Αποξηραμένα φύλλα

Η ξήρανση και η σύνθλιψη των φύλλων *Stevia* είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση περισσότερων γλυκών συστατικών από το φυτό. Ένα αποξηραμένο φύλλο είναι πολύ πιο γλυκό από ότι ένα φρέσκο και αποτελεί τη μορφή της *Stevia* που χρησιμοποιείται κατά την παρασκευή τσαγιού. Αποξηραμένα φύλλα *Stevia* μπορούν να πωληθούν χύμα ή συσκευασμένα σε φακελάκια τσαγιού. Μπορεί επίσης να είναι ελαφρώς κονιοποιημένα. Στην μορφή αυτή, η *Stevia*, είναι 15-20 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη (ένα κουταλάκι του γλυκού *Stevia* είναι περίπου ισοδύναμο με ένα φλιτζάνι ζάχαρη). Έχει ένα πρασινωπό χρώμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων και ποτών, συμπεριλαμβανομένου του καφέ, των γλυκών αλλά και άλλων βρώσιμων πιάτων (28).

- Εκχυλίσματα *Stevia*

Το εκχύλισμα *Stevia*, σε μορφή λευκής σκόνης, αποτελεί τον κύριο τρόπο χρήσης της ως γλυκαντικό. Η *Stevia* στη μορφή αυτή είναι 200 έως 300 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη (κατά βάρος). Η λευκή αυτή σκόνη, αποτελεί εκχύλισμα των γλυκοζιτών στεβιόλης, δηλαδή των φυσικών γλυκαντικών ουσιών του φυτού (28).

- Υγρά συμπυκνώματα

Πρόκειται για ένα μαύρο υγρό σε μορφή σιροπιού, το οποίο προκύπτει από τον βρασμό των φύλλων στο νερό και έχει την ικανότητα να ενισχύει τη γεύση πολλών τροφίμων. Η εμφάνιση των φύλλων σε αποσταγμένο νερό ή σε μίγμα νερού και αλκοόλης σιτηρών είναι ένας άλλος τρόπος παρασκευής του υγρού συμπυκνώματος *Stevia* (28).

1.3.10 Χρήσεις

Τα προϊόντα και τα εκχυλίσματα *Stevia* μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα ποτών και τροφίμων. Το καθαρό εκχύλισμα των γλυκοζιτών στεβιόλης αποτελεί εναλλακτική λύση σε όλες σχεδόν τις χρήσεις της ζάχαρης. Αντίθετα με άλλα υποκατάστατα ζάχαρης, η *Stevia* είναι σταθερή όταν θερμαίνεται και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ψημένα προϊόντα με ασφάλεια. Οι γλυκοζίτες στεβιόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλα γλυκαντικά όπως η ζάχαρη και η φρουκτόζη δρώντας όχι μόνο ως γλυκαντικό αλλά και ως βελτιωτικό γεύσης (29).

Τα διατροφικά προϊόντα με *Stevia* που παράγονται και καταναλώνονται είναι κυρίως ανθρακούχα αναψυκτικά, μεταλλικά νερά, χυμοί, παγωτά, γαλακτοκομικά προϊόντα, σάλτσες, μπισκότα, κέικ, γλυκά, σοκολάτες, δημητριακά και διάφορα υλικά ζαχαροπλαστικής (29).

Τα προϊόντα με *Stevia* συνήθως συνιστανται σε άτομα που αποσκοπούν στην απώλεια βάρους αλλά και σε διαβητικούς. Ορισμένες ακόμα ωφέλιμες επιπτώσεις της κατανάλωσης γλυκοζιτών στεβιόλης συμπεριλαμβάνουν τη μείωση της υψηλής αρτηριακής πίεσης, τη μείωση των υψηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, τη μείωση των οδοντικών τερηδοντικών βακτηρίων και άλλων βακτηριοκτόνων επιδράσεων (29).

Μία από τις πιο προφανείς ενδείξεις για την ασφάλεια της *Stevia*, είναι το γεγονός πως δεν έχει υπάρξει καμία αναφορά αρνητικής επίδρασής της, σε πάνω από 1500 χρόνια χρήσης της από τους Παραγουανούς. Επίσης, παρά τα πάνω από είκοσι χρόνια εκτεταμένης χρήσης της στην Ιαπωνία, δεν έχει υπάρξει κανένα περιστατικό ανεπιθύμητων επιδράσεων. Παρόλα αυτά έχουν λάβει χώρα αρκετές εργαστηριακές δοκιμές σχετικά με την ασφάλεια κατανάλωσης της *Stevia*. Η πρώτη επίσημη διερεύνηση πιθανής τοξικότητας έλαβε χώρα το 1930 από τον Romaret και τους συνεργάτες του στην Νότια Αμερική. Οι δοκιμές ήταν αρνητικές. Διαπίστωσαν ότι ο στεβιοσίδης διέρχεται από τον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα, χωρίς να επηρεάζει τις πεπτικές διεργασίες (28). Σε δύο πρόσφατες μελέτες, η στεβιόλη παρήγαγε θετικό αποτέλεσμα σε ορισμένες δοκιμές μεταλλαξιογόνου δράσης. Στις ίδιες μελέτες ο στεβιοσίδης δεν έδειξε τέτοιο αποτέλεσμα. Άλλες αναφορές αποδεικνύουν την έλλειψη μεταλλαξιογένεσης και για τα δύο συστατικά (30).

1.3.11 Πικρή επίγευση

Ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματα της *Stevia* ως γλυκαντικό είναι η πικρή της επίγευση. Οι χημικές ουσίες της *Stevia*, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πικρή επίγευση είναι ο στεβιοσίδης, τα διτερπένια εποξυλαδιενίου, τα παράγωγα κλεροδανίου που βρίσκονται στα φύλλα του φυτού αλλά και τα φλαβονοειδή (30). Επίσης, η πικρή επίγευση, είναι συνδεδεμένη με την ύπαρξη λακτονών σεσκιτερπενίου (24).

Προκειμένου να μειωθεί η πικρή επίγευση του γλυκαντικού, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον καθαρισμό του εκχυλίσματος από τα πικρά συστατικά αλλά και στην ενζυματική τροποποίηση του στεβιοσίδη από υδρολυτικά ένζυμα όπως η β-γαλακτοζιδάση και η σακχαράση δεξτρίνης (31). Πλέον μία καινοτόμα μέθοδος βελτίωσης της επίγευσης της *Stevia*, είναι ο μικροεγκλεισμός μέσω του οποίου παρατείνεται η αίσθηση της γλυκύτητας λόγω της σταδιακής απελευθέρωσής της. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η ξήρανση με ψεκασμό, η ξήρανση με ψύξη αλλά και η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία (32).

1.4 Εγκλεισμός

1.4.1 Βασικές αρχές

Εγκλεισμός ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία μια δραστική ουσία, σε στερεά, υγρή ή αέρια μορφή, επικαλύπτεται ή παγιδύεται σε μικροθύλακες ή κάψουλες ώστε να μπορεί να απελευθερωθεί το περιεχόμενό τους με ελεγχόμενους ρυθμούς υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Στην πραγματικότητα αντιγράφει την λειτουργία των φυσικών μεμβρανών των κυττάρων. Οι μικροθύλακες και οι κάψουλες ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα, ανάλογα με τα υλικά και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για να παραχθούν. Τα σωματίδια μπορούν να έχουν διάφορες μορφές όπως σφαίρες με ομοιόμορφο πάχος ή σωματίδια που περιέχουν πυρήνα με ακανόνιστο σχήμα.

Η απελευθέρωση του εγκλεισμένου συστατικού μπορεί να ελεγχθεί με διάχυση είτε από το τοίχωμα της κάψουλας, είτε από μια μεμβράνη η οποία καλύπτει το τοίχωμα αυτό. Στην πρώτη περίπτωση η διάχυση ονομάζεται ελεγχόμενη από τη μήτρα, ενώ στην δεύτερη, ελεγχόμενη από την μεμβράνη. Ο ρυθμός διάχυσης επηρεάζεται από τη διαπερατότητα μέσω της μήτρας αλλά και από τη διαλυτότητα του συστατικού του τοιχώματος του θύλακα. Γενικά, η ένωση που πρόκειται να διαχυθεί, πρέπει να είναι διαλυτή στη μήτρα. Ωστόσο αυτό δεν είναι απαραίτητο στην περίπτωση πτητικών ουσιών, όπου η τάση ατμών είναι η κύρια κινητήρια δύναμη για την διάχυση. Η διάχυση επηρεάζεται επίσης από τη χημική σύσταση, τη μορφολογία και τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης.

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί απελευθέρωσης των εγκλεισμένων συστατικών, όπως η ενεργοποιημένη από την πίεση απελευθέρωση αλλά και η ενεργοποιημένη από τον διαλυτή απελευθέρωση, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και πραγματοποιείται με την προσθήκη νερού σε ξηρά τρόφιμα. Ένας άλλος μηχανισμός αφορά στην τήξη της μεμβράνης του τοιχώματος ή του ίδιου του τοιχώματος του θύλακα.

Οι εφαρμογές της τεχνικής του εγκλεισμού λαμβάνουν χώρα κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων όπου τα εγκλεισμένα υλικά μπορούν να προστατευτούν από την υγρασία και τη θερμότητα, αλλά και ενισχύσουν την σταθερότητα και την διατηρησιμότητά τους.

1.4.2 Υλικά που χρησιμοποιούνται ως μήτρες κατά τον εγκλεισμό

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά τον εγκλεισμό ως μήτρες, επηρεάζουν τις ιδιότητες του γαλακτώματος αλλά και τα χαρακτηριστικά των τελικών σωματιδίων. Βασική προϋπόθεση είναι να μην παρεμβαίνουν ή να αντιδρούν με την ενεργή ουσία ή οποία πρόκειται να εγκλειστεί. Επίσης, θα πρέπει να συμβάλουν στη σταδιακή απελευθέρωση των ενθυλακωμένων ουσιών αλλά και στην ανθεκτικότητα του εξωτερικού φλοιού(40).

Η χρήση αραβικού κόμμεος ως μήτρα εγκλεισμού αποτελεί την πιο κοινή επιλογή, λόγω του ιξώδους, της διαλυτότητας και της ικανότητας γαλακτωματοποίησής του. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμυλο προερχόμενο από πατάτες, καλαμπόκι, σιτάρι και ρύζι για την ενθυλάκωση βιταμινών, λιπιδίων, αιθέριων ελαίων, χρωστικών ουσιών και πρωτεϊνών. Τα κύρια πλεονεκτήματά του είναι η υψηλή διαθεσιμότητα, το χαμηλό κόστος του αλλά και διάφορες λειτουργίες του που αφορούν στην κατακράτηση νερού και στο υψηλό ή χαμηλό ιξώδες του. Το μη τροποποιημένο άμυλο γίνεται πολύ παχύρρευστο όταν αναμιγνύεται με το νερό. Για τον λόγο αυτό, τροποποιείται χρησιμοποιώντας χημικές, φυσικές ή ενζυματικές μεθόδους ώστε να βελτιωθεί η λειτουργικότητά του και να εμφανίσει υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού. Οι δεξτρίνες προκύπτουν με τη θέρμανση ξηρού αμύλου με οξύ ή βάση σχηματίζοντας ένα πολύ διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο άμυλο εμφανίζει καλύτερη υδατοδιαλυτότητα και ιξώδες. Ωστόσο είναι ακατάλληλες για συστατικά με βάση το έλαιο λόγω της συμβολής τους στο χρώμα και στο άρωμα. Επίσης, το τροποποιημένο άμυλο με ένα λιπόφιλο συστατικό (OSA-άμυλο), παρουσιάζει υψηλή ικανότητα διατήρησης των πτητικών κατά την ξήρανση με ψεκασμό, καλές γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και καλές ιδιότητες σχηματισμού τοιχώματος παρέχοντας

σταθερότητα σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. (41) Τα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως ως μήτρες εγκλεισμού είναι τα εξής:

- Ζεΐνη

Η ζεΐνη είναι φυτική πρωτεΐνη που απομονώνεται από το καλαμπόκι. Το μοριακό βάρος της κυμαίνεται από 22 έως 27 kDa και το ισοηλεκτρικό pH της έχει τιμή 6.228. Ανήκει σε μια οικογένεια προλαμινών που αποτελούνται από υψηλές ποσότητες (> 50%) υδρόφοβων αμινοξέων, όπως η προλίνη, η γλουταμίνη και οι ασπαραγίνες. Είναι αδιάλυτη στο νερό, αλλά διαλυτή σε διάλυτες που περιέχουν κατώτερη αλειφατική αλκοόλη (αιθανόλη, μεθανόλη και ισοπροπανόλη) Η ζεΐνη, χρησιμοποιείται ως μήτρα εγκλεισμού λειτουργώντας ως φράγμα υγρασίας, αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων και συσκευασίας ως επικάλυψη για καραμέλες, ξηρούς καρπούς, φρούτα και χάπια (33).

- Μαλτοδεξτρίνη

Οι μαλτοδεξτρίνες σχηματίζονται με μερική υδρόλυση αμύλου αραβόσιτου με οξέα ή ένζυμα. Περιέχουν διαφορετικά μεγέθη πολυμερών γλυκόζης. Το ιξώδες τους είναι χαμηλότερο από αυτό του αραβικού κόμμεος και δεν διαθέτουν λιπόφιλες ομάδες. Άρα οι ιδιότητες γαλακτωματοποίησής τους είναι χαμηλές. Τα πλεονεκτήματά τους περιλαμβάνουν την ήπια γεύση, τη χρήση τους σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών και την αύξηση της διάρκειας ζωής των εσπεριδοειδών(42).

- Ινουλίνη

Η ινουλίνη είναι ένα είδος προβιοτικού, μια ουσία που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς της πεπτικής οδού και επηρεάζει θετικά την υγεία. Η ινουλίνη, εξάγεται από φυτικές ίνες της ρίζας κιχωρίου. Βρίσκεται επίσης σε μικρότερες ποσότητες σε ολόκληρο το σιτάρι και σε ορισμένα λαχανικά και φρούτα, όπως τα σπαράγγια, το σκόρδο και οι μπανάνες. Τα στοιχεία από το 1999 (το πιο πρόσφατο διαθέσιμο) βάζουν τη μέση αμερικανική πρόσληψη ινουλίνης που απαντάται φυσιολογικά σε τρόφιμα στα 2,5 έως 3,5 g την ημέρα. Η ινουλίνη μακρύτερης αλυσίδας έχει κρεμώδη αίσθηση στο στόμα, επομένως χρησιμοποιείται συχνά για τη μείωση της περιεκτικότητας σε λιπαρά στα προϊόντα. Η ινουλίνη βραχείας αλυσίδας (FOS) έχει ελαφρώς γλυκιά γεύση, γι 'αυτό χρησιμοποιείται για να μειώσει την ποσότητα ζάχαρης, αλλά και τω νυποκαταστών της, στα τρόφιμα και τα ποτά (31).

1.4.3 Μέθοδοι εγκλεισμού

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές εγκλεισμού, όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία (electrospinning/electrospraying), η ξήρανση με κατάψυξη, η συσσωμάτωση, κλπ.

- Επίστρωση ρευστοποιημένου στρώματος

Τα στερεά σωματίδια αιωρούνται σε έναν θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας με αέρα υψηλής ταχύτητας, όπου το υλικό της μήτρας ψεκάζεται. Τα βέλτιστα αποτελέσματα παρατηρούνται όταν το μέγεθος των σωματιδίων κυμαίνεται ανάμεσα στα 50 και 500 μικρόμετρα. Η ποσότητα του υλικού το οποίο καλύπτει τα σωματίδια εξαρτάται από το χρονικό διάστημα στο οποίο αυτά βρίσκονται στον θάλαμο. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για

επιχρίσματα θερμής τήξης όπως υδρογονωμένο φυτικό έλαιο, στεατίνες, λιπαρά οξέα, γαλακτωματοποιητές και κηρούς, αλλά και για επιχρίσματα με βάση διαλύτες όπως άμυλο, κόμμεα και μαλτοδεξτρίνες. Όσον αφορά στα θερμά τήγματα, χρησιμοποιείται ψυχρός αέρας ώστε να σκληραίνει τον φορέα, ενώ για τα επιχρίσματα με βάση διαλύτες, χρησιμοποιείται θερμός αέρας ώστε να εξατμίζεται ο διαλύτης (34).

- Παγίδευση σε λιποσώματα

Τα λιποσώματα αποτελούν έναν τύπο μικροθύλακα με πιο ευπροσάρμοστες ιδιότητες και λιγότερη ευθραυστότητα από εκείνους που παράγονται από λιπίδια. Έχουν χρησιμοποιηθεί για την κυκλοφορία εμβολίων, ενζύμων, ορμονών και βιταμινών στο ανθρώπινο σώμα. Αποτελούνται από ένα ή περισσότερα στρώματα λιπιδίων και άρα είναι μη τοξικά και αποδεκτά στα τρόφιμα. Η διαπερατότητα, η σταθερότητα και η επιφανειακή δραστηριότητά τους ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και την λιπιδιακή σύνθεση των θυλάκων. Το εξωτερικό στρώμα των λιποσωμάτων αποτελείται από φωσφολιπίδια. Το υδρόφιλο τμήμα των λιπιδίων προσανατολίζεται προς την υδατική φάση, ενώ οι υδρόφοβες ομάδες τους συνδέονται με τις υδρόφοβες ομάδες των άλλων λιπιδίων. Η αναδίπλωση των λιπιδίων σε α σφαιρικό σχήμα σχηματίζει έναν πολύ σταθερό θύλακα λόγω της μηδενικής αλληλεπίδρασης των λιπιδίων με το νερό. Στις μεμβράνες αυτές παγιδεύονται υδατικά ή λιποδιαλυτά υλικά, αλλά όχι ο συνδυασμός και των δύο. Συνήθως η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό γεύσεων βρίσκοντας εφαρμογές κυρίως στην τυροκομία (34).

- Συγκρυστάλλωση

Η συγκρυστάλλωση είναι μία διαδικασία ενθυλάκωσης κατά την οποία η κρυσταλλική δομή της σακχαρόζης τροποποιείται από ένα τέλειο σε ένα ακανόνιστο κρύσταλλο, ώστε να αποτελέσει μία πορώδη μήτρα στην οποία μπορεί να ενσωματωθεί ένα δεύτερο δραστικό συστατικό. Η αυθόρμητη κρυστάλλωση του υπερκορεσμένου σιροπιού σακχαρόζης επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία (πάνω από τους 120 °C) και χαμηλή υγρασία. Εάν προστεθεί ταυτόχρονα ένα δεύτερο συστατικό, η αυθόρμητη κρυστάλλωση οδηγεί στην ενσωμάτωσή του στον κενό χώρο ανάμεσα στα συσσωματώματα των μικροδιαμορφωμένων κρυστάλλων. Τα κύρια πλεονεκτήματα της συγκρυστάλλωσης είναι η βελτιωμένη διαλυτότητα, η ομοιογένεια, η ικανότητα διασποράς, αλλά και η σταθερότητα και η ρευστότητα των ενθυλακωμένων υλικών. Επίσης, το υλικό του πυρήνα μπορεί να μετατραπεί σε μορφή σκόνης χωρίς επιπλέον ξήρανση ενώ το προκύπτον υλικό από τον εγκλεισμό εμφανίζει άμεσα χαρακτηριστικά δισκιοποίησης λόγω της συσσωματωμένης δομής του (35).

- Συσσωμάτωση

Η τεχνική αυτή κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας την δεκαετία του 1950 και αποτελεί μία αποτελεσματική αλλά ακριβή μέθοδο εγκλεισμού. Αρχικά διαλυτοποιείται μία πρωτεϊνική γέλη και στη συνέχεια γαλακτωματοποιείται στην πρωτεΐνη ένα υλικό όπως ένα αρωματικό έλαιο. Η επικάλυψη σε υγρή μορφή απομακρύνεται από ένα πολυμερικό διάλυμα, επικαλύπτει το υλικό το οποίο πρόκειται να εγκλωβίσει και στη συνέχεια ο θύλακας στερεοποιείται και συλλέγεται με φυγοκέντρηση ή διήθηση ενώ συνήθως ακολουθεί ξήρανση με ψεκασμό. Παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και η σύνθεση, είναι σημαντικοί κατά

τη μέθοδο του εγκλεισμού με συσσωμάτωση. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον εγκλεισμό υδροφοβικών συστατικών όπως η βιταμίνη Α ή έλαια λαχανικών και εσπεριδοειδών (34).

- Συμπλοκοποίηση

Κατά την τεχνική αυτή χρησιμοποιείται η β-κυκλοδεξτρίνη καθώς διαθέτει υδρόφοβο κέντρο και υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και άρα τα μόρια νερού που βρίσκονται στο κέντρο της, αντικαθίστανται από λιγότερο πολικά μόρια. Το σύμπλοκο που δημιουργείται καθιζάνει εκτός διαλύματος και στην συνέχεια το ίζημα ανακτάται και ξηραίνεται. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για τη σταθεροποίηση των λιποδιαλυτών βιταμινών Α, Ε και Κ (34).

- Περιστροφικός ή φυγοκεντρικός διαχωρισμός αιωρήματος

Κατά την μέθοδο αυτή, το ενεργό υλικό και η μήτρα αναμιγνύονται και στην συνέχεια τοποθετούνται σε έναν περιστρεφόμενο δίσκο. Το ενεργό υλικό στην συνέχεια, απομακρύνεται από τον δίσκο, έχοντας μία επίστρωση από το υλικό της μήτρας. Οι θύλακες που λαμβάνονται ξηραίνονται ή ψύχονται. Η όλη διαδικασία μπορεί να διαρκέσει από μερικά δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά. Δεδομένου ότι είναι μία συνεχής μέθοδος υψηλής ταχύτητας, είναι εξαιρετικά κατάλληλη για την χρήση της σε τρόφιμα, κυρίως εκείνα τα οποία είναι ευαίσθητα στην απορρόφηση υγρασίας όπως οι βιταμίνες και η ασπαρτάμη (34).

- Ξήρανση με κατάψυξη (Freeze Drying)

Η ξήρανση με κατάψυξη χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση βιοϋλικών σε μήτρες άμορφων υδατανθράκων όπως η μαλτοδεξτρίνη. (36) Κατά την μέθοδο αυτή, το υλικό καταψύχεται και στην συνέχεια, μέσω μείωσης της πίεσης και αύξησης της θερμοκρασίας, το κατεψυγμένο νερό στο υλικό εξαχνώνεται απευθείας από τη στερεή στην αέρια φάση. Ο εγκλεισμός επιτυγχάνεται με ομογενοποίηση του υλικού του πυρήνα στο διάλυμα της μήτρας, τα οποία στην συνέχεια συν-λυοφιλοποιούνται σχηματίζοντας ακανόνιστες μορφές (44).

- Ξήρανση με ψύξη (Spray Drying/Spray Chilling)

Κατά τη μέθοδο αυτή, το ενεργό συστατικό αναμιγνύεται με το υλικό της μήτρας, και στην συνέχεια ψεκάζεται σε ψυχρό αέρα. Χρησιμοποιείται συνήθως για τον εγκλεισμό υλικών ευαίσθητων στην θερμότητα και βρίσκει εφαρμογές σε ξηρά μίγματα σούπας και σε τρόφιμα πλούσια σε λιπαρά.

- Ξήρανση με ψεκασμό (Spray Drying)

Αποτελεί μία αποτελεσματική και οικονομική μέθοδο εγκλεισμού κατά την οποία δεν απαιτείται εξειδικευμένος εξοπλισμός (34)

- Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία (Electrohydrodynamic process)

Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία αποτελεί μία εναλλακτική τεχνολογία εγκλεισμού κατά την οποία δεν απαιτείται υψηλή θερμοκρασία και ακριβός εξοπλισμός.

Μεταξύ των μεθόδων εγκλεισμού, η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία είναι μία καινοτόμος μέθοδος εγκλεισμού, της οποίας η χρήση κερδίζει συνεχώς έδαφος τα τελευταία χρόνια. Οι δύο αυτές μέθοδοι περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

1.4.4 Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία

1.4.4.1 Διάταξη και βασικές αρχές

Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1934 και αποτελεί μία καινοτόμο μέθοδο εγκλεισμού. Βασίζεται στην εφαρμογή υψηλής τάσης σε ένα πολυμερικό διάλυμα με σκοπό τη δημιουργία μικρο και νανοσωματιδίων ή μικρο και νανοϊνών.

Η συσκευή που χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία αποτελείται από μία βελόνα με άκρο εσωτερικής διαμέτρου 1,5 mm τοποθετημένη σε ρυθμιζόμενο, ηλεκτρικά μονωμένο στήριγμα. (37) Η βελόνα συνδέεται με μία σύριγγα στην οποία είναι τοποθετημένο το πολυμερικό διάλυμα. Όταν εφαρμόζεται υψηλή τάση (της τάξης των 1-30 kV), η σταγόνα του πολυμερικού διαλύματος εξέρχεται στην άκρη της βελόνας. Συνήθως προτιμώνται πηγές συνεχούς ρεύματος αν και η χρήση εναλλασσόμενου ρεύματος είναι επίσης εφικτή. Η σταγόνα υφίσταται δύο είδη ηλεκτροστατικών δυνάμεων, την ηλεκτροστατική άπωση ανάμεσα στα φορτία της επιφάνειας και τη δύναμη Coulombπου ασκείται από το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο. Υπό την επίδραση των ηλεκτροστατικών αυτών δυνάμεων, η υγρή σταγόνα, μετατρέπεται σε κώνο, ο οποίος είναι γνωστός και ως κώνος Taylor. Όταν η δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου ξεπεράσει μία οριακή τιμή, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις υπερβαίνουν την επιφανειακή τάση του πολυμερικού διαλύματος κι έτσι αναγκάζουν την εκτίναξη της υγρής εκροής από το άκρο της βελόνας (38). Η υδροστατική πίεση δημιουργείται από μια αντλία αέρα, που ελέγχεται από βαλβίδες, και διαβάζεται σε ένα μανόμετρο. Η πίεση ρυθμίζεται ώστε να κρατήσει το διάλυμα στην άκρη του σωλήνα, χωρίς όμως να στάζει. Το διάλυμα φορτίζεται συνδέοντας το μεταλλικό ηλεκτρόδιο σε μία πηγή υψηλής τάσης. Μία μεταλλική οθόνη χρησιμοποιείται ως συλλέκτης για τις φορτισμένες ίνες ή σωματίδια. Η οθόνη τοποθετείται σε μονωμένη βάση της οποίας το δυναμικό μπορεί επίσης να ελεγχθεί (37).

Κατά την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, υπάρχει δυνατότητα εγκλεισμού με μονοαξονικό ή ομοαξονικό τρόπο. Κατά τον μονοαξονικό τρόπο, χρησιμοποιείται γαλάκτωμα του πολυμερούς και της ουσίας προς εγκλεισμό και άρα ο βιοδραστικός παράγοντας ενθυλακώνεται στον πυρήνα και δεν διασπείρεται ομοιόμορφα μέσα στις ίνες ή τα σωματίδια. Κατά τον ομοαξονικό τρόπο, η διεργασία περιλαμβάνει δύο ακροφύσια και άρα αποφεύγονται οι επιζήμιες επιδράσεις από την άμεση επαφή των βιοδραστικών ουσιών με τους οργανικούς διαλύτες.

Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, διακρίνεται σε ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning), όταν παράγονται συνεχείς ίνες και σε ηλεκτροστατικό ψεκασμό (electrospraying), όταν παράγονται σωματίδια. Η δημιουργία ινών ή σωματιδίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος πολυμερούς, όπου η χαμηλή συγκέντρωση οδηγεί στην δημιουργία σωματιδίων, ενώ η υψηλή συγκέντρωση, οδηγεί στην δημιουργία ινών.

1.4.4.2 Παράμετροι της διεργασίας

Η μορφολογία των εγκλεισμένων δομών εξαρτάται από τις ιδιότητες του διαλύματος και τις συνθήκες επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα:

Παράγοντες που αφορούν στις ιδιότητες του διαλύματος

- Ο τύπος του πολυμερούς
- Η ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Η επιφανειακή τάση

Παράγοντες που αφορούν στις συνθήκες επεξεργασίας

- Το ηλεκτρικό πεδίο
- Η απόσταση μεταξύ του ακροφυσίου και του συλλέκτη
- Η παροχή της τροφοδοσίας
- Η θερμοκρασία
- Η υγρασία (39)

1.4.4.3 Πλεονεκτήματα της μεθόδου

Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία αποτελεί μία καινοτόμο μέθοδο εγκλεισμού με την οποία μπορούν να παραχθούν μικροδομές αλλά και νανοδομές με ανώτερα χαρακτηριστικά. Παρουσιάζει υψηλή απόδοση εγκλεισμού χωρίς την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών ή δυσμενών συνθηκών pH που μπορούν να προκαλέσουν την αποικοδόμηση των ευαίσθητων συστατικών. Επίσης, η μέθοδος αυτή, παρουσιάζει εφαρμογές σε προϊόντα τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής, καθώς οδηγεί στην παραγωγή δομών με χρήση υδατικών διαλυμάτων, ενώ ρυθμίζοντας κατάλληλα τις παραμέτρους της διεργασίας, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της μορφολογίας και των δομών.

1.4.4.4 Εφαρμογές

- Φάρμακα

Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για την ενθυλάκωση υδρόφιλων και υδρόφοβων φαρμάκων σε πολυμερικά διαλύματα. Τα υδρόφοβα φάρμακα, αναμιγνύονται αρχικά με πολυμερή, και στη συνέχεια διαλυτοποιούνται σε ήπιους οργανικούς διαλύτες ώστε να ληφθεί το αρχικό διάλυμα. Τα υδρόφιλα φάρμακα, διαλύονται πρώτα σε υδατικό διάλυμα και στην συνέχεια αναμιγνύονται με ένα διάλυμα οργανικού πολυμερούς ώστε να ληφθεί ένα γαλάκτωμα, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται ηλεκτροστατικό ψεκασμό προς τη δημιουργία πολυμερικών σωματιδίων (39).

- Τρόφιμα

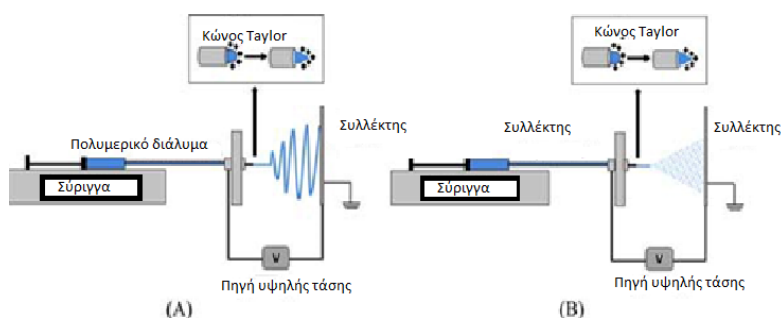
Η ενθυλάκωση των θρεπτικών και λειτουργικών συστατικών των τροφίμων προφέρει προστασία από την αποικοδόμησή τους, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση λειτουργικών

τροφίμων με πρόσθετα οφέλη για την υγεία. Επίσης, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τροφίμων με επιθυμητή υφή και γεύση αλλά και χαμηλό θερμιδικό φορτίο (39).

- Άλλες εφαρμογές

Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή παραγόντων αντίθεσης σε εφαρμογές απεικόνισης. Επίσης, στο πεδίο της ιατρικής, η μέθοδος αυτή έχει δείξει σημαντικές δυνατότητες, όσον αφορά στις ανοσοθεραπείες, στην μηχανική των ιστών και στην κυκλοφορία θρεπτικών συστατικών από και προς τα κύτταρα (39).

Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, περιγράφεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 1-5: Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία (40).

1.4.5 Ξήρανση με ψεκασμό

1.4.5.1 Αρχή της μεθόδου

Κατά τη μέθοδο αυτή, τα βιοενεργά συστατικά, διαλυτοποιούνται ή διασπείρονται σε οργανική ή ελαιώδη φάση και στη συνέχεια ομογενοποιούνται σε υδατική φάση η οποία περιέχει το υλικό της μήτρας. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα κινητικά σταθερό γαλάκτωμα, το οποίο τροφοδοτείται στην κατάλληλη συσκευή και ψεκάζεται σε θερμαινόμενο αέριο (αέρας). Ο αέρας, δημιουργεί μία ελεγχόμενη στροβίλωση, η οποία προκαλεί την αιώρηση των σταγόνων και την ξήρανση. Αναλυτικά τα τέσσερα στάδια της διεργασίας είναι:

- Παρασκευή της υγρής τροφοδοσίας και του θερμαντικού παράγοντα ξήρανσης

Το πρώτο στάδιο της διεργασίας είναι η προετοιμασία της τροφοδοσίας για την οποία χρησιμοποιούνται κυρίως υγρά διαλύματα, εναιωρήματα ή πολτοί. Για την παραγωγή μικροθυλάκων με ξήρανση με ψεκασμό, χρησιμοποιείται ως τροφοδοσία ένα γαλάκτωμα του υλικού του πυρήνα και του υλικού της μήτρας. Για το λόγο αυτό, δύο ή περισσότερες μη αναμίξιμες ουσίες, υποβάλλονται σε διαδικασία ομογενοποίησης. Για να μειωθεί η πιθανότητα υποβάθμισης και διαίρεσης του γαλακτώματος στις φάσεις του, η τροφοδοσία σταθεροποιείται με τη βοήθεια επιφανειοδραστικών ουσιών, των γαλακτωματοποιητών. Το αδιάλυτο υλικό του πυρήνα διασκορπίζεται στο διάλυμα της μήτρας. Το μέγεθος των διασκορπισμένων σωματιδίων μέσα στο γαλάκτωμα επηρεάζει την τελική μορφολογία των

μικροθυλάκων. Εάν τα σταγονίδια του υλικού του πυρήνα είναι μικρότερα από τα σταγονίδια που δημιουργούνται κατά την διάρκεια του ψεκασμού, είναι δυνατόν οι μικροθύλακες να περιέχουν εγκλεισμένους αρκετούς πυρήνες. Σε άλλες περιπτώσεις, δημιουργούνται μικροθύλακες ενός πυρήνα ή τα σωματίδια του πυρήνα είναι πολύ μεγάλα για να εγκλειστούν. Ο έλεγχος του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού του πυρήνα γίνεται κυρίως με μικροσκοπική ανάλυση. Για να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των στερεών, η τροφοδοσία είναι τοποθετημένη σε θερμοστατημένη δεξαμενή με αναδευτήρα αναμόρφωσης για την παροχή ομοιόμορφης συγκέντρωσης στερεών και την πρόληψη της κροκίδωσης. Σε ορισμένες διαδικασίες ξήρανσης με ψεκασμό, η τροφοδοσία αρχικά αφυδατώνεται ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωσή της σε στερεά.

- Ψεκασμός της υγρής τροφοδοσίας

Το δεύτερο στάδιο είναι ο ψεκασμός της ήδη παρασκευασμένης υγρής τροφοδοσίας σε θάλαμο ξήρανσης με ψεκαστήρες, οι οποίοι διασπών το υγρό ρεύμα σε σταγονίδια. Οι ψεκαστήρες αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες:

Ψεκαστήρες πίεσης: Μετασχηματίζουν την ενέργεια πίεσης σε κινητική ενέργεια με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κώνου υγρού στην έξοδο του ακροφυσίου. Ανάλογα με τον τύπο του ακροφυσίου και την διαδικασία που ακολουθείται, μπορεί να δημιουργηθεί μέγεθος σωματιδίου έως 800 μm. Ο ψεκασμός διεξάγεται υπό πίεση από 0,7 έως 3 MPa. Οι ψεκαστήρες πίεσης δεν είναι κατάλληλοι για την μέθοδο την μικροενθυλάκωσης καθώς μπορεί να δημιουργηθεί υψηλή μηχανική καταπόνηση και να καταστρέψει τη δομή των μικροθυλάκων.

Πνευματικοί ψεκαστήρες: Ο ψεκασμός πραγματοποιείται ως αποτέλεσμα σύγκρουσης της τροφοδοσίας με συμπιεσμένο αέριο. Η κινητική ενέργεια που απαιτείται για να σπάσει το ρεύμα υγρού, προέρχεται από το ρεύμα αέρα το οποίο έχει ταχύτητα 100-200 m/s. Ο ψεκασμός με αυτήν τη μέθοδο συνίσταται κυρίως για τροφοδοσίες με υψηλή πυκνότητα και ιξώδες καθώς και για ετερογενείς ουσίες (εναιωρήματα ή γαλακτώματα). Η διάμετρος των σωματιδίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα προσθήκης του αερίου. Ωστόσο, επιπλέον αέρας μπορεί να προκαλέσει τον εγκλεισμό φυσαλίδων στο σωματίδιο και άρα την οξείδωση του υλικού του πυρήνα.

Περιστροφικοί ψεκαστήρες: Το κύριο μέρος των ψεκαστήρων αυτών είναι ένας περιστρεφόμενος δίσκος με διάμετρο 350-500 mm. Ο λόγος κατακερματισμού των σωματιδίων της τροφοδοσίας εξαρτάται από την ταχύτητα περιστροφής του δίσκου η οποία κυμαίνεται από 4000 έως 30000 rpm. Τα σωματίδια εκτοξεύονται από τον ψεκαστήρα λόγω της φυγόκεντρου δύναμης τους δίσκου, ενώ η αρχική τους ταχύτητα είναι σχετικά χαμηλή συγκριτικά με άλλους τύπους ψεκαστήρων. Οι περιστροφικοί ψεκαστήρες, χρησιμοποιούνται κυρίως για τον ψεκασμό χημικά ενεργών υγρών, που μπορεί να διαβρώσουν ή να φράξουν το ακροφύσιο. Οι ψεκαστήρες αυτοί προτιμώνται για τον εγκλεισμό με ξήρανση με ψεκασμό, λόγω της χαμηλής μηχανικής αντοχής και του καλού ελέγχου του μεγέθους των δημιουργούμενων σωματιδίων.

Ειδικοί ψεκαστές: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ψεκαστές που κατασκευάζονται για σκοπούς μεμονωμένων εγκαταστάσεων. Παραδείγματα τέτοιων είναι οι ψεκαστές με μεγάλη ικανότητα επεξεργασίας (πύργοι ψύξης), οι ακουστικοί ψεκαστές οι οποίοι χρησιμοποιούν ηχητικά κύματα, οι υπερηχητικοί ψεκαστές και οι ηλεκτροστατικοί ψεκαστές. Επίσης στην αγορά διατίθενται νέες κατασκευές ψεκαστών μονοδιασποράς στους οποίους τα σταγονίδια δημιουργούνται από την κίνηση ενός πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου το οποίο διαταράσσει το υγρό ρεύμα και το αποσυνθέτει σε σταγονίδια. Ένας ακριβής έλεγχος των δημιουργούμενων σωματιδίων επιτρέπει την πρόβλεψη της δομής και της μορφολογίας των παραγόμενων θυλάκων, ενώ βοηθά στον σχεδιασμό νέων ιδιοτήτων υλικών.

- Ξήρανση σωματιδίων λόγω επαφής με τον παράγοντα ξήρανσης

Κατά το στάδιο αυτό, τα σωματίδια εισέρχονται στον θάλαμο ξήρανσης όπου ξηραίνονται με θερμό, κυρίως, αέρα. Σε περιπτώσεις όπου σχηματίζεται εύφλεκτος ατμός λόγω της εξάτμισης, χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια όπως το άζωτο. Η διαδικασία ξήρανσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους: ίδιο ρεύμα αέρα και υγρού, αντίθετο ρεύμα ή συνδυασμός και των δύο.

- Συλλογή προϊόντος

Κατά το στάδιο αυτό, το αποξηραμένο υλικό μπορεί να ανακτηθεί είτε μαζί είτε χωρίς τον παράγοντα ξήρανσης. Η ανάκτηση της σκόνης μαζί με τον παράγοντα ξήρανσης αποτελεί τον ευκολότερο τρόπο στους θαλάμους ξήρανσης με κωνικό πυθμένα. Ωστόσο, σε κατασκευές όπου η βαρυντική εκροή των σωματιδίων είναι δύσκολη, είναι απαραίτητη η εγκατάσταση μίας πρόσθετης συσκευής ώστε να πιέζει το προϊόν. Σε κατασκευές όπου η σκόνη ανακτάται χωρίς τον παράγοντα ξήρανσης, η διαίρεση των φάσεων πραγματοποιείται στο εσωτερικό του θαλάμου, όπου τα σωματίδια πέφτουν στον πυθμένα και ο παράγοντας ξήρανσης ανακτάται στην κορυφή του πύργου.

1.4.5.2 Παράμετροι της διεργασίας

Η μορφολογία των εγκλεισμένων δομών εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του μίγματος τροφοδοσίας και τις συνθήκες επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα:

Παράγοντες που αφορούν στις συνθήκες της διεργασίας

- Η θερμοκρασία εισόδου του αέρα
- Η θερμοκρασία εξόδου του αέρα
- Η παροχή της τροφοδοσίας
- Ο χρόνος παραμονής
- Το υλικό και η μορφολογία του ακροφυσίου

Παράγοντες που αφορούν στα χαρακτηριστικά του μίγματος τροφοδοσίας

- Το ιξώδες
- Η περιεκτικότητα σε στερεά

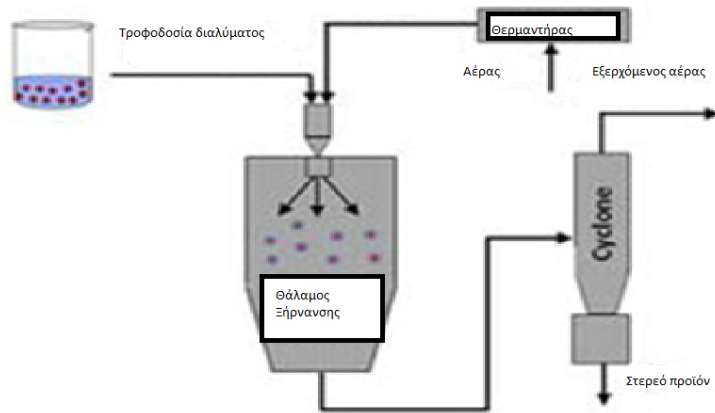
- Η επιφανειακή τάση
- Η πτητικότητα του διαλύτη

1.4.5.3 Πλεονεκτήματα της μεθόδου

Η ξήρανση με ψεκασμό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ξήρανση θερμικά ευαίσθητων τροφίμων, φαρμακευτικών και άλλων ουσιών, λόγω της ταχείας εξάτμισης του διαλύτη από τα σταγονίδια. Παρότι θεωρείται κυρίως διαδικασία αφυδάτωσης, η ξήρανση με ψεκασμό μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος εγκλεισμού. Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές μικροενθυλάκωσης, προσφέρει το ελκυστικό πλεονέκτημα μικροκαψουλών με μία σχετικά απλή διαδικασία συνεχούς επεξεργασίας. (49) Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής περιλαμβάνουν επίσης την υψηλή αποτελεσματικότητα εγκλεισμού, την αποτροπή της εξόδου του εγκλεισμένου υλικού από την μήτρα, την προστασία των επιθυμητών ιδιοτήτων της εγκλεισμένης ουσίας, όπως το άρωμα και η λειτουργικότητα, αλλά και την απελευθέρωση του εγκλεισμένου συστατικού με ελεγχόμενο τρόπο.

1.4.5.4 Εφαρμογές

- Τρόφιμα:
Η ξήρανση με ψεκασμό προτείνεται στη βιομηχανία τροφίμων καθώς μειώνει την αντιδραστικότητα του ενεργού υλικού με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, μειώνει το ποσοστό μεταφοράς του ενεργού υλικού προς το περιβάλλον του και ελέγχει την απελευθέρωση του ενεργού υλικού. Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται κυρίως για την ενθυλάκωση γεύσεων, λιπιδίων και καρτενοειδών (41).
- Φάρμακα:
Η χρήση της ξήρανσης με ψεκασμό στην φαρμακοβιομηχανία, ξεκίνησε το 1940 και αφορά σε εγχύσεις, εκχυλίσματα, ανόργανα φαρμακευτικά άλατα, αδρεναλίνη και βιταμίνη C. Επίσης αφορά στην απομόνωση δραστικών συστατικών που είναι θερμικά ευαίσθητα ή δύσκολο να κρυσταλλωθούν (42).
- Άλλες εφαρμογές:
Η ξήρανση με ψεκασμό μπορεί να εφαρμοστεί στην βιομηχανία χρωμάτων, σε κεραμικά υλικά, σε υποστηρίγματα καταλυτών και σε μικρόφύκη.
Η διεργασία της ξήρανσης με ψεκασμό, περιγράφεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 1-6: Διεργασία της ξήρανσης με ψεκασμό (40)

2 Πειραματικό μέρος

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλεισμός των γλυκοζιτών στεβιόλης, χρησιμοποιώντας της μεθόδους του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης με ψεκασμό. Οι μήτρες που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό, είναι η ζεΐνη, και μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης σε αναλογία 50:50. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των εγκλεισμένων σωματιδίων, με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), και της φασματοσκοπίας υπεράυθρου (FTIR), προς απόδειξη της δημιουργίας νέου συμπλόκου. Το ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού, υπολογίστηκε έμμεσα, με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

2.1 Πειραματικός εξοπλισμός

2.1.1 Συσκευές

- Ζυγός Kern&Sohn GmbH (Germany)
- Φυγόκεντρος NF 400 Nuve (Turkey)
- Συσκευή διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC 6 Pyris Perkin Elmer
- Μαγνητικός αναδευτήρας CAT
- Συσκευή ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας FLUIDNATEK LE-10, Bioinicia
- Συσκευή HPLC Shimadzu HP 1100 Series (USA)
- Ξηραντήρας με ψεκασμό (ModelYC-015, Shanghai Pilotech Instrument & Equipment Co. Ltd)
- FT/ IR-4200, JASCO International Co., Ltd. Japan

2.1.2 Αντιδραστήρια

- Υπερκάθαρο νερό
- Σκόνη εκχυλίσματος *Stevia*
- Ζεΐνη
- Οξικό οξύ
- Αιθανόλη
- Μεταλλικό Νερό
- Μαλτοδεξτρίνη
- Ινουλίνη

Έκτος από τα παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, σφαιρικές φιάλες, σύριγγες, φίλτρα, falcon, σπαθίδες.

2.2 Πειραματική διαδικασία

2.2.1 Εγκλεισμός

2.2.1.1 Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία

Προετοιμασία διαλυμάτων

Κατά την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, ως μήτρα εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκε το φυσικό πολυμερές ζεΐνη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα όγκου 50 ml σε 2 επίπεδα συγκέντρωσης 10% και 15% w/v ζεΐνης, σε διάλυμα νερού-αιθανόλης σε αναλογία 90:10. Η συγκέντρωση της *Stevia* και στα δύο διαλύματα ήταν 10% ως προς τη ζεΐνη. Συγκεκριμένα, για το διάλυμα συγκέντρωσης 10% αναμίχθηκαν 5g ζεΐνης με 0,5g σκόνης *Stevia*. Στη συνέχεια προστέθηκαν 40,5 ml αιθανόλης και 4,5 ml νερό. Για το διάλυμα συγκέντρωσης 15% αναμίχθηκαν 7,5 g ζεΐνης με 0,75g σκόνης *Stevia*. Στη συνέχεια προστέθηκαν 38,25 ml αιθανόλης και 4,25 ml νερό. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 4 h.

Τα διαλύματα ζεΐνης-*Stevia* τοποθετούνταν στη συνέχεια σε σύριγγα των 10 mL. Παράλληλα, σε δεύτερη σύριγγα τοποθετούνταν οξικό οξύ, το οποίο προφύλασσε τον διαλύτη, δηλαδή την αιθανόλη, από άμεση εξάτμιση.

Ανάπτυξη εγκλεισμένων δομών

Η ανάπτυξη των εγκλεισμένων δομών πραγματοποιήθηκε στη συσκευή ηλεκτροστατικού ψεκασμού FluidNatek L-10, Bioinicia, η οποία φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

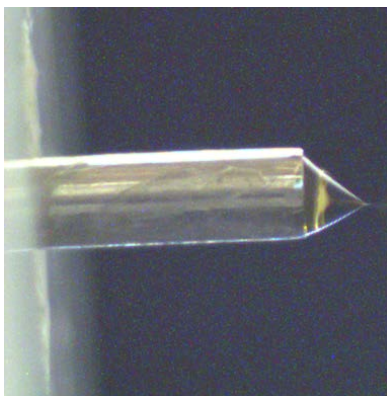


Εικόνα 2-1: Συσκευή Ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας- FLUIDNATEK LE-10, Bioinicia.

Τα βασικά εξαρτήματά της είναι:

- σύριγγες τροφοδοσίας
- μία βελόνα από ανοξείδωτο χάλυβα με αμβλύ άκρο
- μία αντλία, για την κίνηση των συριγγών, που περιέχουν τα διαλύματα
- ένα τροφοδοτικό – πηγή παροχής υψηλής τάσης 0-30 kV
- ένας γειωμένος συλλέκτης

Οι δύο σύριγγες τοποθετούνταν στη συσκευή του ηλεκτροστατικού ψεκασμού, ενώ στο συλλέκτη τοποθετούνταν αλουμινόχαρτο. Ρυθμιζόταν κατάλληλα η τάση, η ροή και η απόσταση του συλλέκτη από τη βελόνα και ξεκινούσε η διεργασία του εγκλεισμού. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η ροή (200, 300 και 400 $\mu\text{L}/\text{h}$) και η απόσταση της οθόνης συλλογής (8, 10 και 12 cm). Μετά από προκαταρκτικά πειράματα, η επιβαλλόμενη τάση για όλα τα δείγματα καθορίστηκε στα 28,5 kV. Στην Εικόνα 2-1 φαίνεται ο κώνος Taylor ως αποτέλεσμα της επίδρασης των ηλεκτροστατικών δυνάμεων στην σταγόνα του πολυμερικού διαλύματος. Μετά το πέρας της διεργασίας, με χρήση γαντιού, συλλεγόταν το προϊόν από το αλουμινόχαρτο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2-2 και τοποθετούνταν σε κατάλληλο υάλινο δοχείο.



Εικόνα 2-2: Κώνος Taylor



Εικόνα 2-3: Προϊόν ηλεκτροστατικού ψεκασμού πολυμερικού διαλύματος ζεΐνης-Stevia

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δύο επαναλήψεις. Ακολουθήθηκε πλήρης σχεδιασμός (full design) και παρακάτω φαίνεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων.

Πίνακας 2-1: Συνθήκες λειτουργίας κατά την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία.

Παράμετρος	Τιμές/Κωδικοποίηση			Κεντρικές τιμές
	-1	0	1	
Απόσταση βελόνας από συλλέκτη, L (cm)	8	10	12	10
Ροή διαλύματος, V (μL/h)	200	300	400	300
Συγκέντρωση ζεΐνης, C (%)		10	15	

Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι οι εξής:

Πίνακας 2-2: Κωδικοποίηση δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού

Κωδικός δείγματος	Ροή (μL/h)	Απόσταση (cm)	Συγκέντρωση ζεΐνης (%)
E-1-10	200	8	10
E-100	200	10	10
E-110	200	12	10
E0-10	300	8	10
E000	300	10	10
E010	300	12	10
E1-10	400	8	10
E100	400	10	10
E110	400	12	10
E-1-11	200	8	15
E-101	200	10	15
E-111	200	12	15
E0-11	300	8	15
E001	300	10	15
E011	300	12	15
E1-11	400	8	15
E101	400	10	15
E111	400	12	15

2.2.1.2 Ξήρανση με ψεκασμό

Προετοιμασία διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν διαλύματα όγκου 1,5 L συγκέντρωσης 5% και 10% w/v μίγματος μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης (50:50), σε υπερκάθαρο νερό. Η συγκέντρωση της *Stevia* και στα δύο διαλύματα ήταν 10% ως προς το μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης. Συγκεκριμένα, για το διάλυμα συγκέντρωσης 5% αναμίχθηκαν 37,5 g μαλτοδεξτρίνης με 37,5 g ινουλίνης και με 7,5g σκόνης *Stevia*. Στη συνέχεια προστέθηκε 1,5 L υπερκάθαρου νερού. Για το διάλυμα

συγκέντρωσης 10% αναμίχθηκαν 75 g μαλτοδεξτρίνης με 75 g ινουλίνης και 15 g σκόνης *Stevia*. Στη συνέχεια προστέθηκε 1,5 L υπερκάθαρου νερού. Τα δύο διαλύματα τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 2 L.

Ανάπτυξη εγκλεισμένων δομών

Η ανάπτυξη των εγκλεισμένων δομών πραγματοποιήθηκε στη συσκευή ξήρανσης με ψεκάσμο Model YC-015, που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 3-2: Ξηραντήρας με ψεκάσμο (Model YC-015, Shanghai Pilotech Instrument & Equipment Co. Ltd)

Τα διαλύματα που παρήχθησαν τροφοδοτήθηκαν στον ξηραντήρα προς παραγωγή σκόνης. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η ροή (600, 800 και 1000 mL/h) και η θερμοκρασία (160, 170 και 180°C). Στη συνέχεια, η παραγόμενη σκόνη, συλλεγόταν με σπαθίδα και τοποθετούνταν σε ειδικά υάλινα δοχεία. Ακολουθήθηκε πλήρης σχεδιασμός (full design) και παρακάτω φαίνεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δύο επαναλήψεις.

Πίνακας 2-3: Συνθήκες λειτουργίας κατά την ξήρανση με ψεκάσμο

Παράμετρος	Τιμές/Κωδικοποίηση			Κεντρικές τιμές
	-1	0	1	
Θερμοκρασία εισόδου (θερμοκρασία εξόδου), T (°C)	160 (95)	170 (100)	180 (105)	170
Ροή διαλύματος, V (mL/h)	600	800	1000	800
Συγκέντρωση μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης(50:50), C(%)		5	10	

Η θερμοκρασία εξόδου εξαρτήθηκε από τη θερμοκρασία εισόδου.

Με βάση τα παραπάνω προκύπτουν οι ακόλουθοι κωδικοί δειγμάτων για την ξήρανση με ψεκασμό:

Πίνακας 2-4: Κωδικοποίηση δειγμάτων ξήρανσης με ψεκασμό

Κωδικός δείγματος	Ροή (μL/h)	Θερμοκρασία (T)	Συγκέντρωση μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης (%)
S-1-10	600	160	5
S-100	600	170	5
S-110	600	180	5
S0-10	800	160	5
S000	800	170	5
S010	800	180	5
S1-10	1000	160	5
S100	1000	170	5
S110	1000	180	5
S-1-11	600	160	10
S101	600	170	10
S-111	600	180	10
S0-11	800	160	10
S001	800	170	10
S011	800	180	10
S1-11	1000	160	10
S101	1000	170	10
S111	1000	180	10

2.3 Μελέτη των ανεπτυγμένων εγκλεισμένων δομών

2.3.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

2.3.1.1 Βασικές αρχές

Η υπέρυθη (infrared –IR) φασματοσκοπία, αποτελεί από το 1950 ένα από τα παλαιότερα και περισσότερο καθιερωμένα χημικά εργαλεία ανάλυσης. Αποτελεί μία φασματοσκοπική τεχνική μοριακής δόνησης ή περιστροφής, καθώς η ακτινοβολία που απορροφάται από το δείγμα προκαλεί διέγερση των μορίων σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής των δεσμών των μορίων. Μόνο οι ομοιοπολικοί δεσμοί που διαθέτουν

διπολική ροπή μπορούν να απορροφήσουν ακτινοβολία στην περιοχή του υπερύθρου και να δώσουν τα αντίστοιχα φάσματα. Παλιότερα, τα φάσματα καταγράφονταν χρησιμοποιώντας τη λεγόμενη τεχνική διασποράς, δηλαδή με όργανα πλέγματος ή πρίσματος. Πλέον χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο τα φασματοόμετρα μετασχηματισμού Fourier (Fourier transform infrared spectrometers-FTIR) τα οποία χρησιμοποιούν συμβολόμετρο αντί για μονοχρωμάτορα με αποτέλεσμα να κατευθύνονται στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα. (43)

2.3.1.2 Συσκευή FTIR

Τα τρία βασικά μέρη του φασματοόμετρου FTIR με συμβολόμετρο είναι:

Πηγή: Ως πηγή χρησιμοποιούνται κυρίως λυχνίες Global ή Nerst

Συμβολόμετρο: Το πιο διαδεδομένο είναι το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο αποτελείται από δύο κάτοπτρα M1 και M2 εκ των οποίων το ένα παραμένει σταθερό και το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα. Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο το οποίο είναι κατασκευασμένο από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθρη περιοχή. Η θέση του συμβολόμετρου είναι μετά το δείγμα καθώς η υπερίσως ακτινοβολία έχει υψηλή ενέργεια και προκαλεί αλλοίωση του δείγματος.

Ανιχνευτής: Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι θερμικοί (θερμοζεύγη) και προσδιορίζουν τη θερμότητα που παράγεται κατά την απορρόφηση της ακτινοβολίας.

Κατά τη λειτουργία του φασματοόμετρου, η υπέρυθρη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή, κατευθύνεται προς τον διαχωριστή δέσμης όπου διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, όπου ή μία προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο, ενώ η άλλη στο κινητό. Στη συνέχεια, οι δύο δέσμες αντανακλώνται και επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλουν. Ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στον θάλαμο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο επιστρέφει στην πηγή.

2.3.1.3 Αποτελέσματα FTIR

Τα φάσματα IR έχουν ως τεταγμένη την % διαπερατότητα του δείγματος, και ως τετμημένη τον κυματαριθμό σε cm^{-1} . Η απορρόφηση σχηματίζεται ως ανάποδη κορυφή και χαρακτηρίζεται από τον κυματαριθμό και στην ένταση. Η ταυτοποίηση μιας ουσίας γίνεται με σύγκριση του φάσματός της με το φάσμα μίας πρότυπης ουσίας.

Η φασματοσκοπία FTIR μπορεί να εφαρμοσθεί σε μικροαναλύσεις όπου απαιτείται υψηλή ευαισθησία, σε αναλύσεις υδατικών διαλυμάτων ή σκόνων στερεών δειγμάτων, σε έρευνες όπου δίνουν έμφαση στην ποσοτική αξιολόγηση αλλά και σε πειράματα όπου ο χρόνος αποτελεί περιοριστικό παράγοντα.

2.3.1.4 Μεθοδολογία

Όσον αφορά στην ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, απαιτείται αρχικά έκπλυση των παραγόμενων δομών για την απομάκρυνση της ποσότητας stevia που δεν έχει εγκλειστεί. Η

έκπλυση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με υπερκάθαρο νερό, το οποίο διαλύει τη stevia αλλά όχι το πολυμερές ζεΐνη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα, με διάλυση 5 mg των δειγμάτων σε 5 mL υπερκάθαρο νερό. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν στο Vortexγια 2 min και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για 5 min, στις 3000 στροφές. Το ίζημα των διαλυμάτων ξηράνθηκε σε φούρνο κενού στους 40°C για 20 h. Στη συνέχεια, κονιοποιήθηκε και μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα στον κρύσταλλο του οργάνου.

Όσον αφορά στην ξήρανση με ψεκασμό, μικρή ποσότητα των δειγμάτων τοποθετήθηκε απευθείας στον κρύσταλλο του οργάνου.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε η συσκευή FT/ IR-4200, JASCO International Co., Ltd. Japan.

2.3.2 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC)

2.3.2.1 Βασικές αρχές-Λειτουργία συσκευής

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης είναι μία τεχνική θερμικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται περισσότερο από δύο δεκαετίες. Με τη μέθοδο αυτή, μπορεί να γίνει μέτρηση των θερμοκρασιών και των ροών θερμότητας που σχετίζονται με αλλαγές που συμβαίνουν στα υλικά, συναρτήσει του χρόνου και της θερμοκρασίας. Τέτοιες μετρήσεις παρέχουν ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες σχετικά με τις φυσικές ή χημικές αλλαγές που συνεπάγονται οι ενδόθερμες ή εξώθερμες διεργασίες. Το DSC είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος θερμικής ανάλυσης με εφαρμογές σε πολυμερείς, οργανικές αλλά και ανόργανες ουσίες. (44)

Η συσκευή που χρησιμοποιείται αποτελείται από ένα σύστημα δύο κυψελίδων, οι οποίες θερμαίνονται ή ψύχονται ομοιόμορφα με σταθερό ρυθμό. Η μία κυψελίδα περιέχει το δείγμα, ενώ η άλλη το υλικό αναφοράς. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης, η θερμοκρασία των δύο ουσιών παραμένει ίση και μετράται η διαφορά στη ροή θερμότητας που προσφέρεται ή απάγεται στο υπό μελέτη δείγμα για την αύξηση ή μείωση της θερμοκρασίας του έναντι αυτής που προσφέρεται ή απάγεται στο δείγμα αναφοράς, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να καταγραφούν τα ποσά ενέργειας που απορροφώνται ή απελευθερώνονται κατά τη μετατροπή των διαφόρων φάσεων. Στη συνέχεια καταγράφεται η ροή θερμότητας ως συνάρτηση του χρόνου ή της θερμοκρασίας για τα εξώθερμα ή ενδόθερμα φυσικοχημικά φαινόμενα. (45)

2.3.2.2 Αποτελέσματα DSC

Τα διαγράμματα που προκύπτουν απεικονίζουν κορυφές απορρόφησης ή απόδοσης θερμότητας στις διάφορες θερμοκρασίες, οι οποίες αποτελούν τις θερμοκρασίες αυτές στις οποίες μετατρέπεται η φάση του δείγματος. Η ενθαλπία των μετατροπών μπορεί να υπολογιστεί με βάση το εμβαδόν των κορυφών αυτών.

Μία σημαντική πληροφορία, που παρέχεται από τα διαγράμματα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, είναι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (glass transition temperature - T_g). Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης είναι η θερμοκρασία κάτω από την

οποία οι φυσικές ιδιότητες των πολυμερών μεταβάλλονται σε εκείνες μίας υαλώδους ή κρυσταλλικής κατάστασης. Πάνω από τη θερμοκρασία αυτή, το υλικό συμπεριφέρεται ως ελαστικό. Στην ουσία, δεν πρόκειται για μία διακριτή θερμοδυναμική μετάβαση, αλλά για μία περιοχή θερμοκρασιών πάνω από την οποία η κινητικότητα των αλυσίδων αυξάνεται σημαντικά. Η T_g είναι απαραίτητη για την εξέταση πολυμερών που προορίζονται για συγκεκριμένη τελική χρήση (55).

Στις εγκλεισμένες δομές, σημαντικός, είναι ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης, καθώς χαρακτηρίζει την αλλαγή στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της μήτρας και της εγκλεισμένης ουσίας, αλλά την ανθεκτικότητα των τελικών σωματιδίων.

2.3.2.3 Μεθοδολογία

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης προσδιορίστηκε με χρήση συσκευής διαφορικής θερμίδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) (Perkin Elmer DSC 6, CT, USA), η οποία χρησιμοποιεί λογισμικό Pyris 6 (Software, Perkin Elmer).

Για τη δημιουργία αδρανούς ατμόσφαιρας χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο, με παροχή 20 mL/min. Ποσότητα περίπου 5mg από κάθε δείγμα σφραγίστηκε σε δειγματοφορέα αλουμινίου, ο οποίος εισήχθη στη συσκευή DSC. Ένας κενός, σφραγισμένος δειγματοφορέας χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς. Τα δείγματα υποβλήθηκαν στο παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα τριών κύκλων:

Δείγματα ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας

Κύκλος 1: Θέρμανση από τους 25°C μέχρι τους 200°C, με ρυθμό 5°C/min

Κύκλος 2: Ψύξη από τους 200°C μέχρι τους 25°C, με ρυθμό 10°C/min

Κύκλος 3: Θέρμανση από τους 25°C μέχρι τους 250°C, με ρυθμό 5°C/min

Δείγματα ξήρανσης με ψεκασμό

Κύκλος 1: Θέρμανση από τους -15°C μέχρι τους 160 °C, με ρυθμό 5°C/min

Κύκλος 2: Ψύξη από τους 160°C μέχρι τους -15°C, με ρυθμό 10°C/min

Κύκλος 3: Θέρμανση από τους -15°C μέχρι τους 160°C, με ρυθμό 5°C/min

Να σημειωθεί επίσης ότι πριν τον πρώτο κύκλο, πραγματοποιούνταν αναμονή ενός λεπτού στη θερμοκρασία έναρξης. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο επαναλήψεις.

Η συσκευή DSC που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 2-4: Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (PerkinElmerDSC 6).

2.3.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

2.3.3.1 Βασικές αρχές χρωματογραφίας

Ο όρος χρωματογραφία (chromatography) αφορά σε αναλυτικές μεθόδους που αποσκοπούν στον διαχωρισμό ουσιών στα συστατικά τους. Εφαρμόζεται κυρίως για τον προσδιορισμό της παρουσίας ή μη συστατικών σε μίγματα τα οποία περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών/προσμίξεων, γνωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας. Κάθε χρωματογραφική τεχνική αποτελείται από μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τα διαχωριζόμενα συστατικά του μίγματος μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ή ένα σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση είναι ένα πορώδες στερεό υλικό ή ένα υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την αγκιστεία (φυσικοχημική συγγένεια) του συστατικού με την κάθε φάση. Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να διακριθούν με βάση το μέσο στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση (χρωματογραφία στήλης, επίπεδη χρωματογραφία) αλλά και με βάση το είδος της κινητής και στατικής φάσης (υγρή χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία). Επίσης, ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις προς διαχωρισμό ουσίες και τη στατική φάση, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), αποτελεί την πιο εξελιγμένη μορφή χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Η HPLC, διακρίνεται σε κανονικής και αντίστροφης φάσης. Κατά την HPLC κανονικής φάσης, το πληρωτικό υλικό είναι κάποιο πολικό υλικό, ενώ η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας. Με αυτόν τον τρόπο, οι πολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με τη στατική φάση ως προς τις άπολες, οι οποίες και εκλούνται από τη στήλη νωρίτερα. Κατά την HPLC αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι υδρόφοβη, ενώ η κινητή είναι αυξημένης πολικότητας καθώς αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά

ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό. Η έκλυση των προσροφημένων μορίων, επιτυγχάνεται με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης και άρα την ελάττωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών και της στατικής φάσης. Όσο πιο άπολο είναι ένα μόριο, τόσο περισσότερο θα αλληλεπιδρά με τη στατική φάση και τόσο περισσότερη θα είναι η συγκέντρωση του διαλύτη στην κινητή φάση που απαιτείται για την αποδέσμευσή του. Άρα επιτυγχάνεται εκλεκτική έκλυση των άπολων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη.

2.3.3.2 Οργανολογία HPLC

Μια βασική διάταξη υγρής χρωματογραφίας, περιλαμβάνει τα εξής μέρη:

Περιέκτες διαλυτών: Αποτελούν ειδικές φιάλες στις οποίες βρίσκονται οι διαλύτες που αποτελούν την κινητή φάση.

Απαερωτής κενού: Ο απαερωτής είναι απαραίτητος για την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να ελέγχεται η πίεση στη χρωματογραφική στήλη.

Αντλία (pump): Η αντλία χρησιμοποιείται για τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): Αποτελεί έναν βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Τοποθετείται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.

Χρωματογραφική στήλη (column): Στη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του.

Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης πραγματοποιείται με κάποιον ανιχνευτή, συνήθως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετريέται η απορρόφηση του φωτός.

Καταγραφικό: Το μετρούμενο σήμα που καταγράφεται κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης αποστέλλεται σε υπολογιστή.

Δεξαμενή αποβλήτων: Αποτελεί τη δεξαμενή την οποία συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος.

2.3.3.3 Αποτελέσματα HPLC

Από το HPLC, προκύπτουν χρωματογραφήματα, δηλαδή γραφικές παραστάσεις του μετρούμενου από τον ανιχνευτή μεγέθους προς τον χρόνο. Στο χρωματογράφημα σχηματίζονται κορυφές, κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη ουσία, σύμφωνα με τον χρόνο στον οποίο εμφανίζονται. Ο χρόνος αυτός, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για τη μεταφορά της ουσίας από την είσοδο της στήλης μέχρι τον ανιχνευτή, ονομάζεται χρόνος ανάσχεσης και είναι κριτήριο για την ταυτοποίηση της κάθε ουσίας. Επίσης, με βάση το εμβαδόν των κορυφών μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της

εκάστοτε ουσίας. Απαιτείται φυσικά η κατασκευή καμπύλης αναφοράς με πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης της προς μέτρηση ουσίας.

2.3.3.4 Μεθοδολογία

Ο προσδιορισμός του ποσοστού εγκλεισμού της *Stevia* πραγματοποιήθηκε με HPLC.

Όσον αφορά στην ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, απαιτείται αρχικά έκπλυση των παραγόμενων δομών για την απομάκρυνση της ποσότητας *Stevia* που δεν έχει εγκλειστεί. Η έκπλυση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με υπερκάθαρο νερό, το οποίο διαλύει τη *Stevia* αλλά όχι το πολυμερές ζεΐνη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα, με διάλυση 5 mg των δειγμάτων σε 5 mL υπερκάθαρο νερό.

Όσον αφορά στην ξήρανση με ψεκασμό, παρασκευάστηκαν διαλύματα, με διάλυση 0,5 g δειγμάτων σε 5 mL μίγματος υπερκάθαρου νερού- αιθανόλης σε αναλογία 50:50.

Τα διαλύματα αναδεύτηκαν στο Vortex για 2 min και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για 5 min, στις 3000 στροφές. Το υπερκείμενο υγρό φιλτραρίστηκε και τοποθετήθηκε 0,5 mL από κάθε δείγμα σε ειδικά υάλινα δοχεία.

Για την ποσοτικοποίηση του Ρεμπαουβιοσίδη Α, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή HPLC Shimadzu HP 1100 Series (USA) η οποία περιέχει ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) και αυτόματο δειγματολήπτη Agilent 1200 Series. Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε στήλη (250 x 4,6 mm) Luna 5 μm C18 (Phenomenex). Οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής ήταν: θερμοκρασία περιβάλλοντος, ακετονιτρίλιο/νερό (80:20) ως εκλούων διαλύτης σε ρυθμό ροής 1 mL/min και μήκος κύματος του ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού 200 nm (46).

Η συσκευή HPLC που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω μετρήσεις φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Η συσκευή περιέχει ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και αυτόματο δειγματολήπτη Agilent 1200 Series.



Εικόνα 2-5: Διάταξη HPLC Shimadzu HP 1100 Series (USA).

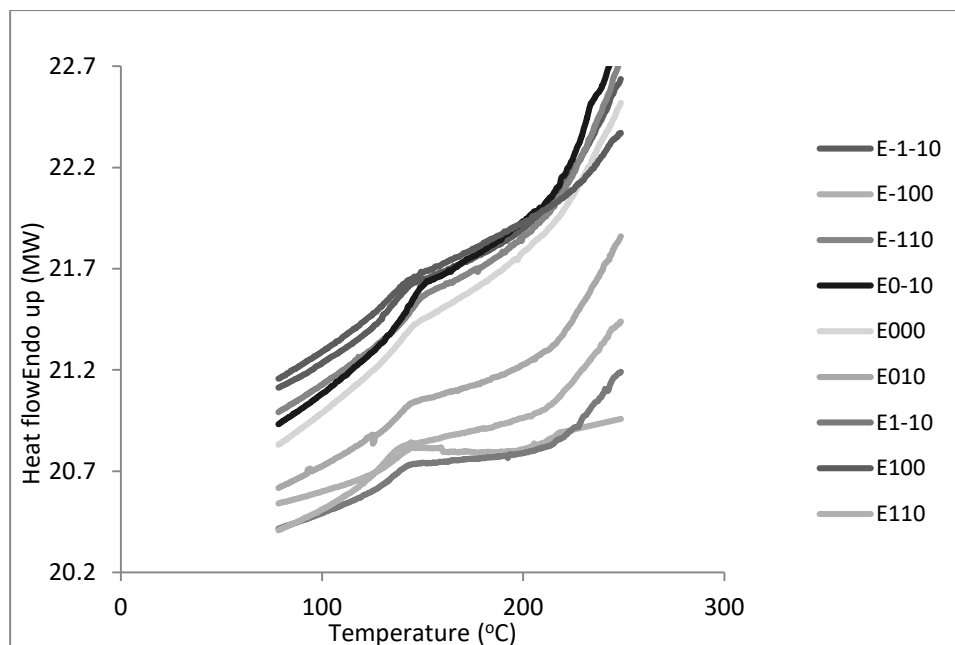
3 Αποτελέσματα

3.1 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης

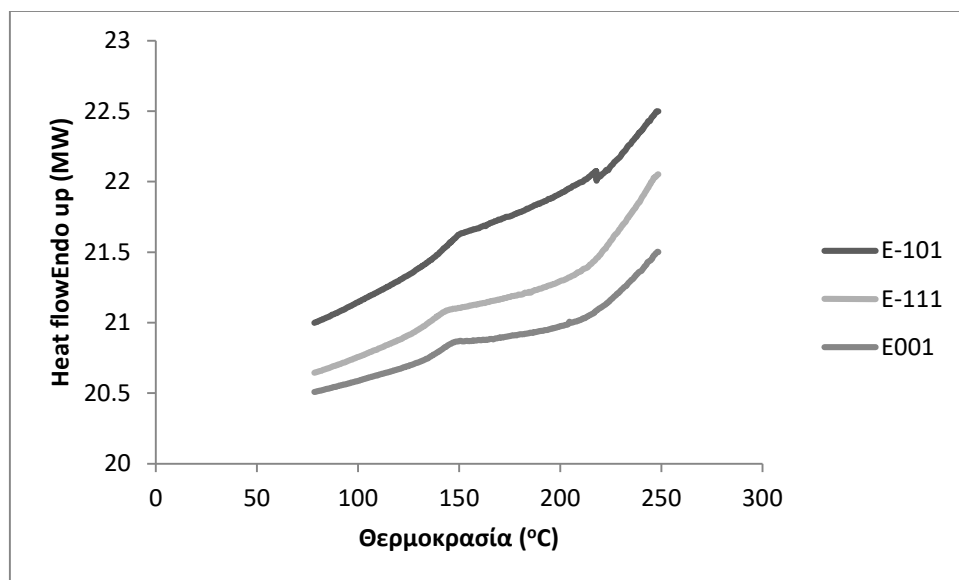
Μελετήθηκε η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) με στόχο τη μελέτη της φυσικής κατάστασης των σωματιδίων ζεΐνης-*Stevia* και μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης-*Stevia* στις διάφορες συνθήκες εγκλεισμού τους.

- Ηλεκτροστατικός ψεκασμός

Κατά την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, μελετήθηκε η επίδραση των παραμέτρων στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του συστήματος ζεΐνης-*Stevia*. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται ενδεικτικά θερμογραφήματα του δεύτερου κύκλου, καθώς ο πρώτος κύκλος είχε ο σκοπό την απομάκρυνση της θερμικής ιστορίας (47).



Γράφημα 3-1: Δεύτερος κύκλος DSC για δείγματα 10% ζεΐνη



Γράφημα 3-2: Δεύτερος κύκλος DSC για δείγματα συγκέντρωσης 15% ζεΐνη.

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα διαγράμματα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης υπολογίστηκε ως η κεντρική τιμή (midpoint) από το δεύτερο κύκλο των θερμογραφημάτων.

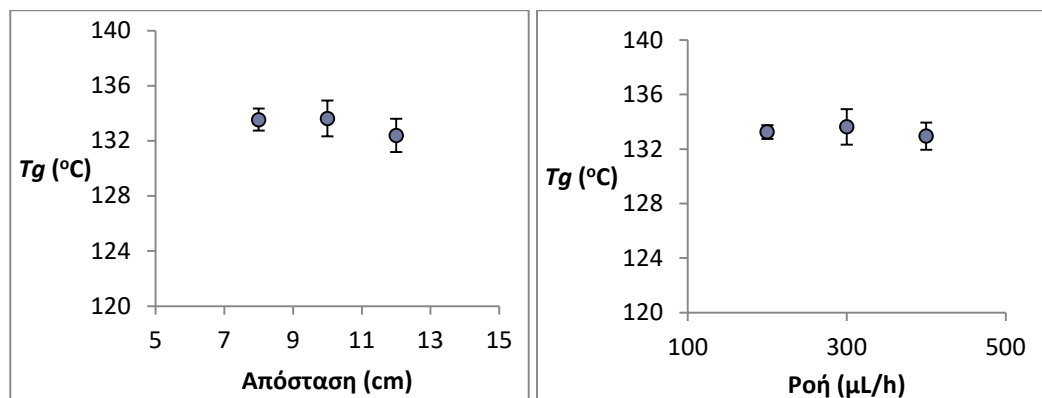
Πίνακας 3-1: T_g δειγμάτων συγκέντρωσης 10% σε ζεΐνη

Κωδικός δείγματος	T_g
E-110	133,04
E-100	133,25
E-110	134,86
E0-10	133,54
E000	133,63
E010	132,39
E1-10	130,12
E100	132,94
E110	132,39

Πίνακας 3-2: T_g δειγμάτων συγκέντρωσης 15% σε ζεΐνη.

Κωδικός δείγματος	T_g
E-101	138,46
E-111	137,13
E001	137,42

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της απόστασης και της ροής.



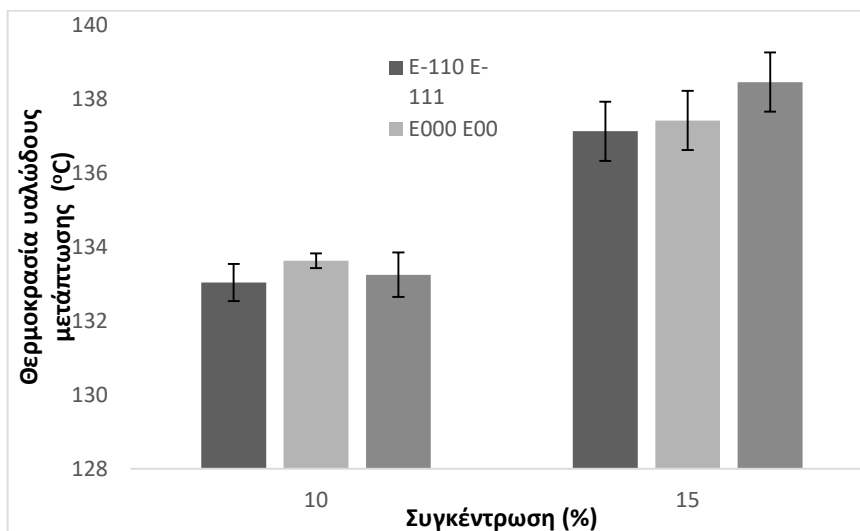
Γράφημα 3-3: Αριστερά: απεικόνιση θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της απόστασης της βελόνας από το συλλέκτη για σταθερή ροή 300 μL/h, Δεξιά: απεικόνιση θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της ροής για σταθερή απόσταση της βελόνας από το συλλέκτη 10 cm

Παρατηρείται ότι οι συνθήκες της διεργασίας (ροή, απόσταση βελόνας από τον συλλέκτη) δεν επηρεάζουν τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Άρα για τη συγκέντρωση ζεΐνης 15% δεν χρειάστηκε να γίνουν μετρήσεις DSC για όλα τα δείγματα.

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης της καθαρής ζεΐνης είναι 139°C (56). Στα δείγματα που μελετήθηκαν όμως η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη. Η υαλώδης μετάπτωση αντιστοιχεί στη μεταβολή της άμορφης περιοχής ενός υλικού, από μία ιξώδη και ελαστομερική συνθήκη σε μία δύσκαμπτη και ψαθυρή. Η μείωση της T_g μπορεί να εξηγηθεί ως αποτέλεσμα της πλαστικοποίησης του ενσωματωμένου συστατικού που σχημάτισε ένα στερεό μίγμα με τη μήτρα κατά τον σχηματισμό των σωματιδίων. Άρα, υποδηλώνεται η ύπαρξη μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της *Stevia* και της ζεΐνης. Η *Stevia* φαίνεται να έχει ενσωματωθεί ικανοποιητικά στα μόρια ζεΐνης αυξάνοντας την κινητικότητα των μοριακών αλυσίδων της, αλλά όχι καταστρέφοντάς την, καθώς τα T_g των δειγμάτων δεν απέχουν πολύ από το T_g της καθαρής ζεΐνης (57).

Παρατηρείται όμως, ότι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης παρουσιάζει μείωση με μείωση της συγκέντρωσης ζεΐνης στο αρχικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεργασία του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το διάλυμα με μικρότερη συγκέντρωση ζεΐνης είχε μεγαλύτερη ποσότητα νερού κατά την παρασκευή του και άρα περισσότερη υγρασία. Το ποσοστό υγρασίας, επηρεάζει το T_g των σωματιδίων καθώς το νερό λειτουργεί ως πλαστικοποιητής για τη ζεΐνη, εμπλέκεται στα μόριά της και δημιουργεί λιγότερο ανθεκτικές δομές (56).

Στο παρακάτω γράφημα, φαίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης της ζεΐνης στην θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης τριών επιλεγμένων δειγμάτων:

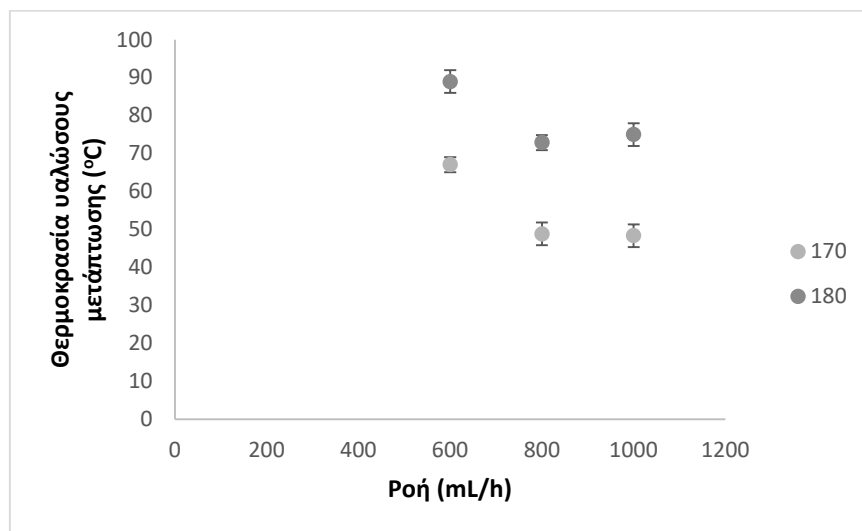


Γράφημα 3-4: Απεικόνιση της επίδρασης της συγκέντρωσης της ζεΐνης στην θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης

- Ξήρανση με ψεκασμό

Κατά την ξήρανση με ψεκασμό, μελετήθηκε η επίδραση των παραμέτρων στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του συστήματος μαλτοξετρίνης-ινουλίνης-*Stevia*.

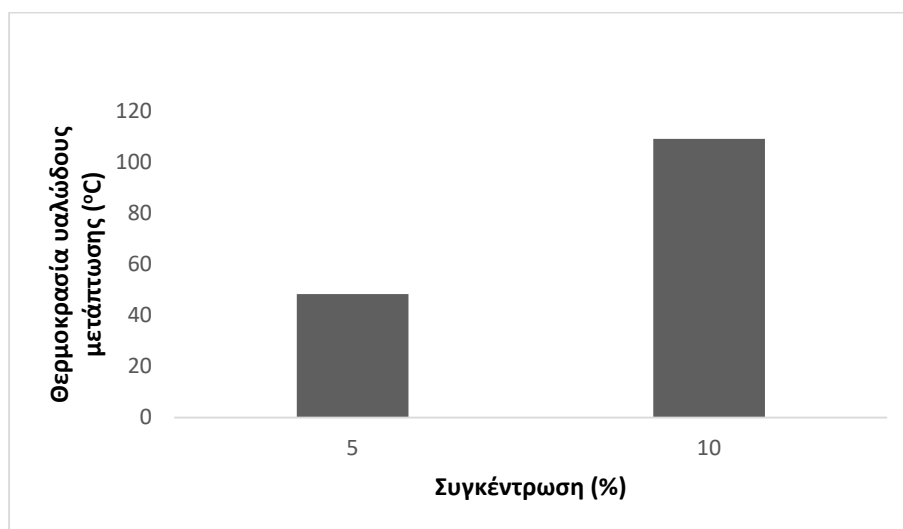
Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της ροής για τις θερμοκρασίες των 170°C και 180°C.



Γράφημα 3-5: απεικόνιση θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης συναρτήσει της ροής για τους 170 και 180 °C

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα, παρατηρείται ότι υπάρχει μείωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης με μείωση της θερμοκρασίας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι αύξηση της θερμοκρασίας σημαίνει μείωση της υγρασίας και άρα αύξηση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης (48).

Η επίδραση της συγκέντρωσης στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα για δύο τυχαία δείγματα:



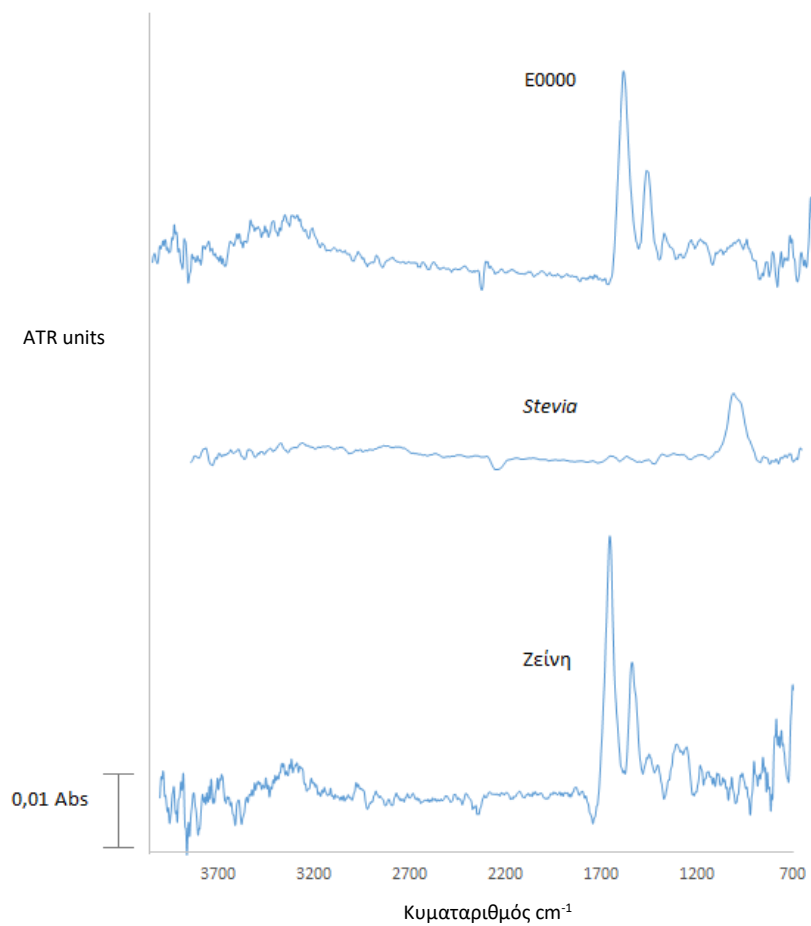
Παρατηρείται ότι αύξηση της συγκέντρωσης της μήτρας, οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης καθώς αυξάνονται τα άμορφα τμήματα του τελικού συστήματος (48).

3.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier

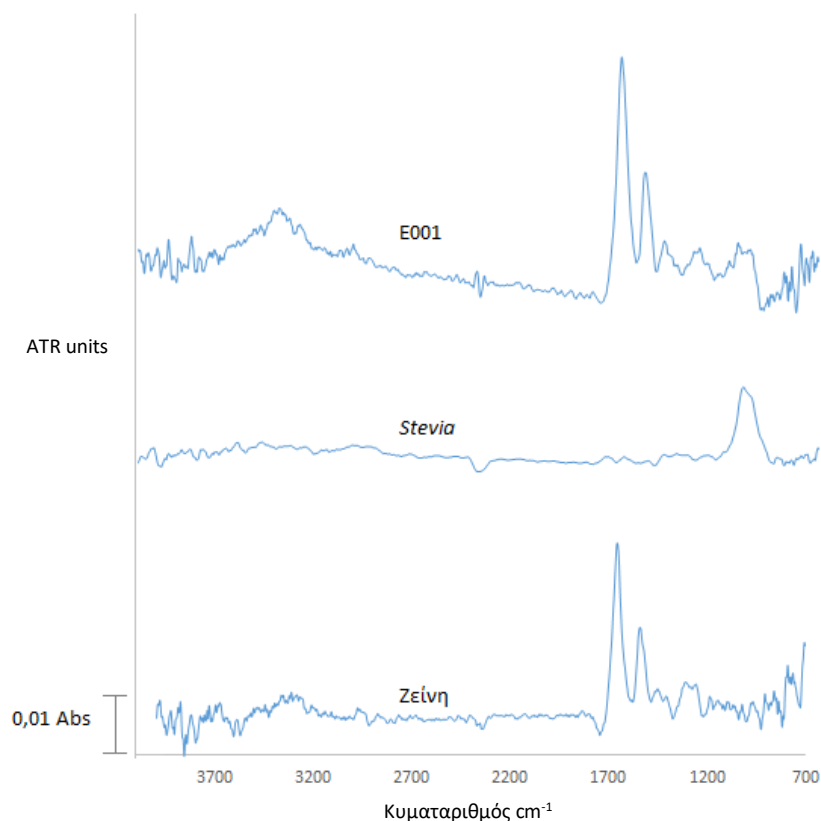
Με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας υπερύθρου, μπορούν να μελετηθούν τα νέα σύμπλοκα που έχουν σχηματιστεί και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μήτρας και του ενεργού συστατικού. Αρχικά, αναλύθηκαν τα δείγματα καθαρής ζεΐνης, καθαρής *Stevia*, μίγματος μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης σε αναλογία 50:50, για να προσδιοριστούν τα φάσματα των καθαρών ουσιών και στη συνέχεια μελετήθηκαν τα δείγματα ζεΐνης-*Stevia* και μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης-*Stevia*.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα που προέκυψαν κατά τη φασματοσκοπία υπερύθρου στις κεντρικές πειραματικές συνθήκες για συγκέντρωση ζεΐνης 10 και 15%, όσον αφορά στον ηλεκτροστατικό ψεκασμό, και για συγκέντρωση μίγματος μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης (50:50) 5 και 10 %, όσον αφορά στην ξήρανση με ψεκασμό:

- Ηλεκτροστατικός ψεκασμός



Γράφημα 3-6: Ανάλυση FTIR για το δείγμα E000, τη Stevia και τη Ζείνη



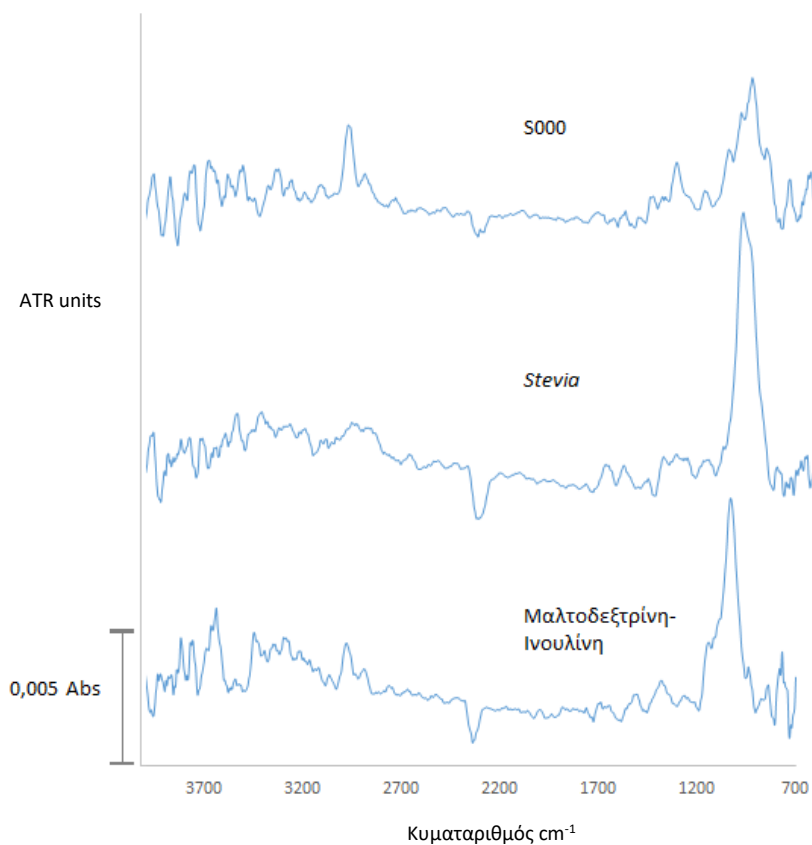
Γράφημα 3-7: Ανάλυση FTIR για το δείγμα E001, τη Stevia και τη ζεΐνη

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω φάσματα, η καθαρή ζεΐνη, έδειξε απορρόφηση σε μήκος κύματος $3600-3100\text{ cm}^{-1}$, η οποία αποδίδεται σε δόνηση καρβοξυλικής ομάδας. Παρακάτω φαίνονται δύο μεγαλύτερες κορυφές, στην περιοχή των 1657 cm^{-1} και 1544 cm^{-1} , οι οποίες αντιστοιχούν σε απορρόφηση αμιδίων I (εκτατική δόνηση του δεσμού C=O) και II αντίστοιχα (δόνηση κάμψης του δεσμού N-H και δόνηση του δεσμού C-N) (49), (47). Γενικά, η δόνηση του αμιδίων I, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, ενώ η δόνηση των αμιδίων II παρουσιάζει πολύ λιγότερη ευαισθησία διαμόρφωσης από τα αμιδία I. Άρα, το γεγονός ότι η κορυφή που οφείλεται στην απορρόφηση των αμιδίων I είναι μεγαλύτερη από αυτήν των αμιδίων II, σημαίνει ότι η πρωτεΐνη έχει δευτεροταγή δομή. (50)

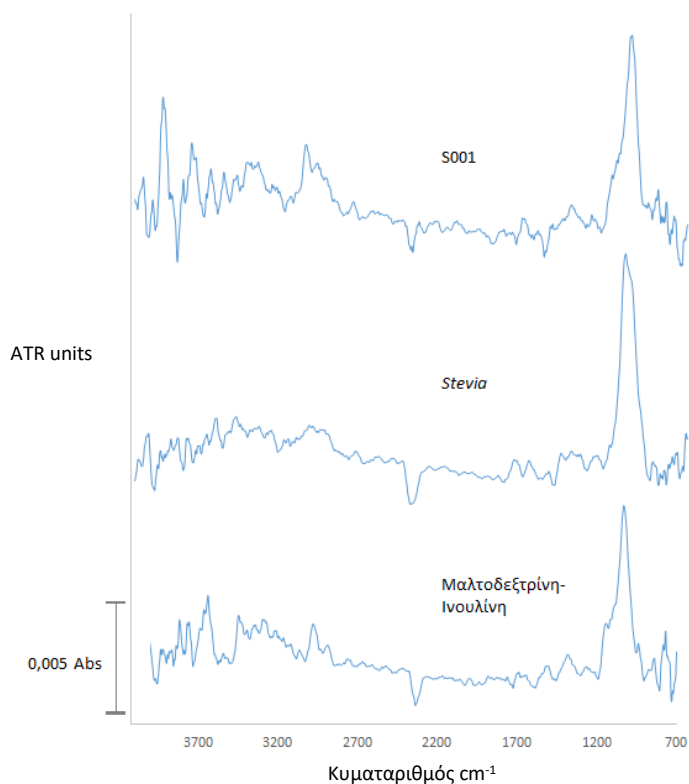
Οι κύριες χαρακτηριστικές κορυφές στην *Stevia*, είναι στην περιοχή των $3600-3100\text{ cm}^{-1}$, η οποία αποδίδεται σε δόνηση της καρβοξυλικής ομάδας, στην περιοχή των 1100 cm^{-1} , λόγω των εστέρων καρβοξυλικού οξέος, στα 1600 cm^{-1} , λόγω του δεσμού C=O και στα 2900 cm^{-1} , λόγω του δεσμού C=C-H (51).

Στα συνολικά φάσματα, οι χαρακτηριστικές κορυφές της καθαρής ζεΐνης και της καθαρής *Stevia*, είναι αμετάβλητες. Οι υδροξυλομάδες στο εξωτερικό του πολυμερούς παραμένουν ανέπαφες και αυτό είναι λογικό, καθώς ο εγκλεισμός γίνεται στην εσωτερική κοιλότητα του πολυμερούς με την ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Επίσης, δεν έχει δημιουργηθεί κάποια νέα κορυφή, γεγονός που σημαίνει ότι δεν αναπτύχθηκε κάποιος χημικός δεσμός ανάμεσα σε μήτρα και ενεργό συστατικό και άρα ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε.

- Ξήρανση με ψεκασμό



Γράφημα 3-8: Ανάλυση FTIR για το δείγμα S000, τη Stevia και το μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης



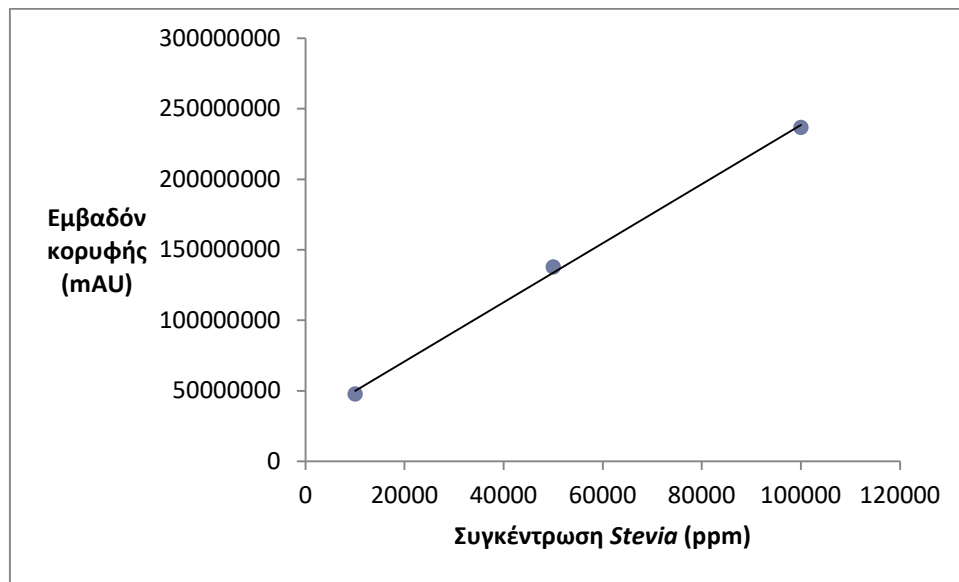
Γράφημα 3-9: Ανάλυση FTIR για το δείγμα S000, τη Stevia και το μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης

Από τα παραπάνω φάσματα, φαίνεται ότι υπάρχει απορρόφηση στα $3600-3100\text{ cm}^{-1}$, η οποία οφείλεται σε δόνηση της καρβοξυλικής ομάδας, για την ινουλίνη αλλά και τη μαλτοδεξτρίνη. Επίσης όσον αφορά στην ινουλίνη, υπάρχει απορρόφηση στην περιοχή $900-1200\text{ cm}^{-1}$, λόγω της παρουσίας υδατανθράκων (52). Όσον αφορά στη μαλτοδεξτρίνη, η κορυφή στα 2905 cm^{-1} , οφείλεται στο δεσμό C-H των μεθυλομάδων, ενώ η μέγιστη απορρόφηση στα 1047 cm^{-1} οφείλεται στην εκτατική δόνηση του δεσμού C-O-C των γλυκοζιδίων (53).

Και σε αυτήν την περίπτωση, οι χαρακτηριστικές κορυφές του μίγματος μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης και της καθαρής Stevia, είναι αμετάβλητες. Άρα, δεν αναπτύχθηκε χημικός δεσμός ανάμεσα σε μήτρα και ενεργό συστατικό και ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε επιτυχώς.

3.3 Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού, (EE%)

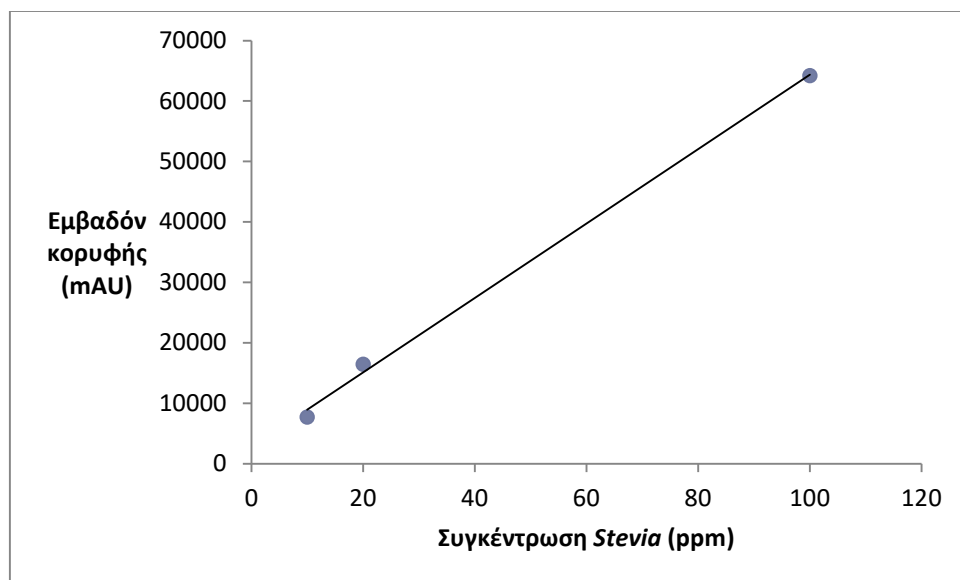
Ο υπολογισμός του ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%), έγινε έμμεσα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας. Αρχικά αναλύθηκε η πρότυπη ουσία Reb A, η οποία εμφάνισε μέγιστο κορυφής σε χρόνο περίπου 9 min για απορρόφηση στο $\lambda_{\max}=200$ nm. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν δύο καμπύλες αναφοράς πρότυπων δειγμάτων *Stevia*, ως προς την πρότυπη ουσία Reb A, συναρτήσε της γνωστής συγκέντρωσής τους, για συγκεντρώσεις 10-100000 ppm. Σημειώνεται ότι κατασκευάστηκαν δύο καμπύλες αναφοράς, η μία για συγκεντρώσεις 1000-100000 ppm και η άλλη για συγκεντρώσεις 10-1000 ppm *Stevia*, καθώς διαπιστώθηκε ότι όταν άλλαζε η τάξη μεγέθους της συγκέντρωσης, η κλίση της καμπύλης αναφοράς άλλαζε. Οι δύο καμπύλες αναφοράς φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Γράφημα 3-10: Καμπύλη αναφοράς *Stevia* για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1000 ppm

Η βέλτιστη ευθεία που προκύπτει με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι η:

$$y = 2.095,52 * x + 29.055.278,92 \quad (1)$$
$$R^2 = 1,00$$



Γράφημα 3-11: Καμπύλη αναφοράς Stevia για συγκεντρώσεις μικρότερες των 1000 ppm

Η βέλτιστη ευθεία που περνάει με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι η:

$$y = 615,8 * x + 2757 \quad (2)$$

$$R^2 = 0,998$$

Με τη μέθοδο του HPLC, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων της ξήρανης με ψεκάσμο και του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. Στην πρώτη περίπτωση μετρήθηκε η απορρόφηση της εγκλεισμένης ποσότητας της ουσίας, ενώ στη δεύτερη η απορρόφηση της μη εγκλεισμένης ποσότητας. Τα αποτελέσματα ποσοτικοποιήθηκαν, υπολογίζοντας με βάση τις εξισώσεις (1) και (2) αντίστοιχα, τη συγκέντρωση της Stevia, από τον εμβαδόν της κορυφής κάθε δείγματος που εμφανίζεται σε χρόνο περίπου 9 min.

- Ηλεκτροστατικός ψεκάσμος

Με βάση την εξίσωση(2) και το εμβαδόν της κορυφής κάθε δείγματος, υπολογίζεται η συγκέντρωση της εγκλεισμένης Stevia. Το ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

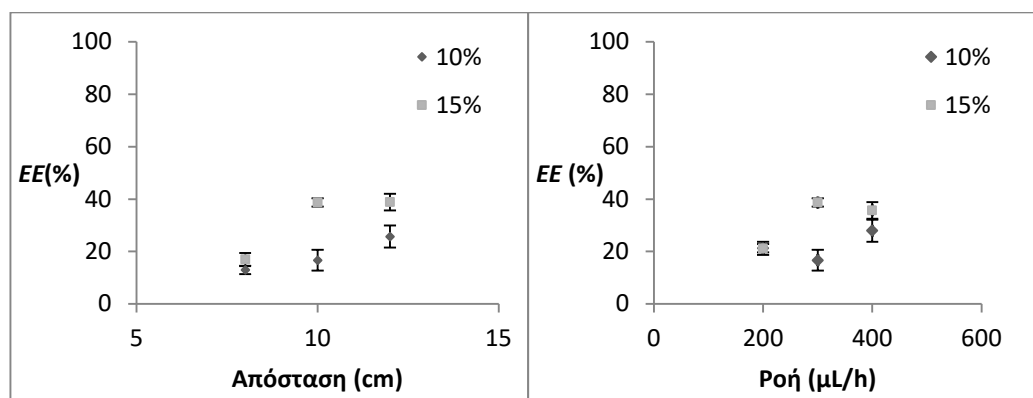
$$EE\% = 1 - \frac{C_{μη\ εγκλεισμένης\ Stevia}}{C_{αρχικής\ Stevia}} * 100$$

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3-3: Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού

Κωδικός δείγματος	Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού
E-100	21,26
E-110	25,75
E000	16,67
E010	25,69
E1-10	17,29
E100	27,94
E110	19,48
E-101	21,18
E-111	28,27
E0-11	16,93
E001	38,70
E011	38,86
E1-11	36,93
E101	35,72
E111	15,26

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτουν τα εξής διαγράμματα απόδοσης εγκλεισμού-απόστασης και απόδοσης εγκλεισμού-ροής για τις δύο συγκεντρώσεις ζεΐνης, κρατώντας σταθερές την κεντρική συνθήκη ροής και απόστασης αντίστοιχα:



Γράφημα 3-12: Αριστερά: απεικόνιση ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της απόστασης της βελόνας από το συλλέκτη δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού για σταθερή ροή 300 μL/h. Δεξιά: απεικόνιση ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της ροής δειγμάτων ηλεκτροστατικού ψεκασμού για σταθερή απόσταση 10 cm

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει ότι ο εγκλεισμός χρησιμοποιώντας την μέθοδο του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και ως υλικό μήτρας τη ζεΐνη, δεν είναι αρκετά ικανοποιητικός, καθώς η υψηλότερη τιμή απόδοσης εγκλεισμού είναι 38,86%. Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση της ζεΐνης, η απόδοση εγκλεισμού, αυξάνεται όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση

ζεΐνης του αρχικού διαλύματος πολυμερικής μήτρας- *Stevia*. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της μήτρας στο πολυμερικό διάλυμα, αυξάνεται το ιξώδες του και αυτό οδηγεί σε πιο ομοιόμορφες δομές. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος της για τα σωματίδια με 10% ζεΐνη, 22,01 %, ενώ για τα σωματίδια με 15% ζεΐνη, είναι 27,73%.

Όσον αφορά στις διαφορετικές ροές (παροχές) των διαλυμάτων, παρατηρείται αύξηση της αποτελεσματικότητας με αύξηση της ροής.

Τέλος, συγκρίνοντας τις διάφορες αποστάσεις, παρατηρείται ότι υπάρχει αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού με αύξηση της απόστασης της βελόνας από το συλλέκτη και για τις δύο συνθήκες. Άρα τα 12 cm, θεωρούνται η βέλτιστη απόσταση.

- Ξήρανση με ψεκασμό

Με βάση την εξίσωση (1) και το εμβαδόν την κορυφής κάθε δείγματος, υπολογίζεται η συγκέντρωση της εγκλεισμένης *Stevia*. Το ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού, υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

$$EE\% = \left(\frac{C_{\text{εγκλεισμένης Stevia}}}{C_{\text{αρχικής stevia}}} \right) * 100$$

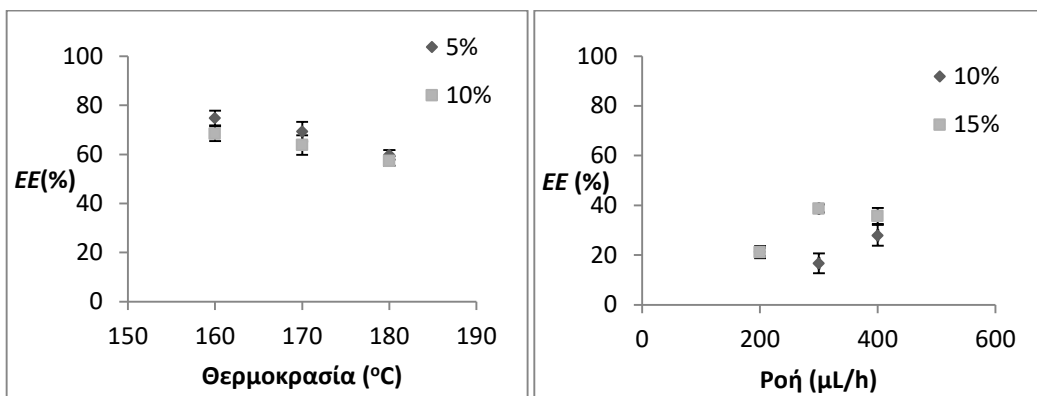
Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3-4: Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού δειγμάτων ξήρανσης με ψεκασμό

Κωδικός δείγματος	Ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού
S-1-10	71,27
S-100	60,53
S-110	65,21
S0-10	74,84
S000	69,30
S010	59,84
S1-10	75,87
S100	74,76
S110	53,82
S-1-11	8,18
S-101	67,96
S-111	52,84
S0-11	68,49
S001	63,83
S011	57,37
S1-11	64,45
S101	64,75
S111	64,32

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτουν τα εξής διαγράμματα απόδοσης εγκλεισμού-θερμοκρασίας και απόδοσης εγκλεισμού-ροής για τις δύο συγκεντρώσεις

μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης, κρατώντας σταθερές την κεντρική συνθήκη ροής και θερμοκρασίας αντίστοιχα:



Γράφημα 3-13:Αριστερά: απεικόνιση του ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας για σταθερή ροή 800 mL/h δειγμάτων ξήρανσης με ψεκάσμο, Δεξιά: απεικόνιση του ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού συναρτήσει της ροής για σταθερή θερμοκρασία 170 °C δειγμάτων ξήρανσης με ψεκάσμο

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι σαφές, ότι το ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού της μεθόδου την ξήρανσης με ψεκάσμο, χρησιμοποιώντας ως μήτρα μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης 50:50, είναι ικανοποιητικό, καθώς φτάνει το 75,87%. Συγκρίνοντας την συγκέντρωση της μήτρας, προκύπτει ότι αύξηση της συγκέντρωσης έχει ως αποτέλεσμα μείωση της απόδοσης εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος απόδοσης εγκλεισμού για συγκέντρωση μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης 5% είναι 67,27%, ενώ για συγκέντρωση 10%, είναι 56,91%.

Παρόμοια μελέτη εγκλεισμού της *Stevia* έχει ξαναγίνει (46), όπου η μήτρα εγκλεισμού ήταν μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης σε αναλογία 80:20. Και σε αυτήν τη μελέτη, τα ποσοστά απόδοσης εγκλεισμού ήταν στα ίδια επίπεδα.

Όσον αφορά στις διαφορετικές θερμοκρασίες, παρατηρείται ότι αύξηση της θερμοκρασίας, οδηγεί σε μείωση της απόδοσης εγκλεισμού και για τις δύο συγκεντρώσεις. Αυτό συμβαίνει καθώς η θερμοκρασία πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να επιτρέπεται ο γρήγορος σχηματισμός μίας ημιπερατής μεμβράνης στην επιφάνεια των σωματιδίων, αλλά όχι τόσο υψηλή ώστε να προκαλεί θερμική βλάβη στο ξηρό προϊόν. Άρα η θερμοκρασία των 160°C, θεωρείται η βέλτιστη (54), (40).

Όσον αφορά στις διαφορετικές ροές, αύξηση της ροής, οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ροή της τροφοδοσίας θα πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε το ψεκασμένο υγρό να εξατμίζεται πριν έρθει σε επαφή με τα τοιχώματα του θαλάμου ξήρανσης. Άρα, η βέλτιστη συνθήκη ροής είναι τα 1000 mL/h (54), (40).

4 Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Ο εγκλεισμός ενεργών συστατικών σε πολυμερικές μήτρες, αποτελεί μία καινοτόμα και πολλά υποσχόμενη μέθοδο με πολυάριθμες εφαρμογές στη βιομηχανία των τροφίμων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν ως μέθοδοι εγκλεισμού, η ξήρανση με ψεκασμό και ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός. Το εγκλεισμένο συστατικό ήταν και στις δύο περιπτώσεις το γλυκαντικό *Stevia*, ενώ ως μήτρα, χρησιμοποιήθηκε ζεΐνη στον ηλεκτροστατικό ψεκασμό και μίγμα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης σε αναλογία 50:50, στη ξήρανση με ψεκασμό. Τα συστήματα που προέκυψαν μελετήθηκαν στη συνέχεια με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης, φασματοσκοπία υπερύθρου και υγρή χρωματογραφία υψηλή απόδοση. Στόχος ήταν η μελέτη της φυσικής κατάστασης των εγκλεισμένων σωματιδίων, η μελέτη των νέων συμπλόκων, της αλληλεπίδρασης μήτρας και ενεργού συστατικού, ο προσδιορισμός του ποσοστού απόδοσης εγκλεισμού, και η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών για την κάθε μέθοδο.

Όσον αφορά στην ανάλυση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν πως η συγκέντρωση της μήτρας στο αρχικό πολυμερικό διάλυμα, είναι η μόνη παράμετρος που επηρεάζει την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του συστήματος. Αύξηση της συγκέντρωσης οδήγησε σε αύξηση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης. Αντιθέτως, οι συνθήκες λειτουργίας (ροή και απόσταση κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό, ροή και θερμοκρασία κατά την ξήρανση με ψεκασμό), φάνηκε να μην έχουν κάποια επίδραση. Συγκεκριμένα, ο εγκλεισμός, οδήγησε γενικά σε χαμηλότερη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης από αυτή της καθαρής μήτρας, γεγονός που σημαίνει ότι σχηματίστηκαν λιγότερο ανθεκτικές δομές.

Όσον αφορά στη φασματοσκοπία υπερύθρου, τα φάσματα δεν έδειξαν κάποια κορυφή ανεξάρτητη από τις κορυφές των φασμάτων των καθαρών ουσιών, γεγονός που σημαίνει ότι υπήρξε χημικός δεσμός ανάμεσα σε μήτρα και ενεργό συστατικό και άρα ο εγκλεισμός επιτευχθεί.

Όσον αφορά στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο εγκλεισμός στο σύστημα μαλτοδεξτρίνης-ινουλίνης-*Stevia*, ήταν αρκετά πιο αποτελεσματικός από ότι στο σύστημα ζεΐνης-*Stevia*. Αυτό οφείλεται στην επιλογή της μήτρας, καθώς η ζεΐνη αποτελεί ένα υδρόφοβο μόριο σε αντίθεση με την υδρόφιλη *Stevia*. Για τον λόγο αυτόν, τα δύο μόρια δεν ήταν συμβατά και δεν μπόρεσαν να αλληλεπιδράσουν. Παρόλα αυτά, η ζεΐνη μελετήθηκε, καθώς αποτελεί μία πρωτεΐνη, η οποία με βάση τη βιβλιογραφία δημιουργεί πολύ καλές δομές εγκλεισμού. Επίσης, έπρεπε να μελετηθεί ένα υδρόφοβο πολυμερές, καθώς τελικός στόχος είναι η εφαρμογή της εγκλεισμένης *Stevia* σε υδατικά προϊόντα όπου η μήτρα δεν θα πρέπει να διασπάται.

Σχετικά με τις δύο μεθόδους, διεργασία του ηλεκτροστατικού ψεκασμού έχει το μειονέκτημα της παραγωγής μικρής ποσότητας προϊόντος ως προς την ξήρανση με ψεκασμό (περίπου 1000 φορές λιγότερη). Παρόλα αυτά χαρακτηρίζεται από το σημαντικό πλεονέκτημα της λειτουργίας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και γενικά ήπιες συνθήκες, γεγονός που εμποδίζει τη θερμική καταστροφή της μήτρας και του ενεργού υλικού κατά τη διεργασία του εγκλεισμού. Η ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία λοιπόν, παρόλο που αποτελεί μία καινοτόμα

και πολλά υποσχόμενη μέθοδο, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, τόσο της ανάπτυξης της όσο και τον παραμέτρων της αποτελεσματικής λειτουργίας της.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα είναι η επιλογή νέων υλικών μήτρας, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, αλλά και η λειτουργία των οργάνων με διαφορετικές παραμέτρους. Επίσης, η ενσωμάτωση του παραγόμενου προϊόντος σε καινοτόμα προϊόντα και ο οργανοληπτικός τους έλεγχος, με στόχο την επιβεβαίωση της κάλυψης της πικρής και μεταλλικής επίγευσης. Τέλος, η οικονομοτεχνική ανάλυση των δύο μεθόδων, ο σχεδιασμός εφαρμογής τους σε βιομηχανική κλίμακα και φυσικά η αξιολόγηση του περιβαλλοντικού τους αποτυπώματος.

5 Βιβλιογραφία

1. **Belščak-Cvitanović, A., D. Komes, et al.** *Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives.*
2. **Aidoo, R. P., E. O. Afoakwa, et al.** *Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts.*
3. **Gibson-Moore.** *Hydration and health, Nutrition Bulletin.*
4. **Παπανικολάου, Γεώργιος.** Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. [συγγρ. βιβλίου] Γ Παπανικολάου. *Η αντίληψη της γεύσης του πικρού.* Αθήνα : Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015.
5. **Emily R. Liman, Yali V. Zhang, Craig Montell.** *Peripheral Coding of Taste.* ISSN 0896-6273.
6. **Walter Willett, JoAnn Manson, Simin Liu.** *Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes.*
7. **Kaye Foster-Powell, Susanna HA Holt, Janette C Brand-Miller.** *International table of glycemic index and glycemic load values.*
8. **Padmini Shankar, Suman Ahuja, Krishnan Sriram.** *Non-nutritive sweeteners: Review and update.* ISSN 0899-9007.
9. **Arshag D. Mooradian, Meridith Smith, Masaaki Tokuda.** *The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future.* ISSN 2405-4577.
10. *Aspartame: Review of Safety.* **Harriett H. Butchko, W.Wayne Stargel, C.Phil Comer, Dale A. Mayhew, Christian Benninger, George L. Blackburn, Leo M.J. de Sonnevill, Raif S. Geha, Zsolt Hertelendy, Adalbert Koestner, Arthur S. Leon, George U. Liepa, Kenneth E. McMartin, Charles L. Mende.** ISSN 0273-2300.
11. *Artificial sweeteners – a review.* **Sanchari Chattopadhyay, Utpal Raychaudhuri, Runu Chakraborty.**
12. *Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues Institute of Food Technologists.* **Manfred Kroger, Kathleen Meister, and Ruth Kava.**
13. *Metal complexes of saccharin.* **Enrique J. Baran, Veysel T. Yilmaz.** ISSN 0010-8545.
14. *Neotame: discovery, properties, utility.* **Claude Nofre, Jean-Marie Tinti.** ISSN 0308-8146.

15. **Ivan Leban, Darja Rudan-Tasic, Nina Lah, Cveto Klofutar.** *Structures of artificial sweeteners – cyclamic acid and sodium cyclamate with other cyclamates.*
16. **J.E. Brandle, P.G. Telmer.** *Steviol glycoside biosynthesis.* 2007. ISSN 0031-9422.
17. **Kinghorn, A.Douglas.** *Stevia: The genus Stevia.*
18. **M.C. Carakostas, L.L. Curry, A.C. Boileau, D.J. Brusick.** *Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages.*
19. **K. Ramesh, Virendra Singh and Nima W. Megeji.** *CULTIVATION OF STEVIA [STEVIA REBAUDIANA (BERT.) BERTONI]: A COMPREHENSIVE REVIEW.*
20. **Debnath, Mousumi.** *Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia rebaudiana.*
21. **Ashok Kumar Yadav, S. Singh, D. Dhyani, and P. S. Ahuja.** *A review on the improvement of stevia [Stevia rebaudiana (Bertoni)].*
22. **Roberto Lemus-Mondaca, Antonio Vega-Gálvez, Liliana Zura-Bravo, Kong Ah-Hen.** *Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener:A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects.*
23. **J. E. Brandle, A. N. Starratt, and M. Gijzen.** *Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties.* 1998.
24. **Soejarto, Djaja Djendoel.** *Ethnobotany of Stevia and Stevia rebaudiana.*
25. **Katarzyna Marcinek, Zbigniew Krejpcio.** *STEVIA REBAUDIANA BERTONI – CHEMICAL COMPOSITION AND FUNCTIONAL PROPERTIES.*
26. **Varanuj Chatsudthipong, Chatchai Muanprasat.** *Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness.*
27. **S.M. Savita, K. Sheela, Sharan Sunanda, A.G. Shankar and Parama Ramakrishna.** *Stevia rebaudiana – A Functional Component for Food Industry.*
28. **S.D Singh, G.P. Rao.** *Stevia : The Herbal Sugar of 21th Century.*
29. **H Rank, Andrew & Midmore, David.** *STEVIA - An intense, natural sweetener.* 2019.
30. **S.K.Goyal.** *Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetene: A review.*
31. **V. T. Kochikyan, A. A. Markosyan, L. A. Abelyan, A. M. Balayan, and V. A. Abelyan.** *Combined Enzymatic Modification of Stevioside and Rebaudioside A.*

32. **Charikleia Chranioti, Sofia Chanioti, Constantina Tzia.** *Microencapsulation of steviol glycosides (Stevia rebaudiana Bertoni) by a spray drying method – Evaluation of encapsulated products and prepared syrups.*
33. **Ahmed O. Elzoghby, Nayra M. Kamel.** *Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery.*
34. **Bernard F. Gibbs, Selim Kermasha,Inteaz Alli, Catherine N. Mulliga.** *Encapsulation in the food industry: a review.*
35. **Zhongxiang Fanga, Bhesh Bhandaria.** *Encapsulation of polyphenols - a review.*
36. **Virginia Sanchez, Rosa Baez, aMara V. Galmarini, Maria Clara Zamora, Jorge Chirife.** *Freeze-Drying Encapsulation of Red Wine Polyphenols in an Amorphous Matrix of Maltodextrin.*
37. **Jayesh Doshi, Darrell H. Reneker.** *Electrospinning process and applications of electrospun fibers.* 1995. ISSN 0304-3886.
38. *Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel.* **Li, D., Xia, Y.** 0935-9648.
39. **M.A. Busolo, S. Castro, and J.M. Lagaron.** *Processes (Electrospinning and Electro spraying) Nonthermal Processes for Micro- and Nanoencapsulation.*
40. **Christina G. Drosou, Magdalini K. Krokida & Costas G. Biliaderis,.** *Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications.*
41. **Adem Gharsallaoui, Gae"lle Roudaut, Odile Chambin, Andre´e Voilley, Re´mi Saurel.** *Applications of spray-drying in microencapsulation of food.*
42. **Gaspar, Filipe.** *Spray drying in the pharmaceutical industry.*
43. **Faix, O.** *Fourier Transform Infrared Spectroscopy.*
44. **P. S. Gill, S. R. Sauerbrunn, M. Reading.** *MODULATED DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY .*
45. **Barton, John M.** *The application of differential scanning calorimetry (DSC) to the study of epoxy resin curing reactions.*
46. **Charikleia Chranioti, Sofia Chanioti, Constantina Tzia.** *Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from Stevia rebaudiana Bertoni plant) – Evaluation of the final products.*
47. **Ji Li, Yunqi Li, Tung-Ching Lee, Qingrong Huang.** *Structure and Physical Properties of Zein/Pluronic F127 Composite Films.*

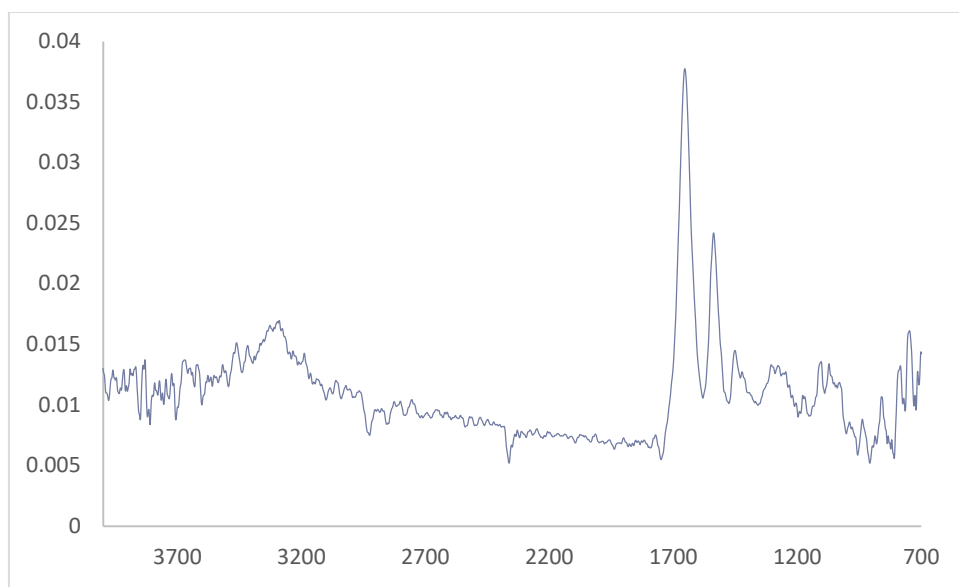
48. **Ulaş Baysan, Feyza Elmas, Mehmet Koç.** *The effect of spray drying conditions on physicochemical properties of encapsulated propolis powder.*
49. **Tatiana C. Bicudo, Lucimara A. Forato, Luiz A. R. Batista, Luiz A. Colnago.** *Study of the conformation of γ -zeins in purified maize protein bodies by FTIR and NMR spectroscopy.*
50. **Christina Drosou, Magdalini Krokidaa, Costas G. Biliaderis.** *Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties.*
51. **Indu Barwala, Anil Sooda, Mohit Sharmab, Bikram Singhb, Subhash C. Yadav.** *Development of stevioside Pluronic-F-68 copolymer based PLA-nanoparticles as an antidiabetic nanomedicine.*
52. **Oliveira, Cassiano.** *Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein–inulin blends as carriers.*
53. **Liangqing Zhanga, Xianhai Zeng, Nan Fu, Xing Tang, Yong Sun, Lu Lin.** *Maltodextrin: A consummate carrier for spray-drying of xylooligosaccharides.*
54. **Judson King, C.** *Spray drying: Retention of volatile compounds revisited. Drying Technology.*
55. **Elliot Adler, Mark A Hoon, Ken L Mueller, Jayaram Chandrashekar, Nicholas J.P Ryba, Charles S Zuker.** *A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. ISSN 0092-8674.*
56. *The receptors and cells for mammalian taste. Jayaram Chandrashekar, Mark A. Hoon, Nicholas J. P. Ryba, Charles S. Zuker. 2006.*
57. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Nandana Bhardwaj, Subhas C. Kundu. ISSN 0734-9750.*
58. **J. Kennelly, Edward.** *Sweet and non-sweet constituents of Stevia rebaudiana.*
59. **Manish Tadhani, Rema Subhash.** *Preliminary Studies on Stevia rebaudiana Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening.*
60. **S.H.L. Kim, Darrick.** *Synthetic investigations on steviol, stevioside, and rebaudioside A, and their applications as starting materials.*
61. **Sirsendu De, Sourav Mondal, Suvrajit Banerjee.** *Stevioside: Technology, Application And Health.*
62. **N.W. Megeji, J.K. Kumar, Virendra Singh, V.K. Kaul, P.S Ahusa.** *Introduction Stevia rebaudiana, a natural zero-calorie sweetener.*
63. **Charikleia Chraniotia, Sofia Chaniotia, Constantina Tziaa.** *Microencapsulation of steviol glycosides (Stevia rebaudiana Bertoni) by a spray drying method – Evaluation of encapsulated products and prepared syrups.*

64. **S Madan, S Ahmad, GN Singh.** *Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni - A Review.*
65. **Re, M. I.** *Microencapsulation by Spray Drying.*
66. **Henrik van der wel, Kees Loeve.** *Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thauma octococcus* in Bent.*
67. **Fereidoon Shahidi, Xiao-Qing Han.** *Encapsulation of Food ingredients.*
68. **Smedts, Annelies & Ceunen, Stijn & Amery, Ruis & Geuns, Jan & Meesschaert, Boudewijn.** *Isolation of different bacterial consortia from Paraguayan soil samples containing steviol related beta-glucosidase activity to degrade stevioside to steviol.* . 2009.
69. **Kaushik, Ramakrishnan & Narayanan, Pradeep & Vasudevan, Vamshi & Muthukumar, Geetha & Antony, Usha.** *Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts.* 2010.
70. **Ebnesajjad, Sina.** *Introduction to Plastics.* 2016. ISBN 9780323473583.
71. **Jaskulski, M., et al.** *Encapsulation Methods: Spray Drying, Spray Chilling and Spray Cooling.*
72. **Desobry, S. A., et al.** *Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for β -Carotene Encapsulation and Preservation.*
73. **Sharif, H., et al.** *Physicochemical properties of β -carotene and eugenol co-encapsulated flax seed oil powders using OSA starches as wall material.*
74. **Yun Ping Neo, Sudip Ray, Jianyong Jin, Marija Gizdavic-Nikolaidis, Michel K. Nieuwoudt, Dongyan Liu, Siew Young Quek.** *Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system.*
75. **H. MADEKA, J. L. KOKINII.** *Effect of Glass Transition and Cross-Linking on Rheological Properties of Zein: Development of a Preliminary State Diagram.*
76. **BRISSETTE, CHRISTY.** *What Is Inulin And Why Is It Being Added to So Many Foods? A Nutritionist Explains.*
77. **Sabina Bancila, Catalina Ciobanu, Manuela Murariu, Gabi Drochioiu.** *Ultrasound-assisted zein extraction and determination in some patented maize flours.*

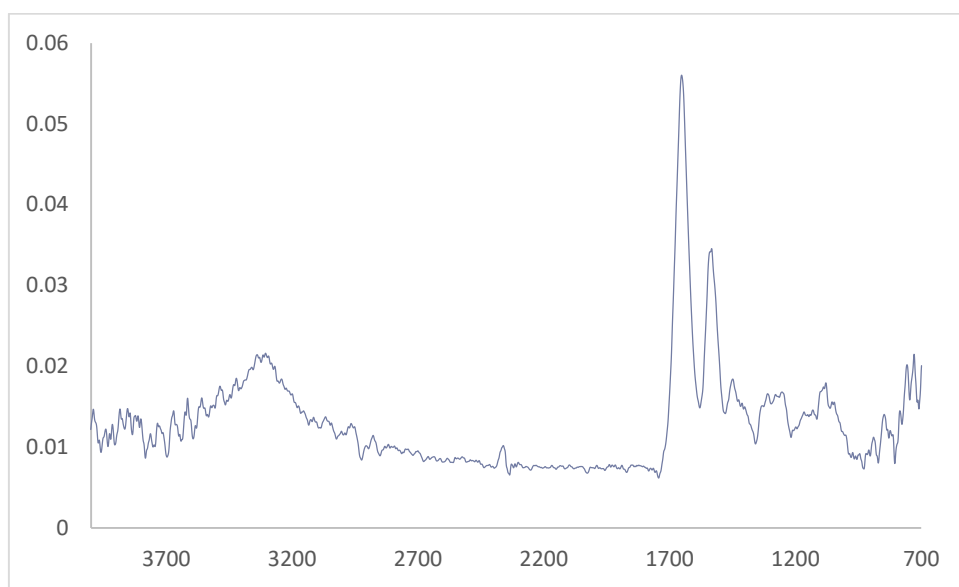
6 Παράρτημα

Παρακάτω, φαίνονται τα φάσματα της φασματοσκοπίας υπεράυθρου, για τις δύο μεθόδους, σε όλες τις συνθήκες.

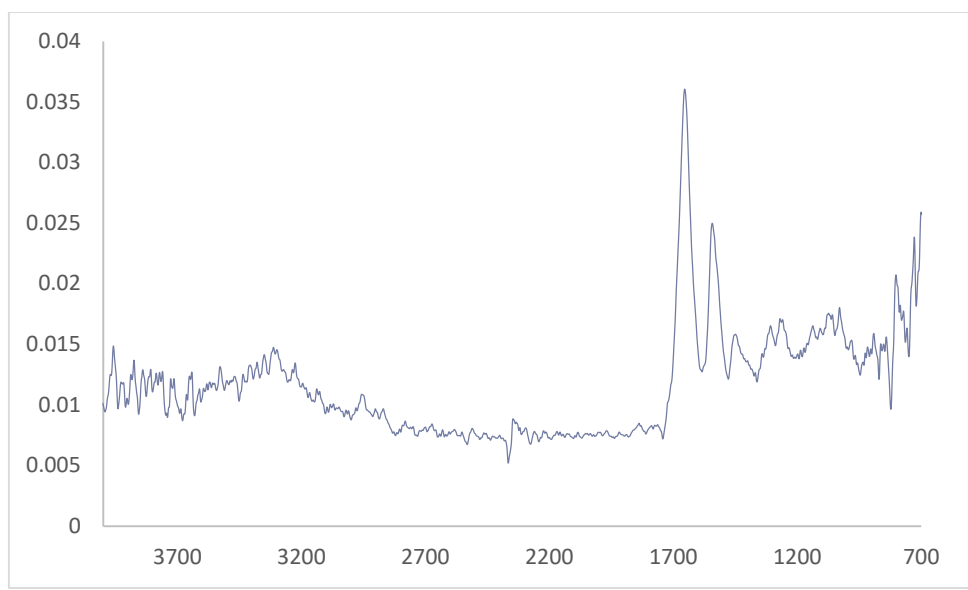
- **Ηλεκτροστατικός ψεκασμός**



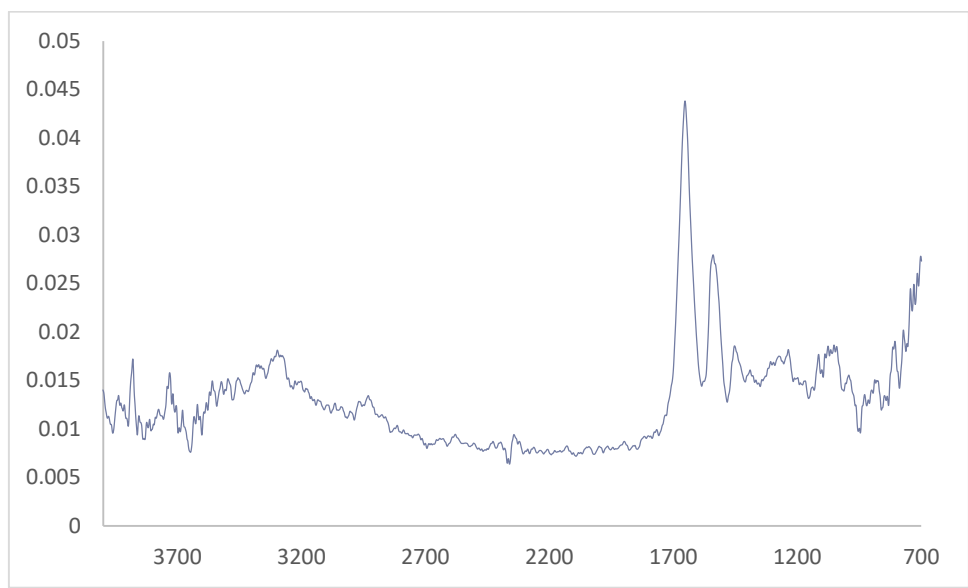
Γράφημα6-1: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-1-10



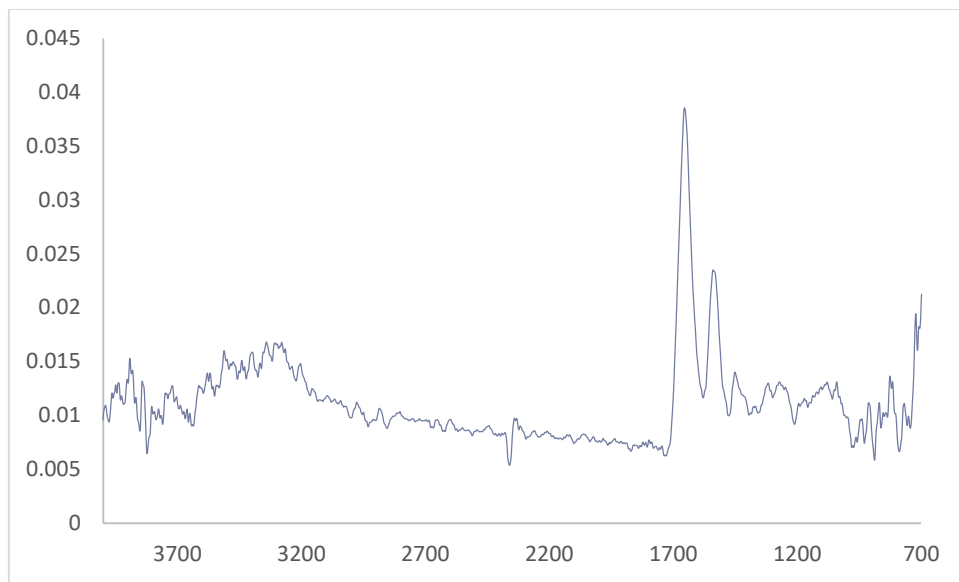
Γράφημα6-2: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-100



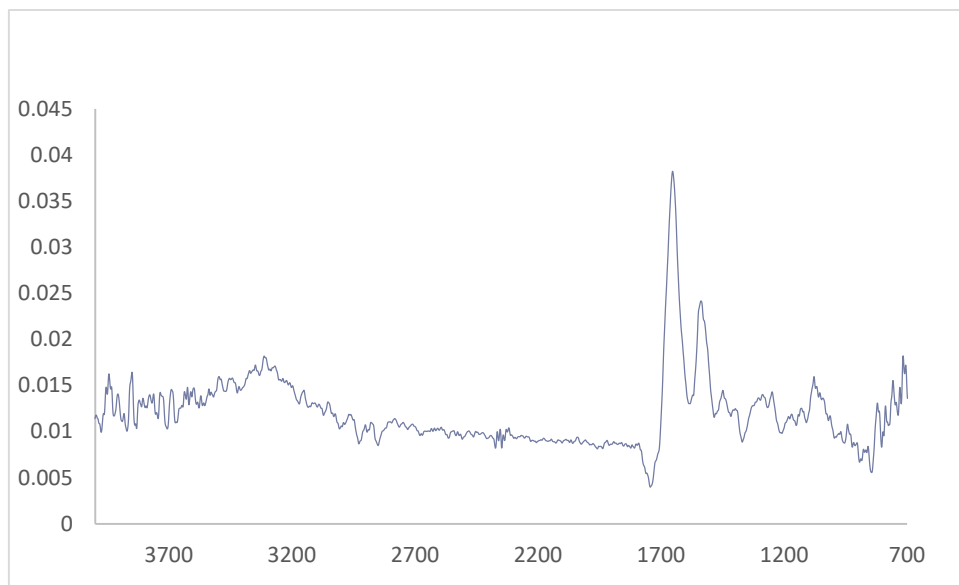
Γράφημα6-3: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-110



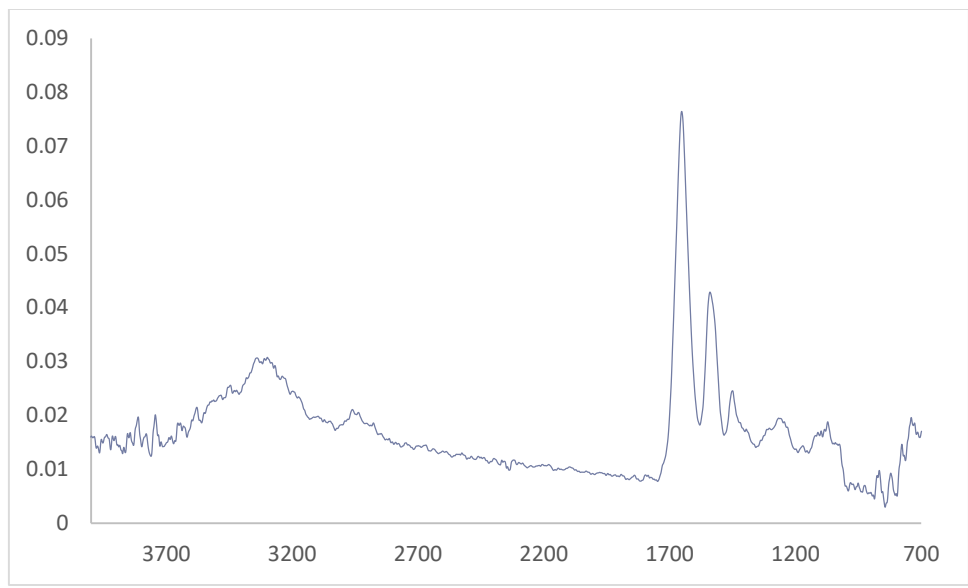
Γράφημα6-4: FTIR ανάλυση για το δείγμα E0-10



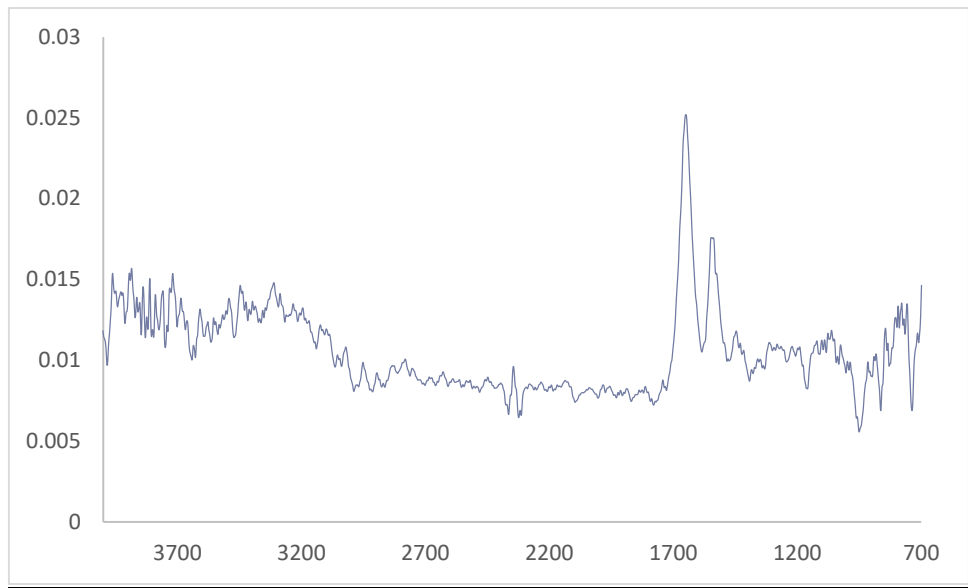
Γράφημα6-5: FTIR ανάλυση για το δείγμα E010



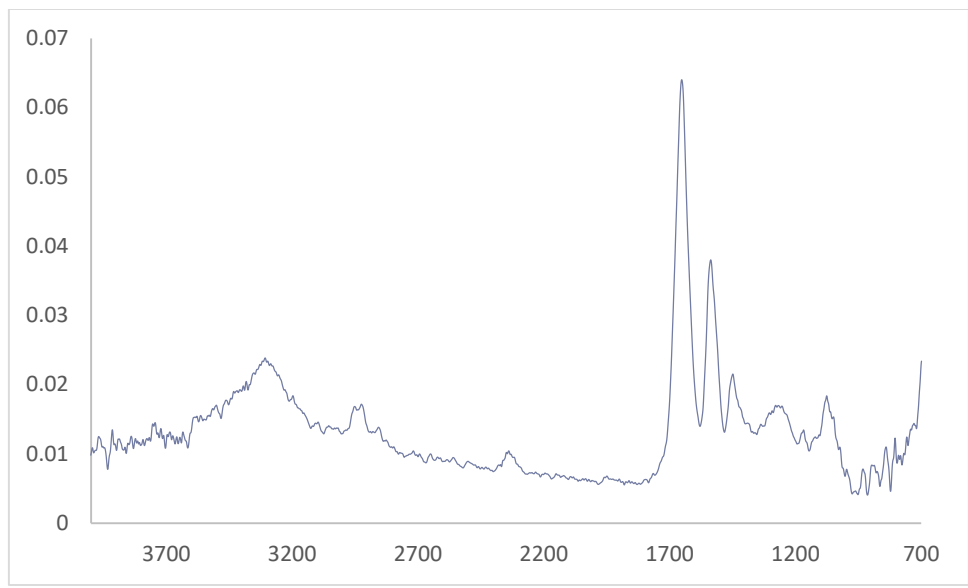
Γράφημα6-6: FTIR ανάλυση για το δείγμα E1-10



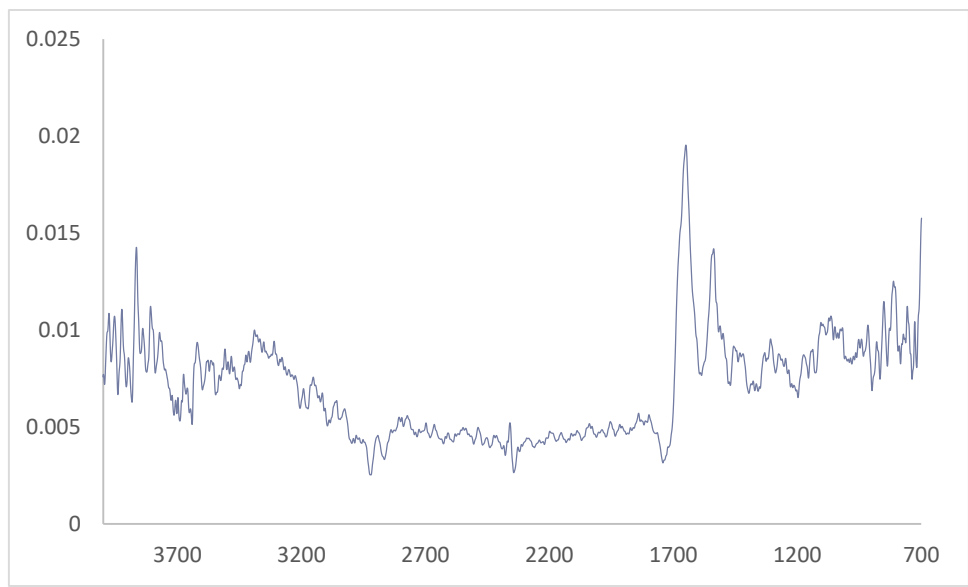
Γράφημα6-7: FTIR ανάλυση για το δείγμα E110



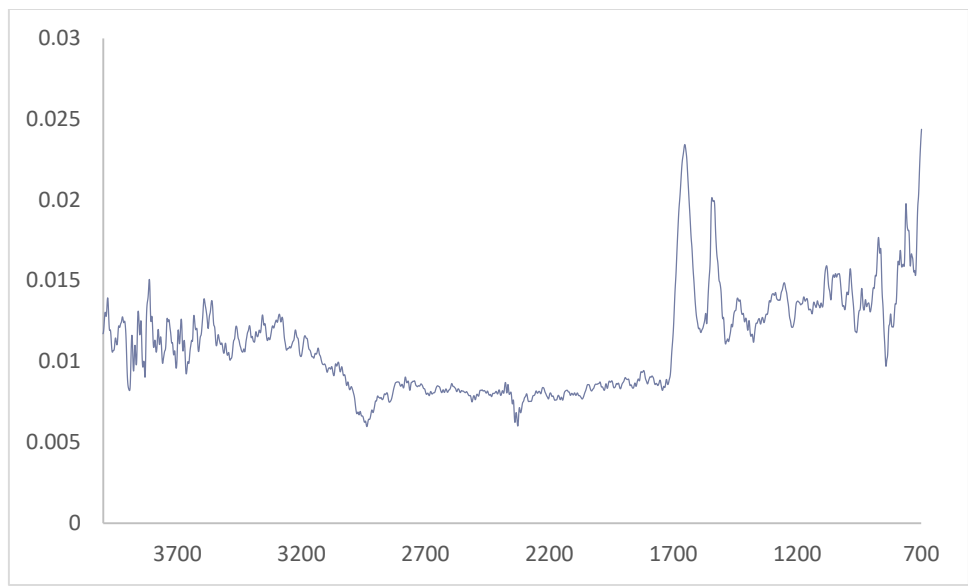
Γράφημα6-8: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-1-11



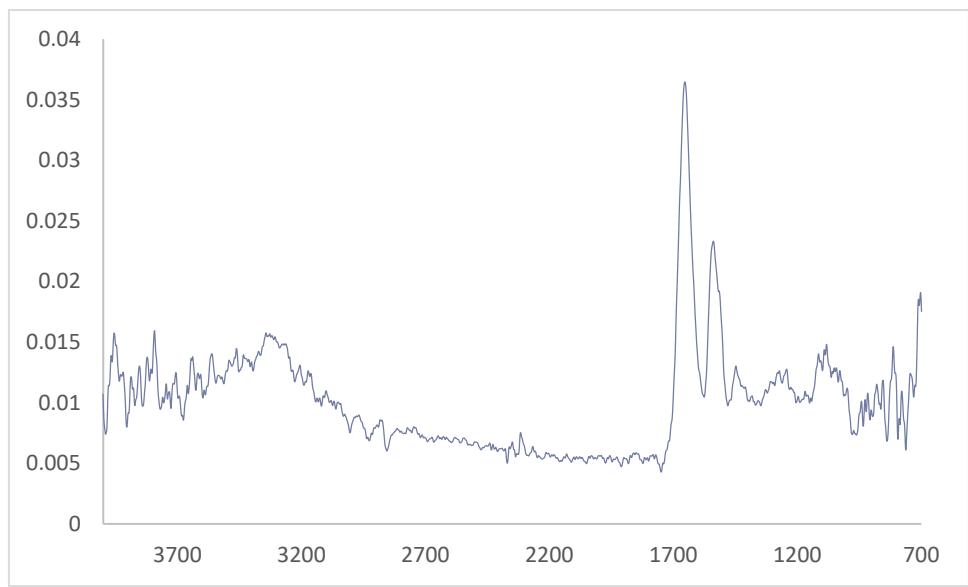
Γράφημα6-9: FTIR ανάλυση για το δείγμα E-111



Γράφημα6-10: FTIR ανάλυση για το δείγμα E0-11

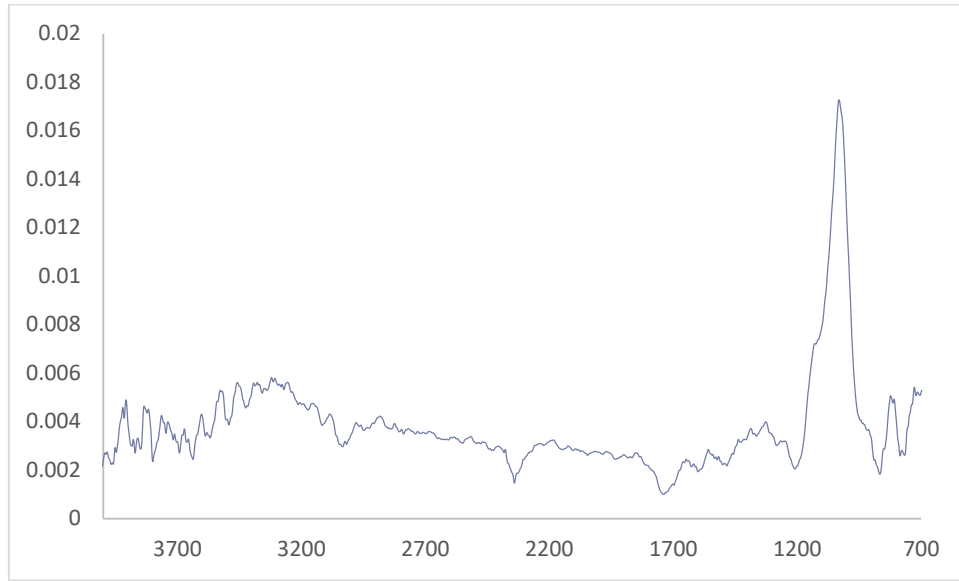


Γράφημα6-11: FTIR ανάλυση για το δείγμα E011

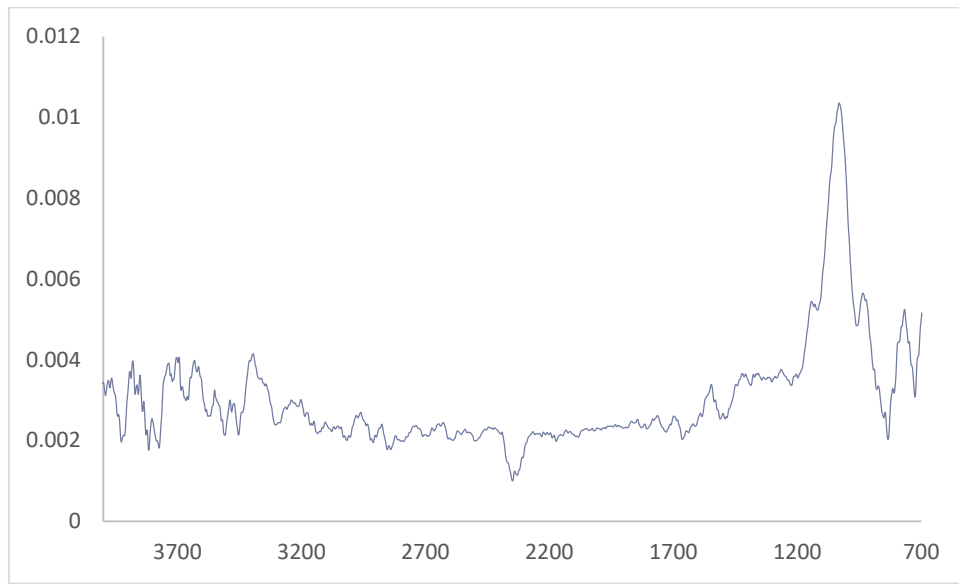


Γράφημα6-12: FTIR ανάλυση για το δείγμα E101

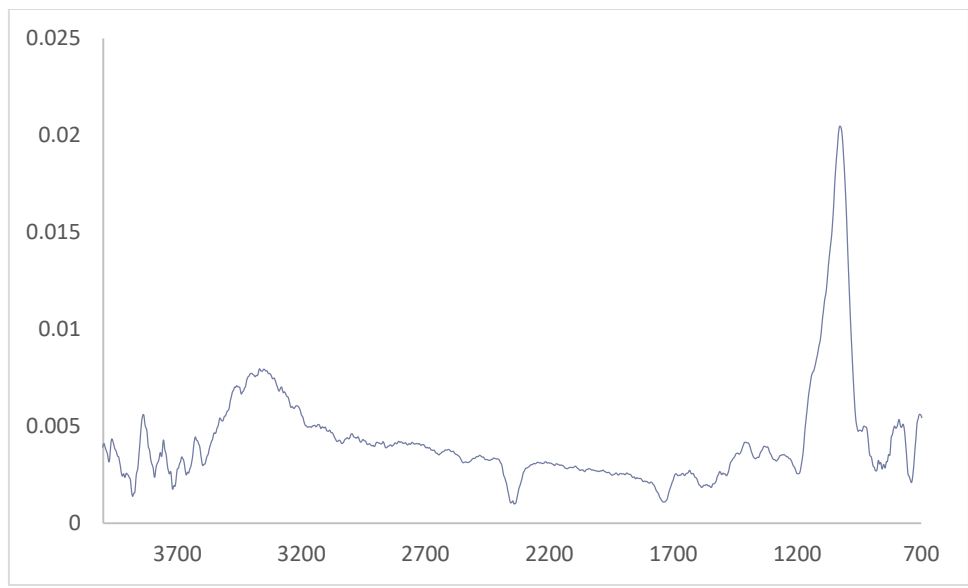
- **Ξήρανση με ψεκασμό**



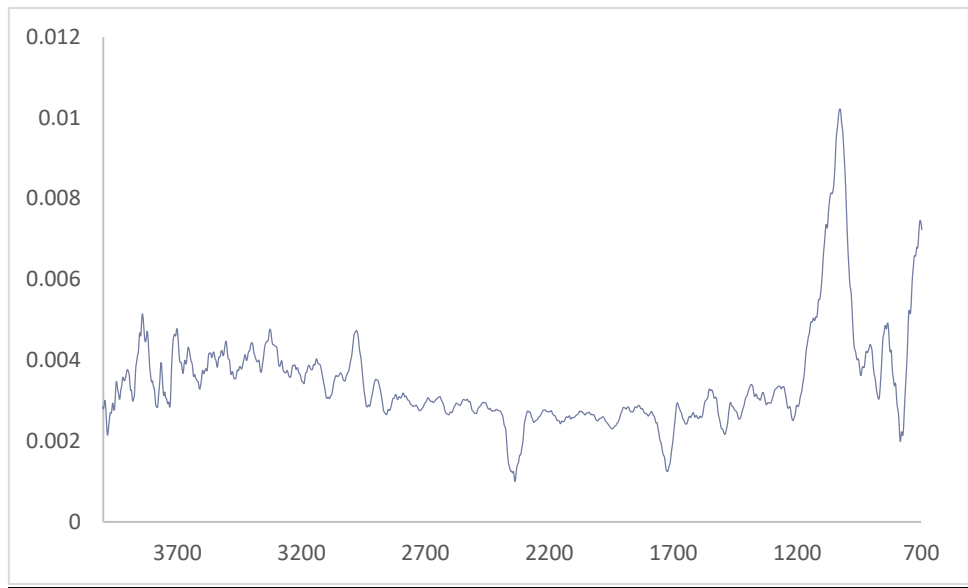
Γράφημα6-13: FTIR ανάλυση για το δείγμα SO-10



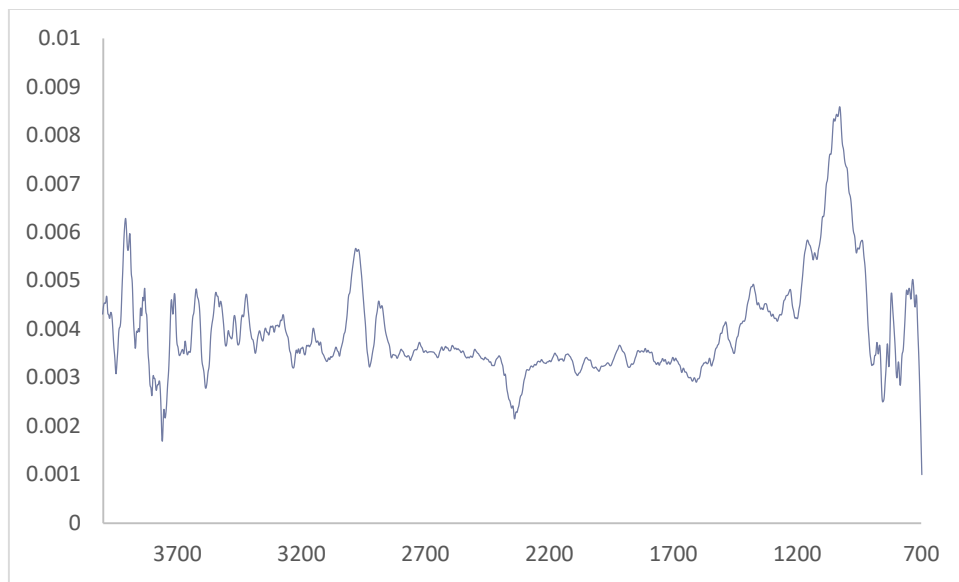
Γράφημα6-14: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-100



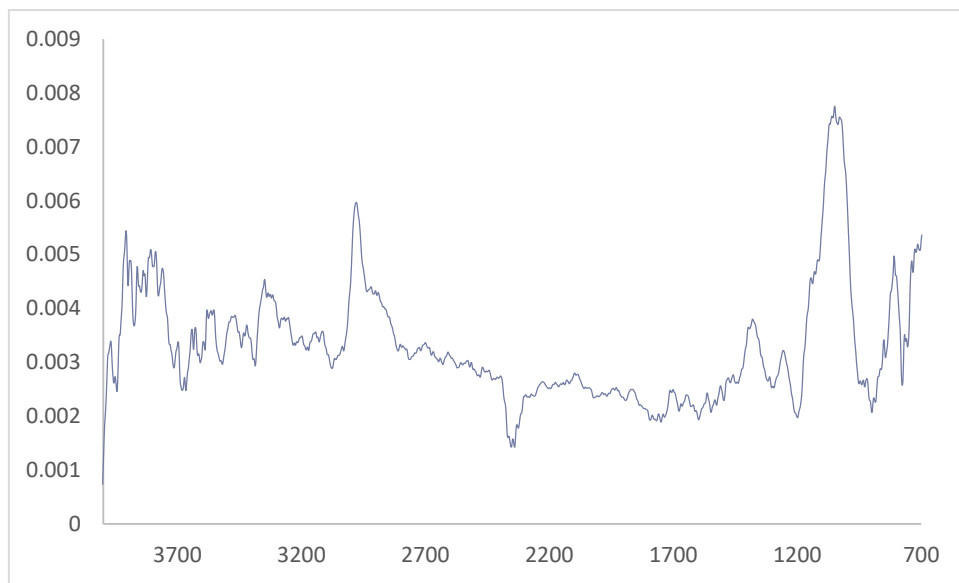
Γράφημα6-15: FTIR ανάλυση για το δείγμα S100



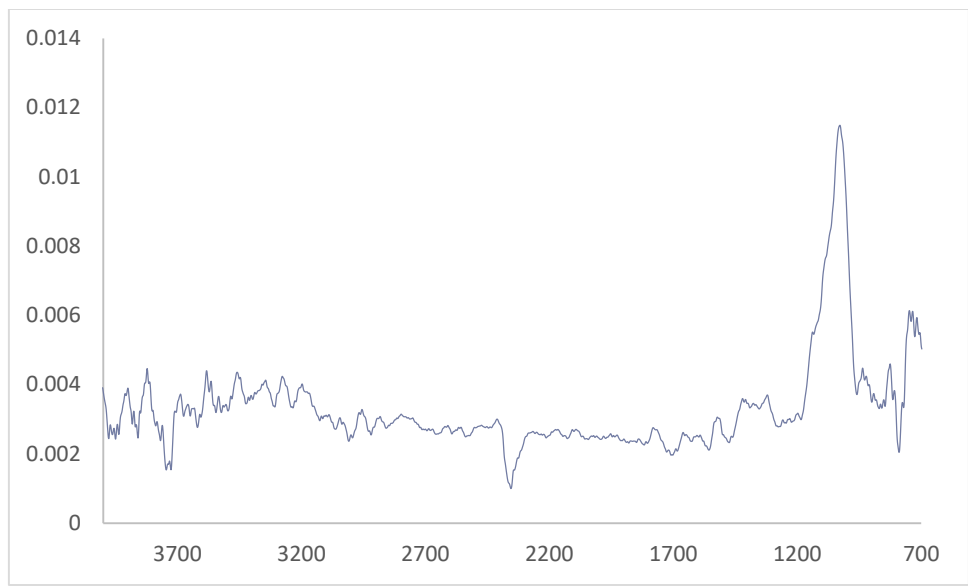
Γράφημα6-16: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-110



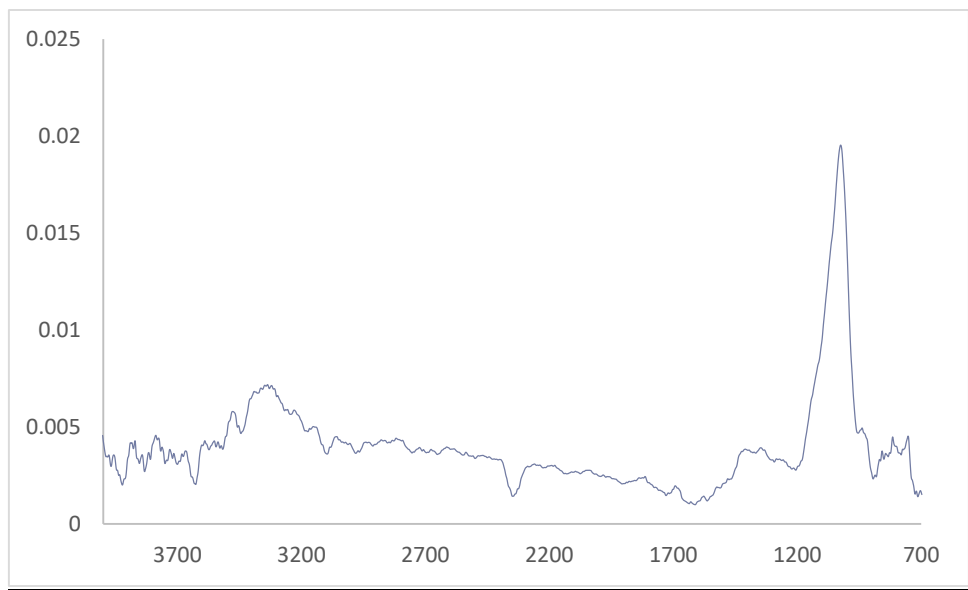
Γράφημα6-17: FTIR ανάλυση για το δείγμα S1-11



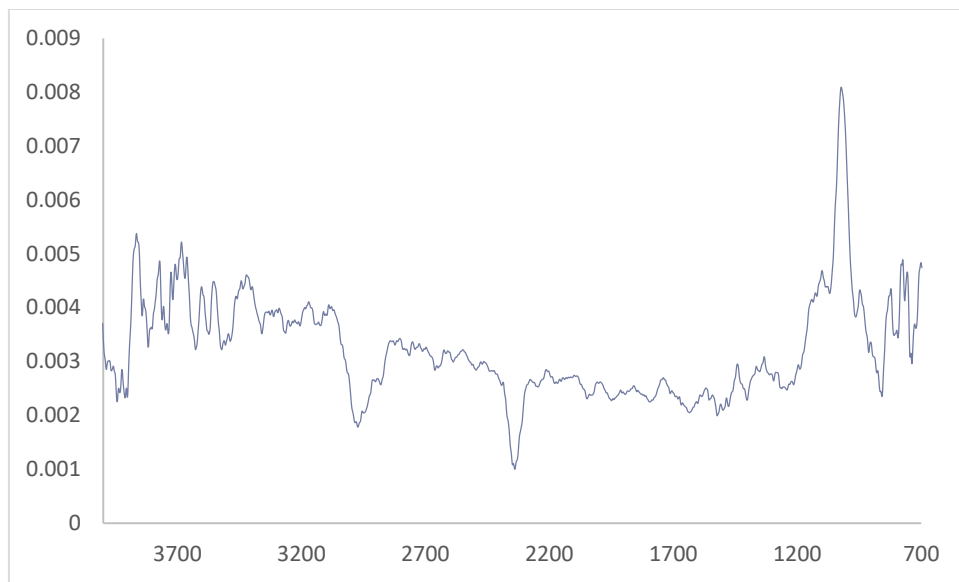
Γράφημα6-18: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-101



Γράφημα6-19: FTIR ανάλυση για το δείγμα S101



Γράφημα6-20: FTIR ανάλυση για το δείγμα S-111



Γράφημα6-21: FTIR ανάλυση για το δείγμα S111