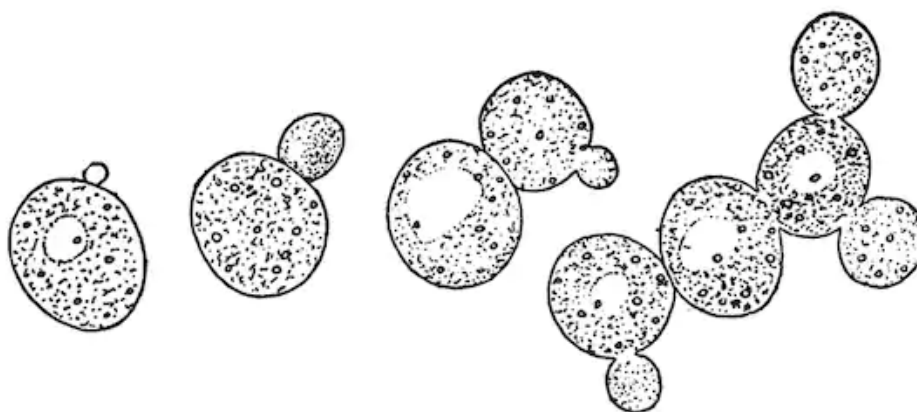




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΡΡΗΞΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ
ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ
Saccharomyces cerevisiae

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Β. ΚΑΤΣΙΜΙΧΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων:

ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΟΥΚΗΣ

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το παρόν πόνημα αποτελεί τη διπλωματική εργασία του προπτυχιακού φοιτητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου Αλέξανδρου Βασιλείου Κατσιμίχα. Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου Πέτρου Ταούκη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πέτρο Ταούκη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντας μου την εκπόνηση της παρούσας διπλωματική εργασίας, για την καθοδήγηση του, καθώς και για όλες τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βασιλική Ωραιοπούλου, τον Διδάκτορα Δημήτριο Τσιμογιάννη και τους Υποψήφιους Διδάκτορες Γεώργιο Δημόπουλο, Αθανάσιο Λημναίο και Βαρβάρα Ανδρέου, για τη σπουδαία βοήθεια, τις συμβουλές και την υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια της άψογης συνεργασία μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, για όλες τις ωραίες στιγμές που μου χάρισαν και για την στήριξη που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μου. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για την πολύτιμη στήριξη και συμπαράσταση που μου προσέφερε και συνεχίζει να μου προσφέρει.

Αλέξανδρος Β. Κατσιμίχας,
Φεβρουάριος 2020.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae*, κοινώς γνωστός και ως μαγιά, αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο μικροοργανισμό στην βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή διάφορων προϊόντων, όπως ενισχυτικών γεύσης, προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας, ενζύμων και χρωστικών ουσιών. Για την παραλαβή των διάφορων ενδοκυτταρικών προϊόντων αυτών, είναι απαραίτητη η διάρρηξη του συμπαγούς κυτταρικού τοιχώματος, μίας σκληρής δομής αποτελούμενης από μαννοπρωτεΐνες, γλυκάνες και χιτίνη, η οποία προσδίδει σταθερότητα και προστασία στα κύτταρα της μαγιάς, καθώς και συγκροτεί το σφαιρικό τους σχήμα.

Η διάρρηξη των κυττάρων της μαγιάς, πραγματοποιείται με διάφορες διεργασίες, όπως η αυτόλυση, η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, οι οποίες διαρρηγνύοντας ή και καταστρέφοντας την δομή του κυτταρικού τοιχώματος, καθιστούν τα κύτταρα πιο διαπερατά. Η αυτόλυση αποτελεί μία μη μηχανική, ενζυμική, θερμική μέθοδο κυτταρικής διάρρηξης, κατά την οποία τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος διασπώνται με την δράση ενδογενών ενζύμων. Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης χαρακτηρίζεται ως μηχανική, μη θερμική μέθοδος, η οποία προκαλεί την θραύση των κυττάρων με την άσκηση υψηλών πιέσεων στο κυτταρικό αιώρημα. Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία περιλαμβάνει την εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών υψηλής τάσης συνεχούς ρεύματος, εντός ενός μέσου, το οποίο είναι τοποθετημένο μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα την δημιουργία πόρων στην επιφάνεια των κυττάρων.

Η μικροενθυλάκωση είναι μία διαδικασία κατά την οποία ένα υλικό ή ένα μείγμα υλικών επικαλύπτεται ή εγκλωβίζεται εντός ενός άλλου υλικού ή συστήματος. Ο κύριος σκοπός της ενθυλάκωσης είναι η προστασία μίας ευαίσθητης ουσίας από τις αρνητικές επιπτώσεις που προκαλούνται σε αυτήν από το φως, την υγρασία και το οξυγόνο, και παράλληλα να είναι εφικτή η ελεγχόμενη απελευθέρωση της ουσίας όταν αυτό είναι επιθυμητό. Επιπλέον η ενθυλάκωση παρουσιάζει τροποποίηση των φυσικών χαρακτηριστικών της αρχικής ουσίας, με αποτέλεσμα τον ευκολότερο χειρισμό της (π.χ. στερεές κάψουλες αντί για υγρές ουσίες). Υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ενθυλάκωσης αποτελούν οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες, τα κόμματα, τα λιπίδια, κυτταρίνη καθώς και ολόκληροι μικροοργανισμοί. Όσον αφορά την μαγιά, το παχύ κυτταρικό τοίχωμα της είναι διαπερατό και από υδρόφιλες και από υδρόφοβες ενώσεις, γεγονός που σε συνδυασμό με τις αρκετά μεγάλες ποσότητες νεκρών και διαρρηγμένων κυττάρων μαγιάς που προκύπτουν ως παραπροϊόν της βιομηχανίας, καθιστά τον μικροοργανισμό κατάλληλο για φορέα ενθυλάκωσης.

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρασκευάζεται με εκχύλιση των ξηρών φύλλων και ανθών του φυτού *Origanum vulgare*, κοινώς γνωστό και ως ρίγανη. Οι κύριες ενώσεις που περιέχει το αιθέριο έλαιο του μεσογειακού αυτού φυτού είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη, δύο ισομερή φαινολικά μονοτερπένια που αποτελούν περίπου το 78 – 82% του ελαίου. Επίσης το αιθέριο έλαιο ρίγανης περιέχει μικρές αλλά υπολογίσιμες ποσότητες μονοτερπινικών υδρογονανθράκων, με κυριότερους το ρ -κυμένιο και το γ -τερπινένιο που αποτελούν περίπου το 5 – 7 % του ελαίου, καθώς και ίχνη μονοτερπινικών αλκοολών, σεσκουιτερπενικών υδρογονανθράκων και οξυγονωμένων σεσκουιτερπενίων. Λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων σε καρβακρόλη, το έλαιο ρίγανης χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα λόγω της αντιμικροβιακής της δράσης, αλλά και ως παράγοντας γεύσης και αρώματος. Η ενθυλάκωση του σε κύτταρα μαγιάς θα προσέφερε προστασία των ενώσεων αυτών από τους διάφορους αλλοιογόνους παράγοντες, καθώς και τον ευκολότερο χειρισμό του.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν οι διεργασίες της αυτόλυσης (52°C για 8 και 24h), της ομογενοποίησης (800 bar, 4 διελεύσεις) και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (ειδικής ενέργειας 3.2, 13.6 και 107.0 kJ/kg), για την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων. Η διεργασία της ομογενοποίησης επιλέχθηκε με στόχο την μελέτη της ενθυλάκωσης αιθέριου ελαίου ρίγανης σε πλήρες διαρρηγμένο κυτταρικό υλικό, λόγω της καταστροφής της δομής του κυτταρικού τοιχώματος της μαγιάς που προκαλείται κατά την διεργασία αυτή (800 bar, 4 διελεύσεις). Η αυτόλυση επιλέχθηκε για την ταχύτερη ενθυλάκωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, εφόσον κατά το πέρας της διεργασίας, επιτυγχάνεται η αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού περιβλήματος, με την υποβάθμιση του κυτταρικού τοιχώματος και την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, σε συνδυασμό με την διατήρηση της δομής του τοιχώματος και την απόρριψη ενδοκυτταρικού περιεχομένου. Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιλέχθηκε λόγω της δημιουργίας πόρων που επιφέρει στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων της μαγιάς και της απελευθέρωσης ενδοκυτταρικού περιεχομένου, σε συνδυασμό με την διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων. Στη συνέχεια, κυτταρικό υλικό επεξεργασμένο με τις προκατεργασίες αυτές χρησιμοποιήθηκε για την ενθυλάκωση αιθέριου ελαίου ρίγανης.

Η ενθυλάκωση πραγματοποιήθηκε με επώαση κυτταρικού υλικού κάθε προκατεργασίας σε θερμοκρασίες 30-65°C, υπό συνεχή ανάδευση σε μείγμα που περιελάμβανε σε κατά βάρος αναλογία 14.5 % κυτταρικό υλικό, 14.5 % έλαιο, 63.8 % νερό και 7.2 % αιθανόλη, για χρονική διάρκεια έως και 48 h. Εκτός από επεξεργασμένο κυτταρικό υλικό, χρησιμοποιήθηκαν και ανεπεξέργαστα κύτταρα. Αρχικά μελετήθηκε το μέγιστο φορτίο ελαίου που ενθυλακώθηκε εντός των κυττάρων, εκφρασμένο σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$. Βρέθηκε ότι η θερμοκρασία επώασης και οι επεξεργασίες εκτός από την ομογενοποίηση, δεν επηρέασαν σημαντικά το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης, με την τιμή του να προκύπτει $35.6 \pm 1.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$. Το τελικό φορτίο για τα ομογενοποιημένα κύτταρα προέκυψε χαμηλότερο και ίσο με $23.6 \pm 0.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ για όλες τις θερμοκρασίες επώασης, γεγονός που οφείλεται στην μεγάλο βαθμού διάρρηξη των κυττάρων από την διεργασία αυτή. Επιπλέον υπολογίστηκε η αποδοτικότητα του εγκλεισμού, μια παράμετρος που εκφράζει το ποσοστό του ελαίου που ενθυλακώθηκε κατά την διάρκεια της επώασης, σε σχέση με το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση. Η αποδοτικότητα προέκυψε επίσης ανεξάρτητη της θερμοκρασίας, με τιμή $55.3 \pm 3.3 \%$ για όλες τις κατηγορίες κυττάρων, εκτός από την περίπτωση των ομογενοποιημένων για την οποία προέκυψε $31.0 \pm 1.0 \%$.

Για την μελέτη της επίδρασης του χρόνου και της θερμοκρασίας επώασης στο φαινόμενο, και δεδομένου πως η ενθυλάκωση πραγματοποιείται παθητικά με διάχυση, τα πειραματικά δεδομένα του φορτίου ενθυλάκωσης σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης, περιγράφηκαν μαθηματικά με την προσαρμογή της λύσης του 2^{ου} νόμου διάχυσης του Fick. Από κάθε προσαρμογή προέκυψε ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης (D_{eff}), με την χρήση του οποίου υπολογίστηκε η παράμετρος t_{90} για κάθε περίπτωση, η οποία δηλώνει τον χρόνο επώασης που επιτυγχάνεται το 90% του τελικού φορτίου ενθυλάκωσης. Ο χρόνος αυτός ορίστηκε ως ο χρόνος ολοκλήρωσης της διεργασίας. Βρέθηκε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει την διάχυση, με αποτέλεσμα την ελάττωση του χρόνου t_{90} έως και 8 φορές (η ενθυλάκωση σε αυτολυμένα κύτταρα 24 h από 10.2 ± 1.4 h στους 30°C, ολοκληρώνεται σε 1.3 ± 0.2 h στους 65°C), με μοναδική εξαίρεση την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης των ανεπεξέργαστων κυττάρων άνω των 45°C, όπου και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές (8.1 ± 0.3 h στους 45°C και 9.4 ± 1.1 h στους 65°C). Ακόμα οι διεργασίες της αυτόλυσης και της ομογενοποίησης επιταχύνουν την διεξαγωγή του φαινομένου, με τους αντίστοιχους χρόνους t_{90} να προκύπτουν χαμηλότεροι από εκείνους των ανεπεξέργαστων κυττάρων. Συγκεκριμένα τα αυτολυμένα κύτταρα 24 h, στην θερμοκρασία των 65°C, η τιμή του

χρόνου t_{90} προέκυψε 1.3 ± 0.2 h, έναντι του αντίστοιχου χρόνου των ανεπεξέργαστων κυττάρων, για τα οποία προέκυψε 9.4 ± 1.1 h. Επιπλέον η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιφέρει αύξηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης με την αύξηση της ειδικής ενέργειας επεξεργασίας, με τις σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα να παρατηρούνται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες.

Η εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία περιγράφηκε μαθηματικά με την εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius, από την οποία προέκυψε η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) της ενθυλάκωσης του ελαίου για κάθε προεπεξεργασία κυττάρων. Την μεγαλύτερη τιμή E_a , δηλαδή την εντονότερη εξάρτηση από την θερμοκρασία, παρουσίασαν τα ανεπεξέργαστα κύτταρα για τα οποία η ενέργεια ενεργοποίησης προέκυψε 78.6 ± 12.6 kJ/mol, στο θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 30 και 45°C. Αμέσως μικρότερες τιμές E_a παρουσιάζουν τα αυτολυμένα κύτταρα (8 και 24 h), για τα οποία προέκυψε πως ο χρόνος αυτόλυσης δεν επηρεάζει την εξάρτηση του D_{eff} από την θερμοκρασία, με τις ενέργειες ενεργοποίησης και των δύο αυτών περιπτώσεων να προκύπτουν 56.0 ± 4.4 και 52.6 ± 7.1 kJ/mol αντίστοιχα. Επίσης η ενέργεια ενεργοποίησης στα ομογενοποιημένα κύτταρα δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές με τις αντίστοιχες των αυτολυμένων κυττάρων, με αυτήν να προκύπτει 47.0 ± 5.2 kJ/mol. Τέλος μικρότερες τιμές E_a παρουσίασαν τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 3.2, 13.6 και 107.0 kJ/kg, για τα οποία οι ενέργειες προέκυψαν 24.6 ± 1.9 , 25.2 ± 2.5 , 26.5 ± 4.7 kJ/mol αντίστοιχα, γεγονός που σημαίνει πως η ειδική ενέργεια της επεξεργασίας δεν επηρεάζει την θερμοκρασιακή εξάρτηση του D_{eff} .

Στην συνέχεια μελετήθηκε το φαινόμενο της απελευθέρωσης του ενθυλακωμένου ελαίου από τα κύτταρα σε συνάρτηση με την ενεργότητα του νερού a_w . Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 25°C σε ένα εύρος a_w από 0.53 έως 0.97. Η ποσοτικοποίηση της απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκε με το ποσοστό απελευθερωμένου ελαίου, το οποίο εκφράζει το ποσοστό του ελαίου που απελευθερώθηκε στο εξωτερικό των καψουλών ως προς το αρχικό φορτίο ενθυλάκωσης. Όπως προέκυψε, στις περισσότερες περιπτώσεις το ποσοστό έχει περίπου τιμή 0 έως και την ενεργότητα 0.68, εμφανίζει μια μικρή αύξηση που δεν ξεπερνά το 9% έως και την τιμή 0.84, ενώ παρουσιάζει ραγδαίες αυξήσεις έως και 90% σε ενεργότητες μεγαλύτερες του 0.93. Μικρότερα ποσοστά παρουσιάζουν τα ανεπεξέργαστα και τα αυτολυμένα κύτταρα, με τα δεύτερα να εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερα ποσοστά από τα ανεπεξέργαστα. Τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία παρουσίασαν αύξηση των τιμών των ποσοστών απελευθέρωσης με την αύξηση της ειδικής ενέργειας, με τα κύτταρα της συνθήκης των 3.2 kJ/kg σε $a_w = 0.97$ να παρουσιάζουν ένα ποσοστό περίπου 76%, ενώ εκείνα των 107.0 kJ/kg παρουσιάζουν ποσοστό 90%. Τα ομογενοποιημένα κύτταρα επίσης παρουσιάζουν εντονότερη απελευθέρωση λόγω της πλήρους διάρρηξης του κυτταρικού τοιχώματος. Η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης από τους 30 στους 65°C προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης κυρίως σε ενεργότητες μεταξύ 0.84 και 0.97, γεγονός που οφείλεται στην θερμοκρασιακή αλλοίωση του κυτταρικού περιβλήματος με αποτέλεσμα την ασθενέστερη συγκράτηση του ελαίου.

Τέλος, μελετήθηκε η σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου, για την οποία προέκυψε πως για υψηλούς χρόνους επώασης (>5 h) σε θερμοκρασίες κάτω των 45°C, η σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου τείνει στη σύσταση του καθαρού ελαίου ρίγανης, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης άνω των 45°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα επιφέρει αλλοίωση της σύστασης, με την περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά να μειώνεται. Ακόμα προέκυψε πως υπάρχει επιλεκτικότητα στην διάχυση των ουσιών του ελαίου στα κύτταρα, η οποία σχετίζεται με την πτητικότητα και την υδροφοβικότητα των ουσιών, αλλά και με την ύπαρξη της πλασματικής μεμβράνης.

Συμπερασματικά, η μέθοδος της ενθυλάκωσης αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κύτταρα μαγιάς παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, εφόσον η μαγιά αποτελεί μια οικονομική πρώτη ύλη, η οποία βρίσκεται σε αφθονία. Καθώς τα κύτταρα δεν είναι απαραίτητο να είναι ζωντανά για την πραγματοποίηση της ενθυλάκωσης, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν μεγάλες ποσότητες κυττάρων μαγιάς που προκύπτουν ως παραπροϊόν από τις βιομηχανίες. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή υπερτερεί έναντι των παραδοσιακών μεθόδων ενθυλάκωσης, λόγω του οικονομικού εξοπλισμού που απαιτείται για την παραγωγή των καψουλών.

EFFECTS OF CELL DISRUPTION PROCESSES ON THE ENCAPSULATION OF OREGANO ESSENTIAL OIL IN YEAST CELLS *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, commonly known as baker's yeast, is a widely used microorganism in the food industry, for the production of various products such as yeast extract, products of high nutrition value and enzymes. Disruption of solid cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is a necessary process to obtain these various intracellular products. The cell wall is a compact structure consisting of mannoproteins, glucans and chitin, that confer stability and protection of yeast cells, and maintains their spherical shape.

Yeast cell disruption is accomplished by various processes such as autolysis, high pressure homogenization and pulsed electric fields, which by disruption or even destruction of the cell wall structure, make the cells more permeable. Autolysis is a non-mechanical, enzymatic, thermal method of cell disruption, in which the components of cell wall are disintegrated by the action of endogenous enzymes. High pressure homogenization is a mechanical, non-thermal method, which cause the destruction of microorganism's cell wall, by applying high pressure on cell suspension. Pulsed electric field (PEF) processing involves the application of high voltage pulses for a few microseconds to food placed or flowing between two electrodes. PEF's result is the creation of pores on cell surface.

Microencapsulation is a process, in which one material or mixture of materials is coated or trapped in another material or system. The main aim of encapsulation is to protect a sensitive substance from the negative effects of light, moisture and oxygen, while at the same time the controlled release of the encapsulated substance is achieved. Also, encapsulation modifies the physical characteristics of starting substance, making it easier to handle (e.g. solid capsules instead liquid substances). Wall materials for capsules include carbohydrates, proteins, gums, lipids, cellulose and microorganisms. The thick cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is permeable to both hydrophilic and hydrophobic compounds, and provides a structured capsule that can be used as an encapsulation material. Also, yeast cells in various degrees of disintegration are available as waste streams from the food industry, making yeast cells a ubiquitous, low-cost material.

Oregano essential oil is prepared by extraction of dry leaves and blossoms of the *Origanum vulgare* plant, commonly known as oregano. The main compounds of oregano essential oil are carvacrol and thymol (78 – 82%), which are two monoterpene phenols with antimicrobial properties. Also, oregano essential oil contains small amounts of monoterpene carbohydrate, with p-cymene and gamma-terpinene being the main ones (5 – 7%), and trace of monoterpene alcohols, sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes. Due to high concentration of carvacrol, oregano essential oil is used in many products as it has antimicrobial activity and oregano flavor. Encapsulation of oregano essential oil into yeast cells provides protection for these compounds and easier handling.

In this diploma thesis, the processes of autolysis (52°C for 8 and 24 h), high pressure homogenization (800 bar, 4 passes) and pulsed electric fields treatment (specific energy 3.2, 13.6 and 107.0 kJ/kg) were used to increase cell permeability. The homogenization process was selected

for the study of the encapsulation of oregano essential oil in fully disrupted cellular material due to the destruction of the yeast cell wall structure caused by this process. Autolysis was chosen to accelerate the encapsulation of oregano essential oil, because at the end of the process, the permeability of the cell wall is increased, the cell membrane is breakdown and the intracellular content is rejected. Pulse electric fields treatment was chosen because of the creation of pores on the membrane of the yeast cells and of the release of intracellular contents, in combination with the maintenance of cell morphology. Subsequently, cellular material, which treated with these pretreatments was used for the encapsulation of oregano essential oil.

Encapsulation was achieved by incubating treated and untreated cell material in a system containing cell material (14.5 % W/W), oregano essential oil (14.5 % W/W), water (63.8 % W/W) and ethanol (7.2 % W/W). Incubations were performed in a temperature range between 30 and 65°C, and their duration did not exceed 48 h. Initially, the maximum encapsulation loading $\left(\frac{\text{mg carvacrol}}{100 \text{ mg dry capsules}}\right)$ was calculated. From these calculations it was observed that, incubation temperature and treatments other than homogenization did not affect final encapsulation loading, with a value of $35.6 \pm 1.6 \frac{\text{mg carvacrol}}{100 \text{ mg dry capsules}}$. The final encapsulation load of homogenized cells was calculated $23.6 \pm 0.6 \frac{\text{mg carvacrol}}{100 \text{ mg dry capsules}}$ for all temperatures. The lower value of homogenized cells was attributed to the high degree of cell disruption caused by this process. Also, encapsulation efficiency was calculated. Encapsulation efficiency is the percentage of oil that is successfully entrapped into baker's yeast cells, to the total oil added. Temperature, also, does not affect encapsulation efficiency, which was calculated $55.3 \pm 3.3 \%$ for all cell types, except for homogenized cells, which was calculated $31.0 \pm 1.0 \%$.

To study the effect of incubation time and temperature on the kinetics of the encapsulation and given that encapsulation in yeast cells follows a diffusion-based passive mechanism, the encapsulation loading as a function of incubation time was mathematically modeled using the solution of Fick's 2nd law of diffusion. In each case the effective diffusion coefficient (D_{eff}) was calculated. Another parameter calculated was denoted as t_{90} and expressed the equivalent time to achieve a value of the encapsulation load equal to 90% of the final value of encapsulation loading. This parameter t_{90} was calculated from diffusion coefficient from each case (treatment and incubation temperature) and was proven useful for the comparison of the overall duration of incubation for each cell material. This time was arbitrarily defined as the time to complete the process. An increase in incubation temperature was found to accelerate diffusion, and also decreased t_{90} up to 8 times (encapsulation in autolysed cells for 24 h from 10.2 ± 1.4 h at 30 °C, completed in 1.3 ± 0.2 h at 65 °C), with the only exception the increase in the incubation temperature of untreated cells above 45°C, where no significant increase or decrease was observed (8.1 ± 0.3 h at 45°C and 9.4 ± 1.1 h at 65°C). Also, the processes of autolysis and homogenization accelerated the oil diffusion into the yeast cells, with the corresponding t_{90} parameters resulting lower than the t_{90} parameters of untreated cells. Specifically, t_{90} time of encapsulation in autolysed cells (autolysis time 24 h) at 65 °C was calculated 1.3 ± 0.2 h and the corresponding value of t_{90} of untreated cells was calculated 9.4 ± 1.1 h. Furthermore, treatment with pulse electric fields results in an increase in the diffusion coefficient with an increase in specific processing energy, and the largest differences compared to untreated cells are observed at relatively low incubation temperatures.

The dependence of the effective diffusion coefficient from the incubation temperature was mathematically modeled using the Arrhenius equation, from which the energy activation (E_a) was calculated. The highest E_a value (i.e. the strongest temperature dependence) was calculated for the untreated cells, and was equal to 78.6 ± 12.6 kJ/mol in the temperature range between 30 and 45°C.

Immediately lower E_a values were calculated for autolysed cells (8 and 24 h), which showed that autolysis time did not affect the dependence of D_{eff} from incubation temperature, with activation energies of both cases being 56.0 ± 4.4 and 52.6 ± 7.1 kJ / mol respectively. Also, the activation energy for the homogenized cells ($E_a = 47.0 \pm 5.2$ kJ/mol) showed no significant difference with the corresponding E_a values of the autolysed cells. The lowest E_a values were calculated for cells treated with pulsed electric fields of specific energy of 3.2, 13.6 and 107.0 kJ/mol, for which the activation energy values were 24.6 ± 1.9 , 25.2 ± 2.5 , 26.5 ± 4.7 kJ / mol respectively, which means that the specific energy of pulsed electric fields does not affect the rate of change of diffusion coefficient versus incubation temperature. Finally, all cell disruption processes increases the range of temperature dependence of the diffusion coefficient from 30 to 65 °C.

Subsequently, release of encapsulated oil from the capsules as a function of water activity (a_w) was studied. This study was carried out at a constant temperature of 25 °C over a water activity range of 0.53 to 0.97. Quantification of the release was performed with the percentage of oil released, which expresses the percentage of oil diffused outside the capsules relative to the initial encapsulation loading. In most cases the percentage was around 0 up to water activity 0.68, and showed a slight increase not exceeding 9% up to 0.84, followed by a steep increase up to 90% at higher water activity values. Lower percentages were calculated in the untreated and autolysed cells, with the second ones showing slightly higher percentages than untreated. Cells that were treated with pulsed electric fields showed an increase in the release percentages values with the increase in specific energy. Cells that were treated with specific energy 3.2 kJ/kg at $a_w = 0.97$ had a release percentage of 76%, whereas cells treated at 107.0 kJ/kg showed a release percentage 90%. Homogenized cells have higher values of release percentages, than others cells groups, due to the complete breakdown of the cell wall. The Increase of incubation temperature from 30 to 65 °C causes an increase in release percentages, mainly at water activities between 0.84 and 0.97, which is due to the change of the cell envelope from temperature, resulting in weaker oil restraint.

Finally, the composition of the encapsulated oil was studied, which resulted in high incubation times at low temperatures, the composition of the encapsulated oil tending to the composition of pure oregano oil, while increasing the incubation temperature over long periods of time results in oil's deterioration, with the volatile constituents being reduced. Also, emerged that there is selectivity in the diffusion of the oil substances into the yeast cells, which is related to the volatility and hydrophobicity of the substances and to the existence of cell membrane.

In conclusion, encapsulation of oregano essential oil in yeast cells has several advantages, because baker's yeast is an economical raw material which is abundant. As the cells do not have to be alive for the encapsulation, large amounts of yeast cells derived from the industries could be utilized. Also, the cost of the equipment is less than the cost of traditional encapsulation methods.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΜΑΓΙΑ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1
1.1. Εισαγωγή	2
1.2. Ταξινόμηση Ζυμών	2
1.3. Στοιχεία Διατροφής και Ανάπτυξης Ζυμών	3
1.4. Δομή και Λειτουργία του Κυττάρου της Μαγιάς	3
1.4.1. Κυτταρικό Περιβλήμα	4
1.4.1.1. Κυτταρικό Τοίχωμα	4
1.4.1.2. Περίπλασμα	6
1.4.1.3. Κυτταρική Μembrάνη	7
1.4.2. Κυτταρόπλασμα και Κυτταροσκελετός	9
1.4.3. Πυρήνας	10
1.4.4. Εκκριτικό Σύστημα	10
1.4.5. Κενοτόπια	11
1.4.6. Μιτοχόνδρια	12
1.5. Παραγωγή Προϊόντων Μαγιάς	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΡΡΗΞΗΣ	14
2.1. Εισαγωγή	15
2.2. Μέθοδοι Κυτταρικής Διάρρηξης	15
2.2.1. Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης	16
2.2.2. Αυτόλυση	18
2.2.3. Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία	21
2.3. Βιομηχανικά Απόβλητα Διαρρηγμένων Κυττάρων Μαγιάς	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ	24
3.1. Εισαγωγή	25
3.2. Τεχνικές Ενθυλάκωσης	25
3.2.1. Ξήρανση με Ψεκάσμο (Spray Drying).....	26
3.2.2. Spray Chilling και Spray Cooling.....	26
3.2.3. Λυοφιλίωση (Freeze Drying).....	27
3.2.4. Εξώθηση	27
3.2.5. Μέθοδος Wurster	28

3.2.6. Παγίδευση σε Λιποσώματα.....	28
3.3. Ενθυλάκωση και Βιομηχανία Τροφίμων	29
3.3.1. Πλεονεκτήματα Ενθυλάκωσης	29
3.3.2. Ενθυλακωμένα Συστατικά Τροφίμων	29
3.3.2.1. Οξέα	30
3.3.2.2. Χρωστικές.....	30
3.3.2.3. Παράγοντες Γεύσης και Αρώματος.....	30
3.3.2.4. Διογκωτικά	31
3.3.2.5. Άλατα	31
3.3.2.6 Γλυκαντικά.....	31
3.3.2.7. Βιταμίνες και Μέταλλα	31
3.3.3. Επικαλυπτικά Υλικά.....	31
3.3.3.1. Υδατάνθρακες.....	32
3.3.3.2. Κυτταρίνη	33
3.3.3.3. Κόμμεα	33
3.3.3.4. Λιπίδια.....	33
3.3.3.5. Πρωτεΐνες.....	34
3.4. Μέθοδοι Απελευθέρωσης Εσωτερικής Φάσης	34
3.4.1. Καταστροφή Επικαλυπτικού Μέσου.....	34
3.4.2. Διάχυση	35
3.4.3. Διάλυση και Τήξη	35
3.4.4. Βιοαποικοδόμηση	36
3.5. Ενθυλάκωση Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης σε Κύτταρα Ζύμης (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	36
3.5.1. Μέθοδοι Εκχύλισης Αιθέριων Ελαίων	36
3.5.1.1. Εκχύλιση Soxhlet.....	37
3.5.1.2. Υδροαπόσταξη.....	37
3.5.1.3. Διαβροχή	37
3.5.1.4. Εκχύλιση Αναδευόμενου Διαλύτη	38
3.5.2. Σύσταση και Ιδιότητες Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης.....	38
3.5.3. Ενθυλάκωση Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης	38
3.5.4. Κύτταρα Ζύμης ως Φορέας Ενθυλάκωσης.....	39
3.5.5. Μηχανισμός Ενθυλάκωσης Αιθέριων Ελαίων σε Ζύμες	39
3.5.6. Επίδραση Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στην Ενθυλάκωση Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης σε Κύτταρα Μαγιάς	40
3.5.7. Στόχος Διπλωματικής Εργασίας.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41

4.1. Εισαγωγή	42
4.2. Παρασκευή Αιωρήματος Μαγιάς 10 % w/w	42
4.3. Επεξεργασία Αιωρήματος.....	42
4.3.1. Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης.....	43
4.3.2. Αυτόλυση.....	43
4.3.3. Επεξεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία	43
4.4. Παραλαβή Ξηρού Κυτταρικού Υλικού	44
4.5. Παρασκευή Μικροκαψουλών Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης.....	45
4.6. GC – MS Ανάλυση του Ελαίου Ρίγανης	47
4.6.1. Προσδιορισμός Σύστασης Ελαίου σε Καρβακρόλη και Θυμόλη	47
4.7. Μέτρηση Συγκέντρωσης Ενθυλακωμένου Ελαίου	48
4.7.1. Φασματοφωτομετρική Μέθοδος Προσδιορισμού Συγκέντρωσης Ελαίου.....	48
4.7.2. Πειράματα Διερεύνησης της Συμπεριφοράς των Καψουλών	50
4.7.3. Μέτρηση Ολικής Συγκέντρωσης Ελαίου	52
4.7.4. Μέτρηση Συγκέντρωσης Επιφανειακού Ελαίου.....	52
4.7.5. Επεξεργασία Μετρήσεων	53
4.8. GC – MS Ανάλυση Σύστασης Ενθυλακωμένου Ελαίου	53
4.9. Προσδιορισμός Απελευθέρωσης Ενθυλακωμένου Ελαίου.....	53
4.10. Στατιστική Επεξεργασία.....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	55
5.1. Εισαγωγή	56
5.2. Μελέτη Κινητικής και Απόδοσης Εγκλεισμού	56
5.2.1. Μέγιστες Τιμές Φορτίου και Αποδοτικότητας Ενθυλάκωσης.....	56
5.2.2. Επίδραση του Χρόνου Επώασης στο Φορτίο Ενθυλάκωσης και Εφαρμογή του 2 ^{ου} Νόμου Διάχυσης του Fick.....	59
5.2.3. Ελάχιστος Χρόνος Ολοκλήρωσης του Φαινομένου του Εγκλεισμού.....	67
5.2.4. Επίδραση της Θερμοκρασίας στον Φαινόμενο Συντελεστή Διάχυσης και Εφαρμογή της Εξίσωσης Arrhenius	70
5.3. Επίδραση της Ενεργότητας Νερού στην Απελευθέρωση του Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης από τις Μικροκάψουλες	78
5.4. Επίδραση Διεργασιών Κυτταρικής Διάρρηξης και Παραμέτρων Επώασης στην Σύσταση του Ενθυλακωμένου Ελαίου.....	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
6.1. Επίδραση Θερμοκρασίας Επώασης και Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στο Τελικό Φορτίο και στην Αποδοτικότητα του Εγκλεισμού	90

6.2. Επίδραση Θερμοκρασίας Επώασης και Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στον Χρόνο Ολοκλήρωσης της Διεργασίας της Ενθυλάκωσης και στο Φαινόμενο Συντελεστή Διάχυσης του Ελαίου.....	90
6.3. Επίδραση Θερμοκρασίας Επώασης και Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στο Φαινόμενο της Απελευθέρωσης του Ελαίου από τις Κάψουλες	92
6.4. Επίδραση Προκατεργασίας Κυττάρων και Παραμέτρων Επώασης στη Σύσταση του Ενθυλακωμένου Ελαίου	93
6.5. Πλεονεκτήματα Ενθυλάκωσης Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης σε Κύτταρα Μαγιάς	93
6.6. Προτάσεις για Μελλοντική Μελέτη	94
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	99
Π.1. Πίνακες Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA) για την Μελέτη της Σύστασης του Ενθυλακωμένου Ελαίου Ρίγανης του Κεφαλαίου 5.4.....	100

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΜΑΓΙΑ (*Saccharomyces cerevisiae*)

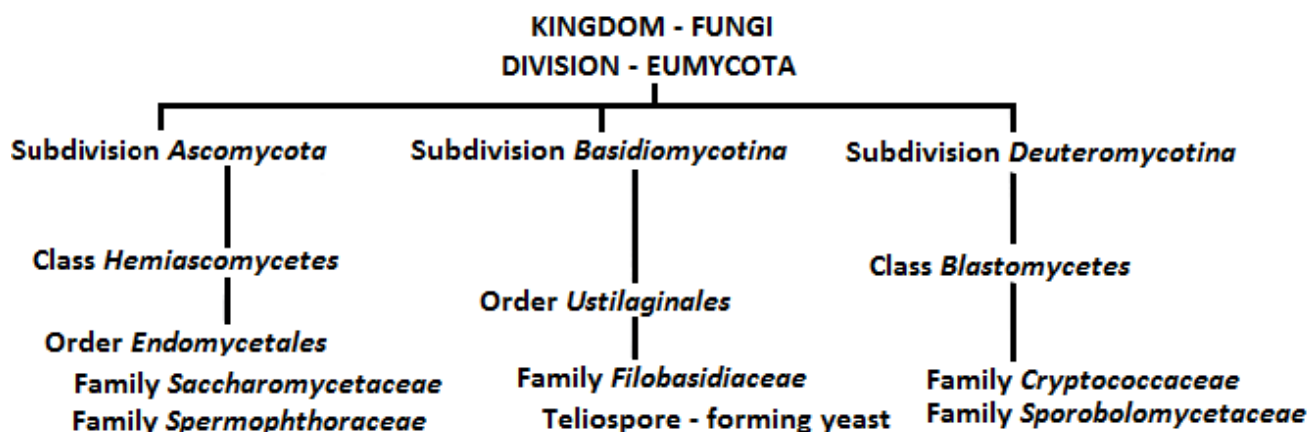
1. Η ΜΑΓΙΑ (*Saccharomyces cerevisiae*)

1.1. Εισαγωγή

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί, μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Εξελίχτηκαν από πολυκύτταρους προγόνους, εφόσον μερικά είδη έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσουν πολυκύτταρικά χαρακτηριστικά, δημιουργώντας ίνες συνδεδεμένων εκβλαστούμενων κυττάρων, γνωστές ως ψευδοϋφές. Οι ζύμες παρουσιάζουν διάφορα μεγέθη, τα οποία εξαρτώνται από το είδος και το περιβάλλον ανάπτυξής τους. Οι περισσότερες ζύμες έχουν διάμετρο από 3 έως 4 μm, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις ζυμών που μπορούν να φτάσουν έως και 40 μm. Οι περισσότερες ζύμες αναπαράγονται αγενώς με μίτωση, ενώ πολλές ζύμες επιτυγχάνουν αυτόν τον τρόπο αναπαραγωγής με τη διαδικασία της ασύμμετρης διαίρεσης (εκβλάστηση) (Legras, Merdinoglu, Cornuet, & Karst, 2007; Reed & Nagodawithan, 1991; Rosa & Péter, 2006; Walker, Skelton, & Smith, 2002; Yong, 2012).

1.2. Ταξινόμηση Ζυμών

Η ταξινόμηση των ζυμών ξεκίνησε από τον Meyer, το 1837, ο οποίος καθιέρωσε την ονομασία Σακχαρομύκης (*Saccharomyces*), από τις Ελληνικές λέξεις «σάκχαρις» (ζάχαρη) και «μύκης» (μύκητας), για τη μαγιά. Το 1984, δημοσιεύθηκε από τον Krieger-van Rij το πρώτο ταξινομικό σύστημα για τις ζύμες, το οποίο δημιουργήθηκε από συνεργατικές προσπάθειες πολλών ταξινομιστών απ' όλον τον κόσμο. Η πρώτη έκδοση του έργου «Οι Ζύμες: Μια Ταξινομική Μελέτη» περιλάμβανε 26 γένη και 164 είδη, ενώ 18 χρόνια αργότερα κυκλοφόρησε η δεύτερη έκδοση από τον Lodder, η οποία αριθμούσε 36 γένη και 349 είδη. Σήμερα έχουν ταξινομηθεί περίπου 1500 είδη, με το ταξινομικό σύστημα του Krieger-van Rij να αποτελεί θεμέλιο του σημερινού βελτιωμένου συστήματος, το οποίο χρησιμοποιείται σχεδόν απ' όλους τους μυκητολόγους.



Εικόνα 1.1. Μερική ταξινόμηση των ζυμών της βιομηχανίας (Reed & Nagodawithan, 1991)

Όλα τα μέλη του βασιλείου των μυκήτων κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες: στους Φυκομύκητες (*Phycomycetes*), στους Ασκομύκητες (*Ascomycetes*), στους Βασιδιομύκητες (*Basidiomycetes*) και στους Δευτερομύκητες (*Deuteromycetes*). Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται κυρίως στα χαρακτηριστικά της βλαστικής ανάπτυξης και στη φυσιολογία των σπορίων (εάν υπάρχουν). Οι περισσότερες ζύμες στην φύση ανήκουν στους Ασκομύκητες (σποριογενείς) και

στους Δευτερομύκητες (ασποριογενείς), καθώς λίγες είναι αυτές που κατατάσσονται στους Βασιδιομύκητες. Παρόλο που οι Φυκομύκητες μπορούν να παρουσιάσουν την μορφολογία των ζυμών υπό ορισμένες συνθήκες, η φυσιολογική τους ύπαρξη είναι σε νηματοειδή μορφή. Για τον λόγο αυτόν, στην συγκεκριμένη κατηγορία μυκήτων δεν εντάσσονται ζύμες (Reed & Nagodawithan, 1991).

Το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, ευρέως γνωστό και ως «μαγιά», ανήκει στην υποδιαίρεση των Ασκομυκήτων. Η μαγιά έχει την ικανότητα, με μία διαδικασία που ονομάζεται ζύμωση, να μετατρέπει τους υδατάνθρακες σε διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη, δύο ουσίες οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στην αρτοποιία και στην παρασκευή αλκοολούχων ποτών. Αποτελεί ακόμα οργανισμό-πρότυπο για την Κυτταρική Βιολογία, καθώς και είναι ένας από τους εκτενέστερα μελετημένους μικροοργανισμούς. Η μαγιά έχει χρησιμοποιηθεί για συλλογή πληροφοριών σχετικά με την βιολογία του ευκαρυωτικού κυττάρου, και κατ' επέκταση για την βιολογία του ανθρώπου. Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* είναι αβλαβές, χωρίς αυτό όμως να σημαίνει πως δεν υπάρχουν παθογόνοι ζυμομύκητες. Για παράδειγμα το είδος ζύμης *Candida albicans* είναι δυνητικά παθογόνο, και έχει την δυνατότητα να προκαλέσει λοιμώξεις σε ανθρώπους (Legras, Merdinoglu, Cornuet, & Karst, 2007; Ostergaard, Olsson, & Nielsen, 2000).

1.3. Στοιχεία Διατροφής και Ανάπτυξης Ζυμών

Οι ζύμες χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας οργανικές ενώσεις, και η ανάπτυξή τους δεν απαιτεί τη ύπαρξη του ηλιακού φωτός. Για αυτούς τους λόγους οι ζύμες χαρακτηρίζονται ως χημειοργανότροφοι μικροοργανισμοί. Κύριες πηγές άνθρακα αποτελούν τα σάκχαρα εξοζών, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, και οι δισακχαρίτες, όπως η σακχαρόζη και η μαλτόζη. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποια είδη ζυμών που μπορούν να μεταβολίζουν σάκχαρα πεντοζών όπως η ριβόζη, αλκοόλες και οργανικά οξέα (Barnett, 1975).

Οι ζύμες είναι είτε υποχρεωτικά αερόβιες, είτε προαιρετικά αναερόβιες. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, δεν έχει βρεθεί κανένα είδος ζύμης, το οποίο να αναπτύσσεται υποχρεωτικά αναερόβια. Το βέλτιστο pH ανάπτυξης των περισσότερων ζυμών είναι ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο.

Το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο αναπτύσσονται οι ζύμες ποικίλει από είδος σε είδος. Για παράδειγμα, το *Leucosporidium frigidum* αναπτύσσεται από τους -2 °C έως τους 20 °C, η *Candida slooffii* από τους 28 °C έως τους 45 °C και ο *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύσσεται βέλτιστα μεταξύ 30 και 35 °C. Τα κύτταρα των ζυμών έχουν την ικανότητα να διατηρηθούν υπό ψύξη, με την βιωσιμότητά τους όμως να μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου.

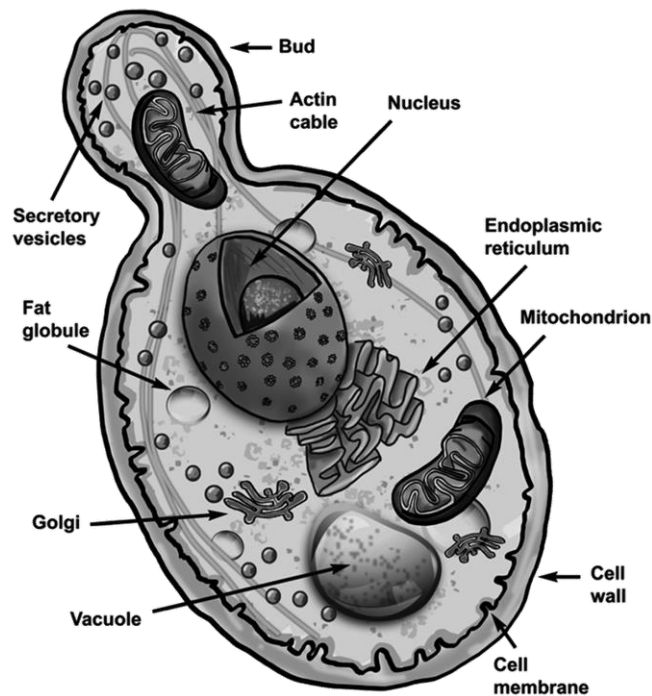
Εργαστηριακά οι ζύμες αναπτύσσονται είτε σε στερεό μέσο ανάπτυξης, είτε σε υγρό ζυμό. Τα συνηθέστερα μέσα τα οποία χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια ζυμών αποτελούν διάφορα είδη άγαρ (Arthur & Watson, 1976).

1.4. Δομή και Λειτουργία του Κυττάρου της Μαγιάς

Ως ευκαρυωτικό κύτταρο, η μαγιά διαθέτει πυρήνα, μιτοχόνδρια, σύμπλεγμα Golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο, κενοτόπια και μικροστοιχεία. Αρκετά από τα οργανίδια αυτά δεν λειτουργούν εντελώς ανεξάρτητα μεταξύ τους, και εμπεριέχονται σε ένα εκτενές ενδομεμβρανικό σύστημα. Εντός του κυτταροπλάσματος συναντώνται επίσης ριβοσώματα και πλασμίδια, ενώ δομή του ενδοκυτταρικού περιεχομένου συγκρατείται από έναν κυτταροσκελετό, ο οποίος αποτελείται από μικροσωληνίσκους και μικροϊνίδια. Το κυτταρικό περιεχόμενο επικαλύπτεται από το κυτταρικό

περίβλημα, το οποίο περιλαμβάνει την κυτταρική μεμβράνη, το περίπλασμα και το κυτταρικό τοίχωμα.

Λόγω του ότι το κύτταρο της μαγιάς παρουσιάζει πολλές λειτουργικές και δομικές ιδιότητες των ανώτερων ευκαρυωτών, αποτελεί πρότυπο μικροοργανισμό για την μελέτη των ευκαρυωτικών κυττάρων. Να σημειωθεί πως η ύπαρξη του κυτταρικού τοιχώματος είναι η αιτία που η μαγιά διαφοροποιείται από τα ζωικά κύτταρα (Alberts et al., 2011; Walker G. M., 1998).



Εικόνα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του *S. cerevisiae* (Walker & Stewart, 2016)

1.4.1. Κυτταρικό Περίβλημα

Το κυτταρικό περίβλημα της μαγιάς αποτελεί την επικάλυψη που περικλείει στο εσωτερικό της το κυτταρόπλασμα, το οποίο φέρει όλα τα οργανίδια του μικροοργανισμού. Το κυτταρικό περίβλημα δομείται από το κυτταρικό τοίχωμα, το περίπλασμα και την κυτταρική (πλασματική) μεμβράνη. Το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλει το περίπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη, ενώ το περίπλασμα βρίσκεται μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης. Το κυτταρικό περίβλημα του *Saccharomyces cerevisiae* καταλαμβάνει περίπου το 15% του συνολικού όγκου του κυττάρου, καθώς και αποτελεί μια δομή υψίστης σημασίας για την λειτουργικότητα του μικροοργανισμού, εφόσον ελέγχει την διαπερατότητα και τις ωσμωτικές ιδιότητες του κυττάρου (Walker G. M., 1998).

1.4.1.1. Κυτταρικό Τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί ένα χαρακτηριστικό στοιχείο όλων των ζυμών. Πρόκειται για μία δομή μεγάλου πάχους (100 – 200 nm), η οποία αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, καθώς και από μικρότερα ποσοστά πρωτεϊνών, λιπιδίων και ανόργανων φωσφορικών αλάτων. Τα κύρια δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος είναι οι γλυκάνες, οι μαννοπρωτεΐνες και σε μικρότερα ποσοστά η χιτίνη. Οι γλυκάνες, όντας μερικώς διατεταγμένες σε ένα δίκτυο μικροϊνών, προσδίδουν στο τοίχωμα μεγάλη αντοχή. Πιο συγκεκριμένα, οι γλυκάνες που συναντώνται στο

κυτταρικό τοίχωμα είναι β-1,3-γλυκάνες και β-1,6-γλυκάνες, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την διαλυτότητά τους σε οξέα και βάσεις. Οι μαννοπρωτεΐνες που περιέχονται, αποτελούνται από έναν α-1,6-συνδεδεμένο πυρήνα με α-1,2 και α-1,3 πλευρικές αλυσίδες. Η χιτίνη είναι ένα πολυμερές Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης, το οποίο βρίσκεται σε μικρότερα ποσοστά στις εκβλαστήσεις (buds) του ζυμομύκητα (Vukoníć & Mrša, 1995; Walker G. M., 1998).

Πίνακας 1.1. Συστατικά κυτταρικού τοιχώματος

Συστατικά Κυτταρικού Τοιχώματος	% w/w Τοιχώματος (σε ξηρή βάση)	Κύριοι Τύποι Σύνδεσης	Βαθμός Πολυμερισμού	Mr (kDa)
Μαννοπρωτεΐνες	40	α-1,6 + α-1,3 + α-1,2		450
Γλυκάνες	58			
Γλυκάνες διαλυτές σε αλκαλικό περιβάλλον	20	β-1,3 + λίγοι β-1,6	1500	243
Αδιάλυτες γλυκάνες	35	β-1,3 + λίγοι β-1,6	1500	243
Γλυκάνες διαλυτές σε όξινο περιβάλλον	3	β-1,6 + λίγοι β-1,3	140	23
Χιτίνη*	2	β-1,4		

*Η χιτίνη συναντάται κυρίως στις εκβλαστήσεις της μαγιάς, το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει λιγότερο από το 10% της συνολικής ποσότητας χιτίνης (Klis, 1994)

Το κυτταρικό τοίχωμα της μαγιάς έχει μια στρωματοποιημένη δομή. Συγκεκριμένα πρόκειται για μια διπλή δομή, αποτελούμενη από ένα εσωτερικό διαφανές, άμορφο, ινώδες στρώμα, και από ένα ινώδες εξωτερικό στρώμα με ινίδια κάθετα στην επιφάνεια του κυττάρου. Το εξωτερικό στρώμα αποτελείται κυρίως από μαννοπρωτεΐνες και είναι ευπαθές στην υδρόλυση από πρωτεολυτικά ένζυμα. Έρευνες έδειξαν πως με καταστροφή του εξωτερικού στρώματος, το σχήμα του μικροοργανισμού παρέμεινε αμετάβλητο. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα πως η εξωτερική πρωτεϊνική στιβάδα δεν εμπλέκεται άμεσα στην διατήρηση της μηχανικής αντοχής του κυτταρικού τοιχώματος, γεγονός που συνεπάγεται με την άμεση σύνδεση της μηχανικής αντοχής με το εσωτερικό στρώμα του τοιχώματος.

Το εσωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται κυρίως από γλυκάνες, και όπως προαναφέρθηκε, είναι υπεύθυνο για την μηχανική αντοχή και σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι και η εσωτερική στιβάδα γλυκάνης, είναι επίσης στρωματοποιημένη και αποτελείται από ένα εσωτερικό ινώδες στρώμα κοντά στην πλασματική μεμβράνη, και από ένα πιο άμορφο εξωτερικό στρώμα αποτελούμενο κυρίως από β-1,6-γλυκάνες. Με πρωτεόλυση της εξωτερικής στιβάδας και μετέπειτα με επίδραση β-1,6-γλυκανάσης αφαιρέθηκε όχι μόνο το εξωτερικό στρώμα, αλλά και το άμορφο στρώμα, με αποτέλεσμα να απομείνει μονάχα η ινώδης στρώση. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν πως και πάλι το αρχικό σχήμα του κυττάρου μπορούσε να αναγνωρισθεί, με την εξαγωγή του συμπεράσματος πως η δομή η οποία είναι κυρίως υπεύθυνη για την μηχανική αντοχή το τοιχώματος είναι η εσωτερική ινώδης στιβάδα. Επίσης στην εσωτερική ινώδη στιβάδα του εσωτερικού στρώματος συναντάται χιτίνη, η οποία πιθανότατα σχηματίζει σύμπλοκα χιτίνης - γλυκάνης. Ακόμα, παρόλη την ανθεκτικότητα και την συνοχή του κυτταρικού τοιχώματος, ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί μία ιδιαίτερα ελαστική ζύμη.

Η στρωματοποιημένη δομή του κυτταρικού τοιχώματος έχει πολλές συνέπειες στις ιδιότητες της μαγιάς. Οι επιφανειακές ιδιότητες της μαγιάς όπως η υδροφοβικότητα, το ηλεκτρικό φορτίο και η σεξουαλική συγκολλησιμότητα καθορίζονται από την εξωτερική πρωτεϊνική στιβάδα. Η εξωτερική στιβάδα, και ιδιαίτερα οι *N*-συνδεδεμένες πλευρικές αλυσίδες μαννοπρωτεϊνών, ευθύνεται για την αδιαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος σε μακρομόρια. (Klis, 1994)

Το κυτταρικό τοίχωμα δεν είναι απλώς ένας αδρανής εξωσκελετός με μοναδική λειτουργία την προστασία του κυττάρου, αλλά αντιθέτως πρόκειται για ένα ζωντανό, πολύλειτουργικό οργανίδιο. Οι λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος μεταβάλλονται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και του μεταβολισμού της μαγιάς, και σχετίζονται με την προστασία του κυττάρου από το εξωγενές περιβάλλον, τη διατήρηση του σχήματος, τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, την πρόσληψη και απόρριψη ουσιών καθώς και με τις εξειδικευμένες ενζυμικές δράσεις. Επιπροσθέτως, το τοίχωμα προσδίδει στην μαγιά κροκιδωτικές, πλωτικές και συγκολλητικές ιδιότητες, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στις βιομηχανίες ζύμωσης, αλλά και στην ιατρική. Στον Πίνακα 1.2. αναφέρονται περιληπτικά όλες οι φυσιολογικές λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος (Vuković & Mrša, 1995; Walker G. M., 1998).

Πίνακας 1.2. Φυσιολογικές λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος του *S. cerevisiae*

Λειτουργίες	
Φυσική Προστασία	Ταυτόχρονα με την προστασία του πρωτοπλάστη, το κυτταρικό τοίχωμα διατηρεί το σχήμα των κυττάρων της μαγιάς.
Ωσμωτική Σταθερότητα	Η αφαίρεση του κυτταρικού τοιχώματος οδηγεί στη λύση του πρωτοπλάστη απουσία ωσμωτικών σταθεροποιητών.
Ρύθμιση Διαπερατότητας	Διαλυμένες ουσίες μεγαλύτερες των 600 Da δεν διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα. Το τοίχωμα επίσης, ελέγχει την εισροή νερού στο κύτταρο.
Ενζυμική Υποστήριξη	Ένζυμα μαλακώματος του τοιχώματος (π.χ. γλυκανάσες) και υδρολάσες (π.χ. ιμπερτάση) είναι ακινητοποιημένα στη μήτρα του κυτταρικού τοιχώματος.
Δέσμευση Κατιόντων	Αρκετά κατιόντα είναι γνωστό ότι απομονώνονται αποτελεσματικά από το κυτταρικό τοίχωμα, συμπεριλαμβανομένων των βαρέων μετάλλων.
Διακυτταρική Αναγνώριση	Περιοχές αναγνώρισης ζευγαρωτικών φερομονών και θανατηφόρων τοξινών υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα.
Διακυτταρική Προσκόλληση	Η κροκίδωση και η συσσωμάτωση κυττάρων μαγιάς είναι φαινόμενα τα οποία σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα.

(Walker G. M., 1998)

1.4.1.2. Περίπλασμα

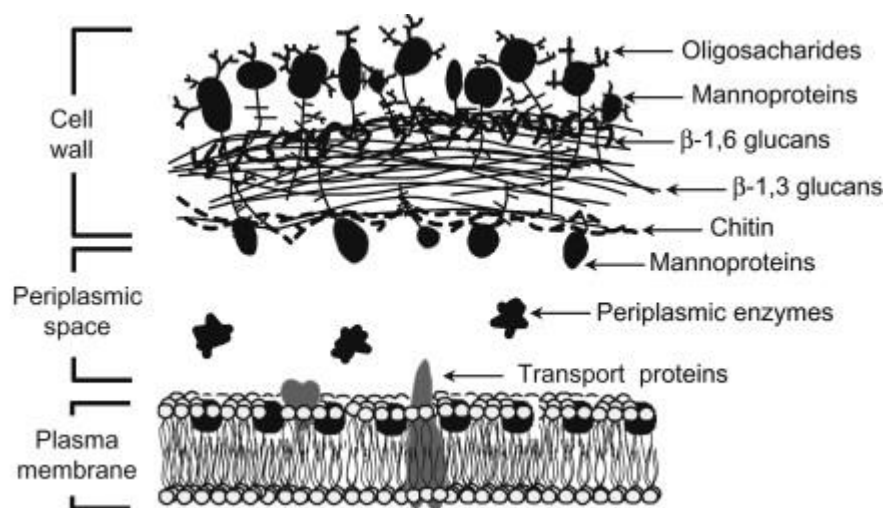
Το περίπλασμα αποτελεί μία δομή μικρού πάχους (35 – 45 Å), η οποία συναντάται μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης. Το περίπλασμα δομείται από εκκρινόμενες πρωτεΐνες, όπως οι μαννοπρωτεΐνες, οι οποίες δεν δύνανται να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα. Επίσης, το περίπλασμα περιλαμβάνει τα γλυκοπρωτεϊνικά ένζυμα ιμπερτάση και όξινη φωσφατάση, τα οποία καταλύουν την υδρόλυση υποστρωμάτων που δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Άλλα ένζυμα που παρατηρούνται στο περίπλασμα είναι η μαλιβιάση και η τρεχαλάση.

Το περίπλασμα της μαγιάς παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, λόγω της περιεκτικότητάς του σε ιμπερτάση, η οποία είναι ένα ένζυμο που βρίσκει εφαρμογή στην βιομηχανία ζαχαροπλαστικής για την υδρόλυση της κρυσταλλικής σακχαρόζης προς φρουκτόζη και γλυκόζη, για την παραγωγή διάφορων γλυκισμάτων όπως μαλακής σοκολάτας. Η ιμπερτάση

παρασκευάζεται από μαγιά αρτοποιίας με την διεργασία της αυτόλυσης και της υδρόλυσης (Walker G. M., 1998).

1.4.1.3. Κυτταρική Μembrάνη

Η κυτταρική (πλασματική) μεμβράνη της μαγιάς συγκροτεί μια δομή πάχους 7.5 μm , η οποία ελέγχει την διέλευση υδρόφιλων μορίων, και κατ' επέκταση την ελεύθερη ανάμειξη των κυτταροπλασματικών ουσιών με το υδατικό περιβάλλον του κυττάρου. Η κυτταρική μεμβράνη, όντας μια βιολογική μεμβράνη, συγκροτείται από μία διπλοστιβάδα λιπιδίων, η οποία περιέχει διάσπαρτες σφαιρικές πρωτεΐνες στην έκτασή της, αποτελώντας ένα ρευστό μωσαϊκό. Τα λιπαρά δομικά συστατικά της μεμβράνης διακρίνονται σε φωσφολιπίδια και στερόλες, τα οποία παρέχουν στο κύτταρο της μαγιάς ρευστότητα και ακαμψία αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες που συναντώνται στην μεμβράνη σχετίζονται με τη μεταφορά διαλυτών ουσιών (τριφωσφορική αδενοσινάση, πρωτεϊνικοί μεταφορείς, κανάλια), τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (συνθάσες γλυκάνης και χιτίνης), τη διαμεμβρανική μεταγωγή σημάτων (αδενυλική κυκλάση, πρωτεΐνες G) και την αγκύρωση του κυτταροσκελετού.



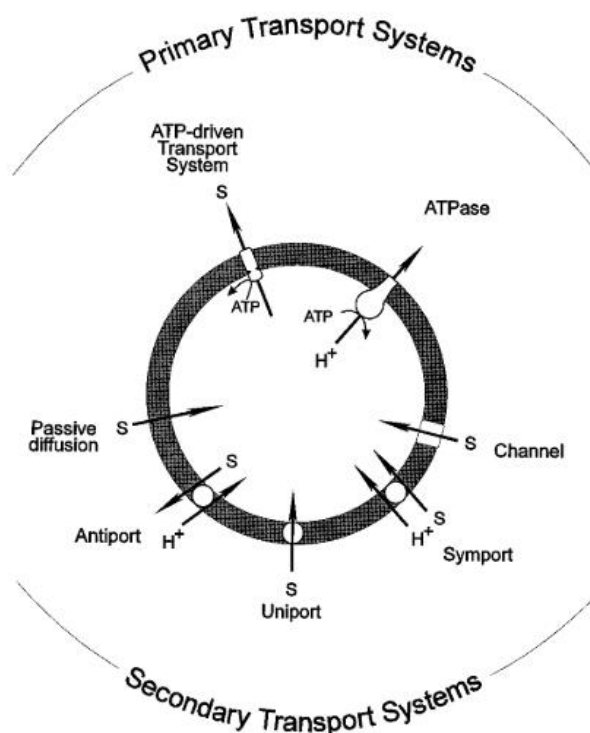
Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού περιβλήματος του *S. cerevisiae* (Paramera, Karathanos, & Konteles, 2014)

Η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει δομικές αλλά και λειτουργικές μεταβολές, αναλόγως των συνθηκών της ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Για παράδειγμα ο ρυθμός ανάπτυξης, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την σύνθεση των λιπιδίων και ιδιαίτερα των ακόρεστων λιπαρών οξέων της μεμβράνης. Τέτοιου είδους μεταβολές έχουν επιπτώσεις στις λειτουργικές ιδιότητες της πλασματικής μεμβράνης, και ιδιαίτερα σε εκείνες που σχετίζονται με την μεταφορά αμινοξέων και σακχάρων.

Οι βασικές λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης σχετίζονται με τον έλεγχο των εισερχόμενων και εξερχόμενων ουσιών από το κύτταρο. Οι ιδιότητες της εκλεκτικής διαπερατότητας οφείλονται στην δράση εξειδικευμένων πρωτεϊνών, των οποίων ο ρόλος σχετίζεται με την θρέψη του μικροοργανισμού, δηλαδή με την πρόσληψη αζώτου, σακχάρων, ιόντων και άλλων χρήσιμων στοιχείων για την μαγιά (Vuković & Mrša, 1995; Walker G. M., 1998).

Πρωτεύουσα μεταφορά, ορίζεται η μεταφορά κατά την οποία λαμβάνει χώρα η μετατροπή της ακτινοβολίας ή της χημικής ενέργειας σε ηλεκτροχημική ενέργεια. Στην περίπτωση της μεμβράνης του *Saccharomyces cerevisiae*, έχουν περιγραφεί μονάχα πρωτεύοντα συστήματα μεταφοράς υποκινούμενα από ATP. Η υδρόλυση του ATP από την ATP-άση της μεμβράνης έχει ως

αποτέλεσμα την δημιουργία μιας ηλεκτροχημικής βαθμίδας πρωτονίων, η οποία αποτελεί την κινητήρια δύναμη της μεταφοράς των πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης. Οι μεταφορείς ABC συμμετέχουν επίσης στην υδρόλυση του ATP, με το πιο αντιπροσωπευτικό μέλος αυτής της υπερικογένειας να είναι η πρωτεΐνη Ste6.



Εικόνα 1.4. Πρωτεύοντα και δευτερεύοντα συστήματα μεταφοράς στον *S. cerevisiae* (Van der Rest et al., 1995)

Ο ρυθμός της παθητικής διάχυσης ουσιών διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης διέπεται εν μέρει από τα φυσικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης, όπως το μήκος των ακετυλο-αλυσίδων, τον βαθμό κορεσμού των λιπαρών οξέων, την ρευστότητα της μεμβράνης, καθώς και από αρκετούς ακόμα παράγοντες. Μια μεγάλη ποικιλία σακχαροαλκοολών όπως η αραβινιτόλη, η ερυθριτόλη, η μαννιτόλη, η ριβιτόλη, η σορβιτόλη και η ξυλιτόλη, μπορούν να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη της μαγιάς, μόνο με παθητική διάχυση. Παρόλο που ακόμα δεν έχει βρεθεί ακριβώς ο μηχανισμός μεταφοράς αυτών των μορίων, η σχετικά υδρόφιλη φύση των σακχαροαλκοολών καθιστούν τον ρυθμό διάχυσης σχετικά μικρό. Οι λιπόφιλες ουσίες, ωστόσο, όπως τα λιπαρά οξέα (οργανικά οξέα), οι αλκανόλες και οι υδατάνθρακες, είναι πιθανότερο να διαχυθούν διαμέσου της μεμβράνης.

Ακόμα η ροή των ουσιών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης της μαγιάς, επιτυγχάνεται επίσης, με τα κανάλια. Μέχρι σήμερα, τα κανάλια μεταφοράς του *Saccharomyces cerevisiae* χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στα κανάλια που εξαρτώνται από την τάση των κατιόντων K^+ , και στα μη ειδικευμένα κανάλια που εξαρτώνται από την έκταση (stretching) της διπλοστοιβάδας. Τα κανάλια της πλασματικής μεμβράνης της μαγιάς, άγουν τόσο τα ανιόντα όσο και τα κατιόντα, απορρίπτοντας έτσι τις ηλεκτροχημικές μεταβολές των ιόντων κατά μήκος της μεμβράνης.

Κατά την δευτερεύουσα μεταφορά ουσιών, η ενέργεια για την μεταφορά μιας ουσίας διαμέσου της μεμβράνης, επιτυγχάνεται με (ηλεκτρο-)χημικές βαθμίδες άλλων διαλυμένων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και ιόντων. Οι ηλεκτροχημικές βαθμίδες των ιόντων συνήθως προκύπτουν από τους πρωτεύοντες μηχανισμούς μεταφοράς, όπως αυτού της ATP-άσης της μεμβράνης. Ωστόσο, έχουν διακριθεί τρεις γενικές κατηγορίες δευτερευόντων μηχανισμών μεταφοράς, οι

οποίες αποτελούνται από τους μηχανισμούς uniport, symport και antiport. Την κινητήρια δύναμη του μηχανισμού uniport αποτελεί η ηλεκτροχημική βαθμίδα της μεταφερόμενης ουσίας, και οι πιο χαρακτηριστικές ουσίες που μεταφέρονται με αυτόν τον μηχανισμό διαμέσου της μεμβράνης του *Saccharomyces cerevisiae* είναι οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και γαλακτόζη. Ο μηχανισμός symport είναι κυρίως υπεύθυνος για την μεταφορά ορισμένων ιόντων, δισακχαριτών, αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, ενώ ο μηχανισμός antiport καταλύει την μεταφορά μονοσθενών και δισθενών κατιόντων. Στην *Εικόνα 1.4.* παρουσιάζονται συνοπτικά όλοι οι προαναφερθέντες μηχανισμοί (Van der Rest et al., 1995).

Άλλη λειτουργία που επιτελεί η κυτταρική μεμβράνη, αποτελεί η μεταγωγή σημάτων από εξωτερικά ερεθίσματα, για την πραγματοποίηση διαφόρων εσωτερικών βιοχημικών αντιδράσεων. Μια ακόμα μεταφορική λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης της μαγιάς, σχετίζεται με την εξωκύττωση και την ενδοκύττωση. Κατά την εξωκύττωση, εκκριτικά κυστίδια, τα οποία προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi, συγχωνεύονται με την κυτταρική μεμβράνη, με στόχο την μεταφορά πρωτεϊνών διά μέσου του κυτταρικού περιβλήματος, ενώ η ενδοκύττωση αποτελεί ένα σύστημα εντοπισμού και ενσωμάτωσης συγκεκριμένων μορίων, με τη βοήθεια εξειδικευμένων μεμβρανικών δομών, γνωστών ως ενδοσώματα (Vuković & Mrša, 1995; Walker G. M., 1998).

1.4.2. Κυτταρόπλασμα και Κυτταροσκελετός

Το κυτταρόπλασμα της μαγιάς αποτελεί ένα όξινο, υδατικό, κολλοειδές ρευστό, εντός του οποίου εμπεριέχονται συστατικά χαμηλού και μέσου μοριακού βάρους, γλυκογόνο, διαλυμένες πρωτεΐνες, και άλλα διαλυτά μακρομόρια. Τα μη οργανοδιακά κυτταροπλασματικά ένζυμα της μαγιάς περιλαμβάνουν γλυκολυτικά ένζυμα, ένζυμα πρωτεϊνικής βιοσύνθεσης και το ενζυμικό σύστημα σύνθεσης λιπαρών οξέων. Επιπλέον, το κυτταρόπλασμα διαθέτει μεμβρανικά μικροσώματα καθώς και μακρομοριακά συσσωματώματα, όπως τα πρωτεασώματα, τα ριβοσώματα και τα λιπίδια. Ο κυτταροσκελετός αποτελείται από ένα δίκτυο μικροσωληνίσκων και μικροϊνιδίων, το οποίο προσδίδει στο κυτταρόπλασμα του μικροοργανισμού δομική οργάνωση.

Τα μικροσώματα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα της μαγιάς διακρίνονται στα υπεροξυσώματα και στα γλυκοξυσώματα, δύο ανεξάρτητα μεμβρανικά οργανίδια, τα οποία διαφέρουν από τα κυστίδια του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα υπεροξυσώματα επιτελούν διάφορες μεταβολικές λειτουργίες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα στη μαγιά, τα υπεροξυσώματα είναι οργανίδια τα οποία βρίσκονται σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος, περιέχοντας καταλάση και οξειδάσες, οι οποίες σχετίζονται με την οξειδωτική χρήση συγκεκριμένων πηγών άνθρακα και αζώτου. Τα γλυκοξυσώματα της μαγιάς περιέχουν καταλάση και ένζυμα του γλυκοξυλικού κύκλου και του μεταβολισμού των αμινών.

Τα πρωτεασώματα της μαγιάς συναντώνται στο κυτταρόπλασμα και στο πυρηνόπλασμα του μικροοργανισμού, και αποτελούν μεγάλα συμπλέγματα πολλαπλών υπομονάδων πρωτεάσης. Η λειτουργία που επιτελούν σχετίζεται με την ρύθμιση του επιπέδου των πρωτεϊνών, καθώς και είναι απαραίτητα για την βιωσιμότητα των κυττάρων.

Τα ελεύθερα ριβοσώματα, σε αντίθεση με τα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων, αποτελούνται όπως και σε άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα από μεγάλες και μικρές ριβονουκλεοπρωτεϊνικές υπομονάδες. Εκτός από ελεύθερα ριβοσώματα, στην μαγιά υπάρχουν και ριβοσώματα συσσωματωμένα με mRNA, τα οποία ονομάζονται πολυσώματα.

Τα λιπαρά σωματίδια (σφαιροσώματα) της μαγιάς εμφανίζονται ως κυστίδια λιπιδίων, τα οποία βιοσυνθέτουν την κυτταρική μεμβράνη του ζυμομύκητα. Περιέχουν κυρίως στερολικούς

εστέρες (αλλά όχι τριγλυκερίδια), και μικρές ποσότητες φωσφολιπιδίων, πρωτεϊνών και ακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Να σημειωθεί πως η περιεκτικότητα των ακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων αυξάνεται στην μαγιά αρτοποιίας, κατά την διάρκεια του τέλους της εκθετικής φάσης σε καλλιέργεια διαλείποντος έργου.

Ο κυτταροσκελετός του κυττάρου της μαγιάς αποτελείται από μικροϊνίδια και μικροσωληνίσκους. Τα στοιχεία αυτά δομούν ένα δίκτυο, το οποίο προσδίδει μηχανική αντοχή στο κύτταρο, συνδέοντας και αποσυνδέοντας ανεξάρτητες πρωτεϊνικές υπομονάδες. Ο κυτταροσκελετός εμπλέκεται σε διάφορους τομείς της φυσιολογίας της μαγιάς, όπως για παράδειγμα στην μίτωση, στην μείωση, και στην κίνηση των οργανιδίων (Feldmann, 2011; Walker G. M., 1998).

1.4.3. Πυρήνας

Ο πυρήνας της μαγιάς αποτελεί ένα ωοειδές οργανίδιο, διαμέτρου περίπου 1.5 μm , το οποίο συναντάται στο κέντρο του κυττάρου ή εκκεντρικά αυτού. Ο πυρήνας επικαλύπτεται από το πυρηνόπλασμα, το οποίο συγκροτείται από μια διπλή μεμβράνη που διαθέτει πόρους, διαμέτρου 50 – 100 nm. Συνήθως στην μαγιά η πυρηνική μεμβράνη είναι συναφής και έχει παρόμοια χημική σύσταση με το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ σε αντίθεση με τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα, κατά την διάρκεια της μίτωσης δεν διασπάται. Στο εσωτερικό του πυρήνα υπάρχει ο πυρηνίσκος, μια περιοχή σε σχήμα μηνίσκου, η οποία εξαφανίζεται κατά την μίτωση και επανεμφανίζεται στη μεσόφαση.

Εντός του πυρηνόπλάσματος εμπεριέχονται: DNA, RNA, βασικές πρωτεΐνες (πρωταμίνες και ιστόνες) και άλλες πρωτεΐνες (μη ιστόνες). Η χρωματίνη, η οποία οργανώνεται σε δομές που ονομάζονται χρωμοσώματα, αποτελεί το βασικό νουκλεοπρωτεϊνικό υλικό που βρίσκεται στο πυρηνόπλασμα, και δομείται από συμπλέγματα ιστονών και διπλής έλικας DNA. Κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή τη φάση σύνθεσης του DNA, κάθε χρωμόσωμα διπλασιάζεται, ενώ κατά τη φάση M του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή τη μίτωση, τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα διαχωρίζονται στα θυγατρικά κύτταρα.

Το γονιδίωμα του *Saccharomyces cerevisiae* περιλαμβάνει περίπου 10 – 15 εκατομμύρια αζωτούχες βάσεις, και κωδικοποιεί 5000 – 10000 γονίδια. Διαθέτει 16 απλοειδή χρωμοσώματα, ενώ οι περισσότερες ζύμες έχουν λιγότερα χρωμοσώματα μεγαλύτερου μεγέθους. Τα χρωμοσώματα της μαγιάς διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, ενώ αποτελούνται από 0.2 έως 6 εκατομμύρια βάσεις το καθένα. Η δομική οργάνωση των χρωμοσωμάτων παίζει καίριο ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής λειτουργίας των κυττάρων της μαγιάς (Fantes & Beggs, 2000; Walker G. M., 1998).

1.4.4. Εκκριτικό Σύστημα

Στο κυτταρόπλασμα της μαγιάς υπάρχουν διάφορα διαμερίσματα, τα οποία περικλείονται από μεμβράνη, και κατέχουν ρόλο υψίστης σημασίας για την μεταφορά πρωτεϊνών, τόσο προς το εξωτερικό, όσο και προς το εσωτερικό του κυττάρου. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η διαδικασία της μεταφοράς πρωτεϊνών μεταξύ των μεμβρανικών διαμερισμάτων αποτελεί σύνηθες φαινόμενο. Μάλιστα ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί πρότυπο μικροοργανισμό για την στοιχειώδη κατανόηση αυτών των διεργασιών.

Η εξαγωγή πρωτεϊνών μέσω απέκκρισης από τα κύτταρα της μαγιάς, περιλαμβάνει διαμεμβρανική και ενδομεμβρανική μεταφορά μέσω κυστιδίων, στην οποία συμμετέχουν το

ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύμπλεγμα Golgi και η κυτταρική μεμβράνη. Άλλες πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω εκκριτικών οργανιδίων, αποτελούν εκείνες που αντί για το εξωκυτταρικό περιβάλλον, προορίζονται για τα κενοτόπια. Ο κυτταροσκελετός συμμετέχει επίσης στην εκκριτική διαδικασία, καθώς η ακτίνη που διαθέτει καθορίζει την κατεύθυνση της διεργασίας αυτής. Η εισαγωγή πρωτεϊνών στα κύτταρα του ζυμομύκητα με ενδοκύτωση (βλ. παράγραφο 1.4.1.3), πραγματοποιείται παρόμοια με την μεταφορά μέσω εκκριτικών κυστιδίων, τα οποία μεταφέρουν το φορτίο τους στα κενοτόπια για πρωτεολυτική επεξεργασία (Walker G. M., 1998).

Στον Πίνακα 1.3. αναπαρίστανται τα κυριότερα στάδια της πρωτεϊνικής έκκρισης στα κύτταρα της μαγιάς.

Πίνακας 1.3. Στάδια πρωτεϊνικής έκκρισης του *S. cerevisiae*

Στάδιο	
1°	Σύνθεση πρωτεϊνών που προορίζονται για απέκκριση, στα πολυσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου.
2°	Απελευθέρωση των πρωτεϊνών στον αγωγό του ενδοπλασματικού δικτύου.
3°	Πρωτεολυτική κατάτμηση και γλυκοζυλίωση ενός πεπτιδίου, στο ενδοπλασματικό δίκτυο.
4°	Μεταφορά των πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύμπλεγμα Golgi, μέσω κυστιδίων που συγχωνεύονται στο σύμπλεγμα cis-Golgi, το οποίο είναι διευθετημένο σε παράλληλες σειρές ή στοίβες.
5°	Τροποποίηση των υδατανθρακικών πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών, στο σύμπλεγμα Golgi
6°	Μεταφορά των πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων προς την κυτταρική μεμβράνη, συγχώνευση των πρωτεϊνών με την κυτταρική μεμβράνη και μεταφορά των πρωτεϊνών στο περίπλασμα.

(Walker G. M., 1998)

1.4.5. Κενοτόπια

Τα κενοτόπια είναι βασικά οργανίδια για την ενδοκυτταρική μεταφορά των πρωτεϊνών στα κύτταρα της μαγιάς. Είναι ενσωματωμένα στο ενδομεμβρανικό σύστημα της ζύμης, το οποίο περιλαμβάνει το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύμπλεγμα Golgi και τα κυστίδια. Επίσης, τα κενοτόπια αποτελούν δυναμικές δομές, οι οποίες υπάρχουν στα κύτταρα ως ένα μεγάλο διαμέρισμα, ή ως πολλά μικρότερα διαμερίσματα.

Τα κενοτόπια, επίσης, είναι όξινα οργανίδια που θυμίζουν τα λυσοσώματα, και σχετίζονται με τη μη εξειδικευμένη ενδοκυτταρική πρωτεόλυση στη μαγιά. Η διεργασία αυτή καταλύεται από τη δράση ενδοκενοτοπικών ενδοπεπτιδασών, αμινοπεπτιδασών και καρβοξυπεπτιδασών. Η ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων πραγματοποιείται κατά την διάρκεια της αυτόλυσης της μαγιάς, όταν τα κύτταρα βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες pH και θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα την αποδόμηση των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος, και κατ' επέκταση την λύση του κυττάρου.

Τα κενοτόπια περιβάλλονται από μια απλή μεμβράνη, τον τονοπλάστη. Ο τονοπλάστης είναι πιο ελαστικός από την πλασματική μεμβράνη, καθώς διαφοροποιείται από αυτήν, σχετικά με την περιεκτικότητά του σε φωσφολιπίδια, ακόρεστα λιπαρά οξέα και στερόλες. Λόγω αυτών, ο τονοπλάστης δεν επηρεάζεται από την λύση των πρωτοπλαστών της μαγιάς υπό υπερωσμωτικές συνθήκες, όμως μπορεί να διαλυθεί υπό συγκεκριμένες συνθήκες αυτόλυσης του κυττάρου. Για παράδειγμα, η παρατεταμένη έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η υψηλή θερμοκρασία, το όξινο pH και η υψηλή συγκέντρωση κατιόντων K^+ , επιφέρουν την απελευθέρωση των ενζύμων των κενοτοπίων και την πέψη των μακρομοριακών αποθεμάτων της μαγιάς. Να σημειωθεί πως η

διεργασία της αυτόλυσης, βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή εκχυλίσματος μαγιάς (Běhalová & Beran, 1979; Walker G. M., 1998).

Άλλα πρωτεολυτικά διαμερίσματα που συναντώνται στα κύτταρα του ζυμομύκητα, αποτελούν το εκδοπλασματικό δίκτυο, του σύμπλεγμα Golgi και τα μιτοχόνδρια. Εξειδικευμένη και ταχεία αποδόμηση πρωτεϊνών στη μαγιά πραγματοποιείται στα πρωτεασώματα του κυτταροπλάσματος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πέψη πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να είναι θανατηφόρες για το κύτταρο.

Τέλος, τα κενοτόπια συμμετέχουν και σε αρκετές ακόμα φυσιολογικές λειτουργίες, εκτός από τις λειτουργίες αποικοδόμησης (λυσοσωματικές λειτουργίες). Για παράδειγμα, τα κενοτόπια είναι οι κύριες αποθήκες βασικών αμινοξέων, πολυφωσφορικών και μεταλλικών κατιόντων των κυττάρων της μαγιάς. Επίσης εμπλέκονται στην ωσμωρύθμιση και στην ομοιοστατική ρύθμιση της συγκέντρωσης ιόντων και του pH του κυτταροπλάσματος (Walker G. M., 1998).

1.4.6. Μιτοχόνδρια

Τα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*, όπως και τα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, περιέχουν μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από μία εξωτερική μεμβράνη, η οποία περιέχει ένζυμα που συμβάλλουν στον μεταβολισμό των λιπιδίων, από την μήτρα, η οποία περιέχει ένζυμα οξείδωσης των λιπαρών οξέων και του κύκλου του κιτρικού οξέος, μαζί με ένα σύστημα πρωτεϊνοσύνθεσης που περιλαμβάνει ριβοσώματα και μιτοχονδριακό DNA, και τέλος από μία εσωτερική μεμβράνη, η οποία περιέχει κυτοχρώματα της αναπνευστικής αλυσίδας, NADH, ηλεκτρικές αφυδρογονάσες και H^+ -τριφωσφορικές αδενοσινάσες (H^+ -ATPases).

Τα μιτοχόνδρια της μαγιάς αποτελούν δυναμικά οργανίδια, τα οποία παρουσιάζουν ποικιλομορφία ως προς το σχήμα, το μέγεθος, και το πλήθος τους, αναλόγως με στέλεχος της ζύμης, των συνθηκών ανάπτυξης και της φάσης του κυτταρικού κύκλου της. Σε γενικές γραμμές όμως, έρευνες έχουν δείξει πως τα κύτταρα της μαγιάς περιέχουν ένα ή πολύ λίγα μεγάλα, περιστασιακά διακλαδούμενα μιτοχόνδρια.

Υπό αερόβιες συνθήκες, τα μιτοχόνδρια της μαγιάς συμμετέχουν στη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP), κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής. Υπό αναερόβιες συνθήκες, τα μιτοχόνδρια είναι αναγωγικά, υπό την αναπνευστική έννοια, λόγω της απουσίας του οξυγόνου ως τελικού δέκτη ηλεκτρονίων. Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια των κυττάρων της μαγιάς εκτελούν διάφορες λειτουργίες υπό αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες παρατηρούνται κυρίως στη μαγιά ζυθοποιίας. Οι λειτουργίες αυτές περιλαμβάνουν:

- Σύνθεση και αποκορεσμό λιπαρών οξέων και μεμβρανικών λιπιδίων
- Συμμετοχή των μιτοχονδριακών κυτοχρωμάτων στην εργοστερολική βιοσύνθεση
- Γενική φυσιολογική προσαρμογή σε τάσεις οι οποίες προκαλούνται από αιθανόλη, τοξικές ρίζες οξυγόνου και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων
- Τροποποίηση των χαρακτηριστικών της κυτταρικής επιφανείας η οποία εμπλέκεται στην κροκίδωση και στη διχοτόμηση του κυττάρου
- Δράση ενζύμων για τη σύνθεση αμινοξέων, ορισμένων δικαροξυλικών οξέων, βάσεων πυριμιδινών και πουρινών, πορφυρίνης και πτεριδινών
- Κινητοποίηση του γυκογόνου
- Παραγωγή γευστικών και αρωματικών ενώσεων

Τέλος, να σημειωθεί πως παρόλο που τα μιτοχόνδρια υποτίθεται ότι είναι ενεργειακά μη λειτουργικά υπό αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες επικρατούν κατά τη ζύμωση του ζύθου,

πραγματοποιείται μια ελάχιστη μιτοχονδριακή ανάπτυξη, για την παροχή των κρισίμων μεταβολικών μέσων και των κυτταρικών συστατικών (Alberts et al., 2011; Walker G. M., 1998).

1.5. Παραγωγή Προϊόντων Μαγιάς

Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο χιλιάδες χρόνια πριν, για τις παραδοσιακές διεργασίες ζύμωσης, όπως για την παραγωγή κρασιού και ζύθου, αλλά και για την παρασκευή αρτοσκευασμάτων. Σήμερα οι ζύμες χρησιμοποιούνται επίσης ως εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών, ενζύμων και βιταμινών υψηλής διατροφικής αξίας, καθώς και βρίσκουν μεγάλο πλήθος εφαρμογών στις βιομηχανίες τροφίμων ως πρόσθετα τροφίμων, βελτιωτικά γεύσης και αρώματος, ενώ ταυτόχρονα συμβάλουν στην παραγωγή μικροβιολογικών μέσων, εκχυλισμάτων και ζωοτροφών.

Η πιο διαδεδομένη ζύμη που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων, δεν θα μπορούσε να είναι άλλη από την μαγιά, η οποία είναι διαθέσιμη σε πολύ μεγάλες ποσότητες. Χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή αρτοσκευασμάτων και προϊόντων ψησίματος. Επίσης το είδος *Saccharomyces cerevisiae* είναι το πιο διαδεδομένο είδος ζύμης στις βιομηχανίες ποτών, καθώς χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρασιού, ζύθου, αποσταγμάτων και αιθανόλης (Bekatorou, Psarianos, & Koutinas, 2006).

Εκτός από αρτοσκευάσματα και ποτά, η μαγιά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή διαφόρων άλλων ενδοκυτταρικών ουσιών. Τα κυριότερα προϊόντα εμπορικής σημασίας της μαγιάς είναι:

- Αρωματικά προϊόντα και ενισχυτικά γεύσης, όπως εκχυλίσματα μαγιάς (yeast extracts) και αυτολύματα μαγιάς (autolysates)
- Προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας, όπως πρωτεΐνες, βιταμίνες Β, φυτικές ίνες και ιχνοστοιχεία
- Χρωστικές ουσίες
- Ένζυμα, όπως ιμπερτάση, λακτάση, μελιβιάση κ.ά.
- Προϊόντα με φαρμακευτική και κοσμετολογική αξία, όπως β-γλυκάνες (Reed & Nagodawithan, 1991)

Να σημειωθεί πως για την παραλαβή αυτών των ενδοκυτταρικών προϊόντων, η μαγιά πρέπει να υποβληθεί σε διάφορες κατεργασίες κυτταρικής διάρρηξης, όπως είναι για παράδειγμα η αυτόλυση και η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης. Οι διεργασίες αυτές αφήνουν πίσω τους μεγάλες ποσότητες στερεών κυτταρικών υπολειμμάτων, αποτελούμενων κυρίως από τις δομές του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών, οι οποίες έχουν καταστεί πιο διαπερατές (Chisti & Moo-Young, 1986).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΡΡΗΣΗΣ

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΡΡΗΞΗΣ

2.1. Εισαγωγή

Για αρκετά χρόνια τώρα, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται ως πηγή εμπορικά χρήσιμων χημικών ουσιών, αντιβιοτικών και ενζύμων. Οι περισσότερες ουσίες μικροβιολογικής προέλευσης που παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα είναι εξωκυτταρικού τύπου, δηλαδή παράγονται εντός του κυττάρου, και στην συνέχεια εκκρίνονται στο περιβάλλον μέσο. Δυστυχώς ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των χρήσιμων ουσιών, παραμένει εγκλωβισμένο εντός της κυτταρικής δομής.

Αρκετά χρόνια τώρα, παράγοντα σε βιομηχανική κλίμακα ενδοκυτταρικά ένζυμα όπως η οξειδάση της γλυκόζης για την συντήρηση τροφίμων, η πενικιλίνη για την ανάπτυξη αντιβιοτικών και η ασπαραγινάση για έρευνα θεραπείας κατά του καρκίνου. Άλλα παραδείγματα ενδοκυτταρικών μικροβιολογικών ενζύμων παρατίθενται στον Πίνακα 2.1..

Πίνακας 2.1. Παραδείγματα μικροβιακών ενδοκυτταρικών ενζύμων με εμπορικό ενδιαφέρον

Ένζυμο	Μικροοργανισμός	Χρήση
L-Ασπαραγινάση	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Escherichia coil</i>	Θεραπεία της οξείας λεμφικής αναιμίας
Καταλάση	<i>Aspergillus niger</i>	Αφαίρεση H ₂ O ₂ μετά από την αποστείρωση του γάλακτος
Οξειδάση Χοληστερόλης	<i>Nocardia rhodochrous</i>	Ανάλυση ορού χοληστερόλης
β-Γαλακτοζιδάση	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Saccharomyces lactis</i>	Υδρόλυση λακτόζης στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων
Ισομεράση Γλυκόζης	<i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Παραγωγή σιροπιών υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης και φρουκτόζης
Οξειδάση Γλυκόζης	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium notatum</i>	Ανάλυση ορού γλυκόζης
Ιμβερτάση	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Παραγωγή προϊόντων ζαχαροπλαστικής

(Chisti & Moo-Young, 1986)

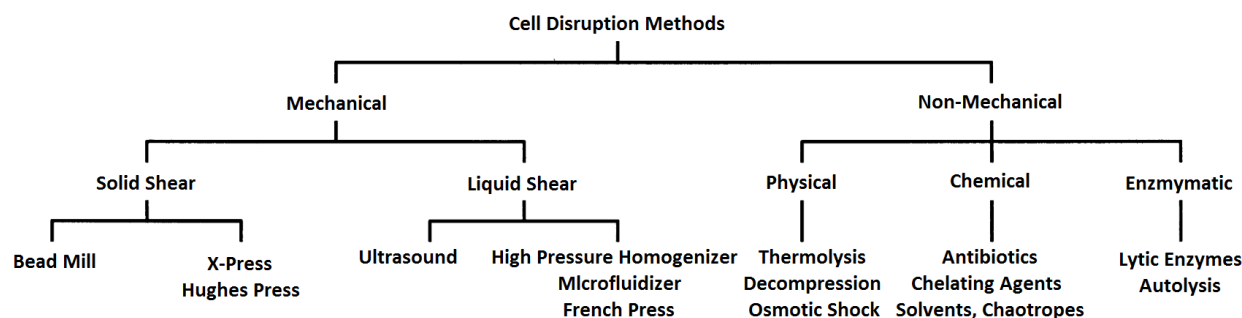
Η παραλαβή των ενδοκυτταρικών προϊόντων απαιτεί πως το κύτταρο είτε θα υποστεί γενετική τροποποίηση ώστε να εκκρίνει κανονικά τα προϊόντα αυτά στο περιβάλλον, είτε θα πρέπει να διαρρηχτεί με φυσικά, χημικά ή ενζυμικά μέσα για την απελευθέρωση των προϊόντων του στο περιβάλλον μέσο. Ωστόσο ο γενετικός χειρισμός, ώστε τα κύτταρα να γίνουν πιο διαπερατά είναι περιορισμένος, καθώς το να γίνει το κυτταρικό περίβλημα διαπερατό σε όλα τα χρήσιμα ενδοκυτταρικά συστατικά, θα σήμαινε ταυτόχρονα την διακοπή της ύπαρξης του κυττάρου. Για τους λόγους αυτούς, οι μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης, οι οποίες αποσκοπούν στο να καταστήσουν το κύτταρο διαπερατό για την παραλαβή των ενδοκυτταρικών προϊόντων του, έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία (Chisti & Moo-Young, 1986).

2.2. Μέθοδοι Κυτταρικής Διάρρηξης

Η δομή του κυτταρικού περιβλήματος των μικροοργανισμών αποτελεί γενικά μία πολύ ανθεκτική δομή, η οποία θυμίζει σπλισμένο σκυρόδεμα. Είναι υπεύθυνη για την αντοχή των

κυττάρων στις ακραίες τιμές πιέσεων που επικρατούν στο εσωτερικό. Αξίζει να σημειωθεί πως η πίεση που ασκείται εντός των μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα στους μικροοργανισμούς *Micrococcus lysodeikticus* και *Sarcina lutea*, οφείλεται στην όσμωση, και μπορεί να φτάσει έως και 20 atm (Chisti & Moo-Young, 1986).

Όπως προαναφέρθηκε, η διάρρηξη της δομής του κυτταρικού τοιχώματος, με στόχο την αύξηση της διαπερατότητάς του, είναι ένα απαραίτητο στάδιο για την ανάκτηση των ενδοκυτταρικών συστατικών. Η μη εξειδικευμένη καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος επιτυγχάνεται συνήθως με μηχανικά μέσα, καθώς και με μη μηχανικές μεθόδους (χημικές, φυσικές και ενζυμικές), οι οποίες είναι πιο εξειδικευμένες και ήπιες. Στην *Εικόνα 2.1.* συνοψίζονται οι πιο κοινές μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης (Geciova, Bury, & Jelen, 2002).



Εικόνα 2.1. Κατηγοριοποίηση κοινότερων μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης (Geciova et al., 2002)

Εκτός από μηχανικές και μη μηχανικές μεθόδους, οι μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και σε θερμικές και μη θερμικές μεθόδους. Οι θερμικές μέθοδοι είναι οι πιο κοινές και χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, λόγω της αποτελεσματικότητάς τους και του σχετικά μικρού τους κόστους. Παρόλα αυτά ενδέχεται να προκαλέσουν αλλοιώσεις σε θερμοευαίσθητες ουσίες. Λόγω αυτού, την τελευταία εικοσαετία έχουν αναπτυχθεί μη θερμικές μέθοδοι όπως η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, η μέθοδος υπερυψηλής πίεσης και αυτή των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, κατά τις οποίες αποφεύγεται η ανεπιθύμητη αλλοίωση των συστατικών (Diels & Michiels, 2006).

Το κυτταρόπλασμα του *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί μία πλούσια πηγή προϊόντων υψηλής βιολογικής αξίας (πρωτεϊνών, κυτταροπλασματικών ενζύμων, πολυσακχαριτών κ.α.) για την βιοτεχνολογία, την φαρμακολογία και την βιομηχανία τροφίμων. Η μαγιά είναι ένα απλό ευκαρυωτικό κύτταρο, το οποίο διαθέτει ένα σχετικά άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα γύρω από την κυτταρική μεμβράνη. Λόγω της ύπαρξης του κυτταρικού τοιχώματος, η αποτελεσματική διάρρηξή του, αποτελεί αναγκαίο βήμα για την ανάκτηση των ενδοκυτταρικών προϊόντων. Τα βασικά δομικά συστατικά του τοιχώματος αποτελούν οι γλυκάνες, οι μαννοπρωτεΐνες και η χιτίνη, οι οποίες προσδίδουν στο κύτταρο μηχανική αντοχή. Η πλήρης διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών προϊόντων, απαιτεί την καταστροφή των συστατικών που του παρέχουν αντοχή, δηλαδή στην περίπτωση της μαγιάς, των γλυκανών (Liu, Zeng, Sun, & Han, 2013).

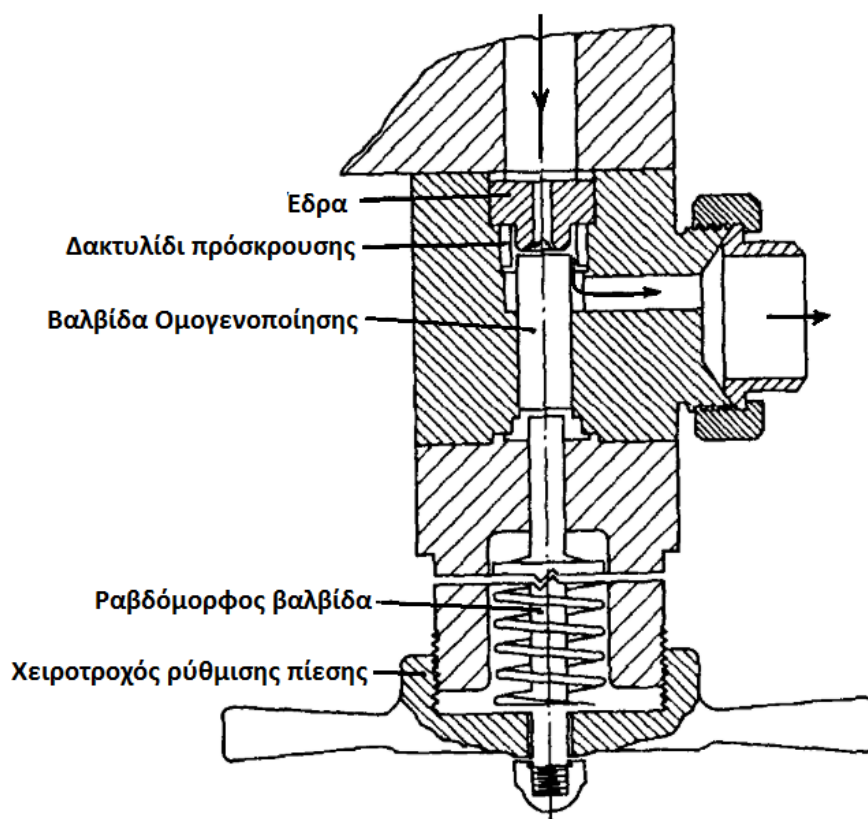
2.2.1. Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης

Για να μπορέσει μία μη θερμική μέθοδος κυτταρικής διάρρηξης να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα, είναι απαραίτητο να έχει την δυνατότητα συνεχούς επεξεργασίας βιομάζας με υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (δηλ. υψηλού ξέωδους), να έχει υψηλή ενεργειακή απόδοση, μικρό χρόνο παραμονής, καθώς και να μην προκαλεί αλλοίωση στο προϊόν. Η ομογενοποίηση

υψηλής πίεσης (ΟΥΠ) παρουσιάζει όλα τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα, και αποτελεί την πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδο κυτταρικής διάρρηξης στην βιομηχανία, καθώς χρησιμοποιείται για την ανάκτηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών από *Escherichia coli* και *Saccharomyces cerevisiae* (Yar, Dumsday, Scales, & Martin, 2015).

Όπως αναφέρθηκε, η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι μία μέθοδος θραύσης κυττάρων, η οποία χρησιμοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα. Απλουστευτικά, κατά την διάρκεια της λειτουργίας του ομογενοποιητή, αυξάνεται η πίεση του κυτταρικού αιωρήματος περίπου στα 1000 bar, το οποίο στην συνέχεια απελευθερώνεται από ένα ειδικά σχεδιασμένο σύστημα βαλβίδων. Τα κύτταρα δέχονται ένα μεγάλο εύρος δυνάμεων, λόγω της αλληλεπίδρασής τους με το ρευστό και με τα στερεά τοιχώματα του συστήματος βαλβίδων. Πίσω από αυτήν την απλοϊκή περιγραφή κρύβονται περίπλοκοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων – ρευστού – συστήματος βαλβίδων, οι οποίοι δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί έως και σήμερα (Kleinig & Middelberg, 1998).

Στην *Εικόνα 2.2.* αναπαρίσταται ένα σύστημα βαλβίδων ενός ομογενοποιητή υψηλής πίεσης, το οποίο αποτελείται από έναν χειροτροχό, που είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της πίεσης, ο οποίος μέσω μιας ραβδόμορφου βαλβίδας, η οποία περιζώνεται από ένα ελατήριο, ρυθμίζει την θέση της βαλβίδας ομογενοποίησης με την έδρα. Κατά την έξοδο του ρευστού από το άνοιγμα μεταξύ βαλβίδας και έδρας, υπάρχει το δακτυλίδι πρόσκρουσης (Chisti & Moo-Young, 1986).



Εικόνα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση συστήματος βαλβίδων ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (Chisti & Moo-Young, 1986)

Πιο συγκεκριμένα, ο ομογενοποιητής υψηλής πίεσης αποτελείται από μία αντλία θετικής εκτόπισης και μια βαλβίδα ομογενοποίησης. Η αντλία χρησιμοποιείται για να ωθήσει το ρευστό στην βαλβίδα ομογενοποίησης, όπου και πραγματοποιείται η κατεργασία. Η εκροή του ομογενοποιητή κανονικά ψύχεται ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι θερμικές αλλοιώσεις, οι οποίες

οφείλονται στην θερμότητα της τριβής, που παράγεται από την υψηλή ταχύτητα του ρευστού, και είναι ικανή να αυξήσει την θερμοκρασία του προϊόντος κατά 2 – 2.5°C ανά 10 MPa. Στην βαλβίδα ομογενοποίησης, το ρευστό αναγκάζεται να περάσει υπό πίεση από ένα μικρό άνοιγμα μεταξύ της βαλβίδας και της έδρας της βαλβίδας. Το ρευστό εγκαταλείπει το μικρό διάκενο υπό την μορφή ακτινικού πίδακα και καταλήγει σε ένα δακτυλίδι πρόσκρουσης. Τελικά, το ρευστό εξέρχεται από τον ομογενοποιητή με χαμηλή ταχύτητα και σε ατμοσφαιρική πίεση (Diels & Michiels, 2006).

Η χρήση της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης στην βιομηχανία αποσκοπεί κυρίως στην παραλαβή ενδοκυτταρικών προϊόντων. Εκτός από τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα της μεθόδου, η ομογενοποίηση μπορεί να προκαλέσει πλήρη διάρρηξη των κυττάρων, με την καταστροφή της δομής του κυτταρικού τοιχώματος. (Yap, Dumsday, Scales, & Martin, 2015).

2.2.2. Αυτόλυση

Η αυτόλυση αποτελεί μία ενζυμική μέθοδο κυτταρικής διάρρηξης, κατά την οποία τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος διασπώνται με την δράση ενδογενών ενζύμων. Παρατηρείται φυσιολογικά στις ζύμες όταν ολοκληρώσουν τον κύκλο ανάπτυξης τους και εισέλθουν στην φάση θανάτου, αλλά μπορεί να προκληθεί και με την έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες σε συγκεκριμένες τιμές pH, αλλά και με την προσθήκη αλάτων και οργανικών διαλυτών. Η αυτόλυση χαρακτηρίζεται από την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και της κυτταρικής οργάνωσης, καθώς και από την αποικοδόμηση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών προϊόντων στο εξωκυτταρικό περιβάλλον.

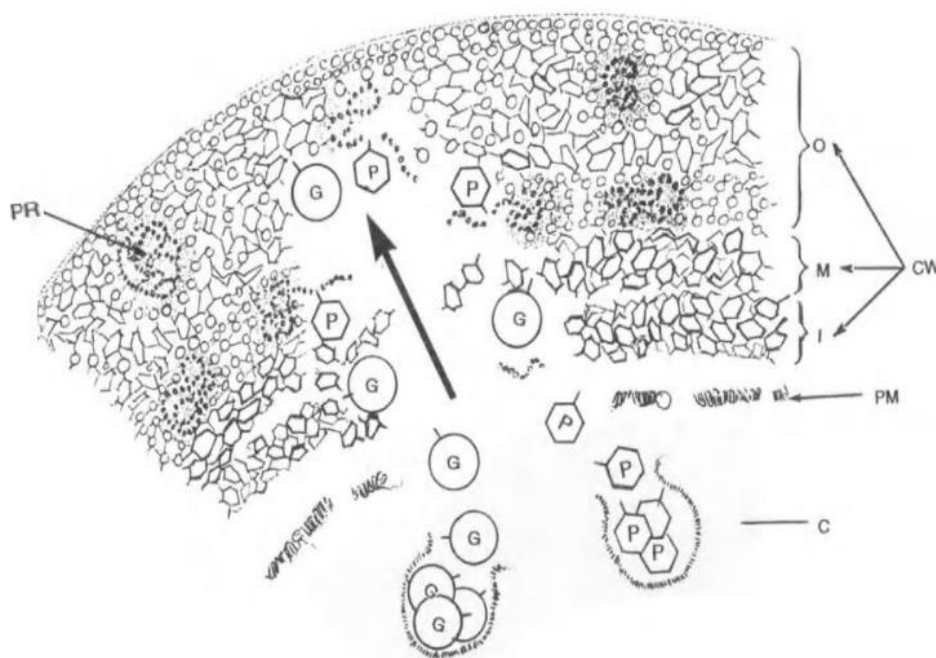
Η αυτόλυση των ζυμομυκήτων έχει πολλές συνέπειες εμπορικής σημασίας. Τα προϊόντα αυτόλυσης του *Saccharomyces cerevisiae* βρίσκουν εμπορική εφαρμογή ως πρόσθετα συστατικά για την επεξεργασία τροφίμων. Η αυτόλυση της μαγιάς, κατά την διαδικασία ζύμωσης ζύθου και οίνου, επηρεάζει το τελικό προϊόν τόσο στη γεύση όσο και στην μικροβιολογική σταθερότητα. Παρά την εμπορική σημασία της διεργασίας, υπάρχει μονάχα μια γενική εικόνα των βιολογικών αλλαγών που πραγματοποιούνται κατά την αυτόλυση της ζύμης. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αλλοίωση των πρωτεϊνών κατά την αυτόλυση, λιγότερες μελέτες στην υποβάθμιση των νουκλεϊκών οξέων, και ακόμα λιγότερες στην μοίρα των λιπιδίων και των υδατανθράκων. Επιπλέον, σχεδόν όλες οι μελέτες έχουν ασχοληθεί με την διεργασία της αυτόλυσης του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, και ουσιαστικά τίποτα δεν είναι γνωστό για το τι συμβαίνει κατά την αυτόλυση άλλων ειδών ζυμομυκήτων (Hernawan & Fleet, 1995).

Η αυτόλυση ζώντων κυττάρων μαγιάς λαμβάνει χώρα με έναν ικανοποιητικό ρυθμό, όταν αιώρημα μαγιάς, συγκέντρωσης περίπου 15 % w/w, διατηρείται στους 45 – 50 °C για 24 – 36 h, σε pH 5.5. Η λύση των κυττάρων οφείλεται κυρίως στη δράση της β-1,3-γλυκανάσης και των πρωτεολυτικών ενζύμων τα βρίσκονται εντός των κύτταρων. Ακόμα και τα ένζυμα β-1,6-γλυκανάση και μαννάση συμμετέχουν στην διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος (Reed & Nagodawithan, 1991).

Το πρωτεολυτικό σύστημα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* είναι αρκετά περίπλοκο, αποτελούμενο από καρβοξυπεπτιδάσες, αμινοπεπτιδάσες και πρωτεάσες, καθώς και από αρκετούς εξειδικευμένους παρεμποδιστές. Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 40 πρωτεολυτικά ένζυμα της μαγιάς κατά την διεργασία της αυτόλυσης. Τέσσερα από τα σημαντικότερα πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία διακατέχουν ρόλο υψίστης σημασίας για τη λύση του κυττάρου, είναι η πρωτεάση A, η πρωτεάση B, η καρβοξυπεπτιδάση Y και η καρβοξυπεπτιδάση S. Η όξινη πρωτεάση A διασπά την καζεΐνη και τη μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη βέλτιστα σε pH 2 – 3. Η πρωτεάση B έχει βέλτιστο pH για τη διάσπαση της καζεΐνης ίσο με 9. Και οι δύο αυτές πρωτεάσες

είναι ενδοπεπτιδάσες. Το τρίτο απομονωμένο ένζυμο είναι μια φυσική πρωτεάση C, ή αλλιώς καρβοξυπεπτιδάση Υ, με βέλτιστο pH 5 – 6. Καθεμιά από τις τρεις πρωτεάσες έχει τον ιδιαίτερο ενδοκυτταρικό παρεμποδιστή της. Και τα τέσσερα αυτά διαλυτά πρωτεολυτικά ένζυμα συναντώνται στα κενοτόπια των κυττάρων, ενώ οι παρεμποδιστές τους βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα γύρω από τα κενοτόπια. Μια τέτοια διαμερισματοποίηση διαχωρίζει τα βιολογικά συμβατά συστατικά, επιτρέποντας τον έλεγχο και την ολοκλήρωση των ενδοκυτταρικών δραστηριοτήτων, για την λειτουργία του κυττάρου (Běhalová & Beran, 1979; Reed & Nagodawithana, 1991).

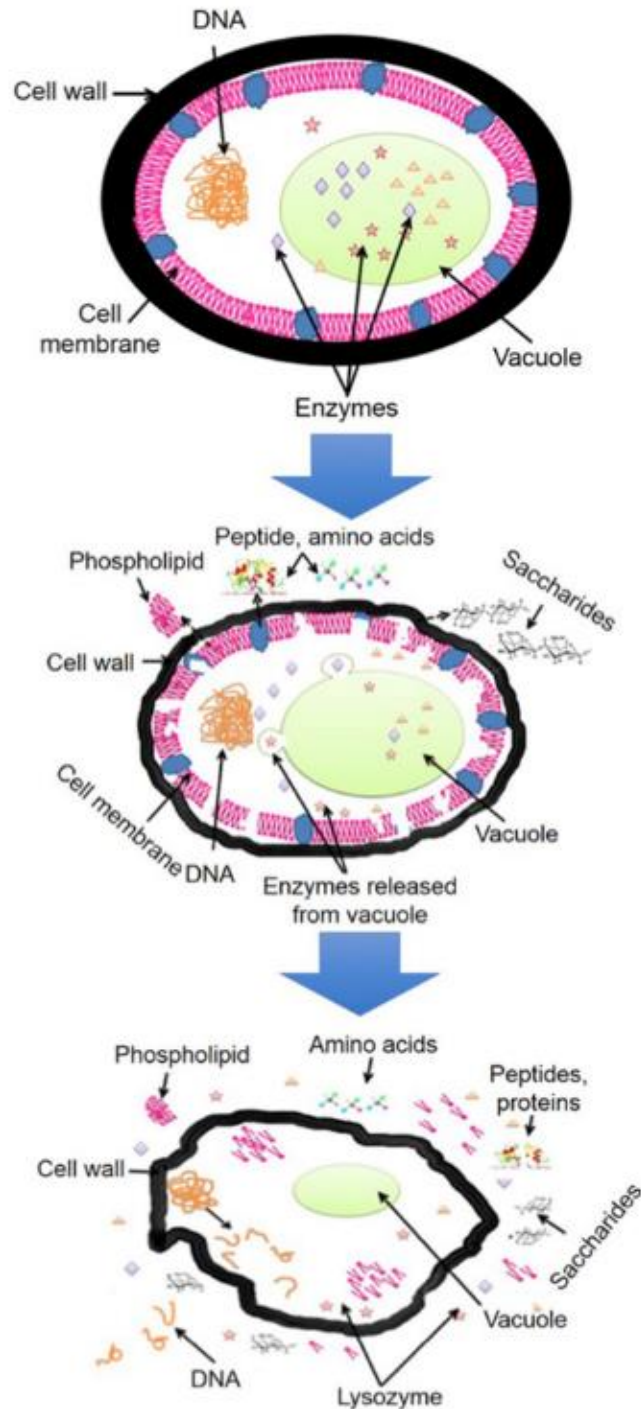
Το άκαμπτο και συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα, προσδίδει το χαρακτηριστικό σχήμα στα κύτταρα της μαγιάς. Αποτελείται από ένα εσωτερικό στρώμα αλκαλικά αδιάλυτης β-γλυκάνης, ένα μεσαίο στρώμα αλκαλικά διαλυτής β-γλυκάνης και ένα εξωτερικό στρώμα γλυκοπρωτεϊνών, στις οποίες οι υδατάνθρακες αποτελούνται από φωσφορυλιωμένες μαννάνες. Το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει, επίσης, περίπου 2 % χιτίνη, ένα ευθύγραμμο πολυμερές N-ακετυλογλυκοσαμίνης, το οποίο συναντάται κυρίως στις εκβλαστήσεις του κυττάρου. Τόσο το αλκαλικά διαλυτό, όσο και το αλκαλικά αδιάλυτο στρώμα γλυκάνης, αποτελεί ένα μίγμα πολυσακχαριτών, με το κυριότερο συστατικό να αποτελείται κυρίως από β-1,3 συνδεδεμένες γλυκάνες και με το δευτερεύον συστατικό να αποτελείται από β-1,6-γλυκάνες με διασυνδέσεις β-1,3-γλυκανών.



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση αυτόλυσης ενός κυττάρου όπου C: κυτταρόπλασμα, CW: κυτταρικό τοίχωμα, I: εσωτερικό αλκαλικά αδιάλυτο στρώμα γλυκάνης, M: μέσο αλκαλικά διαλυτό στρώμα γλυκάνης, O: εξωτερικό γλυκοπρωτεϊνικό στρώμα, P: πρωτεάση, G: γλυκανάση, PM: πλασματική μεμβράνη, PR: πρωτεΐνη (Reed & Nagodawithana, 1991)

Οι γλυκανάσες είναι ένζυμα, τα οποία έχουν απομονωθεί από τη μαγιά και είναι γνωστό ότι υδρολύουν τις β-1,3 και β-1,6 συνδέσεις των γλυκανικών στρωμάτων. Οι γλυκανάσες, ακόμα, συμμετέχουν στη διαδικασία της εκβλάστησης. Ωστόσο, κατά την διεργασία της αυτόλυσης, οι β-1,3-γλυκανάσες, σε συνδυασμό με τις προαναφερθέντες πρωτεάσες, είναι ικανές να διαρρήξουν το κυτταρικό τοίχωμα, κάνοντάς το διαπερατό, και επιτρέποντας έτσι την απελευθέρωση των υδρολυμένων συστατικών από το εσωτερικό προς το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Η διεργασία αυτή μπορεί να ενισχυθεί, εκθέτοντας τη μαγιά σε εξωτερικές πρωτεάσες, όπως η παπαΐνη, και στην συνέχεια σε λυτικές γλυκανάσες (Reed & Nagodawithana, 1991).

Μετά την ολοκλήρωση της αυτόλυσης, το κυτταρικό τοίχωμα συμπιέζεται, ζαρώνει και γίνεται πιο λεπτό σε σχέση με το τοίχωμα των ανεπεξέργαστων κυττάρων. Παρόλα αυτά, το κυτταρικό τοίχωμα παραμένει αδιάσπαστο, χωρίς να προκαλείται πλήρης διάρρηξη. Επίσης, πολλά από τα υδρολυτικά ένζυμα τα οποία απελευθερώνονται από τα κενοτόπια κατά την διεξαγωγή της διεργασίας, αποικοδομούν τα οργανίδια των κυττάρων και τα συστατικά της πλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό σπών στην μεμβράνη κατά την διάρκεια της διεργασίας, την απελευθέρωση μιας ποσότητας κυτταρικού περιεχομένου και τελικά την καταστροφή της δομής της πλασματικής μεμβράνης (Wang et al., 2018).



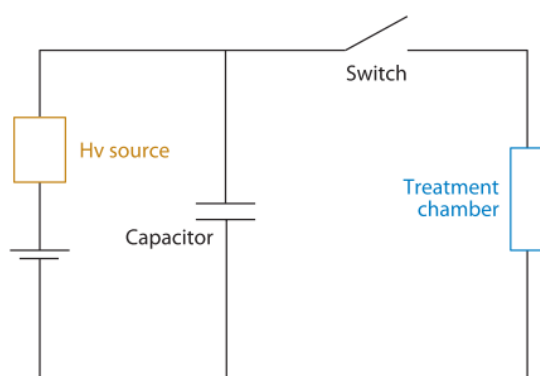
Εικόνα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση των μορφολογικών μεταβολών του κυττάρου της μαγιάς κατά την διάρκεια της αυτόλυσης (Wang et al., 2018)

2.2.3. Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία

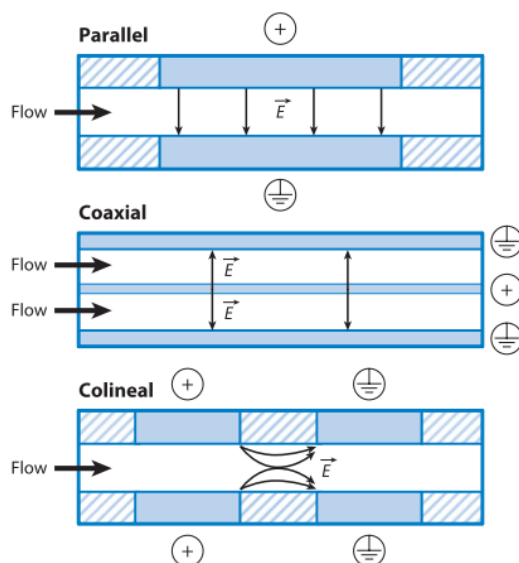
Η μέθοδος των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (ΠΗΠ), αποτελεί μια μη θερμική μέθοδο κυτταρικής διάρρηξης, η οποία περιλαμβάνει την εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών υψηλής τάσης συνεχούς ρεύματος, εντός ενός μέσου, το οποίο είναι τοποθετημένο μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Τα χρονικά διαστήματα της εφαρμογής των παλμών είναι πολύ μικρά, και κυμαίνονται μεταξύ των μs και των ms . Η ασκούμενη τάση καταλήγει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, του οποίου η ένταση εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων και από την παρεχόμενη τάση. Παρόλο που δεν υπάρχουν επίσημα όρια, ηλεκτρικά πεδία με εντάσεις μικρότερες από $0.1 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ θεωρούνται πεδία χαμηλής έντασης, πεδία με εντάσεις μεταξύ $0.1 - 1 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ θεωρούνται μέτρια, ενώ πεδία που έχουν εντάσεις μεγαλύτερες από $1 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ χαρακτηρίζονται ως ηλεκτρικά πεδία υψηλής έντασης. Η διαπερατότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων μπορεί να βελτιωθεί με την εφαρμογή χαμηλών και μέτριων ηλεκτρικών πεδίων για χρονικά διαστήματα μεταξύ $100 - 10.000 \mu\text{s}$ ή με την εφαρμογή υψηλών πεδίων έντασης $1 - 10 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ για χρονικά διαστήματα επεξεργασίας μικρότερα των $100 \mu\text{s}$.

Τα κυριότερα στοιχεία μιας συσκευής παλμικών ηλεκτρικών πεδίων είναι η γεννήτρια υψηλής τάσης και ο θάλαμος επεξεργασίας. Η γεννήτρια υψηλής τάσης αποτελείται από έναν φορτιστή που μετατρέπει το εναλλασσόμενο ρεύμα σε συνεχές, ο οποίος φορτίζει μια συσκευή αποθήκευσης ενέργειας, όπως είναι οι πυκνωτές και οι επαγωγείς. Η εκφόρτιση της ηλεκτρικής ενέργειας εντός του θαλάμου επεξεργασίας, ελέγχεται με έναν διακόπτη, ο οποίος αποτελεί το σημαντικότερο στοιχείο μιας γεννήτριας παλμών βιομηχανικής κλίμακας, διότι πρέπει να ενεργοποιεί και να απενεργοποιεί ένα κύκλωμα υψηλής τάσης και μεγάλης έντασης ρεύματος μέσα σε κλάσματα των μs . Εάν η τάση του πυκνωτή δεν είναι επαρκώς υψηλή, χρησιμοποιείται ένας μετασχηματιστής παλμών για την ενίσχυσή της. Ο θάλαμος επεξεργασίας, ο οποίος φέρει το προς επεξεργασία υλικό, αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια, τα οποία διαχωρίζονται από ένα μονωτικό υλικό. Παρόλο που έχουν αναπτυχθεί πολλά σχέδια θαλάμων επεξεργασίας, τα τρία επικρατέστερα στην βιομηχανία είναι αυτά με παράλληλα ηλεκτρόδια, με ομοαξονικά ηλεκτρόδια και με συγγραμμικά ηλεκτρόδια.

a Basic components of a PEF apparatus



b Treatment chamber designs for PEF processing



Εικόνα 2.5. (a) Βασικά στοιχεία μιας μονάδας ΠΗΠ (b) Επικρατέστεροι θάλαμοι επεξεργασίας (Puértolas, Luengo, Álvarez, & Raso, 2012)

Οι πιο χαρακτηριστικές παράμετροι λειτουργίας της μεθόδου των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων αποτελούν η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το σχήμα, το πλάτος και ο αριθμός των παλμών, η παλμική ενέργεια και η συχνότητα. Η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων του θαλάμου επεξεργασίας και η τάση, επηρεάζουν άμεσα την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Στην περίπτωση του θαλάμου επεξεργασίας που αποτελείται από παράλληλα ηλεκτρόδια, το ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ των ηλεκτροδίων είναι ομοιόμορφο, ενώ στα ομοαξονικά και στα συγγραμμικά ηλεκτρόδια το πεδίο δεν είναι ομοιόμορφο και αλλάζει ανάλογα με την θέση.

Η αύξηση της διαπερατότητας μιας κυτταρικής μεμβράνης, μπορεί να επιτευχθεί, όταν εφαρμόζονται σε αυτήν εξωτερικά παλμικά ηλεκτρικά πεδία για χρονικά διαστήματα της τάξης μεταξύ των μs και των ms . Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ηλεκροδιάτρηση (electroporation), και αποτελεί μία διεργασία η οποία χρησιμοποιείται στην μοριακή βιολογία, ώστε διαφορετικά μόρια να αποκτήσουν πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα και να εισαχθούν στο κύτταρο. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την έκθεση ενός κυττάρου σε παλμικά ηλεκτρικά πεδία, μπορούν να περιγραφούν σε τέσσερα στάδια:

- Αύξηση του διαμεμβρανικού δυναμικού τους κυτταροπλασματικής μεμβράνης
- Έναρξη του σχηματισμού πόρων
- Μεταβολή αριθμού και μεγέθους των πόρων που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία
- Διαρροή ενδοκυτταρικών ουσιών ή και εισροή εξωκυτταρικών ενώσεων, διαμέσου των πόρων

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, για την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν στις παραμέτρους της διεργασίας, στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προς επεξεργασία υλικού, και στα χαρακτηριστικά των προς επεξεργασία κυττάρων. Στον Πίνακα 2.2. παρατίθενται αναλυτικότερα οι παράγοντες αυτοί (Puértolas et al., 2012).

Πίνακας 2.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκροδιάτρηση

Κατηγορίες Παραγόντων	Παράγοντες
Παράμετροι Διεργασίας Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων	ένταση ηλεκτρικού πεδίου, χρόνος επεξεργασίας, ειδική ενέργεια, σχήμα παλμού, πλάτος παλμού, αριθμός παλμών, συχνότητα, θερμοκρασία
Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά Υλικού	αγωγιμότητα, pH
Χαρακτηριστικά Κυττάρων	σχήμα, μέγεθος, μεμβράνη, δομή περιβλήματος

(Puértolas et al., 2012)

Η ηλεκροδιάτρηση των κυττάρων, που προκαλείται από την επεξεργασία τους με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του κυτοπλασματικού τους περιεχομένου. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση ιοντικών ενώσεων και συγκεκριμένων μακρομορίων, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η μορφολογία των μικροβιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα για την μαγιά, η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία έχει μελετηθεί για την εξαγωγή συστατικών όπως πρωτεϊνών, ενζύμων και πολυσακχαριτών, καθώς και για την επιτάχυνση της παραγωγής εκχυλίσματος μαγιάς με αυτόλυση (Dimopoulos, Stefanou, Andreou, & Taoukis, 2018).

2.3. Βιομηχανικά Απόβλητα Διαρρηγμένων Κυττάρων Μαγιάς

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae*, κοινός γνωστός και ως μαγιά, είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος μικροοργανισμός στην βιομηχανία τροφίμων. Το κυριότερο προϊόν που παράγεται από την μαγιά, είναι το εκχύλισμα μαγιάς, το οποίο αποτελεί μια αξιόπιστη και οικονομική πηγή πεπτιδίων, αμινοξέων, μετάλλων και πρωτεϊνών, και χρησιμοποιείται ως βελτιωτικό γεύσης τροφίμων. Για την παραλαβή του εκχυλίσματος μαγιάς, καθώς και όλων των υπόλοιπων ενδοκυτταρικών ουσιών της, είναι απαραίτητο ο μικροοργανισμός να διαρρηχτεί, με αποτέλεσμα το κυτταρικό του περίβλημα να καταστεί πιο διαπερατό. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας, εκτός από την παραλαβή των προϊόντων αυτών, αποτελούν και αρκετά μεγάλες ποσότητες διαρρηγμένων κυττάρων μαγιάς (Dimopoulos, Stefanou, Andreou, & Taoukis, 2018). Επιπλέον, μεγάλες ποσότητες κυτταρικών αποβλήτων προκύπτουν και από τις εφαρμογές της μαγιάς ζυθοποιίας.

Τα κυτταρικά απόβλητα αυτά, λόγω της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος της μαγιάς και του γεγονότος πως έχουν καταστεί διαπερατά σε εξωκυτταρικές ουσίες, θα ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ενθυλάκωσης υδρόφιλων αλλά και λιπόφιλων ουσιών. Ακόμα, η εφαρμογή αυτή θα αποτελούσε μια χρήσιμη μορφή αξιοποίησης αυτού του παραπροϊόντος. Η τεχνολογία της ενθυλάκωσης καθώς και η δυνατότητα ενθυλάκωσης λιπόφιλων ουσιών στα κύτταρα της μαγιάς, θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

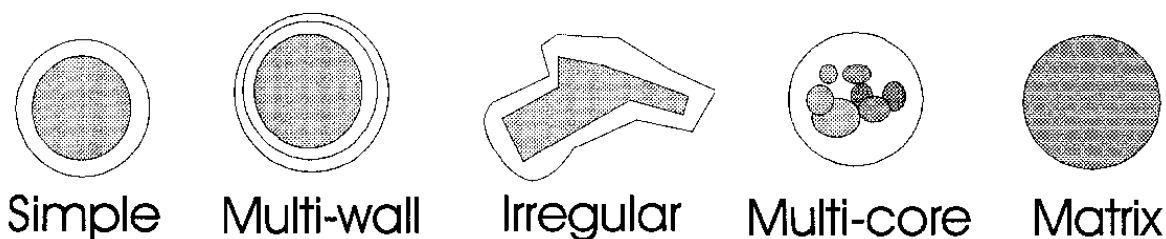
ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

3. ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

3.1. Εισαγωγή

Η ενθυλάκωση είναι μία διαδικασία κατά την οποία ένα υλικό ή ένα μείγμα υλικών επικαλύπτεται ή εγκλωβίζεται εντός ενός άλλου υλικού ή συστήματος. Το υλικό το οποίο είναι επικαλυμμένο ή εγκλωβισμένο βρίσκεται συνήθως σε υγρή κατάσταση, όμως μπορεί να είναι και στερεό σωματίδιο ή αέριο, και η αναφορά σε αυτό περιλαμβάνει διάφορα ονόματα όπως: πυρήνας (core material), επικαλυμμένο συστατικό (coated ingredient), ωφέλιμο φορτίο (payload), ενεργό συστατικό (active ingredient), υλικό πλήρωσης (fill material) ή εσωτερική φάση (internal phase). Το υλικό που αποτελεί το μέσο εγκλεισμού (encapsulating agent) ονομάζεται υλικό τοιχώματος (wall material), επικαλυπτικό υλικό (coating material), επικαλυπτικό μέσο (coating media), φορέας (carrier), μήτρα (matrix), μεμβράνη (membrane), κέλυφος (shell), υπόστρωμα (substrate) ή απλώς τοίχωμα (wall) (Risch, 2009).

Η ενθυλάκωση μπορεί να είναι πολλών διαφορετικών μορφών όπως απλού τοιχώματος, τοιχώματος σφαιρικού ή ακανόνιστου σχήματος, πολλών τοιχωμάτων κατασκευασμένων από το ίδιο ή από διαφορετικά συστατικά, καθώς και πολλών πυρήνων εντός του ίδιου φορέα, όπως αναπαριστάται στην *Εικόνα 3.1*. Η διάμετρος των καψουλών κυμαίνεται από 5 έως 500 μm (Gibbs, Kermasha, Alli, & Mulligan, 1999).



Εικόνα 3.1. Διάφορες μορφές καψουλών (Gibbs et al., 1999)

Ο κύριος σκοπός της ενθυλάκωσης είναι η προστασία μίας ευαίσθητης ουσίας από τις αρνητικές επιπτώσεις που προκαλούνται σε αυτήν από το φως, την υγρασία και το οξυγόνο, και παράλληλα η ελεγχόμενη απελευθέρωση της ουσίας όταν αυτό είναι επιθυμητό. Άλλες λειτουργικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι μικροκάψουλες περιλαμβάνουν την κάλυψη κάποιας ανεπιθύμητης γεύσης ή οσμής, την τροποποίηση των φυσικών χαρακτηριστικών της αρχικής ουσίας ώστε να διευκολύνεται ο χειρισμός της (π.χ. ο χειρισμός στερεών καψουλών είναι ευκολότερος από τον χειρισμό πτητικών υγρών), και την αραίωση της ενθυλακωμένης ουσίας όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε μικρές ποσότητες (Czerniak, Kubiak, Biafas, & Jankowski, 2015).

3.2. Τεχνικές Ενθυλάκωσης

Γενικότερα η κατασκευή των καψουλών προϋποθέτει τον σχηματισμό του φορέα γύρω από το ενεργό συστατικό ή τον εγκλωβισμό του υλικού στην κάψουλα, εξασφαλίζοντας πως δεν υπάρχει διαρροή του υλικού και πως οι ανεπιθύμητες ουσίες παραμένουν εκτός (Gibbs et al., 1999). Υπάρχουν διάφορες τεχνικές για την κατασκευή των μικροκαψουλών, οι οποίες θα αναλυθούν στην συνέχεια του κεφαλαίου.

3.2.1. Ξήρανση με Ψεκάσμο (Spray Drying)

Η τεχνική της ξήρανσης με ψεκάσμο (spray drying) αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο ενθυλάκωσης για συστατικά τροφίμων. Κατέχει κορυφαία θέση στην βιομηχανία τροφίμων αποτελώντας μια από τις πιο οικονομικές και ευρέως διαδεδομένες μεθόδους κατασκευής μικροκαψουλών που σχετίζονται με το άρωμα και την γεύση. Ο εξοπλισμός είναι άμεσα διαθέσιμος και το κόστος παραγωγής είναι μικρότερο σε σχέση με τις περισσότερες τεχνικές εγκλεισμού. Εκτός από μέθοδο ενθυλάκωσης, η ξήρανση με ψεκάσμο αποτελεί επίσης τεχνική αφυδάτωσης, με στόχο την παρασκευή ξηρών προϊόντων όπως η σκόνη γάλακτος.

Για την παραγωγή των καψουλών με την τεχνική αυτή, αρχικά το υλικό τοιχώματος (π.χ. μαλτοδεξτρίνη, τροποποιημένο άμυλο, κόμμι ή συνδυασμός αυτών) ενυδατώνεται. Το συστατικό που πρόκειται να ενθυλακωθεί προστίθεται στον φορέα και το μείγμα ομογενοποιείται ή αναμειγνύεται με κάποια παρόμοια τεχνική. Μία τυπική αναλογία φορέα-πυρήνα είναι 4 : 1, αν και υπάρχουν εφαρμογές που η αναλογία του πυρήνα αυξάνεται. Με την ομογενοποίηση δημιουργούνται μικρά σταγονίδια του ενεργού συστατικού εντός του διαλύματος του φορέα. Η δημιουργία γαλακτώματος αυξάνει την συγκράτηση του πυρήνα κατά την διεργασία της ξήρανσης.

Το μείγμα πυρήνα-φορέα τροφοδοτείται στον ξηραντήρα ψεκάσμου και ψεκάζεται μέσω ενός ακροφυσίου ή ενός περιστρεφόμενου τροχού. Ο θερμός αέρας που ρέει είτε σε ομορροή είτε σε αντιρροή με το ρεύμα τροφοδοσίας, έρχεται σε επαφή με τα σωματίδια εξατμίζοντας το νερό. Με αυτόν τον τρόπο παράγονται ξηρά σωματίδια τα οποία αποτελούνται από το υλικό του φορέα, μέσα στο οποίο περιέχονται μικρά σταγονίδια από το ενεργό συστατικό. Τα σωματίδια πέφτουν στον πυθμένα του ξηραντήρα ψεκάσμου και κατόπιν συλλέγονται. Η λεπτομερής κατανόηση των χαρακτηριστικών της εσωτερικής φάσης καθώς και της εκάστοτε εφαρμογής είναι υψίστης σημασίας για την επιλογή του κατάλληλου υλικού τοιχώματος και για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της ξήρανσης.

Όπως προαναφέρθηκε, τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος λειτουργίας καθώς και ο άμεσα διαθέσιμος εξοπλισμός. Επιπλέον παρέχεται προστασία στην εσωτερική φάση καθώς και υπάρχει μεγάλη ποικιλία από ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς. Ένα βασικό μειονέκτημα είναι πως η σκόνη που παράγεται είναι πολύ λεπτόκοκκη με αποτέλεσμα να χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία όπως συσσωμάτωση για να αποτραπεί ο διαχωρισμός ή για να καταστεί διαλυτή εάν πρόκειται για εφαρμογή σε υγρό. Τέλος σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός πως τα μεγάλα ποσά θερμότητας που απαιτούνται για την εξαίτηση του νερού από το σύστημα, καθιστούν την μέθοδο ακατάλληλη για θερμικά ευαίσθητες ουσίες (Gibbs et al., 1999; Risch, 2009).

3.2.2. Spray Chilling και Spray Cooling

Οι τεχνικές spray chilling και spray cooling είναι παρόμοιες με την τεχνική spray drying σε ότι αφορά την ανάμειξη και ομογενοποίηση της προς ενθυλάκωση ουσίας σε ενυδατωμένο υλικό τοιχώματος και έπειτα του ψεκάσμου. Ωστόσο, σε αντίθεση με την ξήρανση με ψεκάσμο, στις μεθόδους αυτές δεν υπάρχει νερό το οποίο πρέπει να εξατμιστεί. Το μείγμα φορέα-πυρήνα ψεκάζεται σε ψυχρό αέρα, ο οποίος προκαλεί στερεοποίηση του φορέα γύρω από τον πυρήνα. Στην τεχνική spray chilling το επικαλυπτικό υλικό είναι τυπικά ένα κλασματωμένο ή υδρογονωμένο φυτικό έλαιο, το οποίο έχει σημείο τήξης μεταξύ 32 και 42°C. Στην τεχνική spray cooling το επικαλυπτικό υλικό είναι συνήθως ένα φυτικό έλαιο, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα υλικά, με κανονικό σημείο τήξης μεταξύ 45 και 122°C.

Αυτές οι δύο μέθοδοι, οι οποίες διαφέρουν μονάχα στο σημείο τήξης του υλικού τοιχώματος, χρησιμοποιούνται συνήθως για την ενθυλάκωση στερεών ουσιών όπως βιταμίνες, μέταλλα και οξυντικά. Ακόμα, μπορούν να ενθυλακωθούν με αυτές τις τεχνικές κατεψυγμένα υγρά, θερμικά ευαίσθητες ενώσεις καθώς και ουσίες που είναι αδιάλυτες στους συνήθεις διαλύτες. Με αυτές τις μεθόδους, η ελεγχόμενη απελευθέρωση της εσωτερικής φάσης συνδέεται με την τήξη του φορέα, εφόσον το σημείο τήξης της επιλέγεται εκ των προτέρων. Μερικές εφαρμογές των μεθόδων αυτών αποτελούν ξηρά μείγματα σούπας, τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, καθώς και προϊόντα αρτοποιίας (Gibbs et al., 1999; Risch, 2009).

3.2.3. Λυοφιλίωση (Freeze Drying)

Η τεχνική της λυοφιλίωσης (freeze drying) είναι μια μέθοδος ξήρανσης, κατάλληλη για σχεδόν όλες τις θερμικά ευαίσθητες ουσίες. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση υδατοδιαλυτών αποσταγμάτων, φυσικών αρωμάτων και φαρμάκων. Εκτός από την μεγάλη περίοδο αφυδάτωσης (συνήθως 20 h), η μέθοδος της λυοφιλίωσης είναι απλή, ήπια και ιδανική για την ενθυλάκωση παραγόντων γεύσης και αρώματος. Επειδή ολόκληρη η διαδικασία ξήρανσης πραγματοποιείται υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και πίεσης, θεωρείται πως η κατακράτηση πτητικών ενώσεων πρέπει να είναι υψηλή. Η κατακράτηση των πτητικών ουσιών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του συστήματος που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα η κατακράτηση αυξάνεται όταν το μοριακό βάρος των υδατανθράκων μειώνεται και όταν η περιεκτικότητα των ολικών διαλυμένων στερεών αυξάνεται (έως και 20% w/w).

Με απλή διάλυση διάφορων μειγμάτων στερεών σιροπιών καλαμποκιού και σακχάρων (μονοσακχαριτών και δισακχαριτών) σε διαλύματα αρωματικών παραγόντων (περίπου 25% w/w), έχει ισχυριστεί πως με την μέθοδο της λυοφιλίωσης επιτυγχάνεται κατακράτηση των αρχικών πτητικών έως και 75% στον φορέα ενθυλάκωσης. Μια εφαρμογή αποτελούν οι κάψουλες ελαίου εσπεριδοειδών, οι οποίες εφαρμόζονται σε ξηρά μείγματα αφεψημάτων (Augustin, Sanguansri, Margetts, & Young, 2001).

3.2.4. Εξώθηση

Η ενθυλάκωση με την τεχνική της εξώθησης (extrusion) περιλαμβάνει την διασπορά του ωφέλιμου φορτίου σε μία ρευστή μάζα υδατανθράκων. Το μείγμα αυτό τοποθετείται σε έναν θάλαμο, εκεί όπου μια παροχή αζώτου αυξάνει την πίεση, και έτσι το μείγμα εξωθείται σε ένα υγρό αφυδάτωσης, το οποίο σκληραίνει το υλικό τοιχώματος με αποτέλεσμα να παγιδεύσει τον πυρήνα. Το συνηθέστερο υγρό που χρησιμοποιείται στην διεργασία αφυδάτωσης και σκλήρυνσης είναι η ισοπροπυλική αλκοόλη. Το στερεοποιημένο υλικό σπάει σε μικρά κομμάτια διαμέτρου περίπου 1 mm και ξηραίνεται υπό κενό.

Όταν το μείγμα έρχεται σε επαφή με το υγρό αφυδάτωσης και το υλικό τοιχώματος σκληραίνει, ολόκληρη η υπολειμματική ποσότητα του πυρήνα αφαιρείται από την επιφάνεια. Η απουσία υπολειμματικού επιφανειακού υλικού, προσφέρει στις μικροκάψουλες αυτές μία εξαιρετική διάρκεια ζωής έως και 2 χρόνια. Η μέθοδος αυτή παράγει σχετικά μεγάλου μεγέθους κάψουλες, οι οποίες χρησιμοποιούνται όταν είναι επιθυμητά ορατά κομμάτια γεύσης και αρώματος. Ξηρά τρόφιμα στα οποία βρίσκει εφαρμογή αυτή η τεχνική αποτελούν τα μείγματα για ροφήματα, κέικ, κοκτέιλ, ζελατίνη και επιδόρπια, εφόσον οι ενθυλακωμένες ουσίες διαλύονται σε ζεστό ή κρύο νερό (Gibbs et al., 1999; Risch, 2009).

3.2.5. Μέθοδος Wurster

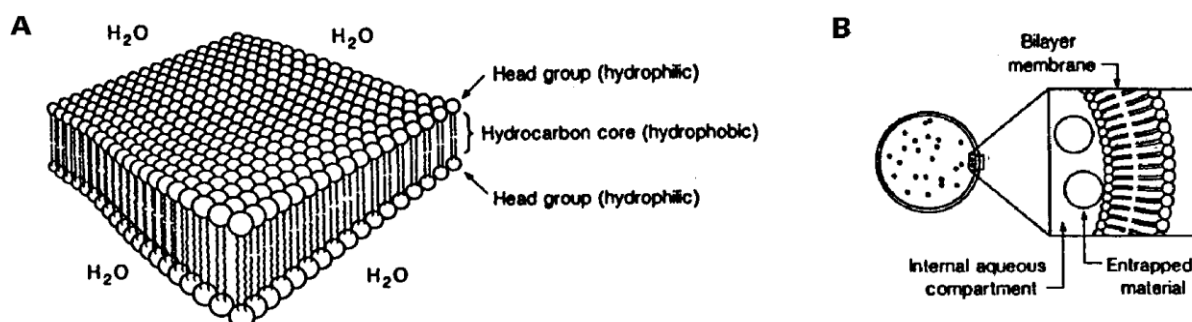
Η μέθοδος Wurster χρησιμοποιείται για την επικάλυψη στερεών σωματιδίων με την χρήση ρευστοστερεάς κλίνης. Τα στερεά σωματίδια αιωρούνται σε έναν θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας με αέρα υψηλής ταχύτητας. Καθώς αιωρούνται, το επικαλυπτικό υλικό ψεκάζεται στο ρεύμα των σωματιδίων με αποτέλεσμα να εναποτίθεται στην επιφάνειά τους. Βέλτιστά αποτελέσματα της μεθόδου παρατηρούνται σε σωματίδια διαστάσεων μεταξύ 50 και 500 μm. Η ποσότητα του επικαλυπτικού υλικού των σωματιδίων εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής των σωματιδίων στον θάλαμο.

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται θερμά τήγματα για επικαλυπτικό υλικό, όπως υδρογονωμένα φυτικά έλαια, λιπαρά οξέα, γαλακτωματοποιητές ή διαλύματα ουσιών όπως άμυλα, κόμμεα και μαλτοδεξτρίνες. Για τα θερμά τήγματα χρησιμοποιείται ψυχρός αέρας για την σκλήρυνση του φορέα, ενώ για τα διαλύματα θερμός ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης. Οι κάψουλες που δημιουργούνται με θερμά τήγματα απελευθερώνουν το περιεχόμενο τους με αύξηση της θερμοκρασίας ή με δυναμική καταπόνηση, ενώ οι κάψουλες της άλλης κατηγορίας με την προσθήκη νερού. Ουσίες που ενθυλακώνονται με την μέθοδο αυτή είναι το κιτρικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το σορβικό οξύ, η βιταμίνη C και το διττανθρακικό νάτριο (Gibbs et al., 1999; Risch, 2009).

3.2.6. Παγίδευση σε Λιποσώματα

Η χρήση λιποσωμάτων ως υλικό τοιχώματος συνεπάγεται την παραγωγή κάψουλων υψηλής σταθερότητας. Τα λιποσώματα αποτελούνται από ένα ή περισσότερα στρώματα λιπιδίων και είναι μη τοξικά. Οι ιδιότητες τους όπως η διαπερατότητα και η σταθερότητα ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος και την λιπιδική τους σύσταση. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 25 nm έως και αρκετά μm, και είναι εύκολο να αποθηκευθούν μετά από λυοφιλίωση (freeze drying).

Τα στρώματα των λιποσωμάτων αποτελούνται από φωσφολιπίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από ένα υδρόφιλο και από ένα υδρόφοβο τμήμα (Εικόνα 3.2.A). Τα υδρόφιλα τμήματα των φωσφολιπιδίων προσανατολίζονται προς την υδατική φάση και οι υδρόφοβες ομάδες συνδέονται με τις υδρόφοβες ομάδες των άλλων φωσφολιπιδίων. Η αναδίπλωση των λιπιδικών στρωμάτων σε σφαιρικά σχήματα δημιουργεί κάψουλες μεγάλης σταθερότητας λόγω του ότι απουσιάζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων και του νερού (Εικόνα 3.2.5.1.B). Σε αυτές τις μεμβράνες παγιδεύονται ξεχωριστά υδατοδιαλυτά ή λιποδιαλυτά υλικά (Gibbs et al., 1999; Risch, 2009).



Εικόνα 3.2. Αναπαράσταση λιπιδικής διπλοστοιβάδας (A) και κάψουλας λιποσώματος (B) (Gibbs et al., 1999)

3.3. Ενθυλάκωση και Βιομηχανία Τροφίμων

Για πολλά χρόνια η τεχνική της ενθυλάκωσης χρησιμοποιούνταν στην φαρμακοβιομηχανία για την χρονικά ελεγχόμενη απελευθέρωση κάποιας φαρμακευτικής ουσίας, την ενισχυμένη σταθερότητα και την κάλυψη δυσάρεστων γεύσεων. Ουσίες που έχουν ενθυλακωθεί στην φαρμακοβιομηχανία αποτελούν οι φαρμακευτικές ουσίες, οι βιταμίνες και τα μέταλλα. Συνεπώς οι εφαρμογές αυτές, καθώς και πολλές άλλες, θα ήταν χρήσιμες και στην βιομηχανία τροφίμων. Παρόλα αυτά οι εφαρμογές αυτές καθυστέρησαν να εφαρμοστούν στην βιομηχανία τροφίμων λόγω του ότι η τεχνική αυτή θεωρούταν πολύ ακριβή και εξειδικευμένη. Ωστόσο καθώς αυξήθηκαν οι όγκοι παραγωγής και αναπτύχθηκαν οικονομικά αποδοτικότερες τεχνικές παρασκευής και νέα υλικά, ο αριθμός των ενθυλακωμένων προϊόντων διατροφής έχει αυξηθεί σημαντικά (Gibbs et al., 1999).

3.3.1. Πλεονεκτήματα Ενθυλάκωσης

Η χρήση μικροκαψουλών στα τρόφιμα μπορεί να τα βελτιώσει οργανοληπτικά με την εισαγωγή ενθυλακωμένων αρωμάτων, γλυκαντικών και χρωστικών, αλλά και διατροφικά με την εισαγωγή βιταμινών, πρωτεϊνών, μεταλλικών στοιχείων καθώς και πολλών άλλων ευεργετικών ουσιών, οι οποίες υπό την προστασία που παρέχει το κέλυφος των καψουλών παραμένουν ασφαλείς από παράγοντες αλλοίωσης και υποβάθμισης όπως το οξυγόνο, το φως και η υγρασία. Επίσης με την ενθυλάκωση ευεργετικών ουσιών με δυσάρεστη γεύση, είναι δυνατή η εισαγωγή των ουσιών αυτών σε τρόφιμα, με την επίτευξη της κάλυψης της ανεπιθύμητης γεύσης τους (Gibbs et al., 1999).

Ο εγκλεισμός ουσιών, που προσφέρουν στο τρόφιμο γεύση και άρωμα, είναι πολύ σημαντικός, καθώς οι ουσίες αυτές αποτελούνται από πτητικά μόρια, τα οποία υπόκεινται σε απώλεια κατά την διάρκεια της επεξεργασίας του προϊόντος. Η ενθυλάκωση παρέχει προστασία στις πτητικές ενώσεις, σταθερότητα κατά την διάρκεια της επεξεργασίας και βελτίωση του χειρισμού των συστατικών. Με την τεχνική αυτή οι υγρές ουσίες μετασχηματίζονται σε στερεή σκόνη, γεγονός που κάνει πολύ αποτελεσματική την προσθήκη ουσιών γεύσης και αρώματος στα τρόφιμά (Sultana et al., 2017).

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα αποτελεί η ελεγχόμενη απελευθέρωση των ενθυλακωμένων ουσιών. Υπάρχουν τεχνικές ενθυλάκωσης που αποσκοπούν στην παραγωγή καψουλών, των οποίων η εσωτερική φάση απελευθερώνεται σταδιακά και αργά με την πάροδο του χρόνου ή και ακαριαία σε μια συγκεκριμένη στιγμή. Παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση είναι η θερμοκρασία, η ενεργότητα του νερού και η δυναμική καταπόνηση όπως η μάσηση. Τέλος, με την ενθυλάκωση μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός συστατικών που θα αντιδρούσαν μεταξύ τους, όμως είναι επιθυμητό να βρίσκονται στο ίδιο σύστημα (Risch, 2009).

3.3.2. Ενθυλακωμένα Συστατικά Τροφίμων

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ενθυλακωμένων συστατικών τροφίμων που χρησιμοποιούνται τόσο για την αύξηση της διατροφικής αξίας, της προστασίας και της συντήρησης ενός τροφίμου, όσο και για την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του όπως η γεύση, το άρωμα, το χρώμα και η υφή. Στον Πίνακα 3.1. παρουσιάζονται οι κατηγορίες των συστατικών αυτών.

Πίνακας 3.1. Διάφορα συστατικά τροφίμων που χρησιμοποιούνται για ενθυλάκωση

Κατηγορίες Συστατικών Τροφίμων
Παράγοντες γεύσης και αρώματος (flavors) όπως έλαια, μπαχαρικά, καρυκεύματα και γλυκαντικά
Οξέα, αλκάλια και ρυθμιστικά διαλύματα
Λιπίδια
Οξειδοαναγωγικά σώματα
Ένζυμα και μικροοργανισμοί
Τεχνητά γλυκαντικά
Διογκωτικά
Αντιοξειδωτικά
Συντηρητικά
Χρωστικές ουσίες
Σταθεροποιητές
Αιθέρια έλαια, βιταμίνες και μέταλλα

(Gibbs et al., 1999)

3.3.2.1. Οξέα

Το αδιπικό, το φουμαρικό, το κιτρικό, το γαλακτικό και το ασκορβικό οξύ, έχουν όλα ενθυλακωθεί. Το ασκορβικό οξύ προστίθεται στο ψωμί για να βελτιώσει την ποιότητα του. Η ενθυλακωμένη μορφή του ασκορβικού οξέος το προστατεύει από αλλοιώσεις που θα προκαλούνταν από το νερό και το οξυγόνο που υπάρχουν στο ψωμί. Το κιτρικό οξύ προστίθεται στο τσάι ως ενισχυτικό γεύσης, όμως μπορεί να αντιδράσει με τις τανίνες προκαλώντας αποχρωματισμό του φακέλου του τσαγιού. Με την ενθυλάκωση του κιτρικού οξέος μπορεί να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα, ενώ παράλληλα αυτό διατηρεί την λειτουργικότητά του. Στα κατεργασμένα κρέατα όπως το πεπερόνι, το σαλάμι και τα λουκάνικα, προστίθενται γαλακτικό και κιτρικό οξύ ως ενισχυτικά γεύσης. Η άμεση προσθήκη δεν είναι εφικτή εφόσον τα οξέα αυτά αντιδρούν με τα τρόφιμα. Μια εναλλακτική λύση είναι η προσθήκη ενθυλακωμένων οξέων ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα αυτά. Επίσης στα κρέατα χρησιμοποιείται γλύκονο-δ-λακτόνη (GDL), που αν ενθυλακωθεί με ένα λιπαρό επικαλυπτικό υλικό προστατεύει το κρέας από πρόωρη όξυνση και σκλήρυνση. Άλλες πιθανές εφαρμογές περιλαμβάνουν επιδόρπια, μείγματα ψησίματος και τροφές για κατοικίδια (Gibbs et al., 1999).

3.3.2.2. Χρωστικές

Το β-καροτένιο, ο κουρκουμάς καθώς και άλλες φυσικές χρωστικές δεν είναι ευδιάλυτες με αποτέλεσμα να προκαλούνται προβλήματα εξαιτίας της αδιάλυτης σκόνης. Τα πλεονεκτήματα του εγκλεισμού αυτών των χρωστικών είναι η αύξηση της διάρκειας ζωής από 6 μήνες σε 2 χρόνια, ο ευκολότερος χειρισμός και η βελτίωση της διαλυτότητας και της σταθερότητας τους (Gibbs et al., 1999).

3.3.2.3. Παράγοντες Γεύσης και Αρώματος

Η ενθυλάκωση του ελαίου εσπεριδοειδών, καθώς και άλλων παραγόντων γεύσης και αρώματος και μπαχαρικών, αυξάνει την σταθερότητα τους. Η μενθόλη, η μέντα και ο δυόσμος σε ενθυλακωμένη μορφή είναι πολύ δημοφιλή αρωματικά στα τρόφιμα, λόγω της υψηλής σταθερότητας που παρουσιάζουν στην σύντομη έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Ο

εγκλεισμός της κανέλας σε λιπαρό φορέα δεν επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με την ανάπτυξη της μαγιάς στα ψημένα προϊόντα (Gibbs et al., 1999).

3.3.2.4. Διογκωτικά

Το διττανθρακικό νάτριο το οποίο χρησιμοποιείται ως διογκωτικό, μπορεί να ενθυλακωθεί ώστε να μειθούν οι αντιδράσεις του με διάφορα οξέα και το νερό, εξασφαλίζοντας καλύτερη δράση. Τα υλικά τοιχώματος που χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό των διογκωτικών είναι συνήθως λιπαρή ή ελαιώδης μορφής, και εφαρμόζονται σε ζύμες πίτσας (Gibbs et al., 1999).

3.3.2.5. Άλατα

Η επικάλυψη χλωριούχου νατρίου με υδρογονωμένο φυτικό έλαιο συνεισφέρει στην αύξηση της ικανότητας ροής του και μειώνει την συσσωμάτωση και την συσσώρευση. Το χλωριούχο νάτριο βοηθάει στην μείωση της αλλοίωσης του χρώματος, στον έλεγχο της απορρόφησης του νερού και στην ανάπτυξη της μαγιάς. Οι κάψουλες αυτές βρίσκουν εφαρμογή σε ζύμες, σνακ και κονιοροποιημένα κρέατα (Gibbs et al., 1999).

3.3.2.6 Γλυκαντικά

Τα γλυκαντικά μπορεί να υποστούν υποβάθμιση από την θερμοκρασία και την υγρασία. Η ζάχαρη, η ασπαρτάμη και τα τεχνητά γλυκαντικά ενθυλακώνονται σε λιπαρούς φορείς για την χρήση τους σε τσίχλες. Τα γλυκαντικά αυτά απελευθερώνονται αργά κατά την διάρκεια της μάσησης της τσίχλας λόγω της δυναμικής καταπόνησης που προκαλείται και της υγρασίας της στοματικής κοιλότητας. Επίσης η ενθυλάκωση της ασπαρτάμης την προστατεύει από τις υψηλές θερμοκρασίες που εκτίθενται τα προϊόντα ψησίματος, εμποδίζοντάς την να διασπαστεί σε ασπαρτικό οξύ και φαινυλαλανίνη και να χάσει την γλυκύτητά της (Gibbs et al., 1999).

3.3.2.7. Βιταμίνες και Μέταλλα

Βιταμίνες και μέταλλα συχνά προστίθενται σε δημητριακά, γαλακτοκομικά προϊόντα, βρεφικές τροφές και σε τροφές για κατοικίδια. Με την ενθυλάκωση τόσο υδατοδιαλυτών όσο και λιποδιαλυτών βιταμινών, μπορεί να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες τους γεύσης και να αυξηθεί η σταθερότητά τους. Επίσης βελτιώνονται και οι ιδιότητες ροής τους (Gibbs et al., 1999).

3.3.3. Επικαλυπτικά Υλικά

Η σύνθεση του τοιχώματος είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τις λειτουργικές ιδιότητες της μικροκάψουλας και της βελτίωσης της χρήσης ενός συστατικού. Ένα ιδανικό υλικό τοιχώματος πρέπει να εμφανίζει καλές ρεολογικές ιδιότητες σε μεγάλη συγκέντρωση και ευκολία χειρισμού κατά την διάρκεια της ενθυλάκωσης. Επιπλέον πρέπει να μπορεί να διασπείρεται στο ενεργό συστατικό ή να γαλακτωματοποιείται με αυτό σχηματίζοντας σταθερά γαλακτώματα, να μην αντιδράει μαζί του τόσο κατά την διαδικασία ενθυλάκωσης όσο και κατά την αποθήκευση, να είναι ικανό να το σφραγίσει και να το συγκρατήσει και να είναι διαλυτό σε διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων όπως το νερό και η αιθανόλη. Τέλος πρέπει να έχει την ικανότητα πλήρους απελευθέρωσης του διαλύτη κατά την διάρκεια της ενθυλάκωσης, της ξήρανση ή άλλων τεχνικών συμπύκνωσης, δυνατότητα παροχής μέγιστης προστασίας του πυρήνα

από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (φως, αέρας, υγρασία), να πληροί συγκεκριμένες ή επιθυμητές ιδιότητες διαλυτότητας καψουλών και απελευθέρωσης του πυρήνα και να είναι οικονομικό. Λόγω του ότι σχεδόν κανένα υλικό δεν πληροί όλες τις παραπάνω προδιαγραφές ταυτόχρονα, στην πράξη χρησιμοποιούνται συνδυασμοί επικαλυπτικών υλικών (Augustin et al., 2001).

Πίνακας 3.2. Επικαλυπτικά υλικά που χρησιμοποιεί η βιομηχανία τροφίμων

Επικαλυπτικά Υλικά	
Υδατάνθρακες	Άμυλο, μαλτοδεξτρίνες, σιρόπι καλαμποκιού, δεξτράνη, σουκρόζη, κυκλοδεξτρίνες
Κυτταρίνη	Καρβοξύ-μεθυλοκυτταρίνη, μεθυλοκυτταρίνη, αιθυλοκυτταρίνη, νιτροκυτταρίνη, ακετυλοκυτταρίνη, οξική φθαλική κυτταρίνη, οξική βουτυλική φθαλική κυτταρίνη
Κόμμεα	Αραβικό κόμμι, άγαρ, αλγινικό νάτριο, καραγενάνη
Λιπίδια	Παραφίνη, τριστεατικό οξύ, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, έλαια, λίπη
Πρωτεΐνες	Γλουτένη, καζεΐνη, ζελατίνη, αλβουμίνη, αιμογλοβίνη, πεπτίδια

(Augustin et al., 2001)

3.3.3.1. Υδατάνθρακες

Η ικανότητα των υδατανθράκων να απορροφούν πτητικές ουσίες, τους καθιστά κατάλληλους για την ενθυλάκωση αρωματικών και γευστικών παραγόντων. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι υδατάνθρακες διατηρούν τα πτητικά συστατικά κατά την διάρκεια διεργασιών όπως η λυοφιλίωση, η ξήρανση με ψεκασμό και η εξώθηση, δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί πλήρως, αλλά πιθανών περιλαμβάνουν κυρίως φυσικές αλληλεπιδράσεις. Θεωρείται πως κατά την διάρκεια της λυοφιλίωσης αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των υδατανθράκων. Αυτό με την σειρά του δημιουργεί ένα σταθερό δίκτυο όπου και παγιδεύονται τα πτητικά συστατικά (Augustin et al., 2001).

Το άμυλο προέρχεται από πατάτα, καλαμπόκι, ρύζι και σιτάρι και συνεπώς υπάρχει σε αφθονία. Δυστυχώς το ακατέργαστο άμυλο γίνεται πολύ ιξώδες όταν αναμειχθεί με το νερό, και τα προϊόντα υδρόλυσής του δεν προσφέρουν ιδιότητες γαλακτοματοποίησης στα συστατικά που είναι ενθυλακωμένα. Τα τροποποιημένα άμυλα όμως, τα οποία είναι χημικώς κατασκευασμένα ώστε να ενσωματώνουν στα μόριά τους λιπόφιλες ενώσεις, μπορούν να προσφέρουν εξαιρετική σταθερότητα στα γαλακτώματά τους. Επίσης παρουσιάζουν πολύ καλή κατακράτηση πτητικών ουσιών κατά την λυοφιλίωση (Augustin et al., 2001; Gibbs et al., 1999).

Η δεξτρίνη προέρχεται από την θέρμανση του ξηρού αμύλου με οξύ ή βάση, σχηματίζοντας πολύ διακλαδισμένα πολυμερή. Ανάλογα με τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται, μπορούν να ληφθούν διάφορα προϊόντα. Σε σύγκριση με το ακατέργαστο άμυλο, τα προϊόντα αυτά παρουσιάζουν καλύτερη ιξώδη συμπεριφορά και διαλυτότητα στο νερό, όμως είναι ακατάλληλα για ενθυλάκωση ελαιωδών συστατικών λόγω της συμβολής τους στην γεύση και στο χρώμα.

Οι μαλτοδεξτρίνες που χρησιμοποιούνται εξίσου ως φορείς ενθυλάκωσης σχηματίζονται με μερική υδρόλυση του αμύλου καλαμποκιού με οξέα ή ένζυμα. Το μοριακό τους βάρος είναι περίπου 1800 daltons. Δεν διαθέτουν λιπόφιλες ομάδες, επομένως έχουν κακές ιδιότητες γαλακτοματοποίησης. Τα πλεονεκτήματά τους περιλαμβάνουν αμελητέα γεύση, χρήση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών και βελτίωση της διάρκειας ζωής των ελαίων εσπεριδοειδών.

Η ανάμιξη στερεού σιροπιού καλαμποκιού, μαλτοδεξτρίνων και τροποποιημένων αμύλων μπορεί να οδηγήσει σε βέλτιστα υλικά τοιχώματος. Στις διεργασίες της ξήρανσης με ψεκασμό και

της εξώθησης, χρησιμοποιούνται τα επιμέρους συστατικά, με σκοπό την παραγωγή καψουλών με υδατοδιαλυτή μήτρα (Gibbs et al., 1999).

3.3.3.2. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι το κύριο συστατικό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Μαζί με ορισμένους άλλους πολυσακχαρίτες, η κυτταρίνη εντάσσεται στην κατηγορία των διαιτητικών ινών. Η διατροφική αξία των διαιτητικών ινών σχετίζεται με την κινητικότητα του εντέρου. Η κυτταρίνη αποτελεί βρώσιμη μεμβράνη για την διατήρηση τροφίμων, η διαπερατότητα της οποίας αλλάζει αν συνδυαστεί και με άλλα επικαλυπτικά υλικά. Χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση υδατοδιαλυτών ενώσεων όπως γλυκαντικών και οξέων, αλλά και για την ενθυλάκωση ενζύμων και κυττάρων (Augustin et al., 2001).

3.3.3.3. Κόμμεα

Τα κόμμεα είναι πολυμερή μακράς αλυσίδας που διασκορπίζονται ή διαλύονται στο νερό, με αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους. Χρησιμοποιούνται κυρίως ως συστατικά για την βελτίωση της υφής ενός τροφίμου, αλλά και ως σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές και φορείς ενθυλάκωσης. Τα περισσότερα παράγονται από φυτικά υλικά όπως φύκια και σπόρους, άλλα είναι προϊόντα μικροβιακής βιοσύνθεσης και άλλα παράγονται με χημική τροποποίηση φυσικών πολυσακχαριτών (Augustin et al., 2001).

Η χρήση του αραβικού κόμμεος ως φορέα ενθυλάκωσης είναι πολύ συνηθισμένη λόγω του ιξώδους, της διαλυτότητάς και των χαρακτηριστικών γαλακτωματοποίησης του. Το κύριο μειονέκτημά του είναι το κόστος λόγω των συχνών ελλείψεών του στο εμπόριο.

Τα αλγινικά άλατα, τα οποία εκχυλίζονται από υδροκολλοειδή συστήματα, μπορούν να αντιδράσουν με ιόντα ασβεστίου σχηματίζοντας ένα σταθερό τζελ. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται για την παγίδευση ή ενθυλάκωση αρωματικών ελαίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα αλγινικά είναι πολυμερή, με μοριακό βάρος από 12.000 έως 180.000 g/mol, αποτελούμενα από D-μανουρονικό οξύ και L-γλουτουρονικό οξύ, συνδεδεμένα μεταξύ τους με 1-4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Για να κατασκευαστούν οι μικροκάψουλες, το αλγινικό γαλακτωματοποιείται με αρωματικό έλαιο και στην συνέχεια προστίθεται στάγδην σε ένα διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου. Τα σφαιρίδια που προκύπτουν έχουν μέγεθος από 200 έως 5.000 μm. Να σημειωθεί πως μόρια μεγαλύτερα από 5.000 daltons διατηρούνται στο τζέλ (Gibbs et al., 1999).

3.3.3.4. Λιπίδια

Μία λιπαρή ουσία που δρα ως γαλακτωματοποιητής και χρησιμοποιείται για ενθυλάκωση είναι η λεκιθίνη. Τα κυστίδια λεκιθίνης χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό ενζύμων, λόγω του ότι οι κάψουλες λεκιθίνης μπορούν να παραχθούν σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Χρησιμοποιώντας κυστίδια λεκιθίνης για την ενθυλάκωση λυσοζύμης και πειψίνης, βρέθηκε πως η αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού είναι βέλτιστη όταν το pH βρίσκεται κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο κάθε ενζύμου αντίστοιχα. Επίσης εκτός από κυστίδια λεκιθίνης, έχει χρησιμοποιηθεί και μείγμα λεκιθίνης και πολυαιθυλενίου για την ενθυλάκωση άλλων δραστικών ουσιών όπως γλυκαντικών και γευστικών παραγόντων (Augustin et al., 2001). Άλλα λιπίδια που χρησιμοποιούνται για ενθυλάκωση αποτελούν τα λιποσώματα τα οποία έχουν αναλυθεί σε παραπάνω παράγραφο (βλ. 3.2.6.).

3.3.3.5. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι σημαντικές θρεπτικές ουσίες, οι οποίες διαθέτουν πολλές εξαιρετικές λειτουργικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες τους επιτρέπουν την χρήση τους ως υλικό τοιχώματος για ενθυσιάκωση συστατικών τροφίμων. Πρωτεϊνικά υλικά όπως η πολυπεπτόνη, η πρωτεΐνη σόγιας, η ζελατίνη και τα παράγωγα γάλακτος μπορούν να σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα με πηκτικούς παράγοντες αρώματος και γεύσης, με το πιο διαδεδομένο υλικό την ζελατίνη. Η ζελατίνη είναι μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, προερχόμενη από το κολλαγόνο. Είναι ένα πολύτιμο επικαλυπτικό υλικό το οποίο είναι μη τοξικό, φτηνό και εμπορικά διαθέσιμο. Οι χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ζελατίνης που σχετίζονται με την ικανότητά της να σχηματίζει πηκτώματα την καθιστούν ιδανική για τον σχηματισμό καψουλών (Augustin et al., 2001; Gibbs et al., 1999).

3.4. Μέθοδοι Απελευθέρωσης Εσωτερικής Φάσης

Η επιλογή του κατάλληλου υλικού τοιχώματος είναι πολύ σημαντική, δεδομένου ότι πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το σύστημα που θα εφαρμοστούν οι κάψουλες και ο μηχανισμός με τον οποίο θα απελευθερωθεί ο πυρήνας. Ο βαθμός διόγκωσης των καψουλών εξαρτάται από την απορρόφηση του νερού ή την παρουσία διαλυτών όπως η γλυκερίνη και η προπυλενογλυκόλη. Γενικά όσο υψηλότερη είναι η ενεργότητα του νερού, τόσο μεγαλύτερος είναι και ο ρυθμός απελευθέρωσης. Επίσης οι σταυροδεσμοί (δεσμοί που ενώνουν τα πολυμερή μεταξύ τους) επηρεάζουν την διάχυσή λόγω της συσσωμάτωσης των καψουλών. Γενικά υψηλοί βαθμοί σταυροσύνδεσης επιφέρουν μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης (Gibbs et al., 1999).

Η δομή του τοιχώματος, εκτός από το ότι προστατεύει τον πυρήνα από διάφορους αλλοιογόνους παράγοντες όπως το οξυγόνο, το φως και η υγρασία, ελέγχει και την απελευθέρωση του πυρήνα. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό απελευθέρωσης (Πίνακας 3.3.), καθώς και διάφοροι μηχανισμοί απελευθέρωσης οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω (Augustin et al., 2001).

Πίνακας 3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό απελευθέρωσης της εσωτερικής φάσης

Εξάρτηση Απελευθέρωσης	
Ιδιότητες Επίστρωσης	Πυκνότητα, κρυσταλλικότητα, προσανατολισμός, διαλυτότητα, πλαστικότητα, σταυροσύνδεση, προκατεργασία
Χαρακτηριστικά Κάψουλας	Μέγεθος, πάχος τοιχώματος, διαμόρφωση, συμμόρφωση, στρώσεις τοιχώματος, μετεπεξεργασία
Φυσικοχημικές Παράμετροι	Θερμοκρασία, pH, υγρασία, διαλύτης, ενεργότητα νερού, μηχανική δράση, μερική διαφορά πίεσης

(Augustin et al., 2001)

3.4.1. Καταστροφή Επικαλυπτικού Μέσου

Ο φορέας μπορεί να καταστραφεί ή να διαρρηχτεί από εξωγενείς δυνάμεις όπως η πίεση, η θερμοκρασία και η μηχανική καταπόνηση, ή και από εσωτερικές δυνάμεις όπως θα συνέβαινε σε μία μικροκάψουλα με επιλεκτικά διαπερατή μεμβράνη. Οι κάψουλες που είναι κατασκευασμένες από λιπαρά και είναι αδιάλυτες στο νερό, μπορούν να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους με μηχανική καταπόνηση, με αύξηση της θερμοκρασίας στο σημείο τήξης του λίπους και με διάτμηση (Augustin et al., 2001).

Η μάσηση είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος απελευθέρωσης με δυναμική καταπόνηση. Άλλη μέθοδος αποτελεί η ανάδευση. Οι επικαλύψεις χαμηλού ιξώδους είναι χρήσιμες στην απελευθέρωση ουσιών κατά την ανάδευση των καψουλών. Επίσης, η απελευθέρωση μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη ενός διογκωτικού παράγοντα στον πυρήνα. Γενικά η απελευθέρωση με μεθόδους θραύσης και καταστροφής της κάψουλας πραγματοποιούνται σε πολύ μικρότερα χρονικά διαστήματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους (Augustin et al., 2001; Gibbs et al., 1999).

3.4.2. Διάχυση

Η απελευθέρωση της εσωτερικής φάσης μπορεί να ελεγχθεί με τον μηχανισμό της διάχυσης από το τοίχωμα της κάψουλας. Αυτό συμβαίνει λόγω του λεπτού τοιχώματος των περισσότερων καψουλών που λειτουργεί σαν ημιπερατή μεμβράνη, και του μικρού τους μεγέθους που οδηγεί σε μεγάλη επιφάνεια ανά μονάδα μάζας. Η διαπερατότητα και η διαλυτότητα της μήτρας επηρεάζουν τον ρυθμό διάχυσης του πυρήνα. Γενικά, η διαχεόμενη ουσία πρέπει να είναι διαλυτή στην μήτρα, αν και αυτό δεν ισχύει πάντα, εφόσον η τάση ατμών μίας πτητικής ένωσης μπορεί να γίνει η κινητήρια δύναμη της διάχυσης σε οποιοδήποτε σημείο του τοιχώματος. Η πτητικότητα των παραγόντων αρώματος και γεύσης μπορεί να ποικίλει σημαντικά από ουσία σε ουσία (Augustin et al., 2001; Gibbs et al., 1999).

Η διάχυση είναι μία διαδικασία διείσδυσης που οφείλεται σε βαθμίδωση της συγκέντρωσης ή σε ελκτικές δυνάμεις. Η διαπερατότητα ορίζεται ως η διαβίβαση ενός διεισδυτικού μέσου, διαμέσου ενός ανθεκτικού υλικού. Δεδομένου πως δεν υπάρχουν ρωγμές, οπές ή άλλα ελαττώματα, ο αρχικός μηχανισμός για την ροή του πυρήνα μέσω του τοιχώματος ονομάζεται ενεργοποιημένη διάχυση. Η ενεργοποιημένη διάχυση περιλαμβάνει τη διάλυση του διεισδυτικού μέσου στην πλευρά του τοιχώματος με την υψηλότερη συγκέντρωση, τη διάχυση του μέσω της μάζας του υλικού λόγω βαθμίδωσης της συγκέντρωσης και την έξοδό του από την άλλη μεριά του τοιχώματος. Το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας, δηλαδή η διάχυση του πυρήνα, εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και την πολικότητα των διεισδυτικών μορίων, καθώς και την τμηματική κίνηση των πολυμερικών αλυσίδων, οι οποίες παρουσιάζουν ελκτικές δυνάμεις δεσμών υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals και βαθμούς σταυροσύνδεσης και κρυσταλλικότητας.

Η απελευθέρωση λαμβάνει χώρα όταν η υαλώδης και αδιαπέραστη δομή του φορέα μεταβαίνει σε μία πιο ελαστική και κινητή κατάσταση. Οι παράμετροι που μεταβάλλουν την διαπερατότητα του φορέα είναι η ενεργότητα του νερού, η θερμοκρασία και ο χρόνος. Δεδομένων αυτών των παραμέτρων, είναι δυνατή η παραγωγή συστημάτων ελεγχόμενης απελευθέρωσης (Augustin et al., 2001).

3.4.3. Διάλυση και Τήξη

Η ακεραιότητα της μήτρας μπορεί να καταστραφεί με διάλυση στον κατάλληλο διαλύτη ή με την χρήση θερμικών μέσων. Οι υδατοδιαλυτές επικαλύψεις μπορούν εύκολα να διαλυθούν με την αύξηση της υγρασίας, απελευθερώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον πυρήνα. Οι αδιάλυτες στο νερό φορείς, μπορούν εξίσου να διαλυθούν με την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη. Η απελευθέρωση με αυτήν την μέθοδο εφαρμόζεται σε κάψουλες που το τοίχωμα αποτελείται από ουσίες όπως σάκχαρα, ζελατίνη, άμυλα και PEG. Στις περιπτώσεις αυτές η απελευθέρωση είναι άμεση, σε αντίθεσή με την απελευθέρωση των ουσιών που προστίθενται στις τσίχλες, όπου η απελευθέρωση πραγματοποιείται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Παραδείγματα αποτελούν οι

ενθυλακωμένες ουσίες που βρίσκονται σε ξηρά προϊόντα (μείγματα κέικ, αφεψημάτων κ.α.) και απελευθερώνονται με την προσθήκη νερού (Augustin et al., 2001; Gibbs et al., 1999).

Με την τήξη του επικαλυπτικού μέσου (το οποίο στις περιπτώσεις αυτές αποτελείται συνήθως από λιπαρές ουσίες) η δομή της κάψουλας καταστρέφεται με αποτέλεσμα οι ουσίες της εσωτερικής φάσης όπως άλατα, διογκωτικοί και γευστικοί παράγοντες και θρεπτικά συστατικά να απελευθερώνονται. Για την απελευθέρωση με αυτόν τον μηχανισμό, χρησιμοποιείται συχνά η τεχνική spray chilling για την κατασκευή των μικροκαψουλών. Η μέθοδος αυτή περιορίζεται σε υδατοδιαλυτές ουσίες, εφόσον οι υδρόφοβες ουσίες θα διαπερνούσαν το υλικό τοιχώματος. Ο μηχανισμός της τήξης βρίσκει εφαρμογή σε ξηρά μείγματα σούπας και προϊόντα αρτοποιίας (Gibbs et al., 1999).

3.4.4. Βιοαποικοδόμηση

Η απελευθέρωση της εσωτερικής φάσης μπορεί να επιτευχθεί με βιοαποικοδόμηση, εάν το υλικό του τοιχώματος μπορεί να υποστεί τέτοιου είδους διεργασίες αποικοδόμησης. Τα επικαλυπτικά υλικά τα οποία αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να αποικοδομηθούν από την δράση των λιπασών (Augustin et al., 2001).

3.5. Ενθυλάκωση Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης σε Κύτταρα Ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*)

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά και πτητικά ελαιώδη υγρά, τα οποία προέρχονται από φυτικές πρώτες ύλες όπως άνθη, μίσχους, σπόρους, φύλλα, κλαδιά, φλοιούς, βότανα, ξύλα, φρούτα και ρίζες. Τα αιθέρια έλαια παράγονται με εκχύλιση αυτών των πρώτων υλών και αποτελούν πλούσιες πηγές βιολογικών και δραστικών ενώσεων όπως τα τερπενοειδή και τα φαινολικά οξέα. Λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων βρίσκουν εφαρμογή στις φαρμακοβιομηχανίες αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, όπου την τελευταία δεκαετία χρησιμοποιούνται κυρίως για τις φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις που διαθέτουν (Hosseini, Zandi, Rezaei, & Farahmandghavi, 2013; Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009).

3.5.1. Μέθοδοι Εκχύλισης Αιθέριων Ελαίων

Η παραγωγή αιθέριων ελαίων βασίζεται στην εκχύλιση στερεού-υγρού με διάφορους διαλύτες. Υπάρχουν διάφορες συμβατικές αλλά και εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης (Πίνακα 3.4.). Ακολουθεί η περιγραφή των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης αιθέριων ελαίων.

Πίνακας 3.4. Μέθοδοι εκχύλισης αιθέριων ελαίων

Μέθοδοι Εκχύλισης	
Συμβατικές Μέθοδοι	Εκχύλιση Soxhlet Υδροαπόσταξη Διαβροχή Εκχύλιση αναδεδυμένου διαλύτη
Εναλλακτικές Μέθοδοι	Υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους Υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα Εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά Σύστημα παλμικών ηλεκτρικών πεδίων Εκχύλιση υψηλής υδροστατικής πίεσης

3.5.1.1. Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet αποτελεί μια από τις πιο κλασικές μεθόδους εκχύλισης, ανακυκλώνοντας μία μικρή ποσότητα διαλύτη ώστε να διαλυθεί μια μεγαλύτερη ποσότητα υλικού. Η μέθοδος αυτή διαθέτει αρκετά πλεονεκτήματα. Καταρχάς, η συνεχής επαφή του υλικού με φρέσκο διαλύτη διευκολύνει τη μεταφορά των ουσιών από το στερεό υλικό στον υγρό διαλύτη. Επίσης η θερμοκρασία εκχύλισης παραμένει σχετικά υψηλή, λόγω της επίδρασης της θερμότητας που εφαρμόζεται στην φιάλη απόσταξης. Τέλος δεν υπάρχει ανάγκη διήθησης μετά την έκπλυση, και γενικά αποτελεί μια απλή και φτηνή μέθοδο με μεγαλύτερες αποδόσεις εκχύλισης σε σχέση με τις εναλλακτικές μεθόδους.

Τα κύρια μειονεκτήματα που παρουσιάζει η μέθοδος είναι ο μεγάλος χρόνος εκχύλισης (περίπου 6 h) και η μεγάλη ποσότητα διαλύτη που απαιτείται. Ακόμα δεν υπάρχει δυνατότητα ανάδευσης για την επιτάχυνση της διαδικασίας, καθώς και η πιθανότητα της θερμικής αποσύνθεσης των ουσιών δεν είναι αμελητέα, εφόσον η διαδικασία πραγματοποιείται στο σημείο βρασμού του διαλύτη για μεγάλο χρονικό διάστημα (Oreopoulou et al., 2019).

3.5.1.2. Υδροαπόσταξη

Η υδροαπόσταξη (hydrodistillation) αποτελεί μία παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης αιθέριων ελαίων, στην οποία δεν χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, καθώς και μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν την αφυδάτωση των φυτικών πρώτων υλών. Η υδροαπόσταξη αποτελείται από τρεις φυσικοχημικές διεργασίες, οι οποίες είναι: η υδροδιάχυση, η υδρόλυση, και θερμική αποσύνθεση. Αρχικά οι φυτικές πρώτες ύλες τοποθετούνται σε έναν θάλαμο όπου προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού, και έπειτα το μείγμα βράζει. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται ρεύμα ατμού, το οποίο έρχεται σε επαφή με τις πρώτες ύλες. Το θερμό νερό και ο ατμός είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση των βιοδραστικών ουσιών από τους φυτικούς ιστούς. Η έμμεση ψύξη με νερό συμπυκνώνει το ατμώδες μείγμα σε νερό και έλαιο. Τέλος το συμπυκνωμένο μείγμα ρέει από τον συμπυκνωτήρα σε έναν διαχωριστή, όπου το έλαιο με τις βιοδραστικές ενώσεις διαχωρίζεται αυτόματα από το νερό. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η πιθανή απομάκρυνση πτητικών και θερμοευαίσθητων βιοδραστικών ουσιών κατά την διάρκεια της εκχύλισης, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν (Oreopoulou et al., 2019).

3.5.1.3. Διαβροχή

Η μέθοδος της διαβροχής (maceration) είναι μία φτηνή και απλή μέθοδος για να εκχυλιστούν φαινολικές ενώσεις. Σε αυτήν την διεργασία η φυτική πρώτη ύλη τοποθετείται σε ένα κλειστό δοχείο μαζί με τον διαλύτη. Η άλεση της πρώτης ύλης χρησιμοποιείται για την αύξηση της επιφάνειας ώστε να πραγματοποιηθεί καλύτερη ανάμειξη με τον διαλύτη. Το σύστημα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για αρκετές ώρες ή και μέρες, με περιστασιακή ανάδευση. Το μείγμα που προκύπτει στραγγίζεται, διηθίζεται, και συμπυκνώνεται με εξάτμιση του διαλύτη (Oreopoulou et al., 2019).

3.5.1.4. Εκχύλιση Αναδεδυμένου Διαλύτη

Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τέσσερα βήματα μεταφοράς μάζας, και συνήθως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες. Κατά το πρώτο βήμα τα κύτταρα του φυτού διογκώνονται λόγω της προσρόφησης του διαλύτη από την στερεά φάση. Η προσρόφηση οφείλεται σε οσμωτικές δυνάμεις, τριχοειδή φαινόμενα και στη διάλυση ιόντων στα κύτταρα. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει την διάλυση των ουσιών στον διαλύτη. Ακολουθεί το βήμα της διάχυσης των ουσιών από την στερεή φάση, το οποίο είναι το καθοριστικό βήμα από το οποίο εξαρτάται ο ρυθμός της εκχύλισης. Ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης στο βήμα αυτό μπορεί να εκφραστεί από τον δεύτερο νόμο του Fick. Το τελευταίο βήμα αποτελείται από την διάχυση από τα εξωτερικά στρώματα των στερεών (Oreoroulou et al., 2019).

3.5.2. Σύσταση και Ιδιότητες Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρασκευάζεται με εκχύλιση των ξηρών φύλλων και ανθών του φυτού *Origanum vulgare*, κοινώς γνωστό και ως ρίγανη. Οι κύριες ενώσεις που περιέχει το αιθέριο έλαιο του μεσογειακού αυτού φυτού είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη, δύο ισομερή φαινολικά μονοτερπένια που αποτελούν περίπου το 78 – 82 % του ελαίου. Επίσης το αιθέριο έλαιο ρίγανης περιέχει μικρές αλλά υπολογίσιμες ποσότητες μονοτερπινικών υδρογονανθράκων, με κυριότερους εκπροσώπους το α -κυμένιο και το γ -τερπινένιο που αποτελούν περίπου το 5 – 7 % του ελαίου. Τέλος το αιθέριο έλαιο περιέχει ακόμη και ίχνη μονοτερπινικών αλκοολών, σεσκουιτερπενικών υδρογονανθράκων και οξυγονωμένων σεσκουιτερπενίων (Botsoglou, Grigoriopoulou, Botsoglou, Gouvaris, & Parageorgiou, 2003; Tsimogiannis & Oreoroulou, 2018).

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε μονοτερπινικές ενώσεις, παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή δράση. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του λιπόφιλου χαρακτήρα των μονοτερπινικών ενώσεων, που έχει ως αποτέλεσμα την επίδρασή τους στην μικροβιακή κυτταρική μεμβράνη, κάνοντας της διαπερατή σε πρωτόνια και μεγαλύτερα ιόντα. Όταν διαταραχθεί η ακεραιότητα της μεμβράνης, οι ιδιότητες της σχετικά με την προστασία του κυττάρου καθώς και με την μεταφορά ουσιών, ενζύμων και ενέργειας χάνονται, γεγονός καταστροφικό για τους μικροοργανισμούς (Liolios et al., 2009).

Η καρβακρόλη είναι η κύρια ουσία που χαρακτηρίζει το αιθέριο έλαιο ρίγανης. Όντας ασφαλές πρόσθετο τροφίμων, χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα λόγω της αντιμικροβιακής της δράσης. Επίσης χρησιμοποιείται και ως παράγοντας γεύσης και αρώματος. Εκτός από αντιμικροβιακή δράση, παρουσιάζει και φαρμακολογικές ιδιότητες έχοντας αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιοξειδωτική δράση. Επίσης η καρβακρόλη συμβάλει στον έλεγχο του πόνου που προκαλείται από τον καρκίνο, ενεργοποιώντας τις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την μείωση του (Guimarães et al., 2015; Liolios et al., 2009).

3.5.3. Ενθυλάκωση Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης

Δυστυχώς οι περισσότερες ενώσεις που απαρτίζουν τα αιθέρια έλαια, και κατ' επέκταση και το αιθέριο έλαιο ρίγανης, είναι πτητικές και εξατμίζονται ή και αποσυντίθενται κατά την διάρκεια της επεξεργασίας του ελαίου, είτε πρόκειται για φαρμακευτικά σκευάσματα, είτε για προϊόντα τροφίμων, λόγω της άμεσης έκθεσης σε φως, πίεση, οξυγόνο και υγρασία (Hosseini et al., 2013).

Προκειμένου να ξεπεραστεί η ευαισθησία και να αυξηθεί η σταθερότητα αυτών των βιοδραστικών ουσιών κατά την διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, η τεχνολογία της

ενθυλάκωσης αποτελεί μία πολύ καλή λύση. Μία μέθοδος ενθυλάκωσης που έχει χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό του αιθέριου ελαίου ρίγανης είναι αυτή της παγίδευσης σε λιποσώματα. Με την μέθοδο αυτή οι ευαίσθητες ουσίες του ελαίου προστατεύονται από αλλοιογόνους παράγοντες, ενώ παράλληλα είναι εφικτή η ενσωμάτωση τους σε κάποιο προϊόν, προστατεύοντάς το από την ανάπτυξη μικροοργανισμών και προσδίδοντάς του γεύση και άρωμα (Liolios et al., 2009).

3.5.4. Κύτταρα Ζύμης ως Φορέας Ενθυλάκωσης

Βρέθηκε ότι η χρήση μικροοργανισμών ως φορείς ενθυλάκωσης είναι εφικτή, όταν παρατηρήθηκε πως τα κύτταρα μαγιάς (*Saccharomyces cerevisiae*) μπορούν να απορροφήσουν υδατοδιαλυτούς αρωματικούς παράγοντες, όπως προέκυψε από μια επεξεργασία με έναν πλασμολύτη. Η ενθυλάκωση λιποδιαλυτών ουσιών επιτεύχθηκε αργότερα σε κύτταρα ζυμών, τα οποία είχαν αρκετά υψηλή συγκέντρωση σε λιπίδια (>40% w/w). Έτσι διαπιστώθηκε πως συστατικά όπως τα αιθέρια έλαια, οι βιταμίνες και οι χρωστικές, μπορούν να γαλακτωματοποιηθούν με τα λιπίδια των ζυμών, είτε αυτές είναι ζωντανές είτε όχι (Bishop, Nelson, & Lamb, 1998).

Το παχύ κυτταρικό τοίχωμα (100 – 200 nm) του *Saccharomyces cerevisiae* το οποίο αποτελείται από β-γλυκάνες, μανοπρωτεΐνες, και μικρές ποσότητες χιτίνης, είναι διαπερατό και από υδρόφιλες και από υδρόφοβες ενώσεις. Οι β-γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες περίπλοκης δομής και υψηλού μοριακού βάρους (100 – 200 kDa), οι οποίες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην βιομηχανία τροφίμων, εφόσον μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηκτικά μέσα, υποκατάστατα λιπαρών και γαλακτοματοποιητές. Η παραγωγή β-γλυκάνων από την βιομηχανία έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν μεγάλες ποσότητες υπολειμματικών κυττάρων ζύμης ως δευτερογενές προϊόν. Παρόλο που οι β-γλυκάνες σχηματίζουν το κυτταρικό τοίχωμα του μικροοργανισμού, η λιπιδική διπλοστοιβάδα παραμένει άθικτη ακόμα και μετά την εκχύλιση. Αυτό το δευτερογενές προϊόν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φορέας ενθυλάκωσης (Sultana et al., 2017).

Η λιπιδική μεμβράνη της λιπιδικής στοιβάδας λειτουργεί ως λιπόσωμα κατά την διάρκεια της ενθυλάκωσης, με αποτέλεσμα τα σταγονίδια ελαίου να παγιδεύονται εντός του κυττάρου. Το παχύ και μηχανικά ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να αποτρέψει την ρήξη του κυττάρου κατά την πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων ωφέλιμων φορτίων. Λόγω της άκαμπτης δομής και της σταθερής συμπεριφοράς που παρουσιάζουν τα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*, μπορούν να θεωρηθούν καλύτεροι φορείς ενθυλάκωσης έναντι των λιποσωμάτων. Τέλος η απελευθέρωση της εσωτερικής φάσης από τα κύτταρα μπορεί να ελεγχθεί από την θερμοκρασία και την ενεργότητα νερού (Czerniak et al., 2015; Sultana et al., 2017).

3.5.5. Μηχανισμός Ενθυλάκωσης Αιθέριων Ελαίων σε Ζύμες

Ο μηχανισμός πρόσληψης των λιπόφιλων ουσιών των αιθέριων ελαίων είναι παθητικός. Γενικά η διεργασία αποτελείται από την διάχυση του ενεργού συστατικού μέσα στο κυτταρόπλασμα, και έπειτα από την συγκράτησή του από τις ενδοκυτταρικές δομές ή από τον σχηματισμό ενδοκυτταρικών σταγονιδίων. Ταυτοχρόνως τα υδατοδιαλυτά ενδοκυτταρικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και αμινοξέα διαχέονται προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή προς το εξωτερικό του κυττάρου. Έτσι η απομάκρυνση του ενδοκυτταρικού υλικού πριν την ολοκλήρωση της διαδικασίας του εγκλεισμού, αυξάνει την χωρητικότητα του κυττάρου, αυξάνοντας έτσι και την απόδοση της διεργασίας. Ακόμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τεχνικές εκκένωσης του κυττάρου όπως η αυτόλυση, η πλασμόλυση, ή η υδρόλυση με εξωγενή ένζυμα. Για την

ολοκλήρωση της διεργασίας συνήθως χρησιμοποιείται ξήρανση με ψεκασμό και λυοφιλίωση (Czerniak et al., 2015).

3.5.6. Επίδραση Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στην Ενθυλάκωση Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης σε Κύτταρα Μαγιάς

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, η μαγιά βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία ως παραπροϊόν της βιομηχανίας, αλλά και σαν οικονομική πρώτη ύλη γενικότερα. Επίσης, λόγω της ασφάλειας που παρουσιάζει ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό, και σε συνδυασμό με την ικανότητα διάχυσης λιπόφιλων ουσιών εντός των κυττάρων, η μαγιά αποτελεί ιδανικό φορέα ενθυλάκωσης για αιθέρια έλαια. Με την ενθυλάκωση των αιθέριων ελαίων επιτυγχάνεται η προστασία των ουσιών τους από διάφορους παράγοντες όπως το οξυγόνο και το φως, καθώς και διευκολύνεται ο χειρισμός τους (διαχείριση στερεών καψουλών έναντι υγρών ελαίων).

Η χρήση μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης, εφόσον αυξάνουν την διαπερατότητα των κυττάρων με στόχο την παραλαβή των ενδοκυτταρικών προϊόντων της μαγιάς, θα μπορούσε να επιφέρει την επιτάχυνση του φαινομένου, με τον εγκλεισμό του ελαίου να ολοκληρώνεται σε μικρότερα χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν οι διεργασίες της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, της αυτόλυσης και των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Η διεργασία της ομογενοποίησης επιλέχθηκε με στόσο την μελέτη της ενθυλάκωσης αιθέριου ελαίου ρίγανης σε πλήρες διαρρηγμένο κυτταρικό υλικό, λόγω της καταστροφής της δομής του κυτταρικού τοιχώματος της μαγιάς που μπορεί να προκληθεί με την διεργασία αυτή. Η αυτόλυση επιλέχθηκε ως προκατεργασία των κυττάρων μαγιάς για την ταχύτερη ενθυλάκωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, εφόσον κατά το πέρας της διεργασίας, επιτυγχάνεται η αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού περιβλήματος, με την υποβάθμιση του κυτταρικού τοιχώματος και την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, σε συνδυασμό με την διατήρηση της σταθερότητας του τοιχώματος και την απόρριψη ενδοκυτταρικού περιεχομένου. Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιλέχθηκε λόγω της δημιουργίας πόρων που επιφέρει στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων της μαγιάς και της απελευθέρωσης ενδοκυτταρικού περιεχομένου, σε συνδυασμό με την διατήρηση της σταθερότητας του τοιχώματος. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες σχετικά με την επίδραση της επεξεργασίας παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, στην ενθυλάκωση σε κύτταρα μαγιάς. Επίσης, εφόσον τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία αποτελούν μια μη θερμική διεργασία, θα ήταν εύλογη η σύγκριση των αποτελεσμάτων της διεργασίας αυτής με την αυτόλυση, με στόχο την αποφυγή της πολύωρης έκθεσης των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες.

3.5.7. Στόχος Διπλωματικής Εργασίας

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της κινητικής του εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κύτταρα μαγιάς συναρτήσει του χρόνου και της θερμοκρασίας για τις διάφορες συνθήκες προκατεργασίας των κυττάρων. Αντικείμενο της μελέτης αποτελεί επίσης η μελέτη της αποδοτικότητας του εγκλεισμού, της απελευθέρωσης του ελαίου από τις μικροκάψουλες συναρτήσει της ενεργότητας νερού, καθώς και της σύστασης του ενθυλακωμένου ελαίου. Τέλος τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για μελλοντικές μελέτες, για την ενσωμάτωση των καψουλών σε κάποιο σύστημα μοντέλο, και στην συνέχεια σε κάποιο τρόφιμο με στόχο την προστασία του από μικροοργανισμούς λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της καρβακρόλης και της θυμόλης, καθώς και την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του λόγω του έντονου αρώματος ρίγανης που χαρακτηρίζει το έλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ενθυλάκωση αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κύτταρα μαγιάς (*Saccharomyces cerevisiae*). Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε ο μηχανισμός και ο ρυθμός ενθυλάκωσης του ελαίου στα κύτταρα, σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 30 έως 65°C. Ακόμα, εκτός από την επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινόμενο αυτό, μελετήθηκε και η επίδραση διάφορων διεργασιών κυτταρικής διάρρηξης στα κύτταρα της μαγιάς, οι οποίες εφαρμόστηκαν ως προκατεργασία, πριν τον εγκλεισμό. Συγκεκριμένα, οι διεργασίες που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα, με σκοπό τα καταστήσουν πιο διαπερατά στις ουσίες του ελαίου περιλαμβάνουν: την αυτόλυση, την ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, και την επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.

Οι κυριότερες ενώσεις του ελαίου ρίγανης, στις οποίες επικεντρώθηκε αυτή η εργασία είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη. Οι δύο αυτές ενώσεις αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του ελαίου, παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και χαρακτηρίζονται από έντονο άρωμα ρίγανης. Ακόμα άλλες δύο ενώσεις που παρουσιάζονται σε μικρά αλλά όχι αμελητέα ποσότητα, όσον αφορά την σύσταση του ελαίου, είναι το γ-τερπινένιο και το ρ-κυμένιο.

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

4.2. Παρασκευή Αιωρήματος Μαγιάς 10 % W/W

Για την διεξαγωγή της μελέτης, παρασκευάστηκε αιώρημα μαγιάς 10 % W/W, με την διαδικασία που θα αναλυθεί παρακάτω. Να σημειωθεί πως για την παρασκευή του αιωρήματος που προορίστηκε για αυτόλυση, χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα σκεύη και αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, υπό στείρες συνθήκες, εντός θαλάμου στρωτής ροής. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ξηρή μαγιά αρτοποιίας (*S. cerevisiae*, Angel Yeast Co. Ltd., Hubei, China, Lot no. 201503 CG).

Σε απιονισμένο νερό θερμοκρασίας δωματίου, εντός κωνικής φιάλης του 1 L, προστέθηκε σταδιακά και υπό συνεχή ανάδευση ξηρή μαγιά αρτοποιίας, σε σταθμική αναλογία $\frac{\text{ξηρή μαγιά}}{\text{απιονισμένο νερό}} = \frac{1}{9}$. Με αυτόν τον τρόπο παρασκευάστηκε το αιώρημα μαγιάς 10 % W/W, το οποίο αφέθηκε υπό έντονη ανάδευση για 20 min, χωρίς πωματισμό του στομίου της κωνικής φιάλης, ώστε τα κύτταρα να ενυδατωθούν πλήρως.

4.3. Επεξεργασία Αιωρήματος

Ένα μέρος του αιωρήματος μαγιάς δεν υπέστη επεξεργασία. Σε ένα άλλο μέρος ωστόσο, εφαρμόστηκαν μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης, με στόχο την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων και κατ' επέκταση του ρυθμού του εγκλεισμού. Όπως προαναφέρθηκε, οι διεργασίες που εφαρμόστηκαν είναι: η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης η αυτόλυση και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.

4.3.1. Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης

Μια ποσότητα αιωρήματος μαγιάς 10 % W/W υπέστη επεξεργασία σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (Invensys APV-1000, London, UK) στα 800 bar. Το αιώρημα μαγιάς διήλθε 4 φορές από τον ομογενοποιητή, με στόχο την μέγιστη διάρρηξη των κυττάρων. Το επεξεργασμένο δείγμα ψύχθηκε στην έξοδο του ομογενοποιητή, με την χρήση μίας σπείρας από ανοξείδωτο χάλυβα, βυθισμένης εντός ενός λουτρού νερού-πάγου. Από προηγούμενα πειράματα που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, βρέθηκε ότι επεξεργασία των κυττάρων στις συνθήκες αυτές επιφέρει το μέγιστο βαθμό κυτταρικής διάρρηξης.



Εικόνα 4.1. Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης SPX APV 1000

4.3.2. Αυτόλυση

Μία ποσότητα αιωρήματος μαγιάς 10 % W/W υποβλήθηκε σε αυτόλυση. Εντός θαλάμου στρωτής ροής, ποσότητα αιωρήματος μεταγγίστηκε σε αποστειρωμένα κυλινδρικά, γυάλινα δοχεία, διαμέτρου 6.5 cm και ύψους 12 cm. Σε κάθε δοχείο μεταγγίστηκαν 150 mL αιωρήματος και το pH ρυθμίστηκε στο 5.5 με τη χρήση 0.1 M οξικού οξέος. Τα δοχεία πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε ένα υδατόλουτρο με ανάδευση (Grant GLS400, Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK) στους 52°C, υπό ήπια και σταθερή ανάδευση 170 rpm. Μελετήθηκαν δύο διαφορετικοί χρόνοι αυτόλυσης του αιωρήματος: 8 και 24 h.

4.3.3. Επεξεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία

Μία ποσότητα αιωρήματος μαγιάς 10 % W/W επεξεργάστηκε με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Οι επεξεργασίες διεξήχθησαν με την χρήση εντός θαλάμου παράλληλων ηλεκτροδίων, ο οποίος τοποθετήθηκε εντός του θαλάμου επεξεργασίας. Τα ηλεκτρόδια του θαλάμου είχαν σχήμα πλάκας, με επιφάνεια 2 cm², ενώ η μεταξύ του απόσταση ήταν 0.4 cm. Το αιώρημα αντλήθηκε διαμέσου του θαλάμου επεξεργασίας με σταθερό ρυθμό ροής 120 mL/min, με την χρήση μιας περισταλτικής αντλίας, η οποία συνδέθηκε με τον θάλαμο ηλεκτροδίων. Στο αιώρημα, εντός του θαλάμου επεξεργασίας, εφαρμόστηκαν ορθογώνιοι παλμοί σταθερού εύρους 15 μs με την χρήση του συστήματος ELCRACK® HVP-5 PEF (DIL, Quackenbrück, Germany).



Εικόνα 4.2. Μονάδα παλμικών ηλεκτρικών πεδίων Elcrack-5kW, DIL

Το σχήμα των παλμών, η τάση και η ένταση του ρεύματος παρακολουθούνταν διαρκώς κατά την διάρκεια των επεξεργασιών, με την χρήση ενός παλμογράφου (Tektronix TDS 1012, Beaverton, OR, USA). Ο αριθμός των παλμών που δέχτηκαν τα δείγματα εντός του θαλάμου επεξεργασίας, υπολογίστηκε με την ρύθμιση της συχνότητας των παλμών. Η θερμοκρασία εισόδου όλων των δειγμάτων ήταν 25°C , ενώ η θερμοκρασία εξόδου τους, στο σημείο συλλογής δεν ξεπέρασε τους 40°C. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν τρεις συνθήκες επεξεργασίας, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Συνθήκες επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Κωδικοποίηση Επεξεργασίας	Ένταση Ηλεκτρικού Πεδίου (kV/cm)	Συχνότητα Παλμών (Hz)	Ειδική Ενέργεια (kJ/kg)
PEF1	8.5	10	3.2
PEF2	17	10	13.6
PEF3	13	100	107.0

Η ειδική ενέργεια κάθε επεξεργασίας υπολογίστηκε με την χρήση της σχέσης:

$$W' = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} I_{(t)} V_{(t)} dt \quad (4.1.)$$

όπου I η ένταση του ρεύματος σε A, V η εφαρμοζόμενη τάση σε V, t η διάρκεια του παλμού σε s και m η μάζα του επεξεργαζόμενου δείγματος σε kg. Η ολική ειδική ενέργεια (W) προέκυψε από τον πολλαπλασιασμό της ενέργειας ανά παλμό (W') με τον αριθμό των παλμών (Raso, Alvarez, Condón, & Sala Trepat, 2000).

4.4. Παραλαβή Ξηρού Κυτταρικού Υλικού

Το αιώρημα των ανεπεξέργαστων και των επεξεργασμένων κυττάρων, προκειμένου να διαχωριστεί, φυγοκεντρήθηκε για 10 min στα 6500·g. Για την φυγοκέντρωση χρησιμοποιήθηκε μία φυγόκεντρος Thermo Scientific™ Heareus™ Megafuge™ 16R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States of America). Μετά την φυγοκέντρωση των αιωρημάτων, το

υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα συλλέχθηκε σε πλαστικά τρυβλία petri, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη, σε θερμοκρασία -20°C .



Εικόνα 4.3. Φυγόκεντρος Thermo Scientific™ Heareus™ Megafuge™ 16R

Τα παγωμένα δείγματα ξηράθηκαν με την μέθοδο της λυοφιλίωσης στους -52°C , σε πίεση 0.080 mbar για 48 h, με την χρήση ενός freeze dryer (Christ Alpha 1-4 LD, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany). Στον Πίνακα 4.2. αναγράφονται οι κωδικοποιήσεις κάθε κυτταρικού υλικού ανάλογα με την επεξεργασία που υπέστησαν.

Πίνακας 4.2. Κωδικοποίηση κυττάρων

Κωδικοποίηση	
UC	Ανεπεξεργαστα κύτταρα
HC	Ομογενοποιημένα κύτταρα (800 bar, 4 διελεύσεις)
AC8	Αυτολυμένα κύτταρα (8 h, 52°C)
AC24	Αυτολυμένα κύτταρα (24 h, 52°C)
PEF1	Επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (ήπια συνθήκη ειδικής ενέργειας 3.2 kJ/kg)
PEF2	Επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (μέτρια συνθήκη ειδικής ενέργειας 13.6 kJ/kg)
PEF3	Επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (έντονη συνθήκη ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg)

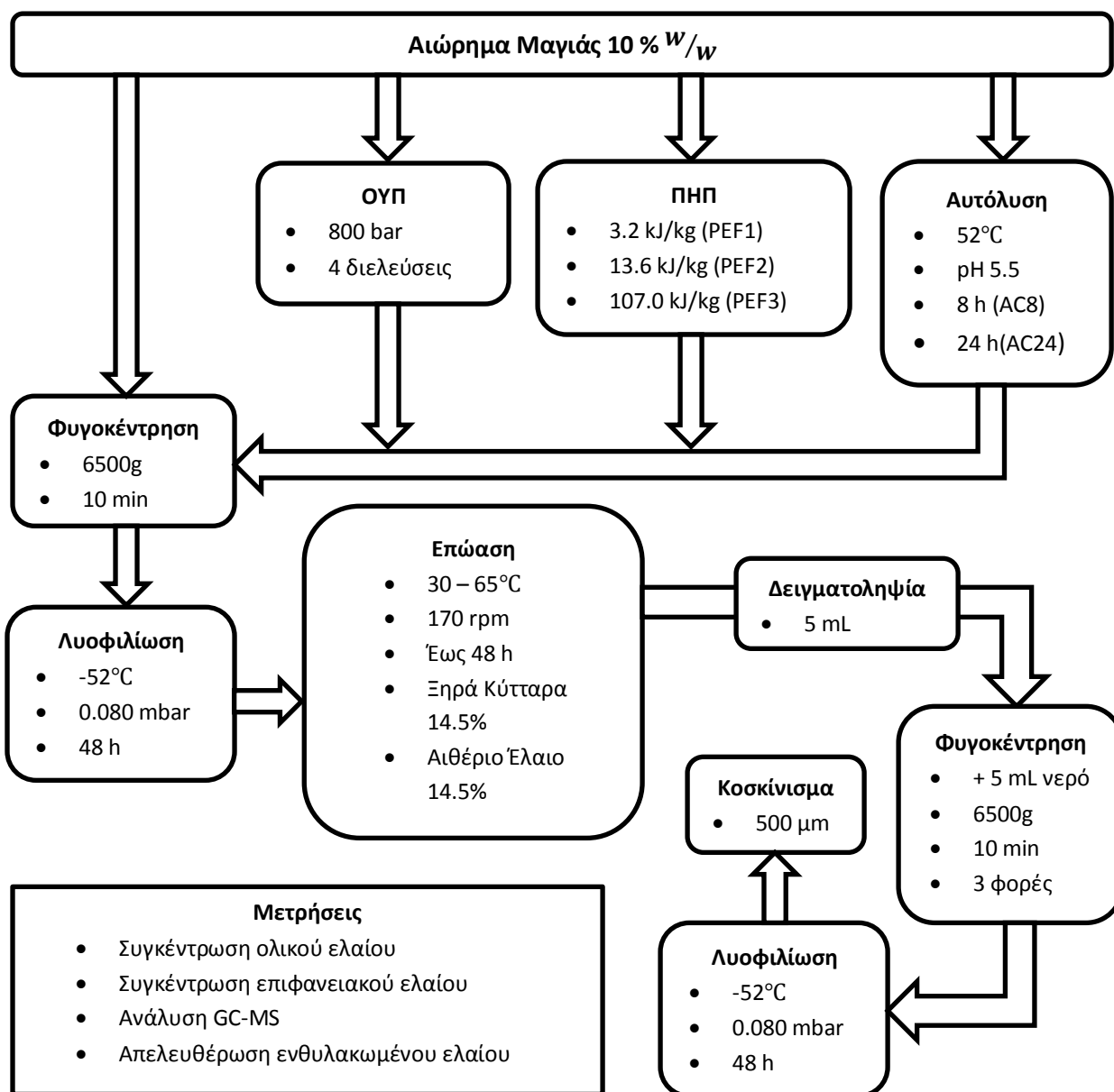
4.5. Παρασκευή Μικροκαψουλών Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης

Για την παρασκευή των μικροκαψουλών, χρησιμοποιήθηκε αιθέριο έλαιο ρίγανης (Natural Food Additives, Ταύρος, Αθήνα). Ξηρό κυτταρικό υλικό από κάθε επεξεργασία (UC, HC, AC8, AC24, PEF1, PEF2, PEF3), επώαστηκε μαζί με το αιθέριο έλαιο, νερό και αιθανόλη σε κατά βάρος αναλογία 14.5 % κυτταρικού υλικού, 14.5 % ελαίου, 63.8 % νερού και 7.2 % αιθανόλης. Οι αναλογίες αυτές προέκυψαν από μία τροποποίηση ενός πρωτοκόλλου της βιβλιογραφίας (Czerniak et al., 2015). Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε κυλινδρικά, γυάλινα, πωματισμένα δοχεία, διαμέτρου 5 cm και ύψους 8.5 cm.

Αρχικά, τοποθετήθηκαν 50 g μείγματος προς επώαση, σε κάθε δοχείο. Τα δοχεία πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν εντός του υδατόλουτρου με ανάδευση (Grant GLS400, Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK). Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ήταν 30°C , 37°C , 45°C και

65°C, ενώ η ανάδευση παρέμεινε σταθερή στα 170 rpm καθ' όλη την διάρκεια της επώασης. Ανά τακτικά χρονικά διαστήματα από τα επωαζόμενα δείγματα, λήφθηκαν δείγματα των 5 mL, τα οποία μεταγγίστηκαν σε πλαστικά κωνικά σωληνάρια Falcon® και αναμίχθηκαν με 5 mL απιονισμένου νερού. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 6500·g, για 10 min με την χρήση της φυγοκέντρου Thermo Scientific™ Heareus™ Megafuge™ 16R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States of America). Τα υπερκείμενα υγρά απορρίφθηκαν, ενώ τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν με 5 mL απιονισμένου νερού, ώστε να απομακρυνθεί το έλαιο που δεν ενθυλακώθηκε και φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα. Οι εκπλυμένες κάψουλες αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20°C έως ότου ξηραθούν με λυοφιλίωση στους -52°C, σε πίεση 0.080 mbar για 48 h, με την χρήση του freeze dryer (Christ Alpha 1-4 LD, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany).

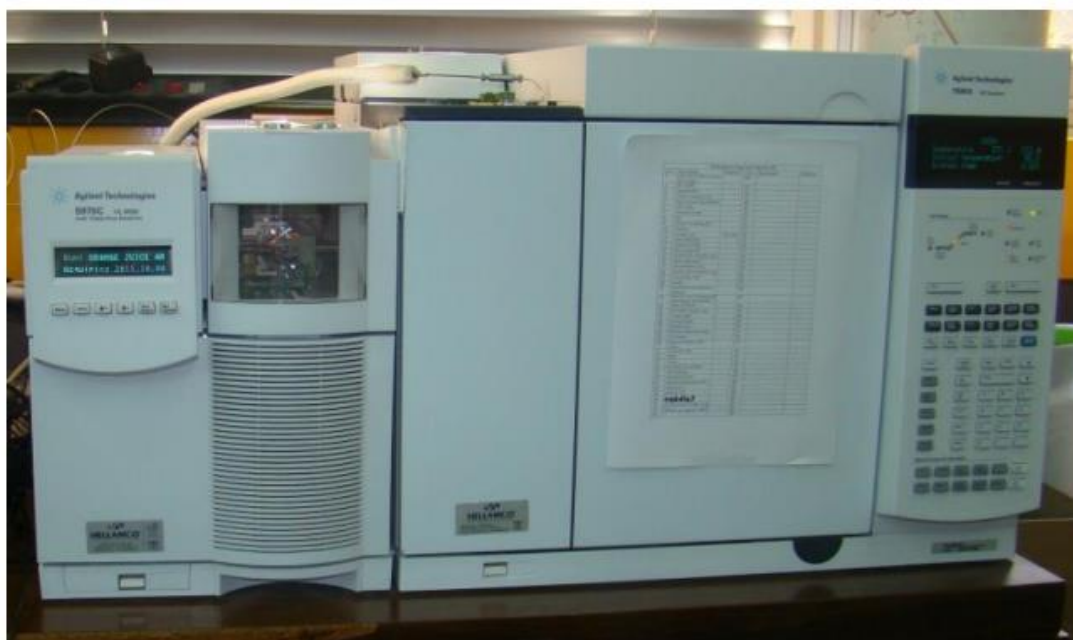
Το ξηρό υλικό καψουλών που λήφθηκε μετά την διεργασία της λυοφιλίωσης κοσκινίστηκε, ώστε η κοκκομετρία του υλικού να είναι ομοιόμορφη. Το κοσκίνισμα πραγματοποιήθηκε με ήπιο θρυμματισμό δια χειρός και με την χρήση κόσκινου των 500 μm.



Εικόνα 4.4. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

4.6. GC – MS Ανάλυση του Ελαίου Ρίγανης

Βάσει της βιβλιογραφίας, το έλαιο ρίγανης αποτελείται κατά κύριο λόγο από καρβακρόλη και θυμόλη, δυο ισομερή φαινολικά μονοτερπένια με αντιμικροβιακές ιδιότητες, σε κατά βάρος ποσοστό 78 – 82 %, σε μικρότερο ποσοστό περίπου 5 – 7 % από γ-τερπινένιο και ρ-κυμένιο, καθώς περιέχει και ίχνη μονοτερπινικών αλκοολών, σεσκουιτερπενικών υδρογονανθράκων και οξυγονωμένων σεσκουιτερπενίων (Botsoglou et al., 2003; Tsimogiannis & Oreopoulou, 2018). Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην καρβακρόλη και στην θυμόλη.

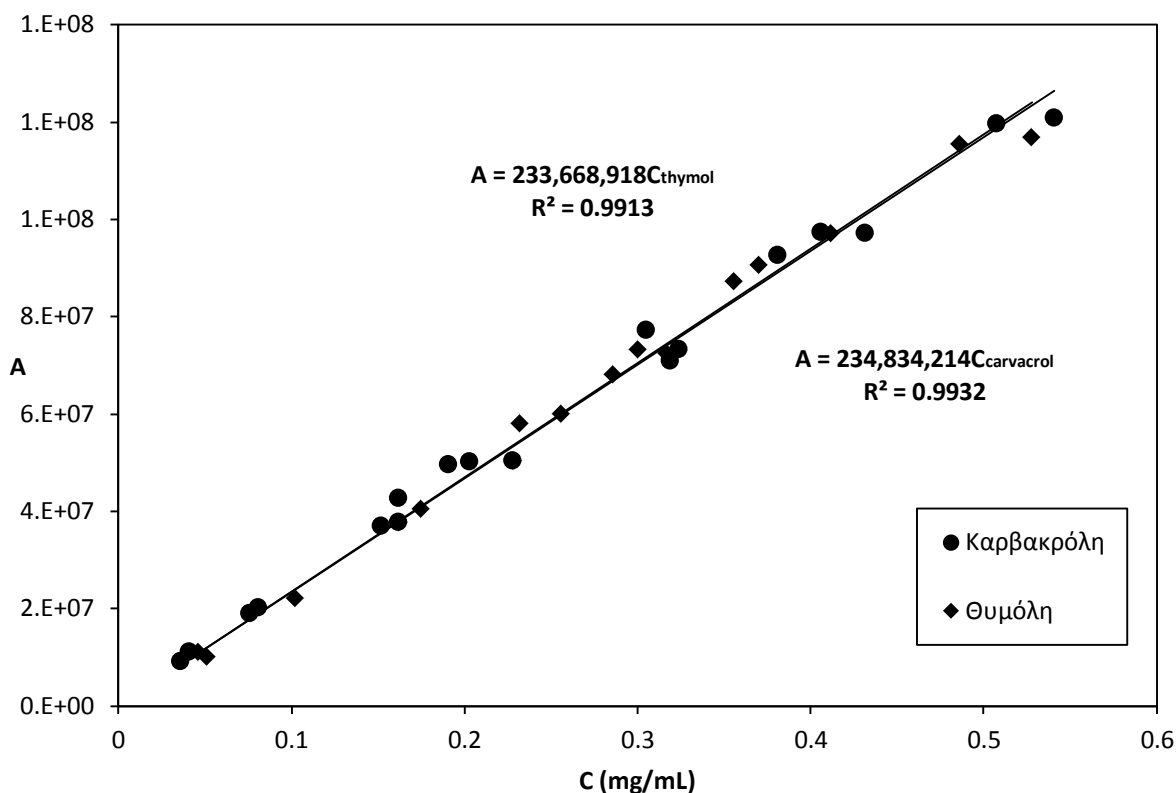


Εικόνα 4.5. Σύστημα αέριας χρωματογραφίας GC HP 6890 (δεξιά) και ανιχνευτής μάζας HP 5973 (αριστερά)

Για την ανάλυση του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας HP 6890, συζευγμένο με έναν εκλεκτικό ανιχνευτή μάζας HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Τα συστατικά των δειγμάτων αυτών, διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας την στήλη MS HP-5 (30 m x 320 μm x 0.25 μm, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Η θερμοκρασία του κλιβάνου ξεκίνησε από τους 50°C και αυξήθηκε στους 100°C με ρυθμό 10°C/min, και στην συνέχεια στους 220°C με ρυθμό 15°C/min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο, με μέση ταχύτητα ροής 1 mL/min. Κάθε ανάλυση διήρκεσε 15 min, και σαρώθηκε το εύρος m/z 40 – 400, ενώ η ταυτοποίηση των ουσιών βασίστηκε στην σύγκριση με τα δεδομένα των βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας NIST και Wiley.

4.6.1. Προσδιορισμός Σύστασης Ελαίου σε Καρβακρόλη και Θυμόλη

Για τον κατά βάρος προσδιορισμό της σύστασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε καρβακρόλη και θυμόλη, ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη καμπυλών αναφοράς για τις ουσίες αυτές. Παρασκευάστηκαν πρότυπα αιθανολικά διαλύματα για καθεμιά από τις ουσίες, τα οποία κάλυπταν ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.040 – 0.550 mg/mL. 1 μL από κάθε δείγμα χορηγήθηκε στο όργανο, με την χρήση σύριγγας των 5 μL. Για κάθε μια συγκέντρωση προέκυψε μία τιμή εμβαδού κορυφής απόκρισης (A), από το εκάστοτε χρωματογράφημα. Στο Διάγραμμα 4.1. παρατίθενται μαζί με τις προκύπτουσες εξισώσεις αναφοράς οι καμπύλες αναφοράς των δύο ουσιών.



Διάγραμμα 4.1. Καμπύλες αναφοράς καρβακρόλης και θυμόλης για την μέθοδο GC – MS

Όπως προέκυψε, οι δύο καμπύλες ταυτίζονται, πράγμα αναμενόμενο εφόσον οι ενώσεις αυτές είναι ισομερείς. Βάσει των καμπυλών του Διαγράμματος 4.1. υπολογίστηκε η κατά βάρος περιεκτικότητα του ελαίου σε καρβακρόλη και θυμόλη. Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό αυτόν χορηγήθηκε στο όργανο 1 μL αιθανολικού διαλύματος ελαίου, συγκέντρωσης $0.503 \pm 0.010 \text{ mg/mL}$. Η κατά βάρος σύσταση του ελαίου σε καρβακρόλη και θυμόλη προέκυψε $72.3 \pm 1.6 \%$ και $4.9 \pm 0.2 \%$ αντίστοιχα.

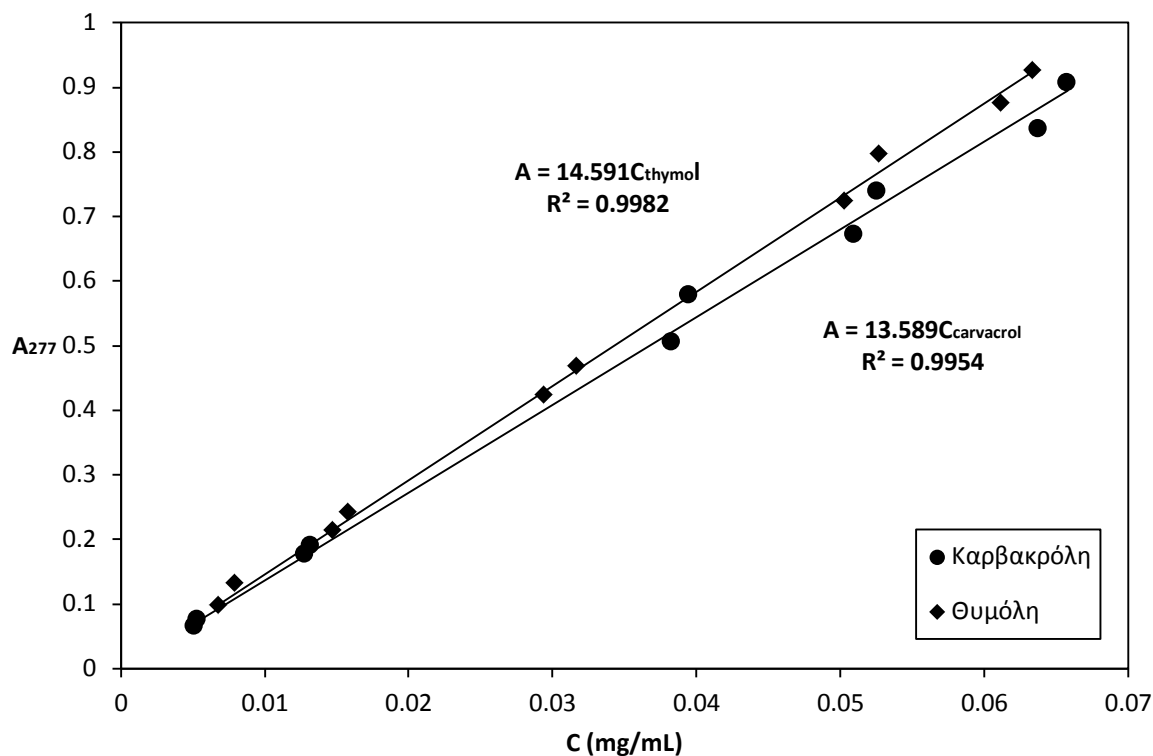
4.7. Μέτρηση Συγκέντρωσης Ενθυλακωμένου Ελαίου

Λόγω του ότι η ενθυλάκωση ελαίων σε κύτταρα μαγιάς είναι μια σχετικά νέα μέθοδος, υπάρχει πολύ μικρός αριθμός άλλων εργασιών στην βιβλιογραφία, οι οποίες να πραγματεύονται την μελέτη αυτού του φαινομένου. Για τον λόγο αυτό, ήταν απαραίτητη η διερεύνηση και η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου για την μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού και του επιφανειακού ελαίου των καψουλών. Η διαδικασία με την οποία δημιουργήθηκαν τα πρωτόκολλα αυτά θα αναλυθεί στην συνέχεια του κεφαλαίου.

4.7.1. Φασματοφωτομετρική Μέθοδος Προσδιορισμού Συγκέντρωσης Ελαίου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ελαίου ρίγανης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Για την χάραξη των καμπυλών αναφοράς της καρβακρόλης και της θυμόλης παρασκευάστηκαν πρότυπα αιθανολικά διαλύματα για καθεμιά από τις ουσίες αυτές, τα οποία κάλυπταν ένα εύρος συγκεντρώσεων από $0.005 - 0.070 \text{ mg/mL}$. Καταγράφοντας το φάσμα των δύο ουσιών με την χρήση μίας κυψελίδας χαλαζία και του φασματοφωτόμετρου HitachiU (UV-Vis

HitachiU 2900), προέκυψε πως και οι δύο παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 277 nm. Να σημειωθεί πως οι απορροφήσεις των αντίστοιχων πρότυπων αιθανολικών δειγμάτων γ-τερπινενίου, ρ-κυμενίου, αλλά και ανεπεξέργαστων κυττάρων στα 277 nm προέκυψαν αμελητέες. Λόγω αυτού, έγινε η παραδοχή πως η απορρόφηση κατά την μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού και του εξωτερικού ελαίου των δειγμάτων των μικροκαψουλών, που θα περιγραφεί παρακάτω, οφείλεται εξ' ολοκλήρου στην καρβακρόλη και στην θυμόλη.



Διάγραμμα 4.2. Καμπύλες αναφοράς καρβακρόλης και θυμόλης για την απορρόφηση στα 277 nm

Όπως προέκυψε, οι δύο καμπύλες αναφοράς έχουν παραπλήσιες κλίσεις, πράγμα που σημαίνει πως απορροφούν με τον ίδιο τρόπο στα 277 nm. Για τον λόγο αυτόν, συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος πως η περιεκτικότητα του ελαίου σε καρβακρόλη είναι αρκετά μεγαλύτερη της περιεκτικότητας σε θυμόλη (βλ. παράγραφο 4.6.1.), όλες συγκεντρώσεις που προέκυψαν από την απορρόφηση στα 277 nm στα πλαίσια της εργασίας αυτής, εκφράστηκαν ως συγκεντρώσεις σε καρβακρόλη. Οι καμπύλες αναφοράς της απορρόφησης των ουσιών αυτών παρατίθενται στο *Διάγραμμα 4.2.* μαζί με τις προκύπτουσες εξισώσεις αναφοράς.



Εικόνα 4.6. Φασματοφωτόμετρο UV-Vis HitachiU 2900

4.7.2. Πειράματα Διερεύνησης της Συμπεριφοράς των Καψουλών

Για την κατανόηση της συμπεριφοράς των καψουλών και κατ' επέκταση την δημιουργία των πρωτοκόλλων μέτρησης, διεξήχθησαν τέσσερα πειράματα. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προέκυψε το *Διάγραμμα 4.3.*

Πείραμα 1

50 mg ξηρών καψουλών δείγματος UC 24 h επώασης και θερμοκρασίας επώασης 65°C, ενυδατώθηκαν με 500 mL απιονισμένου H₂O εντός γυάλινου δοκιμαστικού σωλήνα με πώμα. Οι σωληνίσκοι πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν εντός υδατόλουτρου, θερμοκρασίας 100°C για χρόνους 5, 10 και 15 min. Οι σωληνίσκοι απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και αφέθηκαν να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πτώση της θερμοκρασίας των δειγμάτων, προστέθηκαν 4.5 mL αιθανόλης, και ακολούθησε έντονη ανάδευση με συσκευή Vortex. Πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα των δειγμάτων με την χρήση φίλτρων σύριγγας 0.45 μm, και μέτρηση του εκχυλίσματος με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας σε κυψελίδα χαλαζία, στα 277 nm. Το πείραμα αυτό διεξήχθη με στόχο την πλήρη καταστροφή της δομής του κυτταρικού φορέα των καψουλών, λόγω της έκθεσης του σε υψηλή-καταστρεπτική θερμοκρασία, και την σίγουρη μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού (δηλ. εξωτερικού και ενθυλακωμένου) ελαίου. Να σημειωθεί πως η καρβακρόλη και η θυμόλη, όντας θερμοάντοχες ουσίες με σημεία ζέσης 273.7°C και 232.9°C αντίστοιχα, δεν πραγματοποιήθηκε κάποια θερμοκρασιακή αλλοίωση κατά την διεξαγωγή του πειράματος.

Πείραμα 2

200 mg ξηρών καψουλών δείγματος UC 24 h επώασης και θερμοκρασίας επώασης 65°C, αναμείχθηκαν με 2.5 mL απιονισμένου H₂O εντός γυάλινης κωνικής φιάλης. Στην κωνική φιάλη τοποθετήθηκε ένας κυλινδρικός, μαγνήτης ανάδευσης, και με την βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα το δείγμα ενυδατώθηκε πλήρως. Ενώ δείγμα αναδευόταν συνεχώς με ήπια ανάδευση, μεταγγίστηκαν σε αυτό, 22.5 mL αιθανόλης. Ανά τακτικά χρονικά διαστήματα λήφθηκαν δείγματα με την βοήθεια σύριγγας, τα οποία κατόπιν φιλτραρίστηκαν με την χρήση με την χρήση φίλτρων σύριγγας 0.45 μm. Στην συνέχεια τα διηθήματα φωτομετρήθηκαν στα 277 nm με την χρήση κυψελίδας χαλαζία.

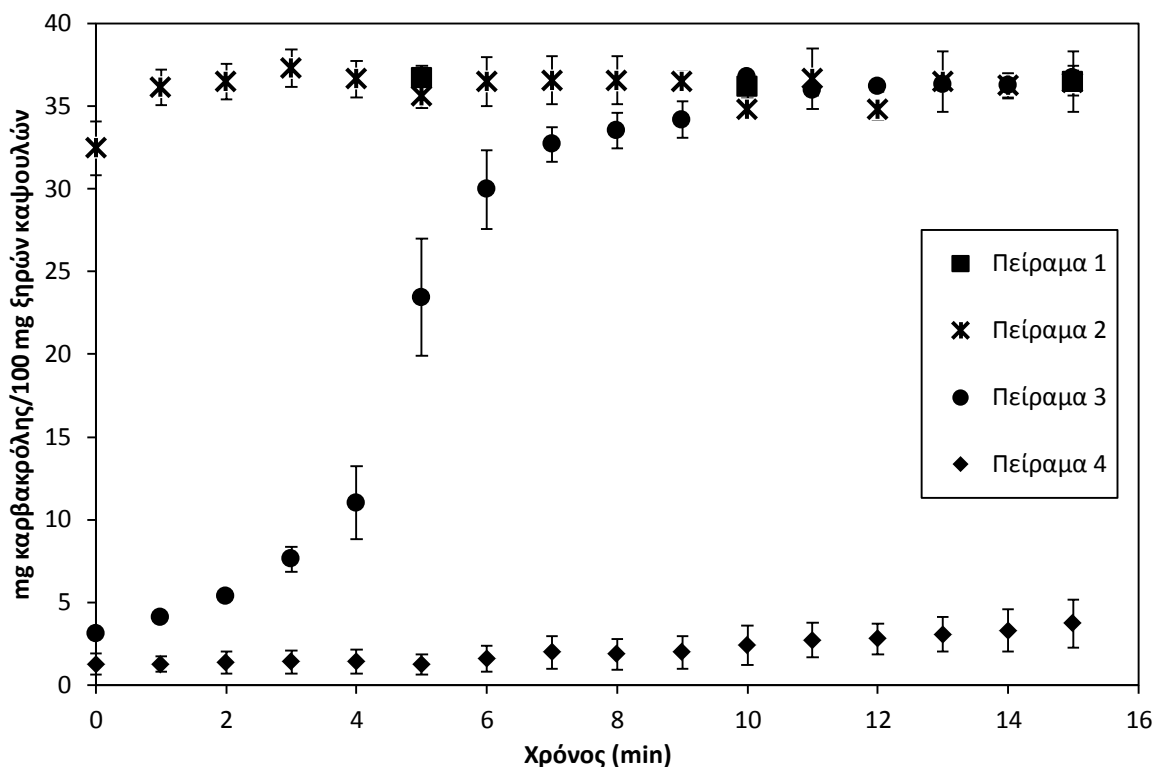
Πείραμα 3

200 mg ξηρών καψουλών δείγματος UC 24 h επώασης και θερμοκρασίας επώασης 65°C, αναμείχθηκαν με 25 mL αιθανόλης εντός γυάλινης κωνικής φιάλης, σε συνθήκες ήπιας ανάδευσης (ίδιες συνθήκες ανάδευσης με αυτές του *Πειράματος 2*) με την χρήση του μαγνητικού αναδευτήρα. Η διαδικασίες της δειγματοληψίας, του φιλτραρίσματος και της μέτρησης με την χρήση φασματοφωτομετρίας ήταν όμοιες με αυτές του *Πειράματος 2*.

Πείραμα 4

Κατά την διεξαγωγή του πειράματος αυτού, ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες με αυτές του *Πειράματος 3*, με μόνη διαφορά την χρήση εξανίου αντί της αιθανόλης.

Από τα αποτελέσματα των τεσσάρων αυτών πειραμάτων, λήφθηκαν σημαντικές πληροφορίες για την συμπεριφορά των μικροκαψουλών. Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων αυτών στο *Διάγραμμα 4.3.*



Διάγραμμα 4.3. Αποτελέσματα πειραμάτων διερεύνησης. **Πείραμα 1:** ενυδάτωση καψουλών, βρασμός στους 100°C, αραιώση με αιθανόλη. **Πείραμα 2:** ενυδάτωση καψουλών και προσθήκη αιθανόλης υπό συνεχή ανάδευση. **Πείραμα 3:** συνεχής ανάδευση καψουλών με αιθανόλη. **Πείραμα 4:** συνεχής ανάδευση καψουλών με εξάνιο

Από το *Διάγραμμα 4.1*, προέκυψε πως για τα *Πειράματα 1* και *2*, οι συγκεντρώσεις του ελαίου ($\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$) προέκυψαν ίδιες, γεγονός που σημαίνει πως μία απλή ενυδάτωση των καψουλών αρκεί για την παραλαβή του ολικού (δηλ. επιφανειακού και ενθυλακωμένου) ελαίου από τις κάψουλες, χωρίς να είναι απαραίτητη η θερμική καταστροφή του κυτταρικού περιβλήματος. Το γεγονός αυτό εικάζεται πως οφείλεται στην σχεδόν ακαριαία εισχώρηση του νερού εντός των καψουλών, με αποτέλεσμα την εξώθηση του λιπόφιλου περιεχομένου στο εξωτερικό περιβάλλον και την εκχύλισή του στην αιθανόλη που προστίθεται μετέπειτα. Το συμπέρασμα αυτό, συμφωνεί με την χρήση του πρωτοκόλλου μέτρησης της ολικής συγκέντρωσης του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε από τους *Sultana et al. (2017)*.

Από τα αποτελέσματα του *Πειράματος 3* διαπιστώθηκε πως η αιθανόλη σταδιακά εισχωρεί στις κάψουλες με αποτέλεσμα στην σταδιακή απομάκρυνση του ελαίου από το εσωτερικό των κυττάρων, έως ότου ολόκληρη η ποσότητα του ελαίου εκχυλιστεί σε αυτήν. Το γεγονός αυτό καθιστά την αιθανόλη ακατάλληλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης του επιφανειακού ελαίου, αλλά και για την μέτρηση του ολικού, λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος εκχύλισης (> 10 min για κάθε δείγμα) και της συνεχούς ανάδευσης, σε σύγκριση με την σχεδόν ακαριαία απελευθέρωση του ελαίου με μία απλή ενυδάτωση.

Τέλος, από το *Πείραμα 4* εξήχθη το συμπέρασμα πως το εξάνιο δεν εισχωρεί στο εσωτερικό των κυττάρων, με αποτέλεσμα την εκχύλιση μονάχα του επιφανειακού ελαίου από τις κάψουλες. Αυτό, εξηγείται από τις τιμές των συγκεντρώσεων, που προέκυψαν πρακτικά αμετάβλητες κατά την διάρκεια του πειράματος. Να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού συμφωνούν με την χρήση του πρωτοκόλλου μέτρησης της συγκέντρωσης του επιφανειακού ελαίου, που χρησιμοποιήθηκε επίσης από τους *Sultana et al. (2017)*.

Για την επαλήθευση των παραπάνω συμπερασμάτων επιλέχθηκε δείγμα καψουλών ανεπεξέργαστων κυττάρων 24 h επώασης στους 65°C. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 50 mg δείγματος και 5 mL εξανίου. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με την χρήση συσκευής vortex για 10 sec. Το εξάνιο συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε για 10 min στα 6500·g και φωτομετρήθηκε στα 277 nm με την χρήση κυψελίδας χαλαζία. Η συγκέντρωση σε καρβακρόλη προέκυψε $1.1 \pm 0.2 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$. Στην συνέχεια, στον δοκιμαστικό σωλήνα με κάψουλες που εκπλύθηκαν με το εξάνιο, χορηγήθηκε προσεκτικά αέρας με στόχο την εξάτμιση του εξανίου που απέμεινε. Το περιεχόμενο του σωλήνα αναμείχθηκε με 500 μL απιονισμένου νερού και το μείγμα αναδεύτηκε έντονα με την χρήση συσκευής vortex για 10 sec. Μετά από χρονικό διάστημα 5 min, προστέθηκαν 4.5 mL αιθανόλης και το δείγμα αναδεύτηκε ξανά με την ίδια διαδικασία. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και φωτομέτρηση του δείγματος, και η συγκέντρωση σε καρβακρόλη προέκυψε $35.4 \pm 1.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$. Δεδομένων αυτών των αποτελεσμάτων, δεν υπάρχει καμία αμφιβολία πως στο εξάνιο εκχυλίζεται μονάχα η ποσότητα του επιφανειακού ελαίου, με την ποσότητα του ενθυλακωμένου ελαίου να ανακτάται με την προσθήκη νερού και αιθανόλης.

Βάσει των παραπάνω συμπερασμάτων, δημιουργήθηκαν τα πρωτόκολλα μέτρησης της ολικής συγκέντρωσης ελαίου και της συγκέντρωσης του επιφανειακού ελαίου, τα οποία ακολουθούν στη συνέχεια.

4.7.3. Μέτρηση Ολικής Συγκέντρωσης Ελαίου

Για την μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης ελαίου, ζυγίστηκαν 50 mg ξηρών καψουλών εντός πλαστικού κωνικού σωλήνα Falcon®. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενυδατώθηκε με την προσθήκη 500 μL απιονισμένου νερού και το μείγμα αναδεύτηκε έντονα με την χρήση συσκευής vortex για 10 sec. Μετά από χρονικό διάστημα 5 min, προστέθηκαν 4.5 mL αιθανόλης και τα δείγματα αναδεύτηκαν ξανά για 10 sec σε συσκευή vortex. Για τον διαχωρισμό του μείγματος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 min στα 6500·g. Στην συνέχεια συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό, και μετρήθηκε η απορρόφηση του στα 277 nm με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας και με την χρήση κυψελίδας χαλαζία. Να σημειωθεί πως οι απορροφήσεις των υπόλοιπων ουσιών του ελαίου πέραν της καρβακρόλης και της θυμόλης, καθώς οι απορροφήσεις των διάφορων συστατικών των κυττάρων που πιθανώς να εκχυλίστηκαν κατά την όλη διαδικασία, θεωρήθηκαν αμελητέες (βλ. 4.7.1.).

4.7.4. Μέτρηση Συγκέντρωσης Επιφανειακού Ελαίου

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης του επιφανειακού ελαίου, ζυγίστηκαν 50 mg ξηρών καψουλών εντός γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων. Στο περιεχόμενο των σωλήνων προστέθηκαν 5 mL εξανίου, και το μείγμα αναδεύτηκε με την χρήση συσκευής vortex για 10 sec. Στην συνέχεια μέρος του εκχυλίσματος εξανίου μεταγγίστηκε σε σωλήνα Falcon® και κατόπιν πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 min στα 6500·g. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε έλαιο πραγματοποιήθηκε όπως η μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού ελαίου, η οποία αναλύθηκε παραπάνω (βλ. 4.7.3.).

4.7.5. Επεξεργασία Μετρήσεων

Η ποσοτικοποίηση και η απόδοση του εγκλεισμού, υπολογίστηκαν με την χρήση του φορτίου ενθυλάκωσης (EL) και της αποδοτικότητας ενθυλάκωσης (EE). Η παράμετρος EL ορίζεται ως η μάζα του ενθυλακωμένου ελαίου σε mg, η οποία υπολογίζεται από την διαφορά του ολικού από το επιφανειακό έλαιο, ανά 100 mg ξηρών καψουλών. Η παράμετρος EE ορίζεται ως το εκατοστιαίο ποσοστό της μάζας του ελαίου που ενθυλακώθηκε κατά την διάρκεια της επώασης προς την μάζα του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση (Czerniak et al., 2015).

$$EL \left(\frac{\text{mg ενθυλακωμένου ελαίου}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}} \right) = \frac{\text{Μάζα ολικού ελαίου (mg)} - \text{Μάζα επιφανειακού ελαίου (mg)}}{\text{Μάζα ξηρών καψουλών (mg)}} \times 100 \quad (4.2.)$$

$$EE (\%) = \frac{\text{Μάζα ελαίου που ενθυλακώθηκε κατά την επώαση (g)}}{\text{Μάζα ελαίου ρίγανης που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση (g)}} \times 100\% \quad (4.3.)$$

4.8. GC – MS Ανάλυση Σύστασης Ενθυλακωμένου Ελαίου

Για την ανάλυση της σύστασης του ενθυλακωμένου ελαίου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας (GC – MS) με την χρήση του συστήματος GC HP 6890, συζευγμένο με έναν εκλεκτικό ανιχνευτή μάζας HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Με την χρήση σύριγγας των 5 μL , χορηγήθηκε στο όργανο 1 μL από δείγματα χρόνων επώασης 0, 5 και 24 h, από κάθε επεξεργασία (UC, HC, AC8, AC24, PEF1, PEF2, PEF3). Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με την μέθοδο εκχύλισης του ολικού ελαίου που αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.7.3.. Ο διαχωρισμός των ουσιών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την στήλη MS HP-5 (30 m x 320 μm x 0.25 μm , Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Οι συνθήκες λειτουργίας της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε είναι οι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στην παράγραφο 4.6.. Επιπλέον, εκτός από τα παραπάνω δείγματα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αιθανολικών διαλυμάτων καθαρού ελαίου ($0.503 \pm 0.010 \text{ mg/mL}$), αλλά και ελαίου το οποίο εκτέθηκε για 24 h στους 65°C ($0.502 \pm 0.013 \text{ mg/mL}$), για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων.

4.9. Προσδιορισμός Απελευθέρωσης Ενθυλακωμένου Ελαίου

Όπως αναλύθηκε παραπάνω η παρουσία του νερού παίζει καθοριστικό ρόλο για την απελευθέρωση του ενθυλακωμένου ελαίου από τις μικροκάψουλες. Δεδομένου αυτού του γεγονότος, η απελευθέρωση του ελαίου μελετήθηκε συναρτήσει της ενεργότητας του νερού (a_w). Ως ενεργότητα νερού ορίζεται ο λόγος της τάσης ατμών του νερού σε έναν σύστημα προς την τάση ατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία. Σε συνθήκες ισορροπίας η ενεργότητα του νερού ορίζεται από τη σχετική υγρασία. Η σταθερή σχετική υγρασία επιτυγχάνεται σε χώρο υπερκείμενο και ευρισκόμενο σε ισορροπία με την χρήση ενός συγκεκριμένου κορεσμένου υδατικού διαλύματος άλατος. Η μέτρηση της απελευθέρωσης του ελαίου στηρίχθηκε στην υπόθεση, πως η ύπαρξη υγρασίας εξωθεί το ενθυλακωμένο έλαιο προς το εξωτερικό των κυττάρων, δίνοντας του έτσι τον χαρακτηρισμό του επιφανειακού ελαίου. Να σημειωθεί πως η υπόθεση αυτή συνάδει και με την βιβλιογραφία (Greenspan, 1976).

Πίνακας 4.3. Ενεργότητα νερού δοχείων επώασης με κορεσμένα διαλύματα αλάτων

Άλας	Ενεργότητα Νερού (a_w)	Θερμοκρασία (°C)
Νιτρικό Μαγνήσιο ($Mg(NO_3)_2$)	0.53	25
Ιωδιούχο Κάλιο (KI)	0.68	25
Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)	0.75	25
Χλωριούχο Κάλιο (KCl)	0.84	25
Νιτρικό Κάλιο (KNO_3)	0.93	25
Θειικό Κάλιο (K_2SO_4)	0.97	25

(Greenspan, 1976)

Για την μέτρηση της απελευθέρωσης του ελαίου συναρτήσεως της ενεργότητας του νερού, ζυγίστηκαν 50 mg ξηρών καψουλών, εντός γυάλινου δοκιμαστικού σωλήνα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που έφεραν τα δείγματα, τοποθετήθηκαν σε ερμητικά σφραγισμένα γυάλινα δοχεία σταθερών συνθηκών ενεργότητας νερού και θερμοκρασίας 25°C. Η επώαση των δειγμάτων διήρκησε 5 ημέρες, ενώ οι διάφορες ενεργότητες νερού επιτεύχθηκαν με την χρήση κορεσμένων υδατικών διαλυμάτων αλάτων, εντός των δοχείων. Τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν και οι ενεργότητες που αντιστοιχούν στα κορεσμένα υδατικά τους διαλύματα αναγράφονται στον Πίνακα 4.3.. Μετά την απομάκρυνση των δειγμάτων από τα δοχεία, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της συγκέντρωσης του επιφανειακού ελαίου σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.7.4..

4.10. Στατιστική Επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Επιπλέον, εφαρμόζεται ο έλεγχος Duncan ($p = 0.05$) για να αποτιμηθούν, για κάθε παράγοντα χωριστά, οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των εναλλακτικών περιπτώσεων. Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια του λογισμικού SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19, SPSS Inc., IBM Company, Release 19.0.0.).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

5.1. Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την μελέτη της ενθυλάκωσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κύτταρα μαγιάς. Αρχικά σχολιάζεται το φορτίο και η αποδοτικότητα ενθυλάκωσης που προέκυψαν κατά την ολοκλήρωση της επώασης, για κάθε κυτταρικό υλικό και θερμοκρασία επώασης. Έπειτα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μαθηματικής μοντελοποίησης του φορτίου ενθυλάκωσης συναρτήσει του χρόνου επώασης, με την χρήση της λύσης του 2^{ου} νόμου διάχυσης του Fick. Η μαθηματική προσαρμογή αυτή, πραγματοποιήθηκε για κάθε θερμοκρασία επώασης, κάθε επεξεργασμένου κυτταρικού υλικού (UC, HC, AC8, AC24, PEF1, PEF2, PEF3). Οι φαινόμενοι συντελεστές διάχυσης που προέκυψαν για κάθε επεξεργασμένο κυτταρικό υλικό μοντελοποιήθηκαν συναρτήσει της θερμοκρασίας, με την χρήση της εξίσωσης Arrhenius, από την οποία προέκυψε η ενέργεια ενεργοποίησης του εγκλεισμού για κάθε επεξεργασία κυττάρων. Ακόμα, σχολιάζεται ο χρόνος ολοκλήρωσης της ενθυλάκωσης, για κάθε περίπτωση. Οι θερμοκρασίες επώασης που μελετήθηκαν ήταν 30, 37, 45 και 65 °C, ενώ η διάρκεια κάθε επώασης ήταν 24 h, με εξαίρεση την επώαση των ανεπεξέργαστων κυττάρων στους 30 °C, για την οποία η επώαση διήρκησε 48 h.

Επίσης, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την απελευθέρωση του ενθυλακωμένου ελαίου σε συνάρτηση με την ενεργότητα του νερού. Οι συνθήκες ενεργότητας νερού που μελετήθηκαν κυμαίνονται μεταξύ του 0.56 – 0.97, σε σταθερή θερμοκρασία 25°C. Τέλος σχολιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας επώασης, του χρόνου επώασης και των μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης στην σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου. Ο σχολιασμός αυτός στηρίζεται στην ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) των αποτελεσμάτων της ενόργανης ανάλυσης GC – MC.

5.2. Μελέτη Κινητικής και Απόδοσης Εγκλεισμού

Με την χρήση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις μετρήσεις της ολικής και επιφανειακής συγκέντρωσης του ελαίου των καψουλών, υπολογίστηκε το φορτίο ενθυλάκωσης (EL) με την εφαρμογή της *Εξίσωσης 4.2.* Σε αυτήν την παράγραφο θα αναλυθεί η μαθηματική μοντελοποίηση του φορτίου ενθυλάκωσης με τον χρόνο, καθώς και του φαινομένου συντελεστή διάχυσης με την θερμοκρασία. Ακόμα θα σχολιαστεί η αποδοτικότητα του εγκλεισμού (EE%), καθώς και ο χρόνος ολοκλήρωσης της ενθυλάκωσης για κάθε περίπτωση.

5.2.1. Μέγιστες Τιμές Φορτίου και Αποδοτικότητας Ενθυλάκωσης

Όπως προέκυψε από τα πειραματικά δεδομένα, η συγκέντρωση του ενθυλακωμένου ελαίου ρίγανης σταθεροποιήθηκε από μία χρονική στιγμή και έπειτα. Η μέγιστη τιμή του φορτίου ενθυλάκωσης (EL_ε) υπολογίστηκε με την βοήθεια της *Εξίσωσης 4.2.*, για κάθε επεξεργασία και θερμοκρασία επώασης. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ενθυλακωμένου φορτίου ισορροπίας, ήταν αυτές που αντιστοιχούν σε χρόνο επώασης 24 h, με μόνη εξαίρεση την περίπτωση αυτή των ανεπεξέργαστων κυττάρων θερμοκρασίας επώασης 30°C, όπου και χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές για χρόνο 48 h. Να σημειωθεί πως ο ελάχιστος χρόνος επώασης που απαιτείται για την επίτευξη της μέγιστης τιμής φορτίου ενθυλάκωσης διαφέρει για κάθε περίπτωση

και θα αναλυθεί στην συνέχεια αυτού του κεφαλαίου. Ακολουθεί ο Πίνακας 5.1. στον οποίο παρουσιάζονται το ενθυλακωμένο φορτίο ισορροπίας για κάθε περίπτωση.

Πίνακας 5.1. Μέγιστο φορτίο ενθυλάκωσης για κάθε κυτταρικό υλικό και θερμοκρασία

T (°C)	E _e (mg καρβακρόλης/100 mg ξηρών καψουλών)						
	UC	PEF1	PEF2	PEF3	AC8	AC24	HC
30	37.4±0.7 ^{cd}	35.7±0.6 ^{bcd}	38.2±0.3 ^d	36.2±0.1 ^{bcd}	33.4±2.1 ^b	35.3±0.8 ^{bcd}	22.9±0.4 ^a
37	34.7±0.6 ^{bcd}	37.5±1.0 ^{cd}	36.6±1.8 ^{bcd}	36.5±1.3 ^{bcd}	35.0±1.6 ^{bcd}	34.8±0.3 ^{bcd}	24.0±0.9 ^a
45	37.1±1.7 ^{bcd}	36.6±0.6 ^{bcd}	36.5±1.0 ^{bcd}	35.5±0.6 ^{bcd}	36.6±0.5 ^{bcd}	33.8±2.0 ^{bc}	23.5±0.9 ^a
65	35.4±1.6 ^{bcd}	33.3±1.0 ^b	34.4±0.1 ^{bcd}	34.1±1.5 ^{bc}	35.9±0.1 ^{bcd}	33.7±3.1 ^{bc}	24.1±0.4 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν σημαντικές στατιστικές διαφορές (p<0.05) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1. το ενθυλακωμένο φορτίο ισορροπίας δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, μεταξύ των επεξεργασιών των κυττάρων, εκτός από την περίπτωση της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης. Για τα ανεπεξέργαστα, τα αυτολυμένα και για τα επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν (χρόνος αυτόλυσης και ειδική ενέργεια), μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης δεν επηρεάζεται. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως η αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού περιβλήματος δεν είναι απαραίτητο πως επηρεάζει την τελική ποσότητα του εγκλεισμένου ελαίου. Ακόμα, η θερμοκρασία επώασης κάθε κυτταρικού υλικού, επίσης δεν επηρεάζει σημαντικά το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης, με τις διαφορές που παρατηρούνται να μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες. Δεδομένων αυτών, για κάθε θερμοκρασία επώασης από τους 30°C έως τους 65°C και για τα κυτταρικά υλικά UC, PEF1, PEF2, PEF3, AC8 και AC24 το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης μπορεί να θεωρηθεί ίσο με $35.6 \pm 1.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$, όπως προέκυψε από τον υπολογισμό της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των αντίστοιχων τιμών του Πίνακα 5.1..

Στην περίπτωση των ομογενοποιημένων κυττάρων παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, με τις τελικές τιμές του φορτίου ενθυλάκωσης να είναι μικρότερες των υπολοίπων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην καταστροφή της δομής του κυτταρικού τοιχώματος που πραγματοποιήθηκε με την διεργασία αυτή. Οι συνθήκες της ομογενοποίησης που εφαρμόστηκαν (800 bar, 4 διελεύσεις) επιλέχθηκαν με σκοπό την πλήρη διάρρηξη των κυττάρων της μαγιάς, για την μελέτη του φαινομένου στην ακραία αυτή περίπτωση. Παρόλα αυτά, η θερμοκρασία και σε αυτήν την περίπτωση δεν επηρεάζει το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης, με τις τιμές του να παρουσιάζουν αμελητέες διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης. Έτσι, στην περίπτωση των ομογενοποιημένων κυττάρων (HC), για κάθε θερμοκρασία επώασης από τους 30°C έως τους 65°C, το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης μπορεί να θεωρηθεί ίσο με $23.6 \pm 0.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$, όπως προέκυψε από τον υπολογισμό της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των αντίστοιχων τιμών του Πίνακα 5.1..

Για τον υπολογισμό της τελικής αποδοτικότητας ενθυλάκωσης (E_e) χρησιμοποιήθηκαν οι Εξισώσεις 4.2. και 4.3. οι οποίες περιγράφουν το φορτίο και την αποδοτικότητα ενθυλάκωσης αντίστοιχα. Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε η κατά βάρος αναλογία ξηρών κυττάρων – αιθέριου ελαίου ρίγανης (1:1 αναλογία) του επωαζόμενου μείγματος, και έγιναν οι παραδοχές πως ο λόγος της

συγκέντρωσης του επιφανειακού ελαίου των καψουλών προς το φορτίο ενθυλάκωσης είναι πολύ μικρότερος του 10 (<< 10) και πως η μάζα των κυτταρικών στερεών που απελευθερώνεται κατά την επώαση είναι αμελητέα σε σχέση με την μάζα του ελαίου που διαχέεται. Βάσει των παραπάνω, δημιουργήθηκε η σχέση:

$$EE = \frac{EL}{100-EL} \times 100\% \quad (5.1.)$$

όπου EE η αποδοτικότητα εγκλεισμού (%) και EL το φορτίο ενθυλάκωσης σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$. Ακολουθεί ο Πίνακας 5.2. στον οποίο παρατίθεται η τελική αποδοτικότητα ενθυλάκωσης για κάθε περίπτωση, όπως προέκυψε από την Εξίσωση 5.1. με την χρήση των αντίστοιχων τελικών φορτίων ενθυλάκωσης.

Πίνακας 5.2. Μέγιστη αποδοτικότητα ενθυλάκωσης για κάθε κυτταρικό υλικό και θερμοκρασία

T (°C)	EE _e (%)						
	UC	PEF1	PEF2	PEF3	AC8	AC24	HC
30	59.7±1.7 ^{cd}	55.4±1.4 ^{bcd}	61.8±0.9 ^d	56.9±0.2 ^{bcd}	50.1±4.7 ^b	54.7±1.8 ^{bcd}	29.7±0.7 ^a
37	53.1±1.5 ^{bcd}	60.1±2.5 ^{cd}	57.7±4.5 ^{bcd}	57.6±3.2 ^{bcd}	53.8±3.9 ^{bcd}	53.4±0.6 ^{bcd}	31.6±1.6 ^a
45	59.0±4.4 ^{bcd}	57.6±1.5 ^{bcd}	57.5±2.5 ^{bcd}	55.1±1.4 ^{bcd}	57.7±1.4 ^{bcd}	51.2±4.6 ^{bc}	30.7±1.6 ^a
65	54.9±3.9 ^{bcd}	49.9±0.3 ^b	52.5±0.3 ^{bcd}	51.7±3.5 ^{bc}	56.0±0.2 ^{bcd}	50.9±7.1 ^{bc}	31.8±0.6 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν σημαντικές στατιστικές διαφορές (p<0.05) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Η αποδοτικότητα ενθυλάκωσης είναι μια παράμετρος, η οποία εκφράζει το ποσοστό του ελαίου (ή γενικότερα του ενεργού συστατικού) που ενθυλακώθηκε κατά την διάρκεια της επώασης σε σχέση με την συνολική ποσότητα του ελαίου (ενεργού συστατικού) που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση. Όσο η παράμετρος αυτή πλησιάζει την τιμή 100%, τόσο πιο αποδοτικός είναι ο εγκλεισμός, από την άποψη πως λιγότερη ποσότητα ελαίου (ενεργού συστατικού) μένει ανεκμετάλλευτη.

Όπως προέκυψε, παρατηρώντας τις τιμές του Πίνακα 5.2. δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές της αποδοτικότητας της ενθυλάκωσης μεταξύ των κυττάρων, εάν εξαιρεθεί και πάλι η περίπτωση των ομογενοποιημένων κυττάρων. Επίσης δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης για κάθε κατηγορία κυττάρων. Και σε αυτήν την περίπτωση, η προκατεργασία των κυττάρων με την διεργασία της αυτόλυσης και με παλμικά ηλεκτρικά πεδία δεν επηρέασε την αποδοτικότητα της ενθυλάκωσης.

Δεδομένου πως η αποδοτικότητα δεν επηρεάζεται με την θερμοκρασία επώασης από τους 30°C έως 65°C και από τις επεξεργασίες της αυτόλυσης και των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, μπορεί να θεωρηθεί πως η αποδοτικότητα ενθυλάκωσης στο θερμοκρασιακό αυτό εύρος για τα κύτταρα UC, PEF1, PEF2, PEF3, AC8 και AC24 ισούται με 55.3 ± 3.3 % όπως προέκυψε από τον υπολογισμό της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των αντίστοιχων τιμών του Πίνακα 5.2.. Η τιμή αυτή δείχνει πως περίπου το 45 % του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση δεν ενθυλακώθηκε. Το γεγονός αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα πως η μείωση της ποσότητας του ελαίου θα αυξήσει την αποδοτικότητα, λόγω του ότι ο μηχανισμός της ενθυλάκωσης στα κύτταρα της μαγιάς, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, στηρίζεται στην διάχυση του ελαίου διαμέσου του κυτταρικού περιβλήματος των κυττάρων και όχι στην δημιουργία μίας μήτρας γύρω από αυτό, πράγμα που σημαίνει ότι ενδεχομένως η υψηλή συγκέντρωση του ελαίου στο επωαζόμενο μείγμα

βοηθάει την διάχυση εντός του κυττάρου. Ένας τρόπος αξιοποίησης του μη ενθυλακωμένου ελαίου θα μπορούσε να είναι η επαναχρησιμοποίηση του με σκοπό την δημιουργία νέων μικροκαψουλών εξοικονομώντας αιθέριο έλαιο.

Για την περίπτωση των ομογενοποιημένων κυττάρων, η τελική αποδοτικότητα μειώνεται σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις, πράγμα που όπως και στην περίπτωση του τελικού φορτίου ενθυλάκωσης, πιθανότατα οφείλεται στην πλήρη διάρρηξη των κυττάρων της μαγιάς με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενθυλακωθεί η ίδια ποσότητα όπως και στις άλλες κατηγορίες κυττάρων, οι οποίες παρουσιάζουν μια σταθερή δομή. Η μέση αποδοτικότητα ενθυλάκωσης για τα κύτταρα HC, στο θερμοκρασιακό εύρος 30 – 65°C προέκυψε 31.0 ± 1.0 %. Η τιμή αυτή είναι μικρότερη από εκείνη των υπόλοιπων κυττάρων. Να σημειωθεί πως οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων της τελικής αποδοτικότητας και του τελικού φορτίου ενθυλάκωσης προέκυψαν ίδιες, πράγμα λογικό εφόσον η αποδοτικότητα εξαρτάται άμεσα από το φορτίο ενθυλάκωσης, όπως υποδεικνύεται από την *Εξίσωση 5.1.*

5.2.2. Επίδραση του Χρόνου Επώασης στο Φορτίο Ενθυλάκωσης και Εφαρμογή του 2^{ου} Νόμου Διάχυσης του Fick

Κατά την διεξαγωγή της επώασης του κυτταρικού υλικού με το αιθέριο έλαιο ρίγανης, δεν σχηματίστηκε κάποια μήτρα η οποία να περικλείει το έλαιο, όπως γίνεται στις παραδοσιακές τεχνικές ενθυλάκωσης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο μηχανισμός με τον οποίο δημιουργούνται οι κάψουλες στηρίζεται στην παθητική διάχυση του ελαίου εντός των ενυδατωμένων κυττάρων (Czerniak et al., 2015). Λόγω αυτού του μηχανισμού, για την περιγραφή της εξέλιξης του φαινομένου με τον χρόνο επώασης χρησιμοποιήθηκε ο 2^{ος} νόμος διάχυσης του Fick:

$$\frac{\partial \varphi(x,t)}{\partial t} = D \nabla^2 \varphi \quad (5.2.)$$

όπου $\varphi(x,t)$ η συγκέντρωση της ουσίας που έχει διαχυθεί σε mol/m^3 , x η θέση σε m , t ο χρόνος σε s και D ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης σε m^2/s .

Η συνάρτηση που χρησιμοποιήθηκε για την μαθηματική μοντελοποίηση του φορτίου ενθυλάκωσης συναρτήσε του χρόνου επώασης, απορρέει από την επίλυση της *Εξίσωσης 5.2.*, η οποία προσαρμόστηκε για τις σφαιρικές κάψουλες που αποτελούν τα κύτταρα της μαγιάς, και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$EL_r = \frac{EL - EL_e}{EL_o - EL_e} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[- (2n+1)^2 \frac{\pi^2 D_{eff} t}{L^2} \right] \quad (5.3.)$$

όπου EL_r το αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης του ελαίου ρίγανης σε χρόνο t , EL το φορτίο ενθυλάκωσης του ελαίου εκφρασμένο σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ σε χρόνο t , EL_e το φορτίο ενθυλάκωσης του ελαίου εκφρασμένο σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ κατά την ολοκλήρωση της επώασης, EL_o το φορτίο ενθυλάκωσης του ελαίου εκφρασμένο σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ κατά την έναρξη της επώασης, n φυσικός αριθμός, D_{eff} ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης σε m^2/s , t ο χρόνος επώασης σε s και L η μέση διάμετρος των καψουλών σε m . Να σημειωθεί πως η διάμετρος των καψουλών της μαγιάς εκτιμήθηκε ίση με $5 \mu\text{m}$, όπως προέκυψε από τον χρωματισμό τους με την χρωστική ουσία κυανό του μεθυλενίου ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) και την χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer.

Το αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης (E_r) αποτελεί μία μεταβλητή η οποία παρουσιάζει το εκατοστιαίο ποσοστό ολοκλήρωσης του φαινομένου του εγκλεισμού. Για την τιμή του φορτίου

ενθυσλάκωσης ίση με το αρχικό φορτίο ενθυσλάκωσης ($EL=EL_0$) η τιμή του αδιάστατου φορτίου είναι ίση με την μονάδα, που σημαίνει πως έχει απομείνει το 100% του φαινομένου για την ολοκλήρωση του. Όταν το φορτίο ενθυσλάκωσης πάρει πρακτικά την τελική τιμή του ($EL=EL_e$) το αδιάστατο φορτίο παίρνει την τιμή μηδέν, που σημαίνει πως το φαινόμενο ολοκληρώθηκε. Έτσι, για παράδειγμα η τιμή $E_r=0.1$ αντιστοιχεί στο 90% της ολοκλήρωσης του φαινομένου, δηλαδή απομείνει το 10% για την ολοκλήρωση του.

Με την χρήση της *Εξίσωσης 5.3* έως και τον πέμπτο όρο της ($n=5$) και του λογισμικού πακέτου SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19, SPSS Inc., IBM Company, Release 19.0.0.) πραγματοποιήθηκε η μαθηματική μοντελοποίηση του αδιάστατου φορτίου ενθυσλάκωσης με τον χρόνο επώασης για κάθε επεξεργασμένο κυτταρικό υλικό και θερμοκρασία επώασης. Η παράμετρος που προέκυψε από κάθε προσαρμογή είναι ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης (D_{eff}). Οι προκύπτοντες συντελεστές διάχυσης παρουσιάζονται στον *Πίνακα 5.3*.

Πίνακας 5.3. Φαινόμενος συντελεστής διάχυσης από κάθε προσαρμογή στα πειραματικά σημεία

T (°C)	D_{eff} (cm ² /s)						
	UC	PEF1	PEF2	PEF3	AC8	AC24	HC
30	0.40±0.04 ^a	0.72±0.04 ^{ab}	0.82±0.03 ^{abc}	0.95±0.06 ^{abc}	1.21±0.09 ^{abc}	1.41±0.25 ^{abcd}	1.53±0.11 ^{abcd}
37	1.18±0.10 ^{abc}	0.93±0.05 ^{abc}	1.20±0.11 ^{abc}	1.59±0.13 ^{bcd}	1.73±0.15 ^{bcd}	1.95±0.22 ^{cd}	1.97±0.24 ^{cd}
45	1.77±0.11 ^{bcd}	1.27±0.06 ^{abc}	1.38±0.14 ^{abcd}	1.81±0.19 ^{bcd}	2.49±0.18 ^{de}	4.89±0.80 ^f	4.25±0.37 ^f
65	1.69±0.16 ^{bcd}	1.99±0.21 ^{cd}	2.46±0.20 ^{de}	3.08±0.41 ^e	9.89±1.05 ^g	11.46±2.07 ^h	9.91±1.84 ^g

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν σημαντικές στατιστικές διαφορές ($p<0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

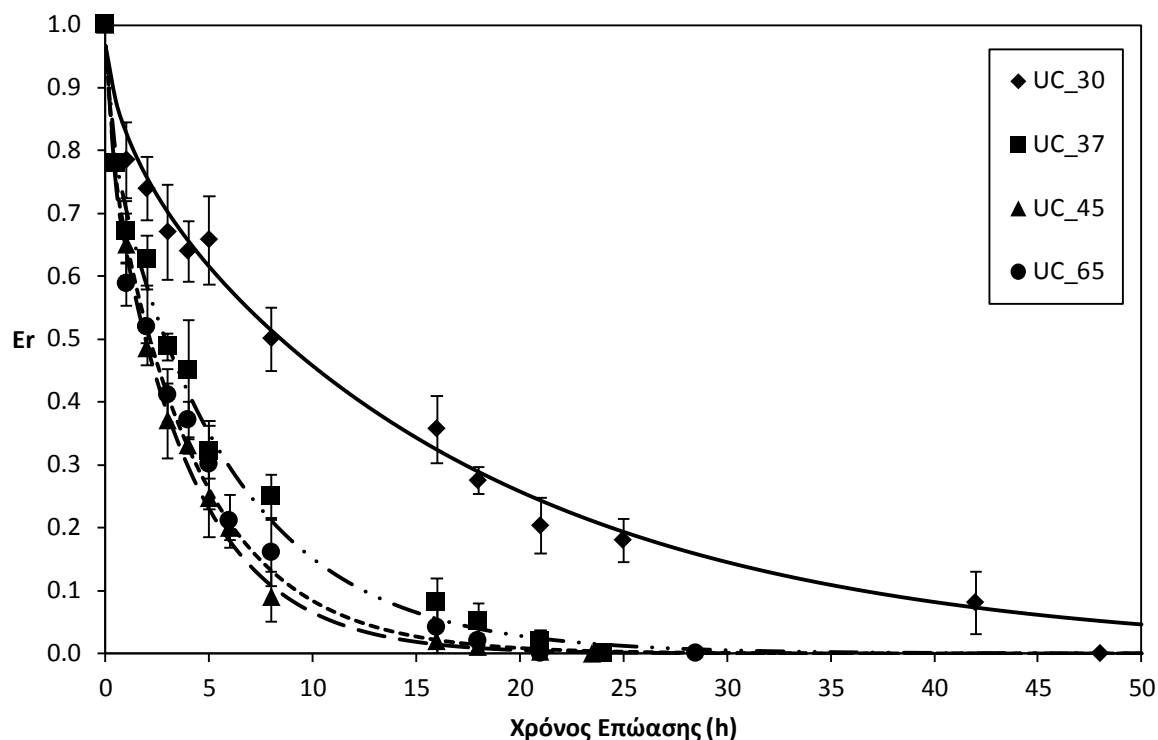
Με βάση τις τιμές του *Πίνακα 5.3* προέκυψε πως ο χαμηλότερος φαινόμενος συντελεστής διάχυσης αντιστοιχεί στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων, θερμοκρασίας επώασης 30°C με τιμή 0.40 ± 0.04 cm²/s, ενώ την μεγαλύτερη τιμή κατέχει ο συντελεστής για τα αυτολυμένα κύτταρα για 24 h, θερμοκρασίας επώασης 65°C με τιμή 11.46 ± 2.07 cm²/s. Ακόμα είναι εμφανές πως η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τον φαινόμενο συντελεστή διάχυσης, επιταχύνοντας την ενθυσλάκωση, εκτός από την περίπτωση των κυττάρων UC για θερμοκρασίες επώασης μεταξύ των 45 και 65°C, που η αύξηση της θερμοκρασίας δεν επιφέρει σημαντικές διαφορές στην τιμή του συντελεστή. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στο ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης αυξάνει την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης των ανεπεξέργαστων κυττάρων, επιφέροντας την επιτάχυνση της ενθυσλάκωσης. Πιθανότατα, η αύξηση της ρευστότητας μεγιστοποιείται περίπου στους 45°C, με αποτέλεσμα μεγαλύτερες θερμοκρασίες επώασης να μην επιφέρουν αύξηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης.

Παρατηρώντας κάθε κυτταρικό υλικό ξεχωριστά, προέκυψε πως η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης των κυττάρων UC από τους 30°C στους 45°C επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην τιμή του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, καθιστώντας τον έως και 4 φορές υψηλότερο. Στα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στις συνθήκες PEF1, ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης παρουσιάζει σταδιακή αύξηση, με σημαντικές αλλαγές να παρατηρούνται μεταξύ των θερμοκρασιών των 30°C και των 65°C, όπου και ο συντελεστής αυξάνεται περίπου 3 φορές. Στα κύτταρα PEF2 οι τιμές του ρυθμού που παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, είναι αυτές των 30 και 37°C με την θερμοκρασία των 65°C, όπου και πάλι ο συντελεστής σχεδόν τριπλασιάζεται σε σχέση με εκείνον των 30°C. Στο κυτταρικό υλικό PEF3, παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης μεταξύ της θερμοκρασίας επώασης των 65°C με όλες τις

υπόλοιπες θερμοκρασίες, ενώ και σε αυτήν την περίπτωση ο συντελεστής στην θερμοκρασία αυτή είναι περίπου τριπλάσιος της χαμηλής θερμοκρασίας των 30°C. Στα κύτταρα που αυτολύθηκαν για 8 h, προέκυψαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των 30°C και των 45°C, καθώς και μεταξύ των 65°C με όλες τις υπόλοιπες θερμοκρασίες. Στην περίπτωση αυτή η θερμοκρασία έχει πιο έντονες επιδράσεις στον φαινόμενο συντελεστή διάχυσης με την τιμή του στους 65°C να είναι σχεδόν 8 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των 30°C. Η ενθυλάκωση στα κύτταρα AC24, παρουσίασε εξίσου έντονη θερμοκρασιακή εξάρτηση, με παρόμοιες στατιστικές διαφορές μεταξύ των συντελεστών διάχυσης, όπως και στην περίπτωση των AC8. Αντίστοιχη επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό διάχυσης παρατηρείται και για τα ομογενοποιημένα κύτταρα, με την διαφορά όμως στην περίπτωση αυτή το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης που επιτυγχάνεται είναι μικρότερο από το κοινό φορτίο που παρουσιάζουν τα υπόλοιπα κύτταρα. Να σημειωθεί πως παρά το γεγονός πως τα ομογενοποιημένα κύτταρα θεωρούνται πλήρως διαρρηγμένα, πιθανότατα διατηρούν μία δομή στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ενθυλάκωση του ελαίου.

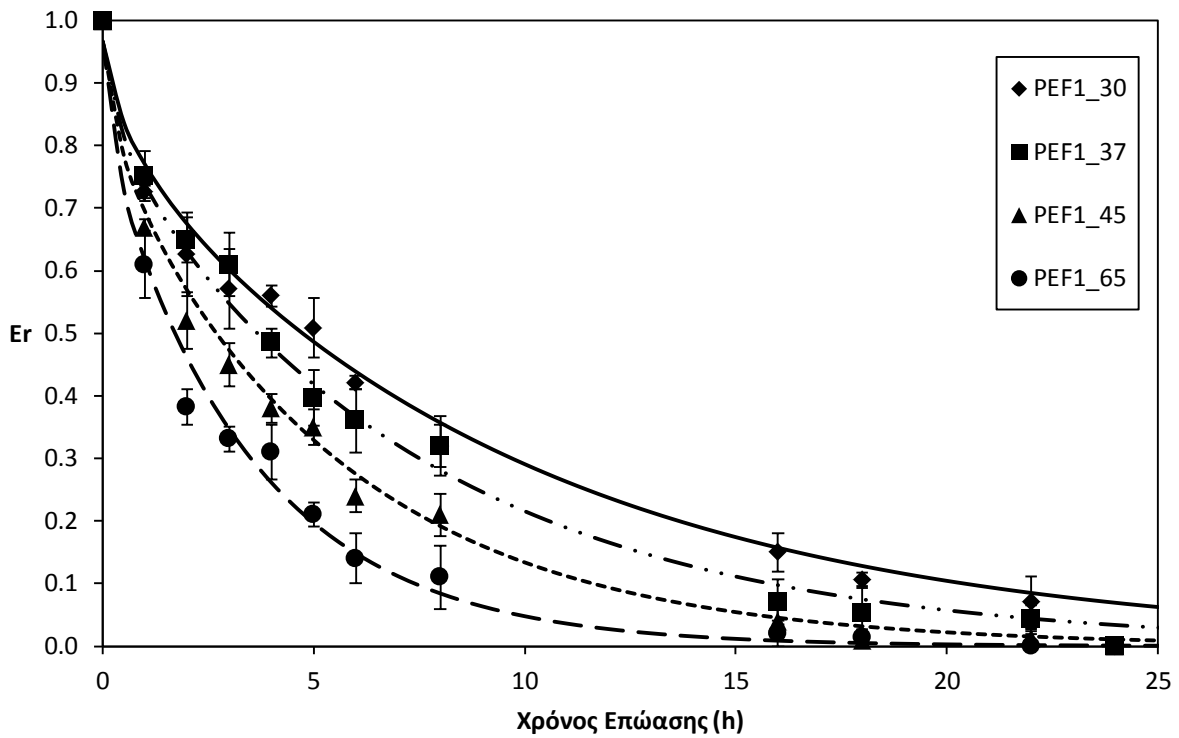
Επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον μεταξύ των επεξεργασιών που υπέστησαν τα κύτταρα πριν την επώαση, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην θερμοκρασία των 30°C, με μοναδική εξαίρεση τον συντελεστή των UC, που είναι περίπου 3 φορές μικρότερος από τους αντίστοιχους συντελεστές των κυττάρων AC8, AC24 και HC. Για την θερμοκρασία των 37°C δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των φαινόμενων συντελεστών διάχυσης για τα διάφορα κυτταρικά υλικά. Στους 45°C ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των κατεργασιών είναι πιο σημαντικές. Συγκεκριμένα σημαντικές στατιστικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των κυττάρων UC, PEF1, PEF2 και PEF3 με τα κύτταρα AC8, καθώς και μεταξύ των κυττάρων AC24 και HC με όλα τα υπόλοιπα κύτταρα. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στη αυξημένη διαπερατότητα των αυτολυμένων κυττάρων σε σχέση με τα υπόλοιπα κυτταρικά υλικά, εφόσον δεν διαθέτουν κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τους τοίχωμα είναι πιο διαπερατό. Οι σημαντικότερες στατιστικές διαφορές παρατηρούνται στην θερμοκρασία των 65°C όπου τα κυτταρικά υλικά μπορούν να χωριστούν σε ομάδες κατά αύξοντα φαινόμενο συντελεστή διάχυσης. Τα κύτταρα UC και PEF1 εντάσσονται στην πρώτη ομάδα χαμηλού φαινόμενου συντελεστή διάχυσης ($D_{\text{eff}} = 1.69 \text{ cm}^2/\text{s}$ για τα UC), τα κύτταρα PEF2 και PEF3 στην δεύτερη ($D_{\text{eff}} = 2.46 \text{ cm}^2/\text{s}$ για τα PEF2), ακολουθούν τα κύτταρα AC8 και HC με υψηλές τιμές φαινόμενου συντελεστή διάχυσης ($D_{\text{eff}} = 9.89 \text{ cm}^2/\text{s}$ για τα AC8), ενώ τα κύτταρα AC24 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη τιμή ($D_{\text{eff}} = 11.46 \text{ cm}^2/\text{s}$). Το συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί είναι πως όσο πιο έντονη είναι η κατεργασία κυτταρικής διάρρηξης στην οποία θα υποβληθούν τα κύτταρα μαγιάς, τόσο πιο έντονα αυξάνεται ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Ενδιαφέρον ακόμα παρουσιάζουν τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, για τα οποία σε κάθε θερμοκρασία, μικρότερες τιμές D_{eff} παρουσιάζονται για τα κύτταρα PEF1 (ειδικής ενέργειας 3.2 kJ/kg), και μεγαλύτερες για τα κύτταρα PEF3 (ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg), δηλαδή η αύξηση της ειδικής ενέργειας της επεξεργασίας αυξάνει με την σειρά της τον φαινόμενο συντελεστή διάχυσης. Ακόμα, παρά τους υψηλούς συντελεστές διάχυσης που παρουσιάζουν τα ομογενοποιημένα κύτταρα σε σχέση με τα υπόλοιπα, δεν πρέπει να παραλείπεται το γεγονός πως το μέγιστο φορτίο ενθυλάκωσης που επιτυγχάνεται με την χρήση αυτών ($23.6 \pm 0.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$), είναι σημαντικά μικρότερο από εκείνο των υπόλοιπων κυτταρικών υλικών ($35.6 \pm 1.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$). Στη συνέχεια του κεφαλαίου αυτού, θα προσδιοριστεί η εξάρτηση του φαινόμενου συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία, καθώς και θα πραγματοποιηθεί σύγκριση των συντελεστών μεταξύ διαφορετικών συνθηκών θερμοκρασίας επώασης και επεξεργασιών κυτταρικής διάρρηξης.

Για κάθε τιμή φαινόμενου συντελεστή διάχυσης που παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.3., κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες των προσαρμογών της Εξίσωσης 5.3. στα πειραματικά σημεία του φορτίου ενθυλάκωσης. Ακολουθούν τα διαγράμματα με τα πειραματικά σημεία και τις αντίστοιχες καμπύλες που προέκυψαν από την μοντελοποίηση. Να σημειωθεί ακόμα πως όλες οι προσαρμογές παρουσίασαν δείκτη $R^2 > 0.9$, γεγονός που τις καθιστά αποδεκτές και αξιόπιστες.

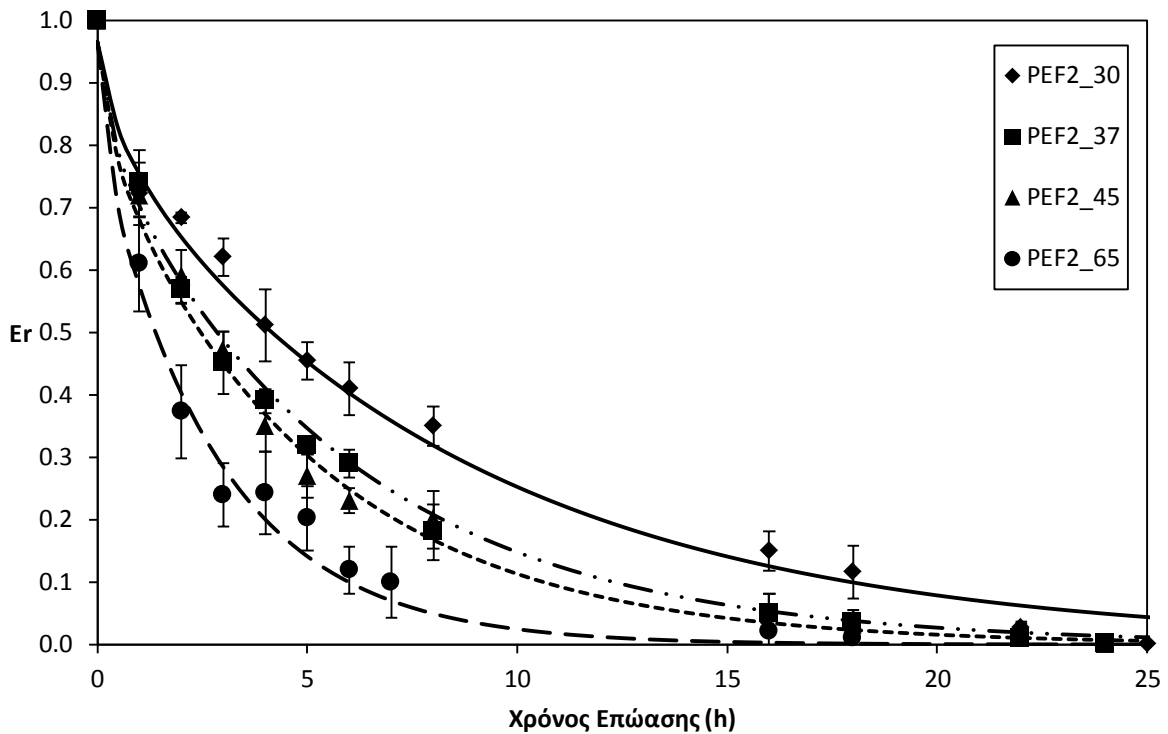


Διάγραμμα 5.1. Αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης σε ανεπεξέργαστα κύτταρα για κάθε θερμοκρασία επώασης

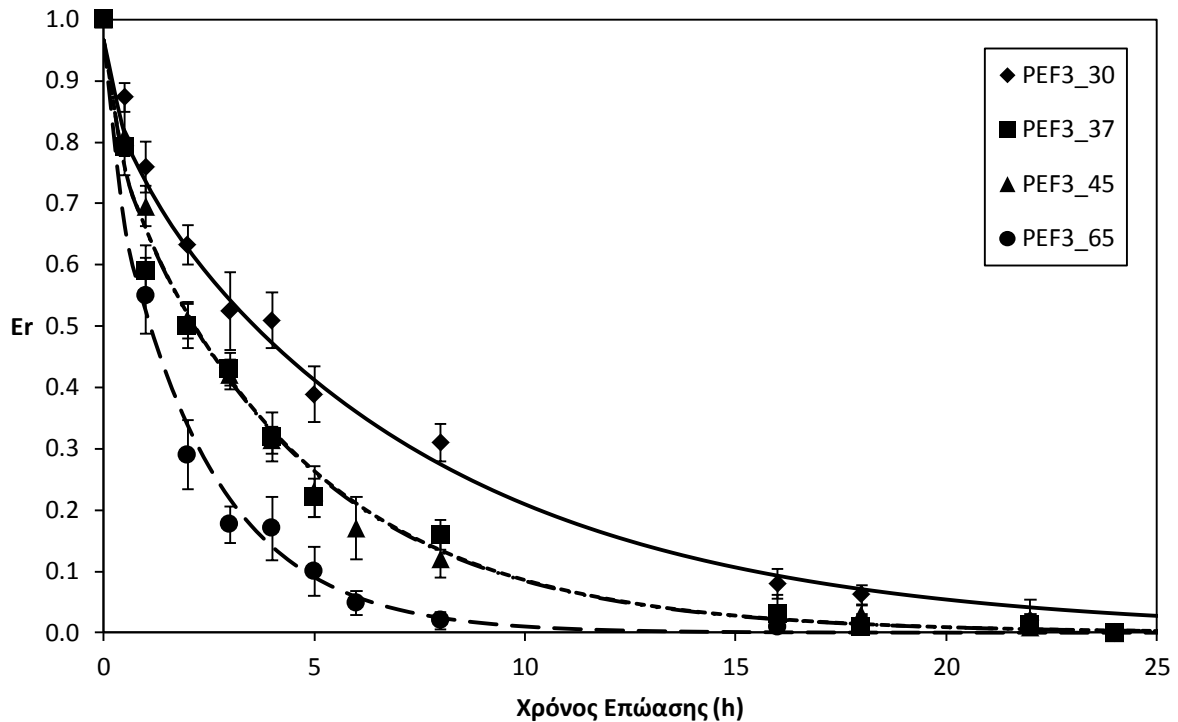
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 5.1. ο ρυθμός μείωσης του αδιάστατου φορτίου ενθυλάκωσης των ανεπεξέργαστων κυττάρων για την θερμοκρασία των 30°C είναι αρκετά μικρότερος από τους ρυθμούς των υπόλοιπων θερμοκρασιών, γεγονός που σημαίνει πως ο εγκλεισμός στην περίπτωση αυτή είναι αρκετά αργός. Αξιοσημείωτο είναι ακόμα το γεγονός πως για την θερμοκρασία επώασης των 30°C των ανεπεξέργαστων κυττάρων ήταν αναγκαία η λήψη πειραματικών σημείων έως και τις 48 h, σε αντίθεση με όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις όπου το φαινόμενο είχε είδη ολοκληρωθεί έως τις 24 h. Επίσης για την θερμοκρασία των 37°C η ενθυλάκωση έχει ολοκληρωθεί κατά το 90 % ($E_r=0.1$) σε ένα χρονικό διάστημα περίπου 12 h, ενώ για την θερμοκρασία των 30°C η τιμή $E_r=0.1$ επιτυγχάνεται περίπου στις 35 h. Είναι εμφανές πως η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης έως και τους 45°C επιταχύνει πολύ έντονα την διάχυση του ελαίου εντός των κυττάρων. Η καμπύλη του αδιάστατου φορτίου των UC στη θερμοκρασία επώασης των 65°C πρακτικά εφάπτεται με εκείνη των 45°C, με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης άνω των 45°C να μην επιφέρει διαφορές στην ταχύτητα της ενθυλάκωσης, γεγονός που σχολιάστηκε παραπάνω από τις τιμές των αντίστοιχων φαινομένων συντελεστών διάχυσης. Για τις θερμοκρασίες αυτές η τιμή 0.1 επιτυγχάνεται περίπου στις 8 h επώασης.



Διάγραμμα 5.2. Αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης σε επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (ήπια συνθήκη PEF1 ειδικής ενέργειας 3.2 kJ/kg) για κάθε θερμοκρασία επώασης



Διάγραμμα 5.3. Αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης σε επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (μέτρια συνθήκη PEF2 ειδικής ενέργειας 13.6 kJ/kg) για κάθε θερμοκρασία επώασης

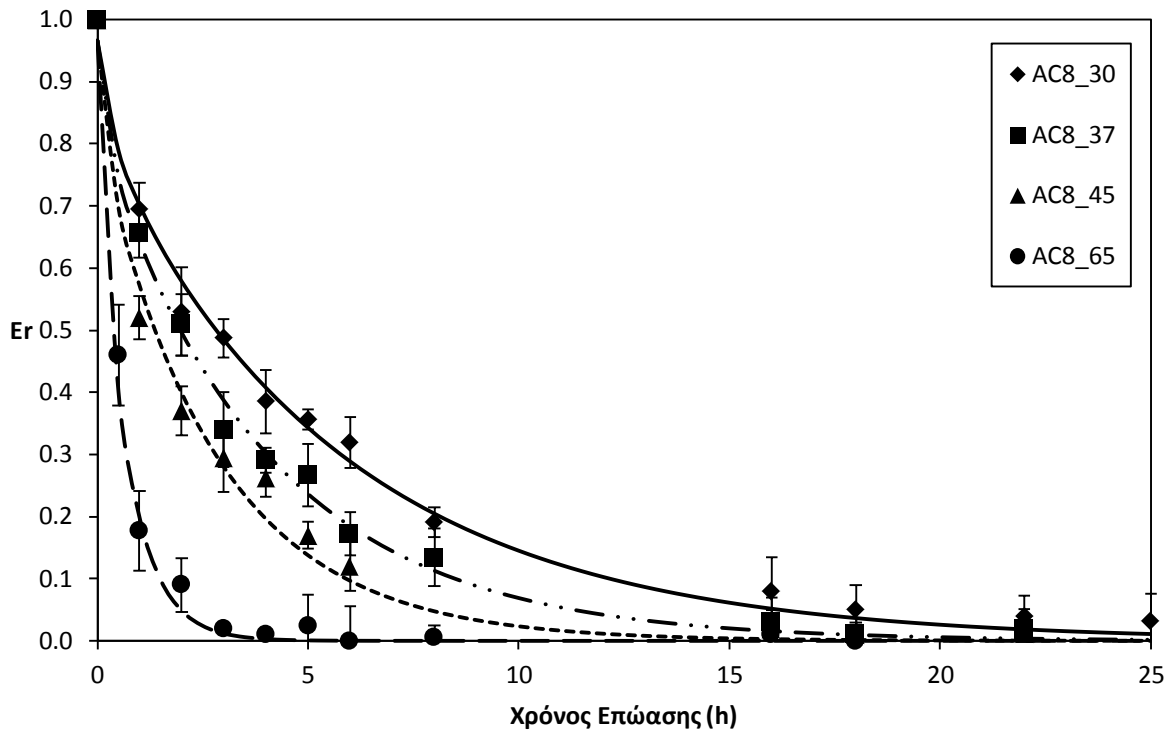


Διάγραμμα 5.4. Αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης σε επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (έντονη συνθήκη PEF3 ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg) για κάθε θερμοκρασία επώασης

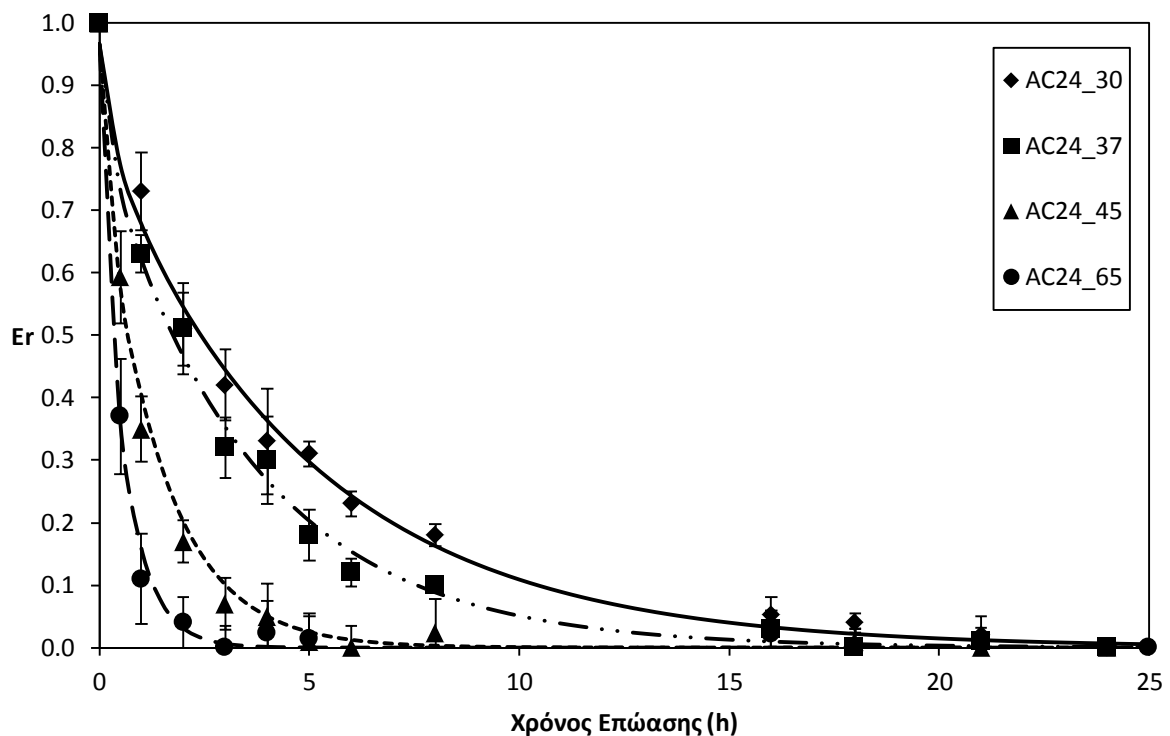
Βάσει του Διαγράμματος 5.2. παρατηρείται πως η διάχυση του ελαίου στα κύτταρα PEF1, θερμοκρασίας επώασης 30°C, έχει ολοκληρωθεί εντός 24 h. Μάλιστα για την χαμηλή θερμοκρασία αυτή η τιμή $E_r=0.1$ επιτυγχάνεται περίπου στις 20 h, έναντι των 35 h των ανεπεξέργαστων κυττάρων στην ίδια θερμοκρασία. Ακόμα είναι αισθητή η επίδραση της θερμοκρασίας και σε θερμοκρασίες άνω των 45°C, έως και τους 65°C, όπου το 90% του φαινομένου πραγματοποιείται περίπου στις 7 h. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν και τα κύτταρα PEF2 και PEF3, των οποίων τα διαγράμματα παρατίθενται παρακάτω.

Από τη σύγκριση των Διαγραμμάτων 5.2., 5.3. και 5.4. προκύπτει πως η αύξηση της ειδικής ενέργειας της επεξεργασίας επιταχύνει το φαινόμενο, με τα κύτταρα PEF3 (ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg) μέσα σε 15 h για τους 30°C και σε 5 h για τους 65°C να επιτυγχάνουν την τιμή 0.1 του αδιάστατου φορτίου, έναντι των αντίστοιχων χρόνων 20 h και 7 h την συνθήκης PEF1 (ειδικής ενέργειας 3.2 kJ/kg). Η παρατήρηση αυτή θα αναλυθεί στην συνέχεια αυτού του κεφαλαίου.

Ακολουθεί το Διάγραμμα 5.5. όπου η θερμοκρασία επώασης επηρεάζει έντονα τον ρυθμό διάχυσης, επιταχύνοντας την διεξαγωγή του φαινομένου του εγκλεισμού του ελαίου στα αυτολυμένα κύτταρα 8 h. Επιπλέον οι καμπύλες των προσαρμογών είναι αρκετά απότομες και σε χαμηλές θερμοκρασίες επώασης, γεγονός λογικό λόγω της έντονης αύξησης της διαπερατότητας των κυττάρων κατά την διεργασία της αυτόλυσης που προηγήθηκε. Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί επίτευξη της τιμής 0.1 του αδιάστατου φορτίου ενθυλάκωσης μέσα σε χρονικό διάστημα επώασης περίπου 2 h για την θερμοκρασία των 65°C, και 12 h για την θερμοκρασία των 30°C, αισθητά μικρότεροι χρόνοι συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα.



Διάγραμμα 5.5. Αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης σε αυτολυμένα κύτταρα 8 h στους 52°C για κάθε θερμοκρασία επώασης

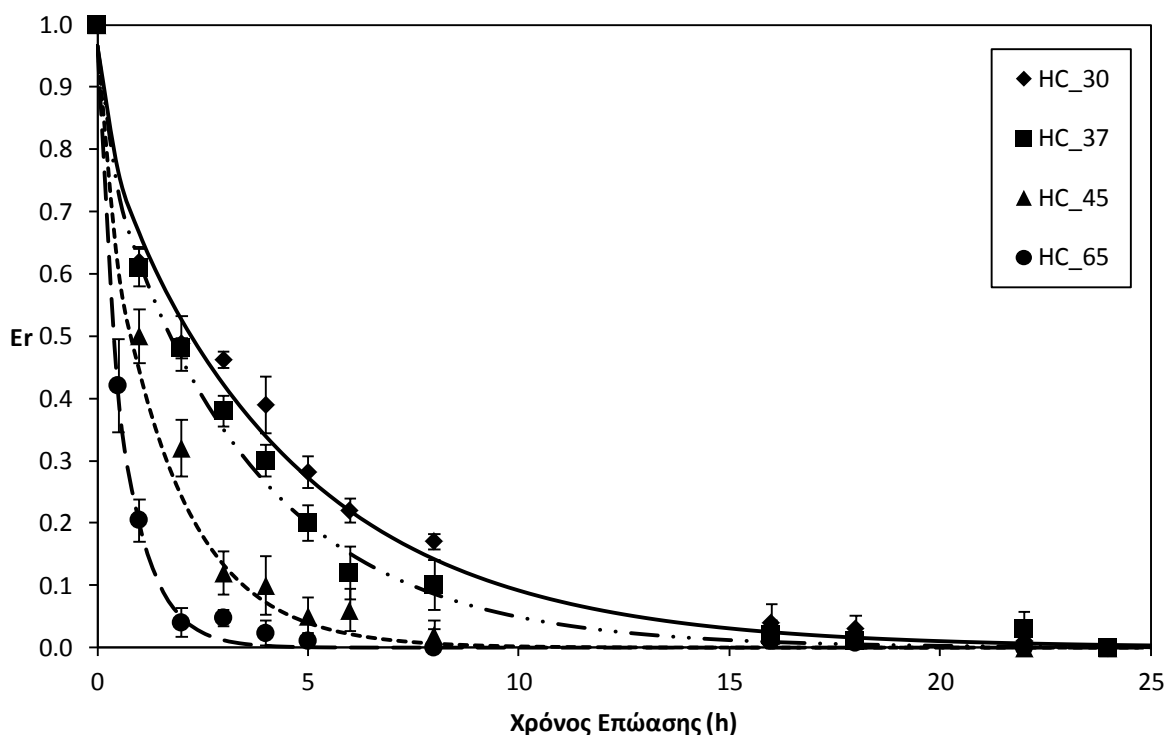


Διάγραμμα 5.6. Αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης σε αυτολυμένα κύτταρα 24 h στους 52°C για κάθε θερμοκρασία επώασης

Η επίδραση της θερμοκρασίας καθώς και η συμπεριφορά των αυτολυμένων κυττάρων 24 h που παρουσιάζεται στο *Διάγραμμα 5.6.* είναι αντίστοιχη με αυτήν των αυτολυμένων κυττάρων 8 h. Και σε αυτήν την περίπτωση οι καμπύλες είναι απότομες λόγω της μεγάλης αύξησης της διαπερατότητας των κυττάρων της μαγιάς, συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος πως σε χρόνο περίπου 2 h και 3 h για τις θερμοκρασίες επώασης 65°C και 45°C αντίστοιχα επιτυγχάνεται η τιμή

0.1 του αδιάστατου φορτίου ενθυλάκωσης, ενώ ο αντίστοιχος χρόνος της τιμής αυτής για την θερμοκρασία των 30°C είναι μόλις 10 h. Το γεγονός πως οι τιμές των αδιάστατων φορτίων δεν διαφέρουν σημαντικά με αυτές της 8ωρης αυτόλυσης, σημαίνει πως επιτυγχάνονται εξίσου καλά αποτελέσματα στην επιτάχυνση της ενθυλάκωσης με την αύξηση της διαπερατότητας, αποφεύγοντας 14 επιπλέον ώρες αυτόλυσης στους 52°C, γεγονός που συμφαίρει τόσο χρονικά όσο και ενεργειακά.

Για όλες αυτές τις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, πρέπει να τονιστεί το γεγονός πως οι τελικές τιμές του φορτίου ενθυλάκωσης είναι πρακτικά ίσες ($35.6 \pm 1.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$), χωρίς να επηρεάζονται από την θερμοκρασία επώασης ή την προκατεργασία των κυττάρων, δηλαδή οι χρόνοι ολοκλήρωσης της διεργασίας αποσκοπούν στην επίτευξη της ίδιας συγκέντρωσης ενθυλακωμένου ελαίου. Ακολουθεί η περιγραφή του φαινομένου του εγκλεισμού του ελαίου στα ομογενοποιημένα κύτταρα, των οποίων η τελική συγκέντρωση διαφοροποιείται.



Διάγραμμα 5.7. Αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης σε ομογενοποιημένα κύτταρα στα 800 bar με 4 διελεύσεις για κάθε θερμοκρασία επώασης

Όπως προέκυψε στο *Διάγραμμα 5.7*, οι καμπύλες είναι εξίσου απότομες με εκείνες των αυτολυμένων κυττάρων. Η επίδραση της θερμοκρασίας είναι εξίσου έντονη με αυτήν της περίπτωσης των AC24, και το 90% του φαινομένου πραγματοποιείται σε παραπλήσιους χρόνους με αυτήν την κατηγορία κυττάρων. Παρόλη την επίτευξη της αύξησης του ρυθμού της ενθυλάκωσης με την προκατεργασία της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, το μέγιστο φορτίο ενθυλάκωσης που επιτυγχάνεται με την ομογενοποίηση ($23.6 \pm 0.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$) είναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με το τελικό φορτίο όλων των υπόλοιπων περιπτώσεων ($35.6 \pm 1.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$), γεγονός που όπως έχει προαναφερθεί οφείλεται στην καταστροφή της κυτταρικής δομής με την διεργασία αυτή. Περαιτέρω ανάλυση των ελάχιστων χρόνων ολοκλήρωσης της κάθε διεργασίας θα ακολουθήσει στην συνέχεια του κεφαλαίου.

5.2.3. Ελάχιστος Χρόνος Ολοκλήρωσης του Φαινομένου του Εγκλεισμού

Όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης επιταχύνει την ενθυλάκωση του ελαίου, αυξάνοντας τον φαινόμενο συντελεστή διάχυσης. Επιπλέον οι διάφορες κατεργασίες κυτταρικής διάρρηξης των κυττάρων της μαγιάς επιταχύνουν την διαδικασία σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα. Ακόμα, υπάρχουν επεξεργασίες οι οποίες επιφέρουν μεγαλύτερες τιμές φαινόμενων συντελεστών διάχυσης, έναντι άλλων επεξεργασιών (π.χ. στα κύτταρα AC24 προέκυψαν μεγαλύτεροι συντελεστές διάχυσης από τα PEF1, σε ίδιες θερμοκρασίες).

Η τιμή του τελικού φορτίου ενθυλάκωσης (E_L) επιτυγχάνεται όταν το αδιάστατο φορτίο ενθυλάκωσης (E_r) πάρει την τιμή μηδέν. Λόγω της εκθετικής μορφής της *Εξίσωσης 5.3.*, θεωρητικά αυτό συμβαίνει όταν ο χρόνος επώασης τείνει στο άπειρο ($\lim_{t \rightarrow \infty} E_r = 0$). Εξαιτίας αυτής της μη πρακτικής συνθήκης, στα πλαίσια αυτής της εργασίας έγινε η παραδοχή πως όταν η τιμή του αδιάστατου φορτίου γίνει $E_r = 0.1$, δηλαδή το φαινόμενο της ενθυλάκωσης ολοκληρωθεί κατά το 90%, θα θεωρείται πως η διεργασία ολοκληρώθηκε. Ο χρόνος κατά τον οποίο επιτευχθεί η τιμή 0.1 του αδιάστατου φορτίου, θεωρήθηκε ο ελάχιστος χρόνος επώασης για την ολοκλήρωση του φαινομένου, και στην εργασία αυτή θα συμβολίζεται ως t_{90} . Η παραδοχή αυτή έγινε με στόχο τη σύγκριση των απαιτούμενων χρόνων επίτευξης του μέγιστου φορτίου ενθυλάκωσης για κάθε συνθήκη θερμοκρασίας και κυτταρικής επεξεργασίας.

Ο χρόνος t_{90} υπολογίστηκε με τη βοήθεια των τιμών των συντελεστών διάχυσης του Πίνακα 5.3. και της *Εξίσωσης 5.3.* Με την χρήση της εντολής Solver του λογισμικού Excel (Microsoft Excel 2010), υπολογίστηκε ο χρόνος για την συνθήκη $E_r = 0.1$, για κάθε περίπτωση. Οι τιμές t_{90} που προέκυψαν παρουσιάζονται παρακάτω στην Πίνακα 5.4..

Πίνακας 5.4. Ελάχιστος χρόνος ολοκλήρωσης (t_{90}) για κάθε θερμοκρασία και κυτταρικό υλικό

T (°C)	t_{90} (h)						
	UC	PEF1	PEF2	PEF3	AC8	AC24	HC
30	36.5±3.5 ^m	20.4±1.3 ^l	18.0±0.8 ^k	15.5±1.0 ^j	12.3±1.0 ⁱ	10.2±1.4 ^{ghi}	9.6±0.6 ^{fgh}
37	12.5±1.0 ⁱ	15.5±0.5 ^j	12.1±0.8 ⁱ	9.2±0.7 ^{efg}	8.5±0.7 ^{ef}	7.5±0.7 ^{def}	7.4±0.8 ^{de}
45	8.1±0.3 ^{ef}	11.5±0.5 ^{hi}	10.5±0.8 ^{ghi}	8.1±0.7 ^{ef}	5.6±0.1 ^{cd}	3.0±0.4 ^{ab}	3.4±0.2 ^b
65	9.4±1.1 ^{efg}	7.2±0.5 ^{de}	6.0±0.5 ^{cd}	4.7±0.5 ^{bc}	1.5±0.2 ^a	1.3±0.2 ^a	1.5±0.3 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν σημαντικές στατιστικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Όπως ήταν αναμενόμενο, ο μεγαλύτερος χρόνος t_{90} αντιστοιχεί στην θερμοκρασία των 30°C για τα κύτταρα UC, ενώ την μικρότερη τιμή κατέχουν τα κύτταρα AC24 για θερμοκρασία επώασης 65°C. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως τα ανεπεξέργαστα κύτταρα στους 30°C παρουσιάζουν την βραδύτερη ολοκλήρωση με χρόνο ολοκλήρωσης ίσο με 36.5 ± 3.5 h, ενώ την ταχύτερη ολοκλήρωση παρουσιάζουν τα κύτταρα AC24 με χρόνο t_{90} μόλις 1.3 ± 0.2 h. Να σημειωθεί ακόμα πως τα ανεπεξέργαστα κύτταρα στους 30°C είναι η μοναδική περίπτωση που παρουσιάζει χρόνο t_{90} μεγαλύτερο των 24 ωρών.

Στρέφοντας αρχικά το ενδιαφέρον μόνο στις διαφοροποιήσεις μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης, παρατηρείται πως στα ανεπεξέργαστα κύτταρα παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των θερμοκρασιών, εκτός από τις θερμοκρασίες 45 και 65°C οι οποίες είναι

παραπλήσιες. Όπως προέκυψε για τα κύτταρα αυτά, αύξηση της θερμοκρασίας κατά 7°C από τους 30°C επιταχύνει μείωση του απαιτούμενου χρόνου στο $\frac{1}{3}$, ενώ για θερμοκρασίες άνω των 45°C επιτυγχάνεται μείωση του χρόνου t_{90} έως και 4.5 φορές. Για τα κύτταρα PEF1, η επίδραση της θερμοκρασίας είναι σημαντική, επιταχύνοντας αισθητά το φαινόμενο για κάθε θερμοκρασία. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται μια σταδιακή μείωση του χρόνου t_{90} από τις 20.4 ± 1.3 h των 30°C, έως και το $\frac{1}{3}$ αυτής της τιμής για την θερμοκρασία των 65°C. Η θερμοκρασιακή εξάρτηση του χρόνου t_{90} για τις περιπτώσεις των κυττάρων PEF2 και PEF3 είναι αντίστοιχη με αυτήν των κυττάρων PEF1, με σημαντικές διαφορές να παρατηρούνται μεταξύ όλων των θερμοκρασιών, με εξαίρεση τις θερμοκρασίες των 37 και 45°C, όπου οι τιμές προκύπτουν παραπλήσιες, πάντα όμως με τους χρόνους να μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Να σημειωθεί ακόμα πως για τα κύτταρα PEF3, παρατηρείται η μοναδική τιμή t_{90} μικρότερη των 10 h στην θερμοκρασία των 37°C, συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Για τα αυτολυμένα κύτταρα, χρόνου αυτόλησης 8 h, παρατηρούνται και πάλι σημαντικές διαφορές μεταξύ των ελάχιστων χρόνων ολοκλήρωσης, εντονότερες μάλιστα από αυτές των κυττάρων που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Στην περίπτωση των κυττάρων αυτών, ο χρόνος t_{90} για την θερμοκρασία των 30°C έχει την τιμή των 12.3 ± 1.0 h η οποία μειώνεται κατά 8 φορές στην θερμοκρασία των 65°C, όπου το φαινόμενο ολοκληρώνεται σε χρόνο μικρότερο των 2 ωρών. Οι χρόνοι t_{90} για τα κύτταρα AC24 παρουσιάζουν εξίσου έντονες διαφοροποιήσεις, όπως και στην περίπτωση των AC8, με την διαφορά πως στις δύο υψηλές θερμοκρασίες (45 και 65°C) οι χρόνοι είναι σχετικά παραπλήσιοι με τον χρόνο ολοκλήρωσης στους 45°C να είναι περίπου 3 h, ενώ στους 65°C η τιμή που επιτυγχάνεται είναι η μικρότερη συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις (1.3 ± 0.2 h). Αξιοσημείωτο είναι ακόμα το γεγονός πως στους 30°C το φαινόμενο ολοκληρώνεται περίπου εντός 10 ωρών. Τέλος, οι τιμές t_{90} των ομογενοποιημένων κυττάρων είναι παραπλήσιες με αυτές των AC24, παρουσιάζοντας εξίσου σημαντικές διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης.

Συγκρίνοντας τις διάφορες κατηγορίες κυττάρων ανά θερμοκρασία, στους 30°C προκύπτουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ σχεδόν όλων των κυτταρικών υλικών, με τις μοναδικές ομαδοποιήσεις που παρατηρούνται να είναι αυτές των αυτολυμένων κυττάρων (8 και 24 h), και των AC24 με τα ομογενοποιημένα κύτταρα. Η περίπτωση της πιο αργής διεργασίας, όπως προαναφέρθηκε είναι αυτή των ανεπεξέργαστων κυττάρων ($t_{90} \approx 36.5$ h), στους 30°C. Ακολουθούν τα κύτταρα τα οποία επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, με τον χρόνο ολοκλήρωσης να μειώνεται από την επεξεργασία PEF1 προς την επεξεργασία PEF3. Μεγάλη εντύπωση παρουσιάζει η δραματική μείωση του χρόνου t_{90} ακόμα και με την συνθήκη PEF1, κατά την οποία στους 30°C το φαινόμενο ολοκληρώθηκε περίπου 16 h νωρίτερα σε σχέση με την αντίστοιχη επώαση των UC. Για τα κύτταρα PEF2 προέκυψε ένας χρόνος ολοκλήρωσης ίσος με τον μισό του αντίστοιχου χρόνου των UC, ενώ με την συνθήκη PEF3 επιτυγχάνεται ένας χρόνος ολοκλήρωσης ίσος με 15.5 ± 1.0 h στους 30°C. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην δημιουργία πόρων στην επιφάνεια των κυττάρων της μαγιάς με την επεξεργασία αυτή, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ενθυλάκωσης. Αμέσως μετά, μικρότεροι χρόνοι t_{90} επιτυγχάνονται για τα αυτολυμένα κύτταρα των 8 h και των 24 h, που οι χρόνοι που προκύπτουν είναι αντίστοιχα 3 και 3.5 φορές περίπου μικρότεροι από τον χρόνο ολοκλήρωσης για τα UC στους 30°C. Η μεγάλη αυτή επιτάχυνση της ενθυλάκωσης επιτυγχάνεται με την διάρρηξη του κυτταρικού περιβλήματος των κυττάρων της μαγιάς, με αποτέλεσμα το έλαιο να δέχεται με μικρότερη αντίσταση εντός των κυττάρων. Το κυτταρικό υλικό που παρουσιάζει την ταχύτερη ολοκλήρωση ενθυλάκωσης είναι αυτό των ομογενοποιημένων κυττάρων, με χρόνο t_{90} περίπου ίσο με 9.6 h. Η μικρή τιμή αυτή σχετίζεται με την πλήρη διάρρηξη των κυττάρων της μαγιάς κατά την ομογενοποίηση, με αποτέλεσμα την ταχεία διάχυση του ελαίου στις κυτταρικές δομές

αυτές. Δεν πρέπει βέβαια να παραλείπεται το γεγονός πως το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης των κυττάρων HC είναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με αυτό των υπόλοιπων κυττάρων.

Στην θερμοκρασία των 37°C το κυτταρικό υλικό που παρουσιάζει τον μεγαλύτερο χρόνο ολοκλήρωσης είναι αυτό της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία PEF1, το οποίο διαφοροποιείται με όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες κυττάρων αυτής της θερμοκρασίας επώασης, παρουσιάζοντας έναν χρόνο t_{90} περίπου ίσο με 15.5 h. Αμέσως ταχύτερη ομάδα αποτελεί αυτή η οποία περιλαμβάνει τα ανεπεξέργαστα κύτταρα και τα κύτταρα PEF2 που παρουσιάζουν αμφότερα χρόνο ολοκλήρωσης περίπου ίσο με 12 h. Τελευταία ομάδα αποτελούν τα κύτταρα PEF3, AC8, AC24 και HC, τα οποία κατέχουν τους μικρότερους χρόνους ολοκλήρωσης σε αυτήν την θερμοκρασία επώασης. Συγκεκριμένα το φαινόμενο της ενθυλάκωσης του ελαίου στα κύτταρα PEF3 ολοκληρώθηκε σε 9.2 ± 0.7 h, και στα κύτταρα AC24 σε χρόνο $t_{90} = 7.5 \pm 0.7$ h. Η τιμή του χρόνου t_{90} των κυττάρων της 8ρης αυτόλυσης υπολογίστηκε 8.5 ± 0.7 h, τιμή αρκετά κοντινή αυτής των κυττάρων της επεξεργασίας PEF3, ενώ πρακτικά ίδιο χρόνο ολοκλήρωσης με τα κύτταρα της αυτόλυσης των 24 h παρουσιάζουν τα ομογενοποιημένα κύτταρα, αλλά με μικρότερο φορτίο ενθυλάκωσης. Στην θερμοκρασία αυτή (37°C), οι επεξεργασίες PEF1 και PEF2 δεν επιφέρουν επιτάχυνση του φαινομένου του εγκλεισμού, εφόσον δεν προέκυψαν μικρότεροι χρόνοι t_{90} σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα. Παρόλα αυτά, η συνθήκη PEF3 «ανταγωνίζεται» χρονικά τις διεργασίες της αυτόλυσης και της ομογενοποίησης.

Για την θερμοκρασία των 45°C, η πιο χρονοβόρα ενθυλάκωση προέκυψε ξανά για τα κύτταρα PEF1, των οποίων η τιμή t_{90} δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με εκείνη των κυττάρων PEF2. Οι χρόνοι ολοκλήρωσης στις περιπτώσεις αυτές προέκυψαν περίπου 11.5 και 10.5 h αντίστοιχα. Τα ανεπεξέργαστα κύτταρα μαζί με τα κύτταρα PEF3 παρουσιάζουν πρακτικά ίσους χρόνους t_{90} , ίσους με 8.1 h. Τα κύτταρα AC8 διαφοροποιούνται με όλα τα υπόλοιπα κύτταρα, με χρόνο ολοκλήρωσης $t_{90} = 5.6 \pm 0.1$ h, ενώ και πάλι μικρότερες τιμές t_{90} προκύπτουν για τα αυτολυμένα κύτταρα 24 h και για τα ομογενοποιημένα κύτταρα με αντίστοιχες τιμές χρόνων ολοκλήρωσης 3.0 ± 0.4 και 3.4 ± 0.2 h. Στην θερμοκρασία αυτή (45°C), είναι προφανές πως η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία όχι μόνο δεν επιταχύνει το φαινόμενο, αλλά μάλιστα το επιβραδύνει. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην εντονότερη θερμοκρασιακή εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης για τα ανεπεξέργαστα κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται μεγαλύτερες τιμές D_{eff} στα UC σε μεγαλύτερη θερμοκρασία. Περαιτέρω σχόλια σχετικά με την εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία θα ακολουθήσει στην επόμενη παράγραφο αυτού του κεφαλαίου. Επίσης, οι διεργασίες της αυτόλυσης και της ομογενοποίησης επιφέρουν και πάλι έντονη μείωση του χρόνου ολοκλήρωσης του εγκλεισμού έως και κατά το $\frac{1}{3}$ του αντίστοιχου χρόνου t_{90} των ανεπεξέργαστων κυττάρων στους 45°C.

Στην υψηλή θερμοκρασία επώασης των 65°C, η τιμή του φαινομένου συντελεστή διάχυσης των κυττάρων UC δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους 45°C, με αποτέλεσμα τα ανεπεξέργαστα κύτταρα να παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο χρόνο $t_{90} = 9.4 \pm 1.1$ h, έναντι των υπολοίπων περιπτώσεων. Λόγω αυτού, και συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος πως η θερμοκρασιακή εξάρτηση των συντελεστών διάχυσης για τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία διατηρείται και μετά τους 45°C, στην θερμοκρασία αυτή τα κύτταρα PEF1, PEF2 και PEF3 παρουσιάζουν μικρότερους χρόνους ολοκλήρωσης ενθυλάκωσης σε σχέση με τα κύτταρα UC, με την τιμή του χρόνου t_{90} των κυττάρων της επεξεργασίας PEF3 να προκύπτει περίπου η μισή αυτής των ανεπεξέργαστων. Τέλος, εντυπωσιακά μικρές τιμές t_{90} παρουσιάζονται για τα αυτολυμένα και τα ομογενοποιημένα κύτταρα, για τα οποία η ενθυλάκωση του ελαίου ολοκληρώνεται σε χρόνο μικρότερο των 2 h.

Όπως προέκυψε, οι προκατεργασίες των κυττάρων της μαγιάς οι οποίες επιταχύνουν έντονα την ολοκλήρωση της ενθυλάκωσης είναι αυτές της αυτόλυσης (8 και 24h) και της ομογενοποίησης. Δυστυχώς η διεργασία της αυτόλυσης απαιτεί την έκθεση των κυττάρων για αρκετές ώρες (έως και 24 h) στους 52°C, ενώ με την ομογενοποίηση μειώνεται σημαντικά το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης των καψουλών. Λόγω αυτών των μειονεκτημάτων, θα ήταν επιθυμητό η επεξεργασία να περιλαμβάνει την χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, κατά την οποία η τελική συγκέντρωση του ενθυλακωμένου ελαίου δεν επηρεάζεται, καθώς και δεν απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλοι χρόνοι επεξεργασίας.

5.2.4. Επίδραση της Θερμοκρασίας στον Φαινόμενο Συντελεστή Διάχυσης και Εφαρμογή της Εξίσωσης Arrhenius

Όπως προέκυψε από την μαθηματική μοντελοποίηση των πειραματικών δεδομένων, ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης εξαρτάται από την θερμοκρασία επώασης. Η θερμοκρασιακή του εξάρτηση διαφοροποιείται ανάλογα με την κατεργασία κυτταρικής διάρρηξης στην οποία υποβλήθηκαν τα κύτταρα, πριν από την διαδικασία της ενθυλάκωσης. Μία από της πιο διαδεδομένες μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν την εξάρτηση ενός ρυθμού από την θερμοκρασία, είναι η εξίσωση Arrhenius, η οποία περιγράφεται από την σχέση:

$$k = A \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (5.4.)$$

όπου, T η θερμοκρασία σε K , k ο ρυθμός ενός φαινομένου στην θερμοκρασία T , A ο προεκθετικός παράγοντας, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης του φαινομένου σε J και R η παγκόσμια σταθερά των ιδανικών αερίων ίση με $8.314 \frac{Pa \cdot m^3}{mol \cdot K}$. Η μαθηματική μοντελοποίηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης συναρτήσε της θερμοκρασίας, για κάθε διεργασία κυτταρικής διάρρηξης, πραγματοποιήθηκε με την εξίσωση:

$$\ln D_{eff} = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + \ln D_{eff,ref} \quad (5.5.)$$

όπου, T η θερμοκρασία σε K , D_{eff} ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης του ελαίου στα κύτταρα της μαγιάς σε m^2/s στην θερμοκρασία T , T_{ref} θερμοκρασία αναφοράς σε K , $D_{eff,ref}$ ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης του ελαίου στα κύτταρα της μαγιάς σε m^2/s στην θερμοκρασία T_{ref} , E_a η ενέργεια ενεργοποίησης του εγκλεισμού σε J και R η παγκόσμια σταθερά των ιδανικών αερίων ίση με $8.314 \frac{Pa \cdot m^3}{mol \cdot K}$.

Με την χρήση της Εξίσωσης 5.5. και του λογισμικού πακέτου SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19, SPSS Inc., IBM Company, Release 19.0.0.) πραγματοποιήθηκε η μαθηματική μοντελοποίηση του φυσικού λογαρίθμου του φαινομένου συντελεστή διάχυσης με τον θερμοκρασιακό όρο $\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)$, όπου ως θερμοκρασία T_{ref} επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 30°C. Από κάθε προσαρμογή προέκυψε η τιμή της κλίσης κάθε ευθείας $\left(-\frac{E_a}{R}\right)$, από την οποία υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης κάθε διεργασίας. Η ενέργεια ενεργοποίησης είναι μία παράμετρος η οποία δηλώνει πόσο έντονη ή όχι είναι η θερμοκρασιακή εξάρτηση ενός φαινομένου. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, μεγάλες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης, δηλώνουν έντονη εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία, δηλαδή μικρές μεταβολές στην θερμοκρασία, επιφέρουν μεγάλες αλλαγές στον φαινόμενο συντελεστή διάχυσης. Να σημειωθεί πως η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C έως τους 65°C, επιφέρει αύξηση στην τιμή του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, με μόνη εξαίρεση την περίπτωση των ανεπεξέργαστων

κυττάρων (UC), στην οποία η θερμοκρασιακή εξάρτηση μετά τους 45°C σταματάει, όπως και σχολιάστηκε από τις τιμές του Πίνακα 5.3.. Οι τιμές των ενεργειών ενεργοποίησης που υπολογίστηκαν από τις κλίσεις των ευθειών, οι οποίες προέκυψαν από την μαθηματική προσαρμογή της Εξίσωσης 5.5., και οι τιμές των δεικτών R^2 κάθε προσαρμογής παρατίθενται στον Πίνακα 5.5..

Πίνακας 5.5. Τιμές ενέργειας ενεργοποίησης και δείκτης R^2 της προσαρμογής της Εξίσωσης 5.5. για κάθε κυτταρικό υλικό

Κυτταρικό Υλικό	E_a (kJ/mol)	R^2	Θερμοκρασιακό Εύρος (°C)
PEF1	24.6±1.9 ^a	0.9881	30 – 65
PEF2	25.2±2.5 ^a	0.9811	30 – 65
PEF3	26.5±4.7 ^a	0.9422	30 – 65
AC8	56.0±4.4 ^b	0.9856	30 – 65
AC24	52.6±7.1 ^b	0.9653	30 – 65
HC	47.0±5.2 ^b	0.9764	30 – 65

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν σημαντικές στατιστικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Αρχικά πρέπει να σχολιαστεί πως οι δείκτες προσαρμογής R^2 προέκυψαν μεγαλύτεροι από 0.9 για κάθε προσαρμογή. Το γεγονός αυτό δηλώνει πως η εξίσωση Arrhenius περιγράφει αποδεκτά την εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία.

Στρέφοντας το ενδιαφέρον στις τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης που προέκυψαν, παρατηρείται πως η μεγαλύτερη θερμοκρασιακή εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης παρουσιάζεται στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων, με τιμή $E_a = 78.6 \pm 12.6$ kJ/mol. Η τιμή αυτή είναι αρκετά υψηλή, υποδηλώνοντας πως μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας επιφέρουν αρκετά μεγάλες μεταβολές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως είναι γενικά μια αρκετά υψηλή τιμή ενέργειας ενεργοποίησης, χωρίς όμως να θεωρείται παράλογη. Ακόμα, δεν πρέπει να αγνοείται το γεγονός ότι η τιμή αυτή ισχύει έως και την θερμοκρασία των 45°C, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται επιτάχυνση της ενθυλάκωσης σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Επίσης, το γεγονός πως η ενέργεια ενεργοποίησης των κυττάρων UC είναι υψηλότερη από τις αντίστοιχες ενέργειες που προέκυψαν για τα επεξεργασμένα κύτταρα, έως και τους 45°C, υποδηλώνει πως η επεξεργασίες κυτταρικής διάρρηξης μπορεί να αυξάνουν τις τιμές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, αλλά υποβαθμίζουν την επίδραση της θερμοκρασίας σε αυτόν. Ωστόσο οι διεργασίες κυτταρικής διάρρηξης επεκτείνουν το θερμοκρασιακό εύρος της επίδρασης έως και τους 65°C. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στο ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης αυξάνει την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης των ανεπεξέργαστων κυττάρων έως και τους 45°C, ενώ στα επεξεργασμένα κύτταρα που η μεμβράνη έχει διαρρηχτεί (ΠΗΠ) ή καταστραφεί (αυτόλυση), η θερμοκρασία επιδρά με διαφορετικό μηχανισμό στην επιτάχυνση της ενθυλάκωσης.

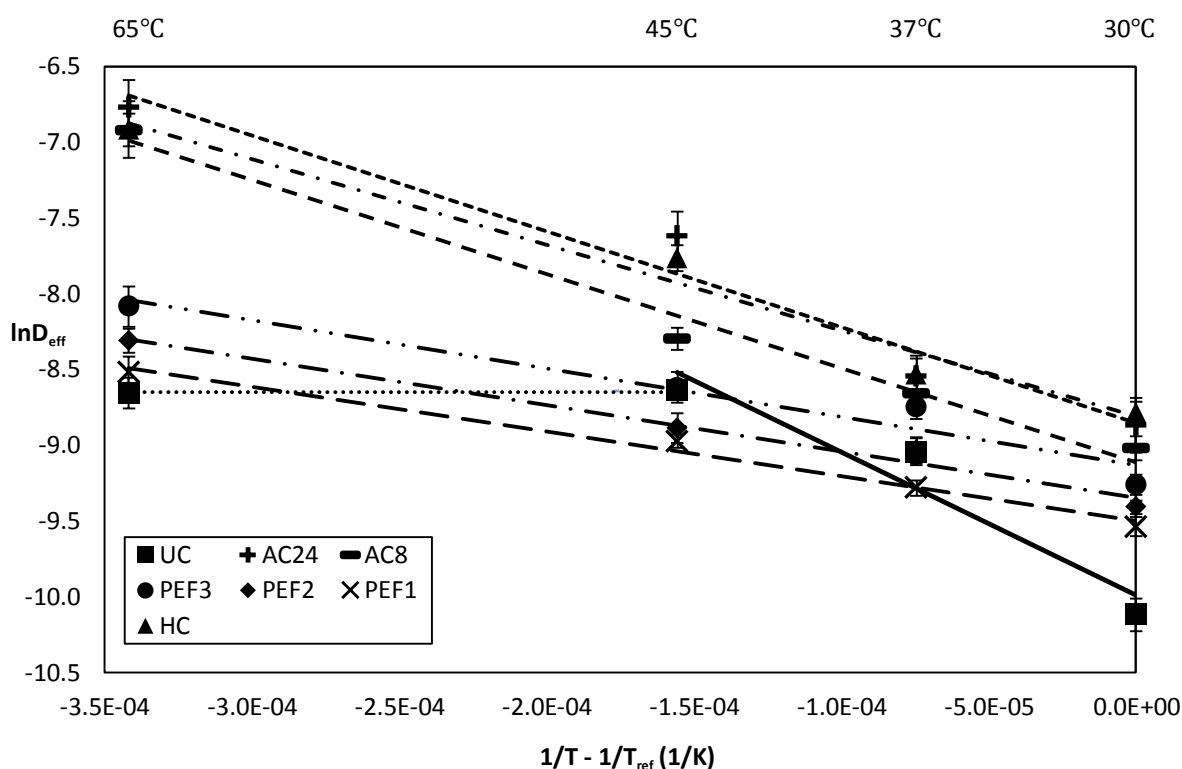
Αμέσως μικρότερες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης παρουσιάζουν τα αυτολυμένα κύτταρα 8 και 24 h (AC8 και AC24), και τα ομογενοποιημένα κύτταρα (HC). Οι ενέργειες ενεργοποίησης για τις περιπτώσεις αυτές δεν παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές, γεγονός που σημαίνει ότι η θερμοκρασία επιδρά με παρόμοιο τρόπο στην διάχυση του ελαίου ρίγανης εντός των κυττάρων. Το γεγονός αυτό μεταφράζεται στο ότι ο χρόνος αυτόλυσης από τις 8 h έως τις 24 h δεν επιφέρει αλλαγές στην επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινόμενο του εγκλεισμού. Επιπλέον η

διεργασία της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης (800 bar, 4 διελεύσεις) επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα στην θερμοκρασιακή εξάρτηση της διάχυσης του ελαίου στα κύτταρα, με την διεργασία της αυτόλυσης. Δεδομένου πως οι κατεργασίες της αυτόλυσης και της ομογενοποίησης θεωρούνται ιδιαίτερα έντονες, οι ομοιότητες μεταξύ των ενεργειών ενεργοποίησης θεωρούνται λογικές, αν και το γεγονός πως διαρρηγνύουν τα κύτταρα της μαγιάς με διαφορετικό μηχανισμό (ενζυμικά και μηχανικά αντίστοιχα) οι διαφορές μεταξύ τους παρατηρούνται στο τελικό φορτίο ενθυλάκωσης. Αν και διαρρηγμένα σε μεγάλο βαθμό, τα αυτολυμένα κύτταρα παρουσιάζουν μια πιο οργανωμένη δομή, έναντι των ομογενοποιημένων κυττάρων, των οποίων το σφαιρικό σχήμα και η σταθερότητα έχουν αλλοιωθεί από την έντονη μηχανική καταπόνηση, με αποτέλεσμα την ενθυλάκωση μικρότερης ποσότητας ελαίου σε αυτά. Οι τιμές E_a κυμαίνονται περίπου στα 52 kJ/mol, και αν και μικρότερες από την τιμή των ανεπεξέργαστων κυττάρων, δεν μπορούν να θεωρηθούν μικρές, με μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας να επιφέρουν επίσης αισθητές μεταβολές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης. Πρέπει ακόμα να τονιστεί το γεγονός πως η θερμοκρασιακή εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης για τα αυτολυμένα κύτταρα, αν και είναι μικρότερη από αυτήν των ανεπεξέργαστων κυττάρων, οι τιμές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των κυττάρων UC. Η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης παρουσιάζει το πώς η θερμοκρασία επιταχύνει το φαινόμενο, και όχι το πόσο γρήγορα ολοκληρώνεται η ενθυλάκωση του ελαίου. Τέλος, να σημειωθεί πως από τους 45°C έως και τους 65°C οι αντίστοιχες τιμές E_a διατηρούνται για τα κύτταρα AC8, AC24 και HC, σε αντίθεση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα από η επίδραση της θερμοκρασίας εξαφανίζεται.

Την μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης παρουσιάζουν τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF1, PEF2 και PEF3). Οι τιμές E_a της διάχυσης στα κύτταρα αυτά δεν παρουσιάζουν διαφορές, κυμαινόμενες και οι τρεις κοντά στην τιμή των 25 kJ/mol. Με αυτά τα αποτελέσματα επαληθεύεται η παρατήρηση σχετικά με την παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση του φαινομένου της ενθυλάκωσης μεταξύ των επεξεργασμένων κυττάρων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, που σχολιάστηκε από την σύγκριση των συντελεστών διάχυσης και των τάσεων των καμπυλών που προέκυψαν από την προσαρμογή της *Εξίσωσης 5.3*. σε αυτές τις κατηγορίες κυττάρων. Το γεγονός πως οι ενέργειες ενεργοποίησης δεν διαφοροποιούνται μεταξύ των κυττάρων αυτών, σημαίνει πως η ειδική ενέργεια της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία από την τιμή των 3.2 kJ/kg έως και των 107.0 kJ/kg, δεν επιφέρει μεταβολές στην θερμοκρασιακή εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης. Αν και η αύξηση της θερμοκρασίας δεν επιφέρει τόσο μεγάλη αύξηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα, το θερμοκρασιακό εύρος επίδρασης της θερμοκρασίας επεκτείνεται έως τους 65°C, σε αντίθεση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα για τα οποία η επίδραση της θερμοκρασίας σταματάει στους 45°C, καθώς και το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης δεν επηρεάζεται, πράγμα που παρατηρείται στα ομογενοποιημένα κύτταρα. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να αγνοηθεί το γεγονός πως ο ρυθμός αύξησης του φαινομένου συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία για τα κύτταρα PEF1, PEF2 και PEF3, είναι ο μισός σε σχέση με τα αυτολυμένα (AC8 και AC24) και τα ομογενοποιημένα κύτταρα (HC), ενώ συγκριτικά με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα (UC) έως και τους 45°C, η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης των κυττάρων PEF είναι περίπου ίση με το $\frac{1}{3}$ αυτής των UC. Βάσει των παραπάνω, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι δημιουργούνται με τη επεξεργασία των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, μειώνουν την επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινόμενο της ενθυλάκωσης του ελαίου, χωρίς αυτό όμως να σημαίνει πως δεν πραγματοποιείται αύξηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, σε ορισμένες θερμοκρασίες.

Εκτός από την σύγκρισή των διάφορων τιμών της ενέργειας ενεργοποίησης που υπολογίστηκαν για την διάχυση του ελαίου σε κάθε κυτταρικό υλικό, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα διαγράμματα που προέκυψαν από την προσαρμογή της *Εξίσωσης 5.5.*, από τα οποία μπορούν να αντληθούν συμπεράσματα όχι μόνο για την επίδραση της θερμοκρασίας στον φαινόμενο συντελεστή διάχυσης, αλλά και για τις ίδιες τις τιμές του. Ακολουθεί το *Διάγραμμα 5.8.*, στο οποίο παρουσιάζονται οι ευθείες που προέκυψαν για κάθε κατηγορία κυττάρων.

Το *Διάγραμμα 5.8.* αποτελεί μία συνολική εικόνα της παρουσίασης του φαινομένου συντελεστή διάχυσης συναρτήσει της θερμοκρασίας. Στον οριζόντιο άξονα αναπαρίσταται η ανεξάρτητη μεταβλητή $\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)$, όπου T η θερμοκρασία επώασης σε K, ενώ ως θερμοκρασία T_{ref} επιλέχθηκε αυθαίρετα η θερμοκρασία των 30°C (303 K). Συνεπώς η τιμή τετμημένης 0 του οριζόντιου άξονα αντιστοιχεί στην θερμοκρασία των 30°C, καθώς όσο η τετμημένη αλγεβρικά μειώνεται (δηλ. από τα δεξιά του οριζόντιου άξονα προς τα αριστερά) η τιμή της θερμοκρασίας επώασης αυξάνεται. Στον κατακόρυφο άξονα αντιστοιχεί η τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής $\ln D_{eff}$, που κάθε μεταβολή μίας λογαριθμική μονάδας αντιστοιχεί σε μεταβολή μίας τάξης μεγέθους του φαινομένου συντελεστή διάχυσης D_{eff} σε m^2/s .

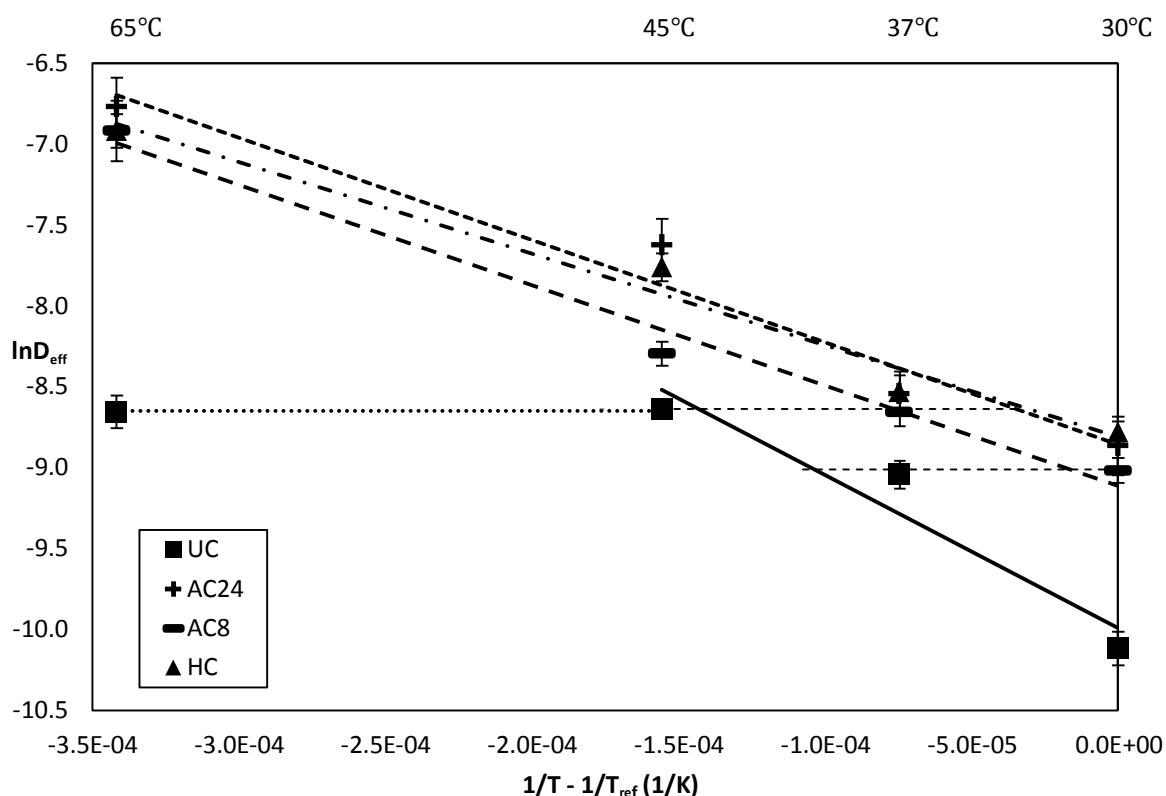


Διάγραμμα 5.8. Διαγράμματα Arrhenius για το συντελεστή διάχυσης του ελαίου σε κάθε κυτταρικό υλικό

Παρατηρώντας την ευθεία των ανεπεξέργαστων κυττάρων (UC) είναι εμφανές πως είναι η πιο απότομη ευθεία συγκριτικά με τις άλλες, όπως ήταν αναμενόμενο από την τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης που υπολογίστηκε. Μάλιστα, από τους 30°C έως τους 45°C παρατηρείται αύξηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης έως και 1.5 λογαριθμικές μονάδες. Επίσης είναι ξεκάθαρο πως μετά τους 45°C ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης δεν επηρεάζεται. Οι ευθείες των κυττάρων AC8 και AC24 είναι παράλληλες, εξίσου αναμενόμενο εφόσον έχουν πρακτικά την ίδια τιμή ενέργειας ενεργοποίησης. Τα κύτταρα HC παρουσιάζουν παραπλήσια κλίση με τα αυτολυμένα. Στις περιπτώσεις αυτές, η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C στους 65°C, επιφέρει αύξηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης έως και 2 λογαριθμικούς. Ακόμα, οι ευθείες των κυττάρων που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF1, PEF2 και PEF3), προέκυψαν επίσης

παράλληλες, γεγονός που υποδηλώνει πως ο τρόπος με τον οποίο η θερμοκρασία επώασης επιδρά στο φαινόμενο της ενθυλάκωσης στα κύτταρα αυτά, είναι ο ίδιος, με αύξηση μιας τάξης μεγέθους από τους 30°C στους 65°C.

Όπως έχει προαναφερθεί, οι διεργασίες της αυτόλυσης και της ομογενοποίησης επιταχύνουν σε μεγάλο βαθμό την ολοκλήρωση του εγκλεισμού του ελαίου εντός των κυττάρων. Δυστυχώς η αυτόλυση είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, η οποία απαιτεί την έκθεση των κυττάρων της μαγιάς στους 52°C, μια θερμοκρασία αρκετά υψηλή. Επίσης η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, επηρεάζει το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης, μειώνοντας το σε σύγκρισή με εκείνο των υπολοίπων περιπτώσεων. Για τους λόγους αυτούς, θα ήταν επιθυμητό οι διεργασίες αυτές να αντικατασταθούν, έστω και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες επώασης, με την χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων.



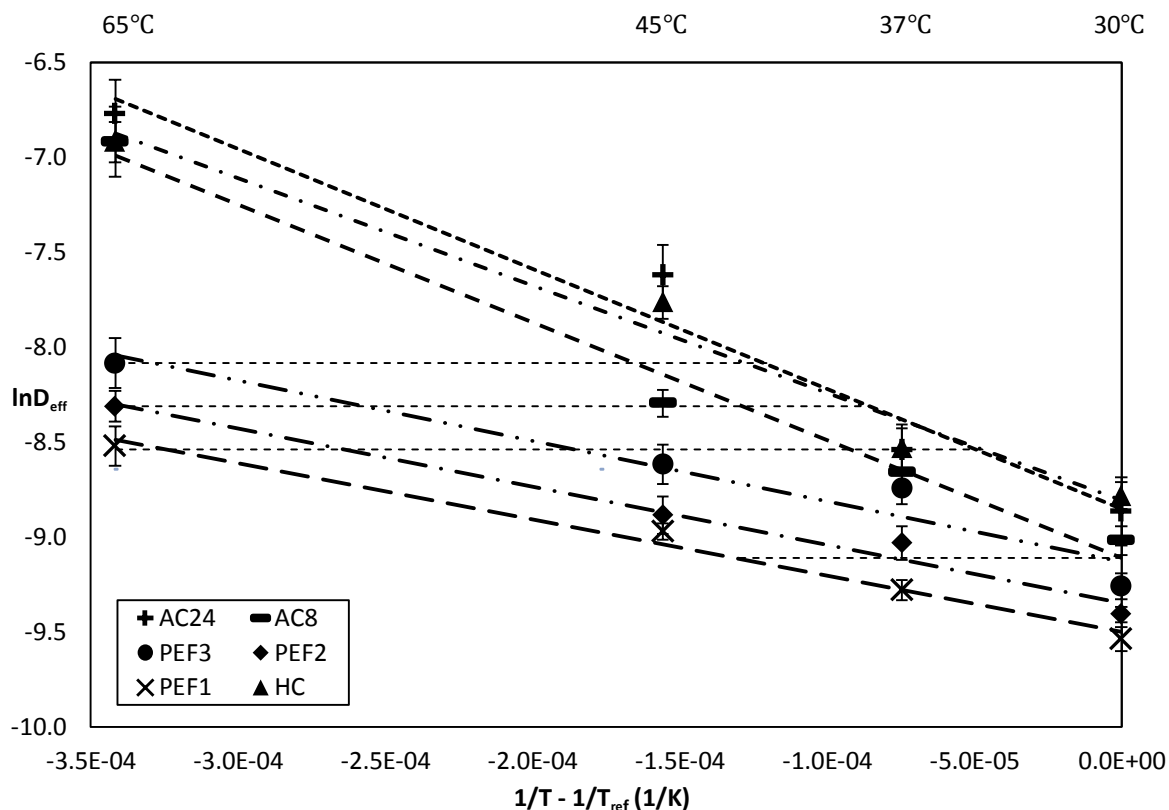
Διάγραμμα 5.9. Διαγράμματα Arrhenius για το συντελεστή διάχυσης του ελαίου σε ανεπεξέργαστα κύτταρα (UC), σε αυτολυμένα κύτταρα (AC8 και AC24) και σε ομογενοποιημένα κύτταρα (HC)

Όπως φαίνεται από το *Διάγραμμα 5.9*, η επώαση των ανεπεξέργαστων κυττάρων στους 37°C, επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα με την επώαση των κυττάρων AC8 στους 30°C. Επιπλέον η επώαση των ανεπεξέργαστων κυττάρων στους 45°C, ισοδυναμεί ως προς τον χρόνο ολοκλήρωσης και την επίτευξη του ίδιου τελικού φορτίου ενθυλάκωσης με τις επώσεις των κυττάρων AC8 και AC24 στους 37°C και στους 33°C αντίστοιχα, όπως εκτιμήθηκε από το διάγραμμα. Ακόμα, η επώαση των κυττάρων UC στους 45°C παρουσιάζει την ίδια τιμή φαινόμενου συντελεστή διάχυσης με την επώαση των ομογενοποιημένων κυττάρων (HC) στους 33°C, με τα οποία όμως επιτυγχάνεται μικρότερο φορτίο ενθυλάκωσης, ίσο με $23.6 \pm 0.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$.

Το συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από τα παραπάνω, είναι πως μπορεί να αποφευχθεί η αυτόλυση 8 h στους 52°C για θερμοκρασίες επώασης μεταξύ 30°C και 37°C καθώς και η 24ωρη αυτόλυση στην ίδια θερμοκρασία για επώσεις από τους 30°C έως τους 33°C, με την χρήση ανεπεξέργαστων κυττάρων σε θερμοκρασίες επώασης μεταξύ των 37°C και 45°C, που το ίδιο τελικό φορτίο ενθυλάκωσης επιτυγχάνεται στους ίδιους χρόνους επώασης. Για θερμοκρασίες

επώασης των κυττάρων AC8 και AC24, μεγαλύτερες των 37°C και των 33°C αντίστοιχα, δεν υπάρχει δυνατότητα αντικατάστασης της αυτόλυσης με χρήση ανεπεξέργαστων κυττάρων.

Βάσει του Διαγράμματος 5.10. μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση του φαινομένου της ενθυλάκωσης μεταξύ των αυτολυμένων και ομογενοποιημένων κυττάρων με τα κύτταρα μαγιάς που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Αρχικά, συγκρίνοντας τις ευθείες μεταξύ τους είναι εμφανές πως η κλίση των ευθειών των κυττάρων PEF1, PEF2 και PEF3 είναι αρκετά μικρότερη σε σύγκρισή με τις κλίσεις των ευθειών των AC8, AC24 και HC. Παρόλα αυτά, υπάρχουν θερμοκρασίες επώασης των κυττάρων PEF, για τις οποίες επιτυγχάνονται τα ίδια αποτελέσματα (τελικό φορτίο και χρόνος ολοκλήρωσης) με τις επώσεις των αυτολυμένων κυττάρων σε μικρότερες θερμοκρασίες επώασης.



Διάγραμμα 5.10. Διαγράμματα Arrhenius για το συντελεστή διάχυσης του ελαίου σε επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF1, PEF2 και PEF3), σε αυτολυμένα κύτταρα (AC8 και AC24) και σε ομογενοποιημένα κύτταρα (HC)

Όπως εκτιμήθηκε από το παραπάνω διάγραμμα, τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, χαμηλής ειδικής ενέργειας 3.2 kJ/kg (PEF1), παρουσιάζουν ίδιο χρόνο ολοκλήρωσης t_{90} περίπου στους 41°C σε σύγκριση με τα αυτολυμένα κύτταρα 8 h (AC8) στους 30°C. Επιπλέον, η θερμοκρασία επώασης των 65°C των κυττάρων PEF1 επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα τελικού φορτίου ενθυλάκωσης και χρόνου ολοκλήρωσης, με τις επώσεις των κυττάρων AC8 και AC24 στους 39°C και στους 34°C αντίστοιχα. Επίσης, ίδιο χρόνο t_{90} αλλά σαφώς μικρότερο τελικό φορτίο ενθυλάκωσης με τις περιπτώσεις αυτές, παρουσιάζουν τα ομογενοποιημένα κύτταρα επίσης στους 34°C, όπως εκτιμήθηκε από το διάγραμμά. Σε αυτήν την περίπτωση, η αντικατάσταση της 8ωρης αυτόλυσης με την συνθήκη PEF1 απαιτεί υψηλή θερμοκρασία επώασης (>52°C) των κυττάρων PEF1 σε σύγκριση με την αρκετά χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης των AC8, αλλά σημαντικό είναι το γεγονός πως μπορούν να αποφευχθούν 8 h αυτόλυσης. Επίσης η επεξεργασία PEF1 και η επώαση των κυττάρων αυτών στους 65°C μπορεί να αντικαταστήσει την 24ωρη έκθεση των κυττάρων στους 52°C ή την ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και στην συνέχεια την επώαση τους

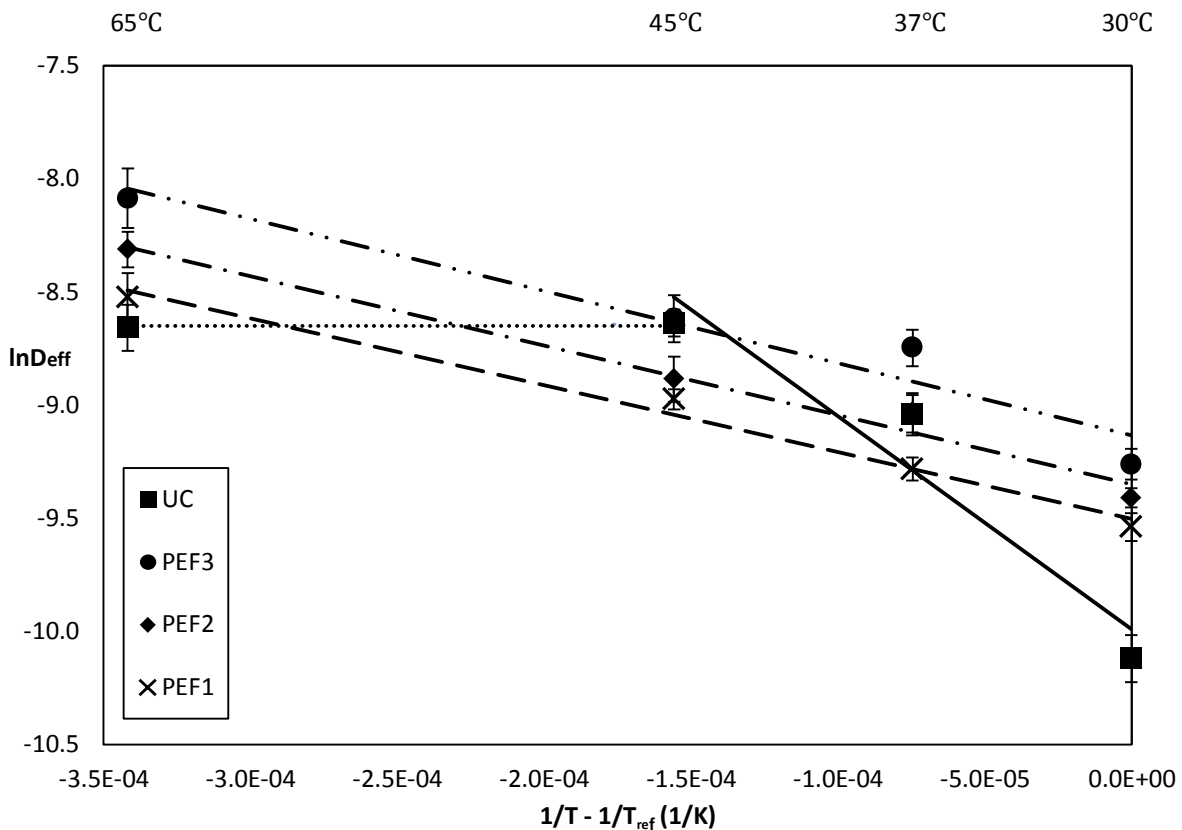
στους 34°C για το ίδιο χρονικό διάστημα. Ανακεφαλαιώνοντας, οι επώσεις μεταξύ 41 και 65°C των κυττάρων που επεξεργάστηκαν με τη συνθήκη PEF1, μπορούν να αντικαταστήσουν τις επώσεις των αυτολυμένων κυττάρων AC8 από τους 30 έως τους 39°C και των AC24 από τους 30 έως τους 34°C, επιφέροντας το ίδιο τελικό φορτίο ενθυλάκωσης σε αντίστοιχους χρόνους επώασης. Τέλος για το ίδιο θερμοκρασιακό εύρος επώασης των κυττάρων PEF1 επιτυγχάνονται παραπλήσιοι χρόνοι ολοκλήρωσης με τις επώσεις των κυττάρων HC από τους 30 έως τους 34°C, από τις οποίες όμως το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης προκύπτει μικρότερο.

Σχετικά με τα κύτταρα τα οποία επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 13.6 kJ/kg (PEF2), παρατηρούνται μεγαλύτερες τιμές φαινόμενου συντελεστή διάχυσης σε σχέση με τα κύτταρα PEF1, οι οποίες όμως χαρακτηρίζονται από την ίδια θερμοκρασιακή εξάρτηση με αυτά. Παρατηρώντας το *Διάγραμμα 5.10*, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η τιμή του φαινόμενου συντελεστή διάχυσης του ελαίου στα κύτταρα PEF2 για την θερμοκρασία των 37°C, ισούται με την αντίστοιχη τιμή των AC8 για την θερμοκρασία των 30°C. Επιπλέον, η επώαση των κυττάρων PEF2 στους 65°C επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα σχετικά με το τελικό φορτίο και τον χρόνο ολοκλήρωσης της ενθυλάκωσης με τις επώσεις των κυττάρων AC8 στους 41°C και των AC24 στους 38°C, όπως εκτιμήθηκε από το *διάγραμμα*. Ίδιο χρόνο t_{90} παρουσιάζουν και τα ομογενοποιημένα κύτταρα (HC) στους 38°C, αλλά με μικρότερη τιμή τελικού φορτίου ενθυλάκωσης. Συμπερασματικά η χρήση των κυττάρων PEF2 για το θερμοκρασιακό εύρος επώασης μεταξύ 37 και 65°C είναι ικανή να αντικαταστήσει την χρήση των κυττάρων AC8 και AC24 για τα εύρη θερμοκρασιών 30 – 41°C και 30 – 38°C αντίστοιχα, επιτυγχάνοντας το ίδιο τελικό φορτίο ενθυλάκωσης σε ίδιους χρόνους επώασης. Με άλλα λόγια η επεξεργασία των κυττάρων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 13.6 kJ/kg μπορεί να αντικαταστήσει την έκθεση των κυττάρων στους 52°C από 8 έως 24 h για τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω.

Σχετικά με τα κύτταρα PEF3, τα οποία επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg, παρατηρείται πως η επώαση τους στους 30°C ισοδυναμεί με την επώαση των αυτολυμένων κυττάρων AC8 στην ίδια θερμοκρασία. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως χωρίς την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης για τα κύτταρα PEF3, το φαινόμενο του εγκλεισμού επιτυγχάνεται στο ίδιο χρονικό διάστημα με την περίπτωση των κυττάρων AC8 στους 30°C.

Επίσης στους 65°C τα κύτταρα PEF3 παρουσιάζουν ίδιες τιμές φαινόμενου συντελεστή διάχυσης με τα κύτταρα AC8 στους 45°C και με τα κύτταρα AC24 περίπου στους 41°C, όπως εκτιμήθηκε από το *Διάγραμμα 5.10*. Όπως προκύπτει, η συνθήκη PEF3 συμφέρει να χρησιμοποιηθεί για επώσεις σε ολόκληρο το θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 30 και 65°C έναντι των διεργασιών της αυτόλυσης 8 h και 24 h, για επώσεις από τους 30 έως τους 45°C και από τους 30 έως τους 41°C αντίστοιχα. Όποια σύγκριση ισχύει μεταξύ των κυττάρων PEF3 και των AC24, ισχύει και μεταξύ των PEF3 και HC, με την διαφορά όμως πως στην περίπτωση των ομογενοποιημένων κυττάρων και πάλι το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης έχει μικρότερη τιμή.

Με βάση τα παραπάνω, είναι εμφανές πως η αύξηση της ειδικής ενέργειας της επεξεργασίας αυξάνει τον φαινόμενο συντελεστή διάχυσης του ελαίου εντός των κυττάρων, με αποτέλεσμα η εντονότερη συνθήκη (PEF3) να είναι ικανή να αντικαταστήσει τις διεργασίες της αυτόλυσης και ομογενοποίησης για περισσότερες θερμοκρασίες επώασης, επιτυγχάνοντας το ίδιο ή μεγαλύτερο τελικό φορτίο ενθυλάκωσης, και μάλιστα σε μικρότερους χρόνους επώασης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες συνθήκες παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF2 και PEF3).



Διάγραμμα 5.11. Διαγράμματα Arrhenius για το συντελεστή διάχυσης του ελαίου σε επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF1, PEF2 και PEF3) και σε ανεπεξέργαστα κύτταρα (UC)

Βάσει του Διαγράμματος 5.11. θα πραγματοποιηθεί η σύγκριση μεταξύ των συντελεστών διάχυσης του ελαίου στα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF1, PEF2 και PEF3) και στα ανεπεξέργαστα κύτταρα (UC). Εξαιτίας της υψηλής τιμής ενέργειας ενεργοποίησης της ενθυλάκωσης στα ανεπεξέργαστα κύτταρα, η κλίση της αντίστοιχης ευθείας είναι αρκετά μεγάλη, με αποτέλεσμα τα τέμνει τις ευθείες Arrhenius των συντελεστών διάχυσης του ελαίου σε κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Όπως προέκυψε από το διάγραμμα, για θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 37°C έως και περίπου τους 60°C τα ανεπεξέργαστα κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές φαινομένου συντελεστή διάχυσης από τα κύτταρα PEF1, ενώ όσο η θερμοκρασία ελαττώνεται από τους 37°C έως τους 30°C οι αντίστοιχοι συντελεστές διάχυσης των PEF1 είναι αρκετά υψηλότεροι από αυτούς των UC, έως και κατά μισή λογαριθμική μονάδα. Να σημειωθεί πως από τους 60°C έως τους 65°C δεν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των συντελεστών διάχυσης των δύο αυτών κυτταρικών υλικών, και δεδομένου πως ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης στα ανεπεξέργαστα κύτταρα δεν μεταβάλλεται μετά από τους 45°C, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η επεξεργασία των κυττάρων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 3.2 kJ/kg συμφέρει για θερμοκρασίες επώασης μικρότερες των 37°C.

Η ευθεία Arrhenius του συντελεστή διάχυσης του ελαίου σε κύτταρα PEF2, τα οποία επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 13.6 kJ/kg, βρίσκεται κατά μικρότερο μέρος της κάτω από την αντίστοιχη ευθεία των ανεπεξέργαστων κυττάρων, σε σχέση με την ευθεία των κυττάρων PEF1. Συγκεκριμένα, όπως εκτιμήθηκε από το παραπάνω διάγραμμα, για θερμοκρασίες επώασης μεταξύ 30 και 40°C καθώς και για θερμοκρασίες μεταξύ 53 και 65°C επιτυγχάνεται επιτάχυνση του φαινομένου της διάχυσης του ελαίου στα κύτταρα PEF2, σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα.

Τέλος, είναι εμφανές πως η καμπύλη των κυττάρων PEF3 είναι πάνω από την καμπύλη των UC για ολόκληρο το θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 30 – 65°C, με μοναδική εξαίρεση την

θερμοκρασία των 45°C στην οποία οι συντελεστές διάχυσης είναι μεταξύ τους ίσοι. Οι μεγαλύτερες αλλαγές παρατηρούνται στις θερμοκρασίες των 30°C και 65°C, όπου με την εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg επιτυγχάνεται αύξηση των τιμών $\ln D_{\text{eff}}$ κατά περίπου μίας μονάδας και 0.6 μονάδων αντίστοιχα, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των ανεπεξέργαστων κυττάρων.

Ανακεφαλαιώνοντας, η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία μπορεί να επιφέρει σημαντικές διαφορές στον ρυθμό διάχυσης του ελαίου στα κύτταρα σε χαμηλές θερμοκρασίες, συγκριτικά με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, επιταχύνοντας το φαινόμενο του εγκλεισμού. Όσο πιο υψηλή είναι η ειδική ενέργεια της επεξεργασίας παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, ο φαινόμενος συντελεστής διάχυσης αυξάνεται, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σημαντικές αυξήσεις του φαινομένου συντελεστή διάχυσης σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, και σε υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης. Οι διεργασίες της αυτόλυσης επιφέρει αύξηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, με πιο επωφελείς εφαρμογές να παρατηρούνται σε υψηλές θερμοκρασίες επώασης, μεγαλύτερες των 45°C, όπου το φαινόμενο ολοκληρώνεται σε πολύ μικρά χρονικά διαστήματα, αρκετά μικρότερα σε σύγκριση με των υπόλοιπων κυτταρικών υλικών. Η διεργασία της ομογενοποίησης επιφέρει πρακτικά τις ίδιες τιμές φαινομένου συντελεστή διάχυσης και κατ'επέκταση τους ίδιους χρόνους ολοκλήρωσης με την διεργασία της αυτόλυσης των 24 h, με την διαφορά όμως πως επιτυγχάνεται σημαντικά μικρότερο τελικό φορτίο ενθυλάκωσης.

5.3. Επίδραση της Ενεργότητας Νερού στην Απελευθέρωση του Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης από τις Μικροκάψουλες

Στην παρούσα εργασία, η απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης από τα κύτταρα της μαγιάς, μελετήθηκε με την επίδραση της ενεργότητας του νερού (a_w). Όπως έχει συζητηθεί (βλ. 3.4.) η ενεργότητα του νερού είναι μία παράμετρος η οποία επηρεάζει άμεσα το φαινόμενο της απελευθέρωσης της εσωτερικής φάσης από το τοίχωμα της μικροκάψουλας, προκαλώντας την διάχυση της στο εξωτερικό περιβάλλον της κάψουλας (Augustin, Sanguansri, Margetts, & Young, 2001). Η μελέτη και η ποσοτικοποίηση της απελευθέρωσης του αιθέριου ελαίου από τις κάψουλες, είναι απαραίτητη για την ενδεχομένως μελλοντική ενσωμάτωση των καψουλών σε κάποιο τρόφιμο, με στόχο την ενίσχυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και την αντιμικροβιακή προστασία του τροφίμου.

Για τη ποσοτικοποίηση της απελευθέρωσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης από τις κυτταρικές κάψουλες, χρησιμοποιήθηκε το ποσοστό απελευθερωμένου ελαίου, το οποίο περιγράφεται από τη εξίσωση:

$$RO (\%) = \frac{SO - SO_0}{EL} \times 100\% \quad (5.6.)$$

όπου RO το εκατοστιαίο ποσοστό του απελευθερωμένου ελαίου, SO η συγκέντρωση του επιφανειακού ελαίου για ενεργότητα νερού a_w σε θερμοκρασία T σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg καψουλών}}$, SO_0 η συγκέντρωση του επιφανειακού ελαίου των ξηρών καψουλών ($a_w = 0$) στην ίδια θερμοκρασία T σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ και EL το φορτίο ενθυλάκωσης σε $\frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$.

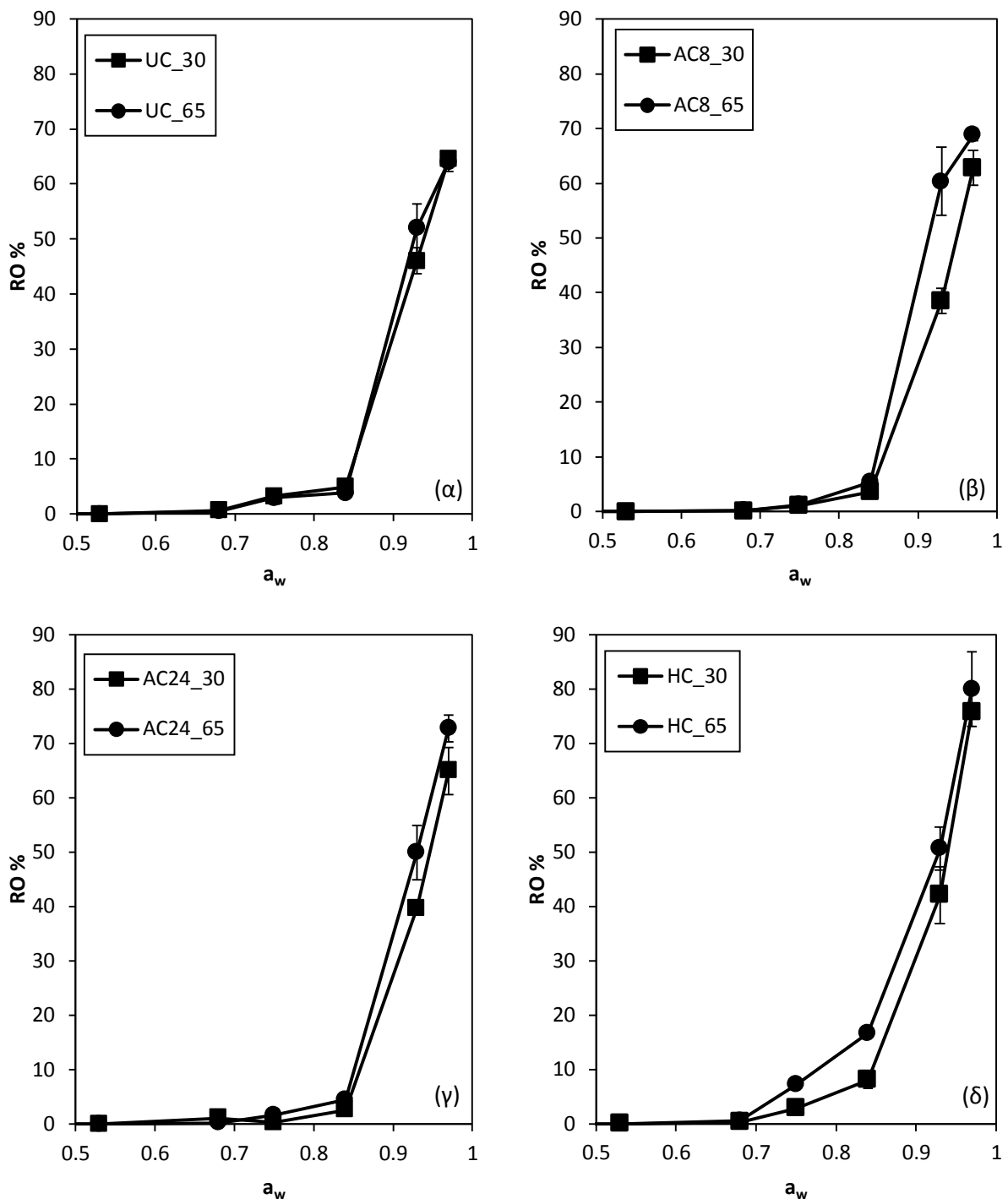
Παρατηρώντας την *Εξίσωση 5.6.* το ποσοστό απελευθέρωσης παίρνει την τιμή 0% όταν η συγκέντρωση του επιφανειακού ελαίου (SO) είναι ίση με την συγκέντρωση του επιφανειακού ελαίου των ξηρών καψουλών (SO_0), ενώ η τιμή 100% επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση του επιφανειακού ελαίου γίνεται ίση με την συγκέντρωση του ολικού ελαίου των καψουλών.

Για λόγους σύγκρισης, η επιλογή των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν ολοκληρώσει 24 h επώασης. Η επιλογή αυτή έγινε με στόχο την αποφυγή του χρόνου επώασης ως μεταβλητή, και συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος πως εντός του χρόνου αυτού, το φαινόμενο της ενθυλάκωσης έχει ολοκληρωθεί σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Οι θερμοκρασίες επώασης των δειγμάτων που μελετήθηκαν είναι αυτές των άκρων του θερμοκρασιακού εύρους των επώασεων, δηλαδή οι θερμοκρασίες των 30°C και των 65°C. Η επιλογή των θερμοκρασιών αυτών έγινε με στόχο την σύγκριση δειγμάτων που επώαστηκαν σε αρκετά χαμηλή και αρκετά υψηλή θερμοκρασία. Τέλος να σημειωθεί πως η θερμοκρασία, στην οποία εκτέθηκαν τα δείγματα ώστε να μελετηθεί η απελευθέρωση του ελαίου, επιλέχθηκε ίση με 25°C.

Βάσει των πειραματικών μετρήσεων και της εφαρμογής της *Εξίσωσης 5.6.* προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα, από τα οποία θα πραγματοποιηθεί σχολιασμός του φαινομένου της απελευθέρωσης, τόσο για την επίδραση της θερμοκρασίας επώασης των κυττάρων, όσο και για την επίδραση της επεξεργασίας στην οποία υποβλήθηκαν τα κύτταρα της μαγιάς πριν την επώαση. Ακολουθεί το *Διάγραμμα 5.12.* από το οποίο θα πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ ανέπαφων (UC), αυτολυμένων (AC8 και AC24) και ομογενοποιημένων κυττάρων (HC).

Όπως προέκυψε στο *Διάγραμμα 5.12.*, όσο η ενεργότητα του νερού αυξάνεται, αυξάνεται και το ποσοστό απελευθέρωσης, γεγονός αναμενόμενο εφόσον βάσει της βιβλιογραφίας, υψηλές τιμές ενεργότητας νερού ενισχύουν την διάχυση του ελαίου προς το εξωτερικό των καψουλών (Augustin et al., 2001). Ακόμα, παρατηρείται πως οι τιμές του ποσοστού απελευθέρωσης για τα δείγματα των 65°C είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων που επώαστηκαν στους 30°C, γεγονός το οποίο πιθανότατα οφείλεται στην φθορά του κυτταρικού υλικού, λόγω της έκθεσης του στην υψηλή αυτή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα. Παρόλα αυτά, οι διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ιδιαίτερα μεγάλες, σε αρκετές περιπτώσεις.

Σχετικά με την απελευθέρωση του ελαίου από τα ανεπεξέργαστα κύτταρα (UC) και για τις δύο θερμοκρασίες επώασης, όπως παρουσιάζεται στο *Διάγραμμα 5.12.α*, είναι εμφανές πως για τιμές ενεργότητας νερού έως και 0.68 το ποσοστό απελευθέρωσης είναι περίπου ίσο με 0%, δηλαδή ολόκληρη η ποσότητα του ενθυλακωμένου ελαίου παραμένει εγκλωβισμένη εντός των κυττάρων. Από την τιμή ενεργότητας 0.68 έως και την τιμή 0.83 παρατηρείται μία ομαλή αύξηση του ποσοστού RO έως και 4%. Για τιμές a_w μεγαλύτερες από 0.83 το ποσοστό απελευθέρωσης αυξάνεται ραγδαία έως και την τιμή 64% για την ενεργότητα 0.97, γεγονός που σημαίνει πως αν οι κάψουλες είχαν ένα φορτίο ενθυλάκωσης περίπου ίσο με $35.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ σε ξηρές συνθήκες (βλ. 5.2.1.), σε συνθήκες υγρασίας με $a_w = 0.97$ το φορτίο ενθυλάκωσης μειώνεται στην τιμή $12.8 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$. Να σημειωθεί πως η θερμοκρασία επώασης δεν φάνηκε να επιφέρει σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών απελευθέρωσης, με τη μόνη διαφορά να παρατηρείται στην ενεργότητα $a_w = 0.93$ όπου το ποσοστό RO των κυττάρων UC που επώαστηκαν στους 65°C προέκυψε μεγαλύτερο κατά περίπου 6%.



Διάγραμμα 5.12. Ποσοστό απελευθέρωσης ενθυλακωμένου ελαίου συναρτήσει της ενεργότητας νερού για τις περιπτώσεις (α) των ανεπεξέργαστων κυττάρων UC, (β) των κυττάρων AC8 που αυτολύθηκαν στους 52°C για 8 h, (γ) των κυττάρων AC24 που αυτολύθηκαν στους 52°C για 24 h και (δ) των κυττάρων HC ομογενοποιήθηκαν στα 800 bar με 4 διελεύσεις, για θερμοκρασίες επώασης 30°C και 65°C. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν σε κάθε περίπτωση χαρακτηρίζονται από 24 h επώασης.

Στρέφοντας το ενδιαφέρον στα κύτταρα που αυτολύθηκαν για 8 h στους 52°C (AC8), τα δείγματα και των δύο θερμοκρασιών επώασης έδειξαν πως το ποσοστό απελευθέρωσης παρουσιάζει τιμές μικρότερες του 1.5% έως και την τιμή ενεργότητας νερού 0.75. Η επίδραση της ενεργότητας του νερού αρχίζει να εμφανίζεται στην τιμή 0.84, ενώ για μεγαλύτερες τιμές, το ποσοστό απελευθέρωσης αυξάνεται δραματικά. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης, με τα κύτταρα που επώαστηκαν στους 65°C να παρουσιάζουν

υψηλότερα ποσοστά απελευθέρωσης από εκείνα που επώαστηκαν στους 30°C. Το γεγονός αυτό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πιθανότατα οφείλεται στην φθορά του κυτταρικού υλικού λόγω της πολύωρης έκθεσής του σε υψηλή θερμοκρασία, καθιστώντας το πιο διαπερατό, υποβοηθώντας την διάχυση του ελαίου τόσο προς το εξωτερικό των καψουλών. Συγκεκριμένα, οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται στην ενεργότητα 0.93, με το ποσοστό των κυττάρων AC8 που επώαστηκαν στους 65°C να είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των κυττάρων των 30°C κατά περίπου 20%. Για την υψηλότερη τιμή ενεργότητας 0.97 τα μέγιστα ποσοστά RO προέκυψαν περίπου 64% για τα κύτταρα των 30°C και 69% για τα κύτταρα των 65°C.

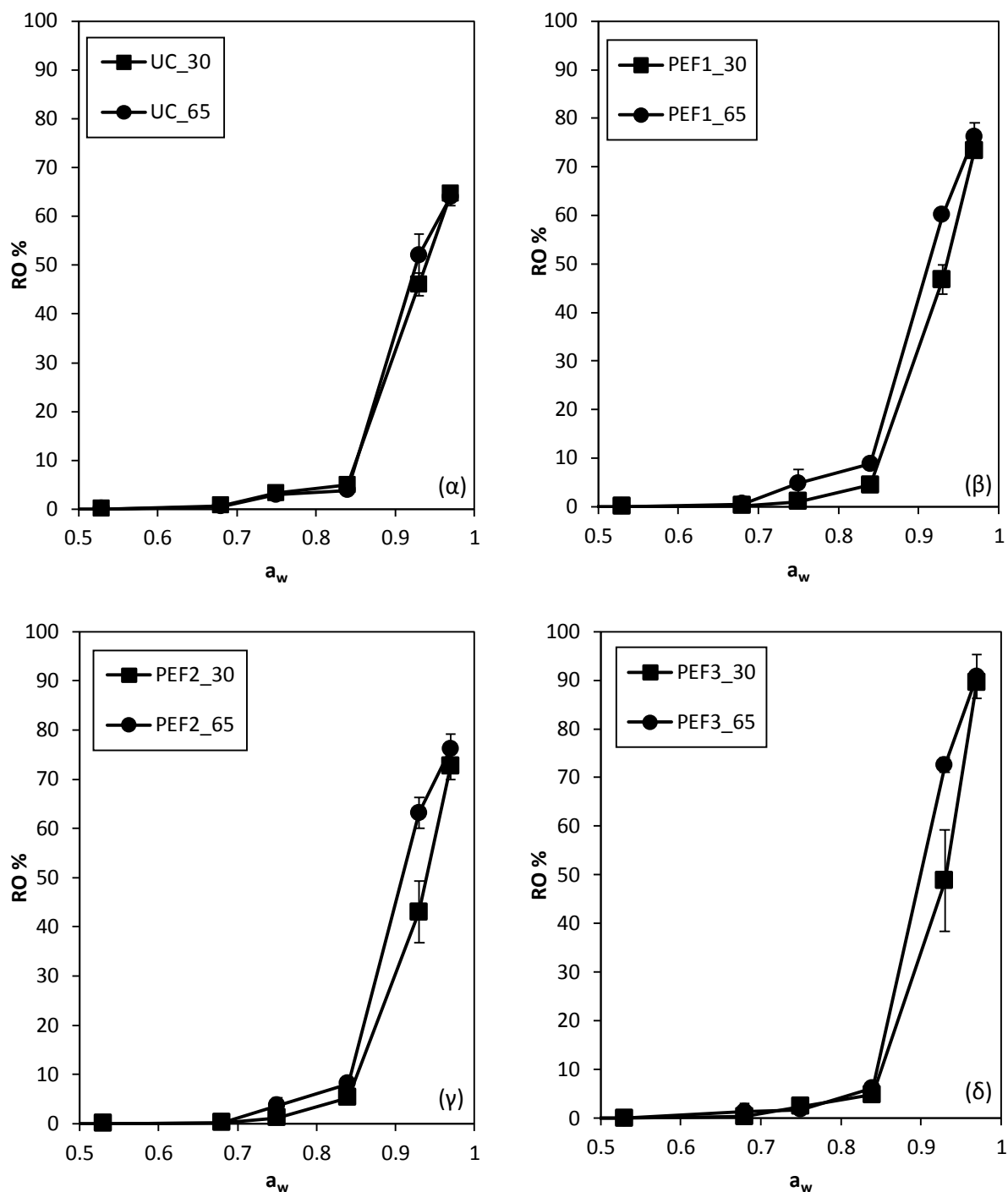
Βάσει του *Διαγράμματος 5.12.γ.*, η απελευθέρωση του ελαίου από τα κύτταρα που αυτολύθησαν για 24 h στους 52°C (AC24), επίσης δεν είναι αισθητή έως και την τιμή ενεργότητας νερού 0.75. Επίσης, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των κυττάρων AC8, η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης από τους 30 στους 65°C, επηρεάζει το ποσοστό απελευθέρωσης, αυξάνοντάς το. Η έντονη άνοδος του ποσοστού RO εμφανίζεται και σε αυτήν την περίπτωση από την ενεργότητα $a_w = 0.83$, από όπου τα ποσοστά απελευθέρωσης από μία τιμή περίπου ίση με 4% αυξάνονται γραμμικά έως και τις τιμές 65% για τα κύτταρα των 30°C, και 73% για εκείνα των 65°C, για την ενεργότητα που ισούται με 0.97.

Τα ομογενοποιημένα κύτταρα (800 bar, 4 διελεύσεις) θεωρούνται πλήρως διαρρηγμένα. Παρατηρώντας το *Διάγραμμα 5.12.δ.*, η ενεργότητα του νερού δεν παρουσιάζει κάποια επίδραση στην απελευθέρωση του ελαίου έως και την τιμή $a_w = 0.68$, ενώ για μεγαλύτερες τιμές παρατηρείται μία σταδιακή αύξηση του ποσοστού RO. Και στην περίπτωση αυτή, η θερμοκρασία επώασης επιδρά στην απελευθέρωση του ελαίου, με το ποσοστό απελευθέρωσης να παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές για την θερμοκρασία επώασης των 65°C. Χαρακτηριστικά, στην τιμή $a_w = 0.97$ το ποσοστό απελευθέρωσης για τα ομογενοποιημένα κύτταρα που επώαστηκαν στους 30°C προέκυψε περίπου 76%, ενώ για τα κύτταρα των 65°C προέκυψε 80%.

Παρατηρώντας τα *Διαγράμματα 5.12.β.* και *5.12.γ.* εξάγεται το συμπέρασμα πως έως την ενεργότητα 0.84, το ποσοστό απελευθέρωσης του ελαίου δεν παρουσιάζει μεταβολές μεταξύ των δύο συνθηκών αυτόλυσης. Με εξαίρεση την τιμή RO% των κυττάρων AC8 των 65°C για την ενεργότητα $a_w = 0.93$, η οποία προέκυψε υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή των κυττάρων AC24, όλες οι υπόλοιπες τιμές από την ενεργότητα 0.84 των κυττάρων AC24 παρουσιάζουν μικρής εμβέλειας αυξήσεις σε σχέση με αυτές των κυττάρων AC8. Οι αυξήσεις αυτές, πιθανότατα οφείλονται στην διαφορετική διάρκεια αυτόλυσης μεταξύ των δύο κυτταρικών υλικών. Είναι λογικό τα κύτταρα AC24 τα οποία εκτέθηκαν στους 52°C για 16 h περισσότερο σε σχέση με τα κύτταρα AC8, να έχουν διαρρηχτεί περισσότερο με αποτέλεσμα να είναι πιο διαπερατά.

Όσον αφορά την σύγκριση μεταξύ της απελευθέρωσης από τα ανεπεξέργαστα (UC) και από τα αυτολυμένα (AC8 και AC24), η τάση των σημείων και για τις τρεις περιπτώσεις δεν διαφοροποιείται σημαντικά. Συγκεκριμένα, έως και την τιμή της ενεργότητας του νερού $a_w = 0.84$, οι τιμές των ποσοστών RO των διάφορων περιπτώσεων προκύπτουν πρακτικά ίσες. Διαφορές παρατηρούνται στις αντίστοιχες τιμές των ποσοστών απελευθέρωσης, κυρίως των υψηλών τιμών ενεργότητας νερού, με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα να παρουσιάζουν μικρότερες τιμές, σε σχέση με τα αυτολυμένα. Ακόμα, για την περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων δεν παρατηρείται διαφοροποίηση με την θερμοκρασία επώασης, σε αντίθεση με την περίπτωση αυτολυμένων κυττάρων που παρατηρούνται διαφορές. Το γεγονός πως οι τιμές των ποσοστών απελευθέρωσης των κυττάρων UC προκύπτουν μικρότερες από αυτές των AC8 και AC24, οφείλεται στο ότι τα κύτταρα αυτά δεν υποβλήθηκαν σε κάποια διεργασία κυτταρικής διάρρηξης, με αποτέλεσμα η διάχυση του ελαίου να είναι δυσκολότερη, τόσο προς το εσωτερικό, όσο και προς το εξωτερικό των κυττάρων.

Ακολουθεί το Διάγραμμα 5.13., στο οποίο παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα των κυττάρων που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF1, PEF2 και PEF3), καθώς και των ανεπεξέργαστων κυττάρων (UC) για λόγους σύγκρισής.



Διάγραμμα 5.13. Ποσοστό απελευθέρωσης ενθυλακωμένου ελαίου συναρτήσει της ενεργότητας νερού για τις περιπτώσεις (α) των ανεπεξέργαστων κυττάρων UC, (β) των κυττάρων PEF1 που επεξεργάστηκαν με ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 3.2 kJ/kg, (γ) των κυττάρων PEF2 που επεξεργάστηκαν με ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 13.6 kJ/kg και (δ) των κυττάρων PEF3 που επεξεργάστηκαν με ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg, για θερμοκρασίες επώασης 30°C και 65°C. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν σε κάθε περίπτωση χαρακτηρίζονται από 24 h επώασης.

Όπως παρατηρείται, η συμπεριφορά της απελευθέρωσης του ελαίου δεν φαίνεται να διαφοροποιείται, με μικρές αυξήσεις του ποσοστού RO να παρατηρούνται από την τιμή ενεργότητας 0.68 έως την τιμή 0.84, ενώ απότομες αυξήσεις παρατηρούνται από την ενεργότητα a_w

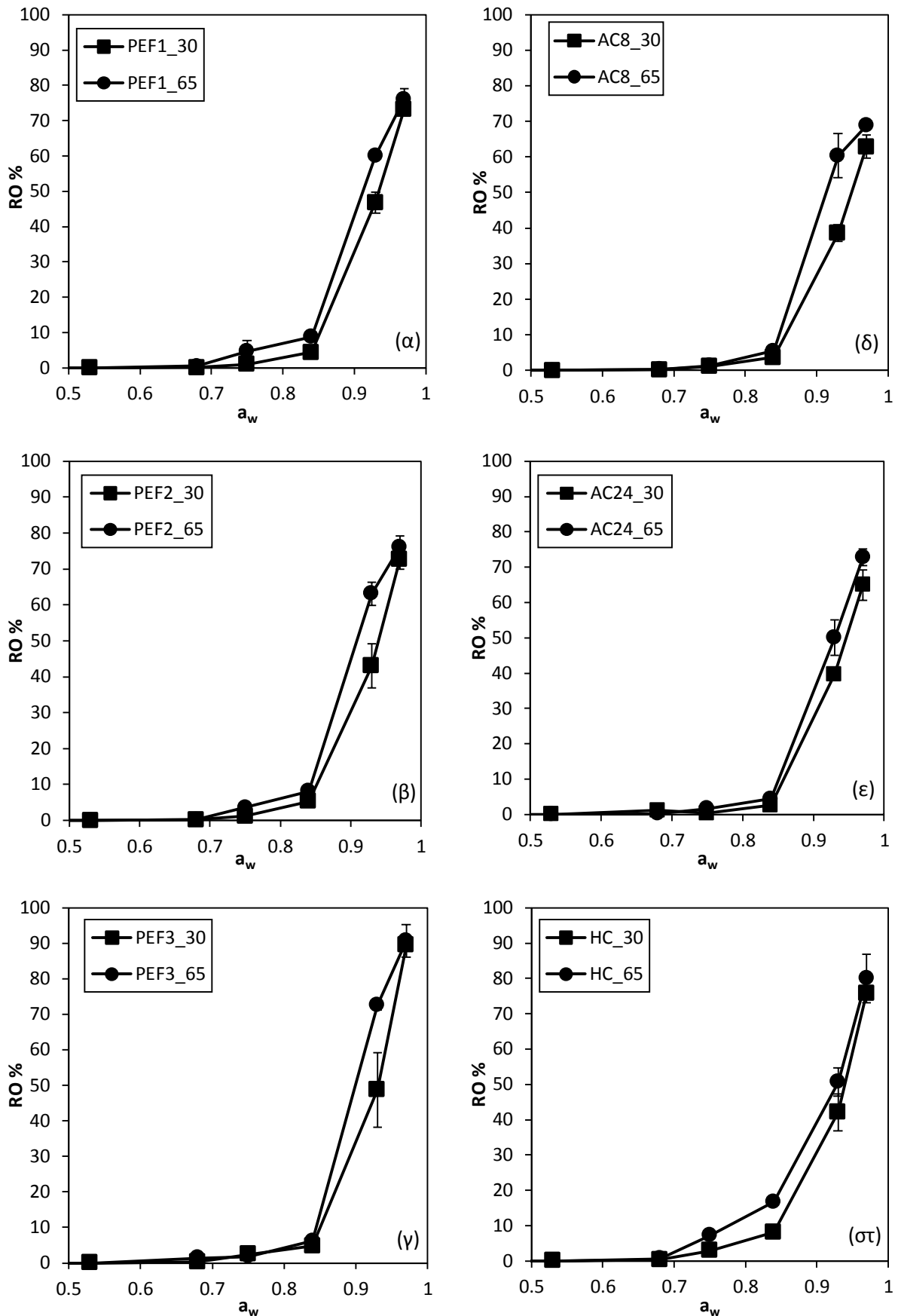
= 0.84 έως την τιμή $a_w = 0.97$. Επιπλέον από τα διαγράμματα των κυττάρων που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, παρατηρείται πως η θερμοκρασία επώασης αυξάνει το ποσοστό απελευθέρωσης, με τις τιμές των ποσοστών RO των δειγμάτων των 65°C να είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων των 30°C. Να σημειωθεί πως οι τιμές RO% οι οποίες αναφέρονται στην τιμή ενεργότητας νερού 0.97, προέκυψαν όμοιες μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης για κάθε συνθήκη παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, γεγονός που σημαίνει πως η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης επιταχύνει την επίτευξη του τελικού ποσοστού απελευθέρωσης συναρτήσει της ενεργότητας νερού.

Βάσει του Διαγράμματος 5.13.β, η απελευθέρωση του ελαίου από τα κύτταρα PEF1, εμφανίζεται από την ενεργότητα 0.68 για τα κύτταρα που επώαστηκαν στους 65°C, ενώ για τα κύτταρα των 30°C εμφανίζεται από την ενεργότητα $a_w = 0.75$. Έως την ενεργότητα 0.84 παρατηρείται μια μικρή αύξηση του ποσοστού απελευθέρωσης, έως περίπου το 9% για τα κύτταρα των 65°C και 4% για εκείνα των 30°C. Για μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας, παρατηρείται μία ραγδαία αύξηση του ποσοστού απελευθέρωσης, το οποίο καταλήγει σε μία τελική τιμή περίπου 75% και για τις δύο θερμοκρασίες επώασης, με τα κύτταρα που επώαστηκαν στους 65°C να παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές ποσοστών για μικρότερες τιμές a_w . Συγκεκριμένα, στην ενεργότητα $a_w = 0.93$, η διαφορά των ποσοστών RO είναι αρκετά μεγάλη, με τα κύτταρα των 30°C να παρουσιάζουν μία τιμή περίπου 48%, ενώ τα κύτταρα των 65°C εμφανίζουν ένα ποσοστό απελευθέρωσης 60%.

Σχετικά με την απελευθέρωση του ελαίου από τα κύτταρα PEF2, παρατηρείται πως και για τις δύο θερμοκρασίες επώασης παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με την περίπτωση των κυττάρων PEF1, έως και την ενεργότητα νερού 0.84. Από την τιμή αυτή έως και την τιμή 0.97 το ποσοστό απελευθέρωσης αυξάνεται επίσης ραγδαία, με τις τιμές RO% επίσης να είναι κοντά στο 75%. Ακόμα παρατηρούνται μεγάλες διαφορές για ενδιάμεσες τιμές ενεργότητας, όπως για την ενεργότητα $a_w = 0.93$, που τα ποσοστά απελευθέρωσης μεταξύ των δύο θερμοκρασιών απέχουν μεταξύ τους κατά 20%, με τα κύτταρα που επώαστηκαν στους 65°C να εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό απελευθέρωσης.

Τέλος, όσον αφορά την απελευθέρωση του ελαίου ρίγανης από τα κύτταρα PEF3, παρατηρείται μια ομαλή αύξηση του ποσοστού RO από την ενεργότητα νερού 0.68 έως την ενεργότητα 0.84, όπου το ποσοστό παρουσιάζει περίπου την τιμή 6% και για τις δύο θερμοκρασίες επώασης. Η αύξηση του ποσοστού απελευθέρωσης έως την τιμή $a_w = 0.97$ είναι πολύ απότομη, με την επίτευξη της τελικής τιμής RO = 90% και για τις δύο θερμοκρασίες επώασης. Οι διαφορές μεταξύ των ποσοστών απελευθέρωσης για τις δύο θερμοκρασίες για $a_w = 0.93$ είναι ακόμα μεγαλύτερες σε σχέση με τις υπόλοιπες, με το ποσοστό RO των κυττάρων των 30°C να ισούται περίπου με 49%, ενώ το ποσοστό απελευθέρωσης των κυττάρων των 65°C αγκίζει την τιμή του 73%.

Συγκρίνοντας όλες τις περιπτώσεις του Διαγράμματος 5.13. εξάγεται το συμπέρασμα πως με την αύξηση της ειδικής ενέργειας της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, το ποσοστό απελευθέρωσης παρουσιάζει εντονότερη εξάρτηση από την θερμοκρασία επώασης, με τις διαφορές του RO% στην ενεργότητα 0.93 να αυξάνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης. Ακόμα αύξηση της ειδικής ενέργειας από τα 13.6 kJ/kg στα 107.0 kJ/kg οδηγεί στην αύξηση του τελικού ποσοστού απελευθέρωσης από το 75% στο 90%. Τέλος, τα ποσοστά απελευθέρωσης από όλα τα κύτταρα PEF παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές από τα αντίστοιχα ποσοστά των UC, γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων PEF λόγω της δημιουργίας πόρων από την διεργασία αυτή. Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των ανεπεξέργαστων κυττάρων και των κυττάρων PEF3, όπου οι διαφορές του ποσοστού απελευθέρωσης σε υψηλές τιμές ενεργότητας νερού (0.97) αγγίζουν το 30%.



Διάγραμμα 5.14. Ποσοστό απελευθέρωσης ενθυλακωμένου ελαίου συναρτήσει της ενεργότητας νερού για τις περιπτώσεις (α) των κυττάρων PEF1, (β) των κυττάρων PEF2, (γ) των κυττάρων PEF3 (δ) των κυττάρων AC8, (ε) των κυττάρων AC24 και (στ) των κυττάρων HC, για θερμοκρασίες επώασης 30°C και 65°C. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν σε κάθε περίπτωση χαρακτηρίζονται από 24 h επώασης.

Τέλος, βάσει του Διαγράμματος 5.14. πραγματοποιείται η σύγκριση της απελευθέρωσης του ελαίου ρίγανης από τα κύτταρα τα οποία κατεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF1, PEF2 και PEF3), αυτόλυση (AC8 και AC24) και ομογενοποίηση (HC).

Μεταξύ των διάφορων κατεργασιών, μικρότερα ποσοστά απελευθέρωσης παρουσιάζουν τα κύτταρα τα οποία αυτολύθηκαν για 8 h στους 52°C (AC8) με τα ποσοστά RO για την ενεργότητα 0.97 να είναι μικρότερα από 70% και για τις δύο θερμοκρασίες επώασης. Ακόμα, η συμπεριφορά της απελευθέρωσης από τα κύτταρα που αυτολύθηκαν για 24 h στους 52°C (AC24) εμφανίζει αρκετά κοινά με την απελευθέρωση από τα κύτταρα PEF1 και PEF2, τα οποία επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 3.2 και 13.6 kJ/kg αντίστοιχα, με την διαφορά πως οι τιμές των ποσοστών απελευθέρωσης των κυττάρων AC24 να είναι ελαφρώς μικρότερες από εκείνες των κυττάρων PEF1 και PEF2. Τις μεγαλύτερες τιμές ποσοστών απελευθέρωσης παρουσιάζουν τα κύτταρα PEF3, των οποίων η ειδική ενέργεια της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία είχε την τιμή 107.0 kJ/kg, και τα κύτταρα που ομογενοποιήθηκαν στα 800 bar με 4 διελεύσεις (HC). Οι διαφορές των δύο αυτών περιπτώσεων είναι πως τα κύτταρα HC παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά απελευθέρωσης έως και την τιμή ενεργότητας $a_w = 0.84$, ενώ για μεγαλύτερες τιμές a_w τα κύτταρα PEF3 παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές RO% λόγω της εντονότερης εξάρτησης του φαινομένου από την υγρασία.

Συμπερασματικά, η απελευθέρωση του ελαίου από τα κύτταρα της μαγιάς, λαμβάνει χώρα από τιμές ενεργότητας νερού μεγαλύτερες από 0.68 στους 25°C, με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα να παρουσιάζουν τα μικρότερα ποσοστά απελευθέρωσης, λόγω της σχετικά ανέπαφης κατάστασης του κυτταρικού περιβλήματος, συγκρατώντας το έλαιο εγκλεισμένο. Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιφέρει εντονότερη απελευθέρωση του ελαίου από τις κάψουλες, όταν η ειδική ενέργεια της επεξεργασίας αυξάνεται (από 3.2 σε 107.0 kJ/kg). Γενικά η αύξηση της ειδικής ενέργειας επιφέρει αύξηση του ποσοστού απελευθέρωσης και αυξάνει την επιρροή της θερμοκρασίας επώασης των κυττάρων με το έλαιο, με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης να καθιστά την απελευθέρωση εντονότερη, σε σχέση με τις χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης η διεργασία της αυτόλυσης δεν επηρεάζει την απελευθέρωση του ελαίου σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο η επεξεργασία PEF3, ενώ η αυτόλυση 8 h επιφέρει τις μικρότερες διαφορές σε σχέση με την απελευθέρωση του ελαίου από τα ανεπεξέργαστα κύτταρα. Ακόμα, οι συνθήκες επεξεργασίας παλμικών ηλεκτρικών πεδίων PEF1 και PEF2, επιφέρουν παρόμοια αποτελέσματα με την 24ωρη αυτόλυση, σχετικά με την απελευθέρωση. Η θερμοκρασία επώασης των ανεπεξέργαστων κυττάρων δεν παίζει κάποιον καθοριστικό ρόλο στην απελευθέρωση του ελαίου, ενώ όσο πιο έντονη γίνεται η προκατεργασία των κυττάρων, τόσο πιο αισθητές γίνονται οι διαφορές των ποσοστών απελευθέρωσης μεταξύ χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών επώασης. Τέλος, η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης επιφέρει αρκετά αδύναμη συγκράτηση του ελαίου εντός των κυττάρων, εξαιτίας του μεγάλου βαθμού κυτταρικής διάρρηξης που προκλήθηκε από την επεξεργασία αυτή.

Εν κατακλείδι, η διεργασία της 8ωρης αυτόλυσης μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλη για επωάσεις κυττάρων και ελαίου σε υψηλές θερμοκρασίες, εφόσον η διάρκεια ολοκλήρωσης του φαινομένου είναι αρκετά μικρή σε συνδυασμό με το ότι οι κάψουλες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συστήματα υψηλότερων συνθηκών υγρασίας, με καλύτερη διατήρηση του ενθυλακωμένου ελαίου. Επίσης η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας έως και 13.6 kJ/kg, είναι ιδανική για επωάσεις χαμηλών θερμοκρασιών, όπου το φαινόμενο της διάχυσης του ελαίου επιταχύνεται ραγδαία σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, και η απελευθέρωση του ελαίου διατηρείται σχετικά χαμηλή ακόμα σε υψηλές τιμές a_w .

5.4. Επίδραση Διεργασιών Κυτταρικής Διάρρηξης και Παραμέτρων Επώασης στην Σύσταση του Ενθυλακωμένου Ελαίου

Όπως έχει αναφερθεί, η καρβακρόλη είναι η κυριότερη ουσία που εμπεριέχεται στο αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70% w/w. Παρόλα αυτά, το έλαιο ρίγανης παρουσιάζει μεγάλη πληθώρα διαφόρων ουσιών όπως φαινολικά μονοτερπένια, μονοτερπινικούς υδρογονάνθρακες, μονοτερπινικές αλκοόλες, σεσκουιτερπενικούς υδρογονάνθρακες και οξυγονωμένα σεσκουιτερπένια. Εκτός της καρβακρόλης, οι κυριότερες ουσίες του ελαίου που παρουσιάζονται σε αυτό σε μικρά αλλά όχι αμελητέα ποσοστά αποτελούν η θυμόλη, το γ-τερπινένιο και το ρ-κυμένιο. (Botsoglou et al., 2003; Tsimogiannis & Oreoroulou, 2018)

Παρόλο που η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του ενθυλακωμένου ελαίου πραγματοποιήθηκε με βάση την καρβακρόλη, στην πραγματικότητα το εγκλεισμένο έλαιο αποτελεί ένα μείγμα ουσιών. Με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.8., πραγματοποιήθηκε η μελέτη της σύστασης του ενθυλακωμένου ελαίου με την χρήση της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Οι ουσίες που στράφηκε το ενδιαφέρον της μελέτης της σύστασης, αποτελούν η καρβακρόλη, η θυμόλη, το γ-τερπινένιο και το ρ-κυμένιο. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ANOVA, προέκυψαν ως τα εκατοστιαία ποσοστά των αποκρίσεων του οργάνου για καθεμιά από τις τέσσερις ουσίες αυτές, ως προς το άθροισμα των αποκρίσεών τους. Για την εφαρμογή της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19, SPSS Inc., IBM Company, Release 19.0.0.). Οι πίνακες που προέκυψαν από την ανάλυση και στους οποίους στηρίζεται ο παρακάτω σχολιασμός, παρατίθενται στο *Παράρτημα Π.1.*

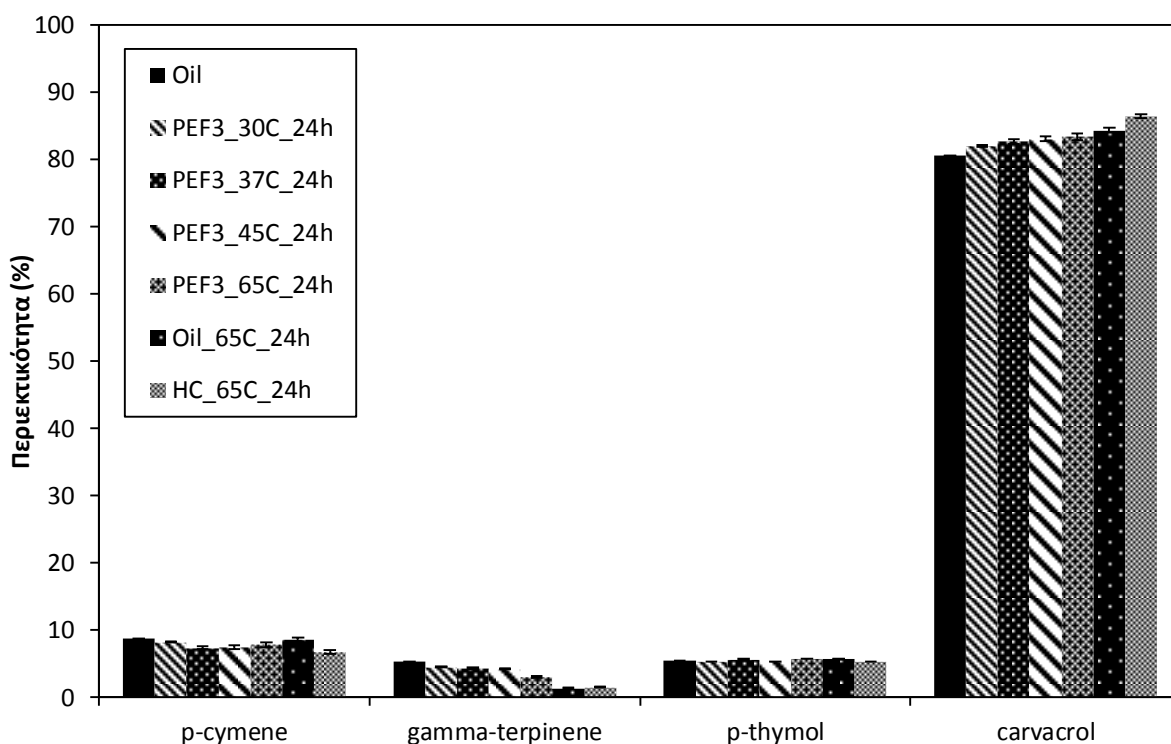
Όσον αφορά την σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου σε ρ-κυμένιο, οι μεταβλητές που παρουσίασαν σημαντικές στατιστικές διαφορές αποτελούν οι μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης και ο χρόνος επώασης. Συγκεκριμένα, μικρότερο ποσοστό σε ρ-κυμένιο παρουσιάζει το ενθυλακωμένο έλαιο των ομογενοποιημένων κύτταρων (5.4%), τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες κυττάρων. Σημαντικές διαφορές επίσης παρουσιάζει το ενθυλακωμένο έλαιο των ανεπεξέργαστων κύτταρων (6.0%), ενώ μεταξύ των κυττάρων AC8, AC24, PEF1, PEF2 και PEF3 δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα του ελαίου σε ρ-κυμένιο, με ένα μέσο ποσοστό 6.9%. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως η αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων ευνοεί την διάχυση του ρ-κυμενίου, όμως η απουσία της σταθερής δομής του κυτταρικού τοιχώματος, που παρατηρείται στα ομογενοποιημένα κύτταρα, οδηγεί στην ελάττωση της περιεκτικότητας του, λόγω της ασθενέστερης συγκράτησης της πηκτικής αυτής ουσίας. Επιπλέον, η αύξηση του χρόνου επώασης οδηγεί στην αύξηση της περιεκτικότητας του ρ-κυμενίου, από 5.2% την χρονική στιγμή 0 h σε 7.5% για χρόνο επώασης 24 h. Το γεγονός αυτό εξηγείται λόγω της υδροφοβικότητας του ρ-κυμενίου. Σύμφωνα με τους Bishop et al. (1998) οι υδρόφοβες ενώσεις διαχέονται βραδύτερα εντός των κυττάρων της μαγιάς σε σχέση τις υδρόφιλες. Πιο συγκεκριμένα, μία ουσία που φαίρει ενεργή ομάδα υδροξειδίου, αυξάνει την ρευστότητα της μεμβράνης των φωσφολιπιδίων, με αποτέλεσμα την ευκολότερη διάχυση της.

Σχετικά με το γ-τερπινένιο, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται σε όλες τις μεταβλητές. Οι κάψουλες των κυττάρων HC παρουσιάζουν την μικρότερη περιεκτικότητα σε γ-τερπινένιο (2.8%), το οποίο όπως και το ρ-κυμένιο αποτελεί μια υδρόφοβη και πηκτική ένωση. Οι κάψουλες των κυττάρων UC, PEF1 και PEF2, τα οποία δεν χαρακτηρίζονται από αυξημένη διαπερατότητα, δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, με ένα μέσο ποσοστό 3.2%. Ακολουθούν τα κύτταρα AC8 και

PEF3, των οποίων η περιεκτικότητα του πυρήνα σε γ-τερπινένιο προέκυψε 3.6%, και τέλος τα κύτταρα AC24 (4.0%), τα οποία αποτελούν τα πιο διαρρηγμένα κύτταρα που διατηρούν την δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Η αύξηση του χρόνου επώασης επιφέρει την αύξηση της περιεκτικότητας του γ-τερπινενίου, με την σύσταση σε χρόνο 0 h (2.8%) να διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη σύσταση σε χρόνους 5 και 24 h (3.7%). Τέλος, η περιεκτικότητα του ελαίου σε γ-τερπινένιο διαφέρει σημαντικά μεταξύ των 65°C (3.1%) και των υπόλοιπων θερμοκρασιών (3.5%), γεγονός λογικό εφόσον το γ-τερπινένιο αποτελεί μια αρκετά πτητική ένωση.

Η σύσταση του πυρήνα σε θυμόλη παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μονάχα μεταξύ των χρόνων επώασης. Παρόλο που προέκυψαν σημαντικές στατιστικές διαφορές της σύστασης μεταξύ των χρόνων επώασης, αξίζει να σημειωθεί πως περιεκτικότητά της θυμώλης αυξάνεται από 5.2% για χρόνο 0 h σε 5.4% για χρόνο 24 h.

Η περιεκτικότητα σε καρβακρόλη παρουσιάζει σημαντικές στατιστικές διαφορές σε όλες τις παραμέτρους. Οι μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής: την μικρότερη σύσταση σε καρβακρόλη παρουσιάζουν οι κάψουλες των κυττάρων AC24 (83.9%), AC8(84.3%) και PEF3 (84.5%), ακολουθούν τα κύτταρα PEF2 (84.8%) και PEF1 (85.1%) τα οποία δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με τα PEF3 και τα AC8, τα κύτταρα UC (85.5%) μπορούν να ομαδοποιηθούν με τα PEF1 και PEF2, ενώ την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε καρβακρόλη παρουσιάζουν οι κάψουλες των HC (86.7%). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι κάψουλες των κυττάρων που παρουσιάζουν μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε πτητικές ενώσεις (p-κυμένιο και γ-τερπινένιο) παρουσιάζουν μικρότερα ποσοστά καρβακρόλης. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε καρβακρόλη μειώνεται με την πάροδο του χρόνου επώασης εφόσον η περιεκτικότητα σε πτητικά στοιχεία αυξάνεται. Συγκεκριμένα η περιεκτικότητα από 86.8% σε χρόνο 0 h, καταλύγει στο 84.0% σε χρόνους 5 και 24 h. Ακόμα, σημαντικές διαφορές στην σύσταση προκύπτουν μεταξύ των 65°C (86.0%) και των υπόλοιπων θερμοκρασιών (84.6%). Οι διαφορές αυτές συμφωνούν με τις αντίστοιχες διαφορές της περιεκτικότητας σε γ-τερπινένιο.



Διάγραμμα 5.15. Περιεκτικότητες καθαρού ελαίου (Oil), ελαίου που εκτέθηκε στους 65°C για 24 h (Oil_65C_24h), ενθυλακωμένου ελαίου σε κύτταρα PEF3 (30, 37, 45 και 65°C για 24 h) και ενθυλακωμένου ελαίου σε κύτταρα HC (65°C για 24 h) σε p-κυμένιο, γ-τερπινένιο, θυμόλη και καρβακρόλη

Τέλος αξίζει να αναφερθεί πως η σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου πλησιάζει την σύσταση του καθαρού ελαίου σε θερμοκρασίες επώασης κάτω των 45°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα επώασης (> 5 h). Στο *Διάγραμμα 5.15*, παρουσιάζεται η περιεκτικότητα του καθαρού ελαίου (Oil) και ελαίου που εκτέθηκε για 24 h στους 65°C (Oil_65C_24h). Όπως προέκυψε, οι διαφορές στην σύσταση, που προκαλούνται από την πολύωρη έκθεση του ελαίου στη θερμοκρασία των 65°C, εμφανίζονται μεταξύ του γ-τερπινενίου και της καρβακρόλης, με την περιεκτικότητα του πτητικού γ-τερπινενίου να μειώνεται και της καρβακρόλης να αυξάνεται. Για λόγους σύγκρισης επιλέχθηκαν τα δείγματα PEF3 των 30, 37, 45 και 65°C για 24 h επώασης και HC των 65°C για 24 h επώασης. Όπως ήταν αναμενόμενο, η σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου των κυττάρων PEF3 τείνει στη σύσταση του καθαρού ελαίου για τις θερμοκρασίες κάτω των 45°C, ενώ στους 65°C η σύσταση του ελαίου αλλοιώνεται, με την περιεκτικότητα σε γ-τερπινένιο να μειώνεται κατά 2.5%. Η σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου των κυττάρων HC (65°C για 24 h) αποκλίνει σε μεγαλύτερο βαθμό από τη σύσταση του καθαρού ελαίου σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα PEF3. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως παρά την αλλοίωση της σύστασης στους 65°C, η ύπαρξη της δομής του κυτταρικού τοιχώματος παρέχει προστασία στο ενθυλακωμένο έλαιο κατά την διάρκεια της επώασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1. Επίδραση Θερμοκρασίας Επώασης και Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στο Τελικό Φορτίο και στην Αποδοτικότητα του Εγκλεισμού

Συμπερασματικά, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, το τελικό φορτίο και η αποδοτικότητα ενθυλάκωσης, δεν εξαρτώνται από την θερμοκρασία επώασης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), από την οποία δεν προέκυψαν σημαντικές στατιστικές διαφορές για τα αποτελέσματα μεταξύ των διάφορων θερμοκρασιών επώασης από τους 30 έως τους 65°C.

Σχετικά με τις διάφορες μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης που χρησιμοποιήθηκαν, δεν προέκυψαν σημαντικά στατιστικές διαφορές του τελικού φορτίου και της αποδοτικότητας ενθυλάκωσης μεταξύ των καψουλών που παράχθηκαν με την χρήση ανεπεξέργαστων κυττάρων, αυτολυμένων κυττάρων στους 52°C για 8 και 24h και κυττάρων που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 3.2, 13.6 και 107.0 kJ/kg. Συγκεκριμένα το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης αυτών των κυτταρικών υλικών (UC, AC8, AC24, PEF1, PEF2 και PEF3) προέκυψε $35.6 \pm 1.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ και η τιμή της αποδοτικότητας υπολογίστηκε $55.3 \pm 3.3 \%$. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι διεργασία της αυτόλυσης και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, αν και αυξάνουν την διαπερατότητα του κυτταρικού περιβλήματος της μαγιάς, δεν επηρεάζουν την χωρητικότητα των κυττάρων. Σε αντίθεση με της κατεργασίες αυτές, η διεργασία της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης (800 bar, 4 διελεύσεις) αποδείχθηκε πως επιφέρει μικρότερες τιμές τελικού φορτίου και αποδοτικότητας ενθυλάκωσης, με τις τιμές αυτών να προκύπτουν $23.6 \pm 0.6 \frac{\text{mg καρβακρόλης}}{100 \text{ mg ξηρών καψουλών}}$ και $31.0 \pm 1.0 \%$ αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην μεγάλο βαθμού διάρρηξη των κυττάρων της μαγιάς, με αποτέλεσμα την καταστροφή του σφαιρικού σχήματος και της ακεραιότητας του μικροοργανισμού.

6.2. Επίδραση Θερμοκρασίας Επώασης και Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στον Χρόνο Ολοκλήρωσης της Διεργασίας της Ενθυλάκωσης και στο Φαινόμενο Συντελεστή Διάχυσης του Ελαίου

Εφόσον ο μηχανισμός της ενθυλάκωσης του ελαίου στηρίζεται στην παθητική διάχυση, τα αποτελέσματα των φορτίων ενθυλάκωσης συναρτήσει του χρόνου επώασης, μοντελοποιήθηκαν με την χρήση της λύσης του 2^{ου} νόμου διάχυσης του Fick. Από τα αποτελέσματα των μοντελοποιήσεων υπολογίστηκε ο χρόνος t_{90} , μία παράμετρος που δηλώνει τον χρόνο κατά τον οποίο επιτυγχάνεται το 90% του τελικού φορτίου ενθυλάκωσης. Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης, διαπιστώθηκε πως η αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει επιτάχυνση της διεργασίας της ενθυλάκωσης σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Το γεγονός αυτό είναι λογικό, εφόσον η διάχυση είναι ένα φαινόμενο που εξαρτάται από την θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος ολοκλήρωσης t_{90} μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C ($20 \text{ h} > t_{90} > 10 \text{ h}$) στους 65°C ($10 \text{ h} > t_{90} > 1.5 \text{ h}$) σε όλες της περιπτώσεις, εκτός από αυτήν των ανεπεξέργαστων κυττάρων (UC) για την οποία ο χρόνος t_{90}

μειώνεται από τους 30 ($t_{90} = 36.5$ h) έως τους 45°C ($t_{90} = 8$ h), ενώ για θερμοκρασίες επώασης μεταξύ 45 και 65°C παραμένει σταθερός. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στο ότι η αύξηση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης των ανεπεξέργαστων κυττάρων, πιθανότατα σταθεροποιείται στους 45°C.

Οι διάφορες μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την επίτευξη της ολοκλήρωσης της διεργασίας της ενθυλάκωσης σε μικρότερα χρονικά διαστήματα. Όπως ήταν αναμενόμενο η προκατεργασία των κυττάρων της μαγιάς, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου ολοκλήρωσης για τις περισσότερες περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, σε ολόκληρο το θερμοκρασιακό εύρος από τους 30 έως τους 65°C, η διεργασία της αυτόλυσης στους 52°C για 8 και 24 h, της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης στα 800 bar με 4 διελεύσεις, και της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/kg (PEF3), επιφέρουν μείωση του χρόνου ολοκλήρωσης, έως και 8 φορές σε σχέση με τους αντίστοιχους χρόνους για τα ανεπεξέργαστα κύτταρα. Μικρότερους χρόνους t_{90} παρουσιάζουν τα αυτολυμένα κύτταρα 24 h (1.3 h στους 65°C), τα αυτολυμένα κύτταρα 8 h και τα ομογενοποιημένα κύτταρα (1.5 h στους 65°C) και τα κύτταρα PEF3 (4.7 h στους 65°C). Μεγαλύτερους χρόνους ολοκλήρωσης παρουσιάζουν τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ειδικής ενέργειας 13.6 και 3.2 kJ/kg, των οποίων οι χρόνοι t_{90} προέκυψαν μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους χρόνους των ανεπεξέργαστων κυττάρων για τις θερμοκρασίες 40 – 53°C και 37 – 60°C αντίστοιχα. Συμπερασματικά, όσο πιο έντονη είναι η μέθοδος κυτταρικής διάρρηξης, τόσο πιο γρήγορα ολοκληρώνεται η διεργασία του εγκλεισμού του ελαίου εντός των κυττάρων.

Δεδομένου πως σε όλες τις περιπτώσεις το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης δεν παρουσίασε σημαντικές στατιστικές διαφορές, εκτός από την περίπτωση των ομογενοποιημένων κυττάρων, ο χρόνος ολοκλήρωσης της διεργασίας σχετίζεται άμεσα με το φαινόμενο συντελεστή διάχυσης (D_{eff}), μιας παραμέτρου η οποία προέκυψε από την μαθηματική μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως προέκυψε, η εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία περιγράφεται από την εξίσωση Arrhenius. Με την εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius, υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης της ενθυλάκωσης του ελαίου ρίγανης εντός των κυττάρων της μαγιάς, για κάθε κυτταρικό υλικό. Παρόλο που οι τιμές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης στα κύτταρα που διαρρήχτηκαν προέκυψαν μεγαλύτερες, η ενέργεια ενεργοποίησης για τα ανεπεξέργαστα κύτταρα εμφάνισε την μεγαλύτερη τιμή, ίση με 78.6 ± 12.6 kJ/mol. Η τιμή αυτή είναι αρκετά υψηλή, υποδηλώνοντας πως η μικρές μεταβολές στην θερμοκρασία επώασης επιφέρουν μεγάλες αυξήσεις του φαινομένου συντελεστή διάχυσης και κατ' επέκταση του χρόνου t_{90} . Αν και οι ενέργειες ενεργοποίησης των υπόλοιπων περιπτώσεων προέκυψαν μικρότερες, το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο ισχύουν καλύπτει τις θερμοκρασίες από 30 έως 65°C, ενώ αυτή των ανεπεξέργαστων κυττάρων ισχύει από τους 30 έως τους 45°C.

Τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία παρουσίασαν παραπλήσιες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης, γεγονός που σημαίνει πως η θερμοκρασιακή εξάρτηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης δεν μεταβάλλεται με την ειδική ενέργεια της επεξεργασίας από τα 3.2 έως τα 107.0 kJ/kg. Να σημειωθεί πως η αύξηση της ειδικής ενέργειας αυξάνει τις τιμές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, εφόσον η διεργασία γίνεται εντονότερη, όμως ο ρυθμός μεταβολής ως προς την θερμοκρασία δεν επηρεάζεται. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν την μικρότερη τιμή E_a , η οποία προέκυψε ίση με 25.4 ± 3.0 kJ/mol και για τις τρεις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, γεγονός που δηλώνει πως μικρές μεταβολές στην θερμοκρασία δεν επιφέρουν τόσο μεγάλες αλλαγές στην τιμή του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις.

Τα κύτταρα που αυτολύθηκαν για 8 και 24 h στους 52°C επίσης παρουσίασαν τιμές ενέργειας ενεργοποίησης χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Και στην περίπτωση αυτή η αύξηση του χρόνου αυτόλυσης αυξάνει τις τιμές του D_{eff} , του οποίου ο ρυθμός μεταβολής ως προς την θερμοκρασία επώασης παραμένει ανεπιβεβαιωμένος. Η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης για τα αυτολυμένα κύτταρα προέκυψε 54.3 ± 5.8 kJ/mol, σχεδόν διπλάσια αυτής των κυττάρων PEF. Παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση παρουσιάζουν και τα ομογενοποιημένα κύτταρα στα 800 bar με 4 διελεύσεις, με ενέργεια ενεργοποίησης 47.0 ± 5.2 kJ/mol, με το τελικό φορτίο ενθυλάκωσης όμως να είναι μικρότερο.

Συμπερασματικά, όσο πιο έντονη είναι η διεργασία κυτταρικής διάρρηξης, τόσο πιο υψηλές τιμές φαινόμενου συντελεστή διάχυσης επιτυγχάνονται. Παρόλα αυτά, οι μεταβολές των παραμέτρων κάθε διεργασίας δεν επηρεάζουν την θερμοκρασιακή εξάρτηση του φαινόμενου συντελεστή διάχυσης. Επιπλέον η εφαρμογή των διεργασιών αυτών αυξάνει το εύρος επίδρασης της θερμοκρασίας, με την θερμική κατεργασία της αυτόλυσης να επιφέρει την μεγαλύτερη τιμή ενέργειας ενεργοποίησης, μετά από αυτήν των ανεπεξέργαστων κυττάρων. Αν και τα ανεπεξέργαστα κύτταρα παρουσιάζουν την μεγαλύτερη τιμή ενέργειας ενεργοποίησης, το μικρότερο θερμοκρασιακό εύρος εξάρτησης δεν επιτρέπει την επίτευξη πολύ μεγάλων συντελεστών διάχυσης και κατ' επέκταση μικρών χρόνων ολοκλήρωσης.

6.3. Επίδραση Θερμοκρασίας Επώασης και Μεθόδων Κυτταρικής Διάρρηξης στο Φαινόμενο της Απελευθέρωσης του Ελαίου από τις Κάψουλες

Η απελευθέρωση του ελαίου από τα κύτταρα της μαγιάς οφείλεται στην διάχυση του προς το εξωτερικό των καψουλών. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται άμεσα από την ενεργότητα νερού, για την οποία προέκυψε πως η αύξηση της από την τιμή 0.75 έως 0.84 προκαλεί αυξήσεις του ποσοστού απελευθέρωσης του ενθυλακωμένου ελαίου έως και 10%, ενώ η αύξηση της ενεργότητας πάνω από την τιμή 0.84 επιφέρει ραγδαία αύξηση του ποσοστού απελευθέρωσης έως και κατά 90%. Η συμπεριφορά των καψουλών συναρτήσει της ενεργότητας του νερού στους 25°C δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές μεταξύ των διάφορων περιπτώσεων για ίδια θερμοκρασία και χρόνο επώασης.

Μικρότερες τιμές ποσοστού απελευθέρωσης παρουσιάζουν τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, γεγονός λογικό εφόσον το κυτταρικό περίβλημα έχει υποστεί αρκετά μικρότερη καταπόνηση σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα που προεπεξεργάστηκαν, με αποτέλεσμα το έλαιο να συγκρατείται αποτελεσματικότερα. Τα κύτταρα που αυτολύθηκαν στους 52°C για 8 και 24 h, δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους, πράγμα που σημαίνει πως ο χρόνος αυτόλυσης δεν επηρεάζει το φαινόμενο. Τα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία παρουσιάζουν εντονότερη απελευθέρωση, όταν η ειδική ενέργεια της επεξεργασίας αυξάνεται, με τα κύτταρα ειδικής ενέργειας 107.0 kJ/mol να παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό απελευθέρωσης (90%) στην υψηλότερη τιμή ενεργότητας ($a_w = 0.97$), γεγονός που σημαίνει πως οι πόροι που δημιουργούνται από την διεργασία αυτή στην επιφάνεια των κυττάρων, συντελούν στην διάχυση του ελαίου προς το εξωτερικό. Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, αρκετά υψηλές τιμές ποσοστού απελευθέρωσης (80% σε $a_w=0.97$) παρουσιάζουν και τα ομογενοποιημένα κύτταρα, τα οποία λόγω της πλήρους διάρρηξής τους δεν επιφέρουν ισχυρή συγκράτηση του ελαίου.

Η θερμοκρασία επώασης δεν επηρεάζει το φαινόμενο της απελευθέρωσης του ελαίου από τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, πιθανότατα λόγω του μικρού βαθμού καταπόνησης τους, εφόσον δεν έχουν επεξεργαστεί περαιτέρω. Στις περιπτώσεις των αυτολυμένων κυττάρων και των κυττάρων

που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης αυξάνει τις τιμές των ποσοστών απελευθέρωσης για τιμές ενεργότητας μεγαλύτερες από 0.84, γεγονός που οφείλεται στην επιπλέον θερμοκρασιακή καταπόνηση που δέχονται τα είδη διαρρηγμένα κύτταρα, με αποτέλεσμα την ασθενέστερη συγκράτηση του ελαίου. Οι διαφορές αυτές είναι αρκετά αισθητές στις περιπτώσεις των κυττάρων PEF2 και PEF3, ενώ τα κύτταρα PEF1 και τα αυτολυμένα κύτταρα παρουσιάζουν μικρότερες διαφορές με την θερμοκρασία επώασης. Τέλος, εντονότερη απελευθέρωση σε υψηλή θερμοκρασία επώασης παρουσιάζουν τα ομογενοποιημένα κύτταρα, και μάλιστα από μικρότερες τιμές ενεργότητας (0.67).

Συμπερασματικά, η διάρρηξη των κυττάρων που προκαλούν οι διεργασίες των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων και της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, ενισχύουν την απελευθέρωση του ελαίου από τις κάψουλες, λόγω των πόρων που δημιουργούνται και της καταστροφής της δομής των κυττάρων αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις αυτές η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης επηρεάζει περαιτέρω το κυτταρικό περίβλημα, το οποίο καταπονείται σε μεγαλύτερο βαθμό. Παρόλα αυτά, κατά την αυτόλυση, η κυτταρική διάρρηξη που προκαλείται δεν επηρεάζει τόσο έντονα το φαινόμενο της απελευθέρωσης.

6.4. Επίδραση Προκατεργασίας Κυττάρων και Παραμέτρων Επώασης στη Σύσταση του Ενθυλακωμένου Ελαίου

Βάσει των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) προέκυψε πως οι κατεργασίες κυτταρικής διάρρηξης επηρεάζουν την σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου. Συγκεκριμένα η αύξηση της διαπερατότητας με την διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων που επιφέρει η αυτόλυση και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιφέρει μεγαλύτερη περιεκτικότητα ελαίου σε πτητικές ενώσεις (ρ-κυμένιο και γ-τερπινένιο), σε σχέση με την σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου των ανεπεξέργαστων κυττάρων, λόγω της επιλεκτικότητας της διάχυσης των ουσιών (οι υδρόφοβες ουσίες διαχέονται βραδύτερα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης). Μικρότερες συγκεντρώσεις πτητικών ουσιών παρουσιάζει επίσης το ενεργό φορτίο των ομογενοποιημένων κυττάρων, λόγω της απουσίας της δομής του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον η αύξηση του χρόνου επώασης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε ρ-κυμένιο και γ-τερπινένιο, οι οποίες αποτελούν υδρόφοβες ενώσεις που διαχέονται βραδύτερα σε σχέση με την καρβακρόλη που διαθέτει μια ομάδα υδροξυλίου, η οποία του επιτρέπει να διαχέεται ταχύτερα. Τέλος η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης επιφέρει την αλλοίωση της σύστασης του ελαίου ρίγανης, με την περιεκτικότητα του γ-τερπινενίου να μειώνεται και της καρβακρόλης να αυξάνεται στους 65°C. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πτητικότητα του γ-τερπινενίου.

6.5. Πλεονεκτήματα Ενθυλάκωσης Αιθέριου Ελαίου Ρίγανης σε Κύτταρα Μαγιάς

Η μαγιά αποτελεί μια οικονομική πρώτη ύλη, η οποία βρίσκεται σε αφθονία. Επίσης, μεγάλες ποσότητες κυττάρων μαγιάς προκύπτουν ως παραπροϊόν από τις βιομηχανίες τροφίμων. Η ενθυλάκωση αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κύτταρα μαγιάς, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αξιοποίηση αυτού του παραπροϊόντος, εφόσον τα κύτταρα δεν είναι απαραίτητο να είναι ζωντανά κατά την διάρκεια της ενθυλάκωσης. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή υπερτερεί έναντι των παραδοσιακών μεθόδων ενθυλάκωσης, λόγω του οικονομικού εξοπλισμού που απαιτείται για την παραγωγή των καψουλών. Επειδή ο μηχανισμός της ενθυλάκωσης του ελαίου στηρίζεται στην

παθητική διάχυση, ο εξοπλισμός που απαιτείται αρκεί να παρέχει συνεχή ανάδευση στο μείγμα κυττάρων-ελαίου υπό σταθερή θερμοκρασία.

6.6. Προτάσεις για Μελλοντική Μελέτη

Εφόσον η κινητική της ενθυλάκωσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κύτταρα μαγιάς και το φαινόμενο της απελευθέρωσης του ελαίου τεκμηριώθηκαν, θα μπορούσε να μελετηθεί η εφαρμογή των καψουλών, με την ενσωμάτωση τους αρχικά σε ένα σύστημα μοντέλο και στη συνέχεια σε τρόφιμο. Η εφαρμογή αυτή μπορεί να αποσκοπεί τόσο στην προστασία του συστήματος από την ανάπτυξη μικροοργανισμών, όσο και στην βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, προσδίδοντάς του χαρακτηριστικό άρωμα ρίγανης. Η ενσωμάτωση των καψουλών σε τρόφιμο, θα απαιτούσε την μικροβιακή μελέτη του συστήματος, καθώς και την εφαρμογή οργανοληπτικών δοκιμών, ώστε η προστασία του τροφίμου να συνδυαστεί με ευχάριστα χαρακτηριστικά (όπως γεύση, οσμή κ.α.) προς τον καταναλωτή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2011). Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας (2η εκδ.). Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
- Arthur, H., & Watson, K. (1976). Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology*, 128(1), 56-68.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C., & Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia*, 53(6), 220–223.
- Barnett, J. A. (1975). The entry of D-ribose into some yeasts of the genus *Pichia*. *Journal of General Microbiology*, 90(1), 1-12.
- Běhalová, B., & Beran, K. (1979). Activation of Proteolytic Enzymes during Autolysis of Disintegrated Baker's Yeast. *Folia Microbiologica*, 24, 455-461.
- Bekatorou, A., Psarianos, C., & Koutinas, A. A. (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 407–415.
- Bishop, J. R. P., Nelson, G., & Lamb, J. (1998). Microencapsulation in yeast cells. *Journal of Microencapsulation*, 15(6), 761–773.
- Botsoglou, N. A., Grigoropoulou, S. H., Botsoglou, E., Govaris, A., & Papageorgiou, G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked Turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, 65(3), 1193–1200.
- Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1986). Review: Disruption of microbial cells for intracellular products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 106(C), 186–193.
- Czerniak, A., Kubiak, P., Białas, W., & Jankowski, T. (2015). Improvement of oxidative stability of menhaden fish oil by microencapsulation within biocapsules formed of yeast cells. *Journal of Food Engineering*, 167, 2–11.
- Diels, A. M. J., & Michiels, C. W. (2006). High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 32, pp. 201–216.
- Dimopoulos, G., Stefanou, N., Andreou, V., & Taoukis, P. (2018). Effect of pulsed electric fields on the production of yeast extract by autolysis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48(June), 287–295.
- Fantes, P., & Beggs, J. (2000). *The Yeast Nucleus*. Oxford University Press.
- Feldmann, H. (2011). Cell Structures and Functions. In H. Feldmann, *Yeast - Molecular and Cell Biology* (pp. 19-21). Wiley-Blackwell.
- Geciova, J., Bury, D., & Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review. *International Dairy Journal*, Vol. 12, pp. 541–553.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213–224.
- Greenspan, L. (1976). Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 23(1), 53–66.
- Guimarães, A. G., Oliveira, M. A., Alves, R. D. S., Menezes, P. D. P., Serafini, M. R., De Souza Araújo, A. A., Bezerra, D. P., Quintans, L. J. (2015). Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions*, 227, 69–76.
- Hernawan, T., & Fleet, G. (1995). Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(6), 440–450.

- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, *95*(1), 50–56.
- Kleinig, A. R., & Middelberg, A. P. J. (1998). On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*, *53*(5), 891–898.
- Klis, F. M. (1994). Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast*, *10*(7), 851–869.
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer, wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, *16*(10), 2091–2102.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, *112*(1), 77–83.
- Liu, D., Zeng, X. A., Sun, D. W., & Han, Z. (2013). Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *18*, 132–137.
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. *Polyphenols in Plants* (2nd ed.).
- Ostergaard, S., Olsson, L., & Nielsen, J. (2000, March). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(1), 34–50.
- Paramera, E. I., Karathanos, V. T., & Konteles, S. J. (2014). Yeast Cells and Yeast-Based Materials for Microencapsulation. In *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 267–281).
- Puértolas, E., Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2012). Improving Mass Transfer to Soften Tissues by Pulsed Electric Fields: Fundamentals and Applications. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 263–282.
- Raso, J., Alvarez, I., Condón, S., & Sala Trepat, F. J. (2000). Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *1*(1), 21–29.
- Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1991). *Yeast Technology* (2nd ed.). New York, New York, United States of America: Van Nostrand Reinhold.
- Risch, S. J. (2009). *Encapsulation: Overview of Uses and Techniques*. (7), 2–7.
- Rosa, C. A., & Péter, G. (2006). *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Berlin, Germany: Springer.
- Sultana, A., Miyamoto, A., Lan Hy, Q., Tanaka, Y., Fushimi, Y., & Yoshii, H. (2017). Microencapsulation of flavors by spray drying using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Engineering*, *199*, 36–41.
- Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2018). A kinetic study of essential oil components distillation for the recovery of carvacrol rich fractions. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *9*(March), 117–123.
- Van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, Vol. 59, pp. 304–322.
- Vuković, R., & Mrša, V. (1995). Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Croatica Chemica Acta*, *68*(3), 597–605
- Walker, G. M. (1998). Yeast Cytology. In G. M. Walker, *Yeast Physiology and Biotechnology* (pp. 11–50). John Wiley and Sons.
- Walker, G.M., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, *2*(4), 30.

- Walker, K., Skelton, H., & Smith, K. (2002). Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Cutaneous Pathology*, 29(10), 616-618.
- Wang, J., Li, M., Zheng, F., Niu, C., Liu, C., Li, Q., & Sun, J. (2018). Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 1–8.
- Yap, B. H. J., Dumsday, G. J., Scales, P. J., & Martin, G. J. O. (2015). Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. *Bioresource Technology*, 184, 280–285.
- Yong, E. (2012, January 16). Yeast suggests speedy start for multicellular life. *Nature*, Nature News.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π.1. Πίνακες Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA) για την Μελέτη της Σύστασης του Ενθυλακωμένου Ελαίου Ρίγανης του Κεφαλαίου 5.4.

Duncan test; variable p-cymene (ANC Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .46929, df = 72.)					
Cell No.	Treatment	p-cymene Mean	1	2	3
4	HC	5.444981		****	
1	UC	6.009857			****
5	PEF1	6.769866	****		
6	PEF2	6.837581	****		
2	AC8	6.837721	****		
7	PEF3	6.857007	****		
3	AC24	7.150921	****		

Duncan test; variable p-cymene (ANC Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .46929, df = 72.)					
Cell No.	Time	p-cymene Mean	1	2	3
1	0 h	5.202101	****		
2	5 h	6.977517		****	
3	24 h	7.495211			****

Εικόνα Π.1. Αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για την σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου σε p-κυμένιο, (α) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης, (β) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των χρόνων επώασης

Duncan test; variable gamma-terpinene (ANOVA Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .12203, df = 72.000)						
Cell No.	Treatment	gamma-terpinene Mean	1	2	3	4
4	HC	2.810454			****	
5	PEF1	3.164795	****			
1	UC	3.210403	****			
6	PEF2	3.222888	****			
2	AC8	3.546896		****		
7	PEF3	3.663131		****		
3	AC24	3.980734				****

Duncan test; variable gamma-terpinene (ANOVA Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .12203, df = 72.000)				
Cell No.	Time	gamma-terpinene Mean	1	2
1	0 h	2.779322		****
3	24 h	3.579353	****	
2	5 h	3.755312	****	

Duncan test; variable gamma-terpinene (ANOVA Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .12203, df = 72.000)				
Cell No.	Temperature	gamma-terpinene Mean	1	2
4	65 C	3.059331		****
3	45 C	3.393089	****	
2	37 C	3.495307	****	
1	30 C	3.537589	****	

Εικόνα Π.2. Αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για την σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου σε γ-τερπινένιο, (α) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης, (β) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των χρόνων επώασης, (γ) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των θερμοκρασιών επώασης

Duncan test; variable p-thymol Homogenous Groups, alpha = Error: Between MS = .01876, d					
Cell No.	Time	p-thymol Mean	1	2	3
1	0 h	5.161159	****		
2	5 h	5.272631		****	
3	24 h	5.363152			****

Εικόνα Π.3. Αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για την σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου σε θυμόλη, αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των χρόνων επώασης

Duncan test; variable carvacrol (ANOVA) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .79576, df = 72.000						
Cell No.	Treatment	carvacrol Mean	1	2	3	4
3	AC24	83.89959		****		
2	AC8	84.30167	****	****		
7	PEF3	84.45783	****	****		
6	PEF2	84.76829	****		****	
5	PEF1	85.05903	****		****	
1	UC	85.50453			****	
4	HC	86.69878				****

(α)

Duncan test; variable carvacrol (ANOVA) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .79576, df = 72.000				
Cell No.	Time	carvacrol Mean	1	2
3	24 h	83.97053	****	
2	5 h	84.05363	****	
1	0 h	86.84291		****

(β)

Duncan test; variable carvacrol (ANOVA) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = .79576, df = 72.000				
Cell No.	Temperature	carvacrol Mean	1	2
2	37 C	84.54679	****	
3	45 C	84.62260	****	
1	30 C	84.70502	****	
4	65 C	85.94830		****

(γ)

Εικόνα Π.4. Αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για την σύσταση του ενθυλακωμένου ελαίου σε καρβακρόλη, (α) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης, (β) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των χρόνων επώασης, (γ) αποτελέσματα Duncan's test για την ομαδοποίηση των θερμοκρασιών επώασης