



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ &
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

Διπλωματική Εργασία

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

ΤΣΙΤΣΕΛΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

Υπεύθυνη καθηγήτρια

ΚΡΟΚΙΔΑ Μ.

Φεβρουάριος, 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, στη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2020 – 2021.

Σκοπός της εν λόγω διπλωματικής εργασίας, ήταν η δημιουργία καινοτόμων ζωοτροφών με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα, από εδώδιμα αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πληθώρα μεθόδων εκχύλισης, μεθόδων ενθυλάκωσης και εν συνεχεία χαρακτηρισμός αυτών, εως ότου προέκυψε η εγκλεισμένη βιοδραστική ουσία, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετη φυτική ύλη στην παραγωγή πέλλετ ζωοτροφής, το οποίο και αποτέλεσε το τελικό προϊόν.

Για την ολοκλήρωση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά, την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Μαγδαληνή Κροκίδα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα των ζωοτροφών, των φυσικών αντιβιοτικών και βοτάνων, αναθέτοντάς μου ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα. Επιπλέον την ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία μας, την καθοδήγησή της, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Περισσότερο, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Παναγιώτα Ελένη, για την ανεκτίμητη στήριξη που μου προσέφερε καθώς και για όλο το χρόνο που αφιέρωσε σε μένα καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της, θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη, όλα τα μέλη του εργαστηρίου που μου παρήχαν με χαρά τις συμβουλές τους σε ό,τι και αν χρειάστηκα, δημιουργώντας ένα όμορφο και ζεστό περιβάλλον εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Νάντια Λαϊνά, πολύτιμη φίλη μου και υποψήφια διδάκτορα, για την ανεκτίμητη βοήθειά της, την αγάπη και τη στήριξη που μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω στους δικούς μου ανθρώπους, στους φίλους που με στήριξαν και στην οικογένειά μου, για την ενθάρρυνση και τη συμπαράστασή τους καθ'όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον στον τομέα της παραγωγής ζωοτροφών, και κατ'επέκταση στον κλάδο της κτηνοτροφικής βιομηχανίας, έγκειται στην ανάπτυξη νέων καινοτόμων προϊόντων, που στοχεύουν στη βελτίωση της ζωής των ζώων κατά την εκτροφή και της ποιότητας των τελικών προϊόντων αυτών, μέσω της μείωσης ή αντικατάστασης των συνθετικών αντιβιοτικών που τους χορηγούνται προληπτικά ή και θεραπευτικά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης των ωφελειών της βιολογικής δράσης ολικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, καθώς και αιθέριων ελαίων, από επιλεγμένα βότανα με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μετέπειτα στην ανάπτυξη λειτουργικών ζωοτροφών με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Για τον σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν τα αρωματικά φυτά βάλσαμο και χαμομήλι, τα οποία ανακτήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως προς τα βιοδραστικά τους συστατικά. Χρησιμοποιήθηκαν καινοτόμες τεχνολογίες εκχύλισης παρουσία υπερήχων (MAE) και μικροκυμάτων (UAE). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αριστοποίηση των μεθόδων αυτών, ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων που προέκυψαν, ενώ συγχρόνως μελετήθηκε και η επίδραση των παραμέτρων εκχύλισης στην ποιότητα των εκχυλισμάτων. Από τη σύγκριση του βιοδραστικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, προέκυψαν δύο βέλτιστα δείγματα, ένα για κάθε φυτό αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning), πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός στα επιλεγμένα βέλτιστα εκχυλίσματα σε μήτρα ζεΐνης (zein), καθώς και σε εμπορικά αιθέρια έλαια από επιλεγμένα βότανα (βάλσαμο, χαμομήλι δενδρολίβανο, ρίγανη και μείγμα αυτών), σε μήτρα ορού γάλακτος πρωτεΐνης:πουλλουλάνης (WPI:pu1). Ακολούθησε χαρακτηρισμός των νανοϊνών με τη μέθοδο του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy – SEM) και υπολογισμός του ποσοστού εγκλεισμού τους.

Από την εξέταση των νανοϊνών στο SEM, διαπιστώθηκε καλύτερη ομοιομορφία ινών και διασπορά των βιοδραστικών ουσιών, στις δομές με υδατική μήτρα WPI:pu1 (30:70%w/w) συγκριτικά με τις δομές που σχημάτισε η αιθανολική μήτρα ζεΐνης (20%w/w), οι οποίες εμφάνιζαν πολλούς σφαιρικούς σχηματισμούς και διακλαδώσεις. Επιπλέον, παρατηρώντας τα ποσοστά εγκλεισμού των βέλτιστων αιθανολικών εκχυλισμάτων βαλσάμου και χαμομηλιού σε μήτρα ζεΐνης, διαπιστώθηκε ότι είναι σημαντικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των αιθέριων ελαίων στην υδατική μήτρα WPI:pu1, με συνέπεια να πρέπει να διερευνηθούν και άλλες μήτρες με δυνητικά καλύτερα αποτελέσματα. Το καλύτερο ποσοστό εγκλεισμού με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης για τα δείγματα των αιθέριων ελαίων αλλά και συνολικά για τα δείγματα που εγκλείστηκαν παρουσίασε το μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) με ποσοστό εγκλεισμού 73%.

Ακολούθως, προκειμένου να παραχθεί το μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε ποσότητα ικανή για να ενσωματωθεί στη συνέχεια ως πρόσθετη ύλη στο τελικό προϊόν, ακολουθήθηκαν δύο νέες μέθοδοι εγκλεισμού: η ξήρανση με εκνέφωση (spray drying) και η ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying). Από τον χαρακτηρισμό των εγκλεισμένων δειγμάτων μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) προέκυψαν δομές

που παρουσίαζαν καλή διασπορά και κατ'επέκταση επιτυχημένο εγκλεισμό των ενώσεων στόχων και για τις δύο μεθόδους εγκλεισμού. Παρόλα αυτά, διαπιστώθηκε πως το δείγμα εγκλεισμένης σκόνης μείγματος αιθέριων ελαίων με τη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying) εμφάνιζε πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα με μεγαλύτερο ποσοστό εγκλεισμού (29.43%) συγκριτικά με τη μέθοδο του freeze drying με ποσοστό εγκλεισμού (10.68%).

Τελικώς, παρασκευάστηκαν 4 διαφορετικά δείγματα συγκεκριμένων προδιαγραφών, τα οποία οδηγήθηκαν προς εκβολή και παραγωγή των τελικών πέλλετ ζωοτροφής. Τα δείγματα που προέκυψαν (A, B, C, D) μελετήθηκαν ως προς το βιοδραστικό τους περιεχόμενο και διαπιστώθηκε ότι, τα εγκλεισμένα δείγματα A και B εμφάνιζαν μικρότερη απώλεια βιοδραστικών ουσιών μετά την διαδικασία της εκβολής (31.66% απώλεια βιοδραστικής ουσίας για το A και 34.42% για το B) συγκριτικά με το μη εγκλεισμένο oil mix (57.52% για το C). Επομένως, γίνεται φανερό πως ο εγκλεισμός των δειγμάτων συνέβαλε στην διατήρηση της βιοδιαθεσιμότητας του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, συγκρίνοντας τα δείγματα A και B, διαπιστώθηκε πως ο εγκλεισμός με τη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση ήταν πιο αποδοτικός από αυτόν της ξήρανσης με κατάψυξη, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη διατήρηση του βιοδραστικού περιεχομένου στο τελικό προϊόν, γεγονός που επαληθεύτηκε και από το ποσοστό εγκλεισμού των δύο μεθόδων ενθυλάκωσης.

Λέξεις κλειδιά:

Ζωοτροφές, αντιβιοτικά, εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια, βιοδραστικά συστατικά, φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική δράση, εγκλεισμός, μήτρα, ηλεκτροστατική ινοποίηση, ξήρανση με εκνέφωση, ξήρανση με κατάψυξη, βιοδιαθεσιμότητα, εκβολή, πέλλετ.

ABSTRACT

In recent years, the scientific interest in the field of animal feeds production, and consequently in the livestock industry, lies in the development of new innovative products, aiming to improve breeding quality, as well as the quality of their final products, through the reduction or replacement of synthetic antibiotics given prophylactically or therapeutically.

In the present dissertation, the possible benefits of the biological action of total extracts of aromatic plants and essential oils utilization is investigated. The raw materials selected, were derived from greek herbs with a high content of bioactive compounds, in order to be used in the development of functional feeds with improved antioxidant and antimicrobial activity.

For this to be achieved, the aromatic plants hypericum (St. John's wort) and chamomile were selected, recovered, and characterized in terms of their bioactive ingredients. Innovative extraction technologies, such as Ultrasound and Microwave Assisted Extraction (UMAE) were applied. Afterwards, these methods were optimized in terms of the total phenolic content (TPC) and the antioxidant capacity of the resulting extracts, whilst the effect of the extraction parameters on the quality of the extracts was studied. From the comparison of the bioactive contents of the extracts, two optimal samples were obtained, one for each aromatic plant respectively.

Then, electrospinning technology was applied to the selected optimal extracts, which were encapsulated in a zein matrix, as well as to commercial essential oils from selected herbs (hypericum, rosemary, chamomile, oregano and their mixture) in an aqueous matrix of Whey Protein Isolate: pullulan (WPI: pul). Subsequently, the nanofibers were characterized by the Scanning Electron Microscopy (SEM) method, and their inclusion rate was calculated.

The examination of the nanofibers at SEM, revealed a better fiber homogeneity and dispersion of bioactive compounds in the structures of the aqueous matrix WPI: pul (30:70% w/w), compared to the structures formed by the ethanolic matrix of zein (20%w/w), which showed many spherical formations (beads) and complicated branches. In addition, observing the inclusion rates of the optimal hypericum and chamomile ethanolic extracts in the zein matrix, it was found that they are significantly lower than the equivalent ones of the essential oils in the aqueous matrix WPI: pul, so different matrices with potential results should be investigated. The best inclusion rate of the electrospinning process, was found generally for the encapsulated essential oils, and specifically for the sample containing the essential oils mixture (oil mix), with an inclusion rate of 73%.

Further on, in order to produce the oil mix in a sufficient amount to be subsequently incorporated as an additive in the final product, two new encapsulation techniques were applied: spray drying and freeze drying. The characterization of the encapsulated samples of the oil mix, revealed structures of good dispersion, resulting in successful encapsulation of the target compounds, in both encapsulation methods. However, it was found that the sample with the encapsulated oil mix powder by the spray drying method, showed more satisfactory results and a higher inclusion rate (29.43%), compared to the freeze drying method sample (10.68% inclusion rate).

Finally, 4 different samples of determined specifications were prepared, which led to the extrusion device for the production of the final feed products (pellets). The resulting samples (A, B, C, D) were scrutinized for their bioactive content. It was found that the encapsulated samples A and B, showed less loss of bioactive substances after the extrusion process (31.66% loss of bioactive substance for A, and 34.42% for B), compared to the non-encapsulated oil mix sample (57.52% for C). Therefore, it becomes clear, that the inclusion of the encapsulated samples in the feed contributed to the maintainance of the bioavailability of the final product. In addition, comparing samples A and B revealed that inclusion rate by spray drying, was more efficient than freeze-drying one, ensuring greater retention of bioactive content in the final feed products.

Key words:

Animal feeds, antibiotics, extracts, essential oils, bioactive compounds, total phenolic content, antioxidant activity, encapsulation, matrix, electrospinning, spray drying, freeze drying, bioavailability, extrusion, pellet.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
ABSTRACT.....	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ix
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	xiii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αντικείμενο και Στόχοι	1
1.2 Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας – Μεθοδολογική προσέγγιση	1
1.3 Επιμέρους στόχοι – Αναμενόμενη συνεισφορά	2
1.4 Διάρθρωση	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
2.1 Φυτοβιοτικά	5
2.1.1 Πηγές φυτοβιοτικών - Αρωματικά Φυτά-Αιθέρια Έλαια.....	5
2.1.2 Βιοδραστικά Συστατικά.....	7
2.2 Ανάκτηση Βιοδραστικών Συστατικών	8
2.2.1 Μέθοδοι Εκχύλισης.....	8
2.2.2 Παράμετροι Εκχύλισης και Αριστοποίησης	12
2.3 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών	15
2.3.1 Μέθοδοι Εγκλεισμού	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	23
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	23
3.1.1 Ανάκτηση Βιοδραστικών Συστατικών	23
3.1.2 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών.....	23
3.1.3 Χαρακτηρισμός Βιοδραστικών Συστατικών.....	24
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ-ΟΡΓΑΝΑ.....	25
3.2.1 Εκχύλιση Βιοδραστικών Συστατικών	25

3.2.2 Χαρακτηρισμός Βιοδραστικών Συστατικών.....	29
3.2.3 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών.....	30
3.2.4 Χαρακτηρισμός νανοϊνών	32
3.2.5 Εγκλεισμός βέλτιστου δείγματος.....	35
3.2.6 Προσθήκη εγκλεισμένου μείγματος ελαίων σε πρόμειγμα για ζωοτροφές - Extrusion	36
3.2.7 Χαρακτηρισμός τελικού προϊόντος-πέλλετ ζωοτροφών	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
4.1 Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων.....	41
4.1.1 Επίδραση των τριών μεταβλητών παραμέτρων εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για το βάσλαμο.	44
4.1.2 Επίδραση των τριών μεταβλητών παραμέτρων εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για το χαμομήλι.....	46
4.2 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών με τη μέθοδο της Ηλεκτροστατικής Ινοποίησης	48
4.3 Χαρακτηρισμός Νανοϊνών.....	55
4.3.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης – Scanning Electron Microscopy (SEM).....	55
4.3.2 Ποσοστό Εγκλεισμού	60
4.4 Χαρακτηρισμός Βέλτιστου Δείγματος (oil mix).....	61
4.4.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης – Scanning Electron Microscopy (SEM).....	62
4.4.2 Ποσοστό εγκλεισμού.....	63
4.5 Χαρακτηρισμός τελικού προϊόντος - πέλλετ ζωοτροφών	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Επίδραση της έντασης μικροκυμάτων (MW) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο	44
Διάγραμμα 2: Επίδραση της έντασης υπερήχων (US) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο	44
Διάγραμμα 3: Επίδραση της διάρκειας εκχύλισης (duration) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο	45
Διάγραμμα 4: Επίδραση της έντασης μικροκυμάτων (MW) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο	46
Διάγραμμα 5: : Επίδραση της έντασης υπερήχων (US) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο	46
Διάγραμμα 6: Επίδραση της διάρκειας εκχύλισης (duration) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο	47

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παράμετροι που επηρεάζουν τη δημιουργία των ηλεκτροστατικά ινοποιημένων ινών	18
Πίνακας 2: Συνδυασμοί τιμών παραμέτρων για τα πειράματα αριστοποίησης των εκχυλίσμων βαλσάμου	26
Πίνακας 3: Συνδυασμοί τιμών παραμέτρων για τα πειράματα αριστοποίησης των εκχυλίσμων χαμομηλιού	27
Πίνακας 4 : Κωδικοί δειγμάτων προς εκβολή	37
Πίνακας 5 : Προδιαγραφές δειγμάτων προς εκβολή	37
Πίνακας 6: Αποτελέσματα TPC, DPPH και απόδοσης για τα εκχυλίσματα βαλσάμου	41
Πίνακας 7: Αποτελέσματα TPC, DPPH και απόδοσης για τα εκχυλίσματα χαμομηλιού	42
Πίνακας 8: Ιδιότητες βέλτιστων δειγμάτων εκχύλισης UMAE	43
Πίνακας 9: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας βέλτιστων δειγμάτων εκχύλισης UMAE.....	43
Πίνακας 10: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα ζεϊνης συγκέντρωσης 20%	48
Πίνακας 11: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα zein 20%w/w σε μείγμα no7:H ₂ O - 90:10 v/v.....	49
Πίνακας 12: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα zein 20%w/w σε μείγμα no27:H ₂ O - 90:10 v/v.....	50
Πίνακας 13: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul συγκέντρωσης (30:70)%	51
Πίνακας 14: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – chamomile EO.....	52
Πίνακας 15: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – rosemary EO.....	52
Πίνακας 16: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – oregano EO.....	53
Πίνακας 17: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – hypericum EO.....	53
Πίνακας 18: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – oil mix ...	54
Πίνακας 19: Συνθήκες επιβαλλόμενης τάσης, παροχής και απόστασης που εφαρμόστηκαν στην ηλεκτροστατική ινοποίηση.....	55
Πίνακας 20: Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού εκχυλισμάτων no7 και no27.....	60
Πίνακας 21: Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού αιθέριων ελαίων.....	61

Πίνακας 22: Ποσοστό εγκλεισμού μείγματος αιθέριων ελαίων με spray drying και freeze drying	64
Πίνακας 23: Απώλεια βιοδραστικής ουσίας των δειγμάτων κατά την διαδικασία της εκβολής.....	64

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Κατάρρευση φυσαλίδας που δημιουργείται από τη σπηλαίωση και απελευθέρωση ουσιών από το δείγμα	11
Εικόνα 2: I)Καταψύκτης Panasonic, II)Συσκευή ξήρανσης υπό κενό	25
Εικόνα 3 : Διάταξη εκχύλισης UMAE, I) Συσκευή MAE, II) Συσκευή UAE.....	28
Εικόνα 4: Διάταξη της εκχύλισης Soxhlet, όπου 1: Θερμαντικός μανδύας, 2: Εκχύλισμα πριν από κάθε σιφωνισμό, 3: Συμπυκνωτήρας, 4: Θάλαμος εκχύλισης και 5: Σφαιρική φιάλη με το μείγμα διαλύτη και εκχυλίσματος	29
Εικόνα 5: Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 765 nm.....	29
Εικόνα 6: Συσκευή Ομοαξονικής Ηλεκτροστατικής Ινοποίησης - FLUIDNATEK LE-10, BioInicia.....	31
Εικόνα 7: Νανοΐνες που προέκυψαν από την ηλεκτροστατική ινοποίηση σε μήτρα wpi:pu1 για αιθέριο έλαιο : α) βαλσάμου, β) χαμομηλιού, γ) δενδρολίβανου, δ) ρίγανης και ε) μείγματος ελαίων(mix)	32
Εικόνα 8: Νανοΐνες που προέκυψαν από την ηλεκτροστατική ινοποίηση σε μήτρα ζεΐνης για τα εκχυλίσματα α)βαλσάμου και β) χαμομηλιού	32
Εικόνα 9: Λήψη δειγμάτων από αλουμινόχαρτο και τοποθέτησή τους σε κατάλληλους δειγματοτοφορείς για το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM).....	33
Εικόνα 10: Επιχρύσωση δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση στο SEM.....	33
Εικόνα 11 : Παραλαβή νανοϊνών	34
Εικόνα 12: Συσκευή ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying)	36
Εικόνα 13: Συσκευή εκβολής - extruder	38
Εικόνα 14: Δείγματα πέλλετ ζωοτροφής μετά την εκβολή	38
Εικόνα 15: Φυγοκεντρημένο δείγμα Α πριν την εκβολή (αριστερά) και μετά την εκβολή (δεξιά).....	39
Εικόνα 16: Φυγοκεντρημένο δείγμα Β πριν την εκβολή (αριστερά) και μετά την εκβολή (δεξιά).....	39
Εικόνα 17: Φυγοκεντρημένο δείγμα C πριν την εκβολή (αριστερά) και μετά την εκβολή (δεξιά).....	40
Εικόνα 18: Εικόνες από SEM για Νανοΐνες σκέτης μήτρας wpi:pu1 με επιβαλλόμενη τάση 25 kV και παροχή 1,5 mL/h σε κλίμακα α)20μm και β)10μm	55
Εικόνα 19: Εικόνες από SEM για νανοΐνες mix oil-WPI:pu1 με παροχές 0.1 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm	56
Εικόνα 20: Εικόνες από SEM για Νανοΐνες ελαίου βαλσάμου-WPI:pu1 με παροχές 0.1 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm.....	57
Εικόνα 21: Εικόνες από SEM για Νανοΐνες ελαίου χαμομηλιού-WPI:pu1 με παροχές 0.1 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm	58

Εικόνα 22 : Εικόνες από SEM για Νανοΐνες σκέτης μήτρας ζεΐνης με επιβαλλόμενη τάση 27.5 kV και παροχή 1 mL/h σε κλίμακα α)20μm και β)10μm	58
Εικόνα 23 : Εικόνες από SEM για Νανοΐνες του δείγματος no7 σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w με παροχή 1 mL/h και επιβαλλόμενη τάση 27.5 kV σε κλίμακα α) 20μm και β)10μm	59
Εικόνα 24: Εικόνες από SEM για νανοΐνες του δείγματος no27 σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w με παροχή 1 mL/h και επιβαλλόμενη τάση 27.5 kV σε κλίμακα α) 20μm και β)10μm	59
Εικόνα 25: Εικόνες από SEM για σκόνη μείγματος ελαίων (oil mix) σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm.....	62
Εικόνα 26 : Εικόνες από SEM για σκόνη μείγματος ελαίων (oil mix) σε κλίμακα α) 20μm και β)10μm....	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντικείμενο και Στόχοι

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη καινοτόμων ζωοτροφών με προσθήκη φυσικών αντιβιοτικών και αντιμικροβιακών παραγόντων.

Η ανάγκη αυξημένων αποδόσεων για τη θρέψη του παγκόσμιου πληθυσμού έχει οδηγήσει στην μετάβαση από ένα εκτατικό σύστημα κτηνοτροφίας, σε ένα εντατικό. Η εντατική κτηνοτροφία συνεπάγεται τη διαμονή μεγάλου αριθμού ζώων σε περιορισμένο χώρο αυξάνοντας το κίνδυνο μόλυνσης, με συνέπεια να καθίστανται η προληπτική χρήση αντιβιοτικών ως μια κοινή πρακτική για τον περιορισμό αυτού του κινδύνου. Οι πιο διαδεδομένοι τρόποι χορήγησης αντιβιοτικών στην σύγχρονη κτηνοτροφία, είναι η χορήγησή τους από το νερό, και ενσωμάτωσή τους στις ζωοτροφές. Ωστόσο, παρόλο που τα αντιβιοτικά είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της υγείας και της παραγωγικότητας των ζώων, όλο και περισσότεροι επιστήμονες συμφωνούν ότι η χρήση αντιβιοτικών ουσιών στην κτηνοτροφία κινδυνεύει να αυξήσει την αντιμικροβιακή αντοχή στα ανθρώπινα παθογόνα. Επομένως, **η μεγάλη σημασία και το επιστημονικό ενδιαφέρον** έγκειται στην ανάπτυξη μιας νέας προσέγγισης στην κτηνοτροφική βιομηχανία που στοχεύει στη βελτίωση της ζωής των ζώων κατά την εκτροφή, και της ποιότητας των τελικών προϊόντων μέσω της μείωσης ή αντικατάστασης των αντιβιοτικών.

Πρόσφατα, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί σε μια πολλά **υποσχόμενη εναλλακτική** υποκατάσταση των συνθετικών αντιβιοτικών, συγκεκριμένα, την αξιοποίηση των ωφέλειών της βιολογικής δράσης ελληνικών βοτάνων και φαρμακευτικών φυτών, ή αλλιώς φυτοβιοτικών, παρουσιάζοντας ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Σημαντικότερη πηγή φυτοβιοτικών θεωρούνται τα αρωματικά φυτά, τα οποία μελετώνται ως φυσικές πηγές βιολογικά δραστικών χημικών ουσιών (βιοδραστικών), με ποικίλλες θεραπευτικές ή/και προληπτικές για την υγεία δράσεις και ιδιότητες.

1.2 Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας – Μεθοδολογική προσέγγιση

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη καινοτόμων ζωοτροφών με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση από εδώδιμα αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις.

Η μεθοδολογική προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν αποτέλεσμα ενδελεχούς βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός και επιλογή αρωματικών φυτών και αιθέριων ελαίων, πλούσιων σε βιοδραστικά συστατικά και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Μέσω καινοτόμων, πράσινων τεχνολογιών εκχύλισης (εκχύλιση παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων) έγινε ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών των επιλεγμένων φυτών, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρήση διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού (μέθοδος ηλεκτροστατικού ψεκασμού, ξήρανση με κατάψυξη και ξήρανση με ψεκασμό) στα βέλτιστα εκχυλίσματα και στα αιθέρια έλαια, με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Ακολούθως, οι εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα υλών για την παραγωγή ζωοτροφών με τη

μέθοδο της φυγοκεντρικής εκβολής, και μελετήθηκαν τυχόν μεταβολές στο βιοδραστικό περιεχόμενο των τελικών προϊόντων.

1.3 Επιμέρους στόχοι – Αναμενόμενη συνεισφορά

Οι **επιμέρους στόχοι** της παρούσας εργασίας συνοψίζονται στα εξής:

- Μελέτη, αξιολόγηση και επιλογή εδώδιμων αρωματικών φυτών και αιθέριων ελαίων με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση.
- Βελτιστοποίηση της ανάκτησης βιοδραστικών ενώσεων από τα επιλεγμένα φυτά μέσω πράσινων μεθόδων εκχύλισης.
- Εγκλεισμός των βιοδραστικών ενώσεων των βέλτιστων εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων.
- Παραγωγή ζωτροφής με ενσωμάτωση φυτοβιοτικών και μελέτη της επίδρασής τους στο βιοδραστικό περιεχόμενο των τελικών προϊόντων.

Εφόσον όλοι οι στόχοι που αναφέρονται παραπάνω ολοκληρώθηκαν με επιτυχία στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, η **αναμενόμενη συνεισφορά** της θα μπορούσε να αποτελείται σαφώς από τις μεθοδολογίες και την παροχή εξειδικευμένης γνώσης για αντίστοιχα πειράματα από άλλους ερευνητές. Σημαντικά είναι όμως και τα επιστημονικά ευρήματα, καθώς δημιουργήθηκε ένα προϊόν με μοναδικά χαρακτηριστικά, του οποίου η εφαρμογή στον τομέα των ζωτροφών μπορεί μελλοντικά να αποβεί καθοριστική.

1.4 Διάρθρωση

Στο **πρώτο κεφάλαιο**, παρουσιάζονται αρχικά το αντικείμενο και οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ακολούθως, αναφέρεται η μεθοδολογική προσέγγιση που ακολουθήθηκε, οι επιμέρους στόχοι και η αναμενόμενη συνεισφορά της διπλωματικής εργασίας. Τέλος, παρουσιάζεται η διάρθρωσή της.

Στο **δεύτερο κεφάλαιο**, γίνεται αρχικά αναφορά στην έννοια των φυτοβιοτικών και κατ'επέκταση στα βιοδραστικά συστατικά τους που θα χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες ύλες στη δημιουργία πέλλετ ζωτροφής. Ακολουθεί παράθεση και ανάλυση διάφορων μεθόδων εκχύλισης για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν και στην εν λόγω διπλωματική εργασία. Εν συνεχεία, παρατίθενται και αναλύονται διάφορες μέθοδοι ενθυλάκωσης βιοδραστικών συστατικών, οι οποίες και εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία. Αναλυτικότερα για κάθε μέθοδο παρουσιάζεται η διάταξη της, εντοπίζονται οι διαφορές καθώς και τα πλεονεκτήματά της έναντι άλλων μεθόδων εγκλεισμού, ενώ παράλληλα αναφέρονται και οι διάφοροι τομείς εφαρμογής της κάθε μεθόδου.

Στο **τρίτο κεφάλαιο**, περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε. Έτσι, αρχικά, αναφέρονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση, και εν συνεχεία για τον εγκλεισμό των βιοδραστικών συστατικών, καθώς και για το μετέπειτα χαρακτηρισμό τους. Έπειτα, παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι μέθοδοι και οι αναλύσεις που ακολουθήθηκαν προκειμένου να καταλήξουμε στην παρασκευή της εγκλεισμένης βιοδραστικής ουσίας, και την μελέτη τόσο αυτής, όσο και του τελικού πέλλετ ζωτροφής που παράχθηκε και την περιείχε.

Στο **τέταρτο κεφάλαιο**, παρουσιάζονται, αναλύονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Τέλος, το **πέμπτο κεφάλαιο** περιέχει τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρούσα εργασία, καθώς και μελλοντικές προοπτικές και προτάσεις για την εξέλιξη του μελετώμενου θέματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Φυτοβιοτικά

Τα φυτοβιοτικά (Phytobiotics, PhytoGENICS, Botanicals) αποτελούν μια ομάδα φυσικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετες φυτικές ύλες στη διατροφή των ζώων. Αυτές οι ουσίες προέρχονται από βότανα, μπαχαρικά και άλλα φυτά και προσθέτονται στις ζωοτροφές, με σκοπό την αύξηση των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων, παράλληλα με τη βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων.[1]

Ο όρος φυτογόνα πρόσθετα ζωοτροφών, επινοήθηκε πριν από σχεδόν τρεις δεκαετίες από μια αυστριακή πολυεθνική εταιρεία πρόσθετων ζωοτροφών με την επωνυμία Delacon και κυκλοφόρησε για πρώτη φορά στην αγορά τη δεκαετία του 1980.[2]

Τα φυτοβιοτικά μελετώνται ως φυσικές πηγές βιολογικά δραστικών χημικών ουσιών, στην προσπάθεια μείωσης και σταδιακής κατάρτησης, των αντιμικροβιακών αυξητικών παραγόντων (antimicrobial growth promoters, AGPs) που χρησιμοποιούνται ευρέως στη σύγχρονη κτηνοτροφία. Σε σύγκριση με τα αντιβιοτικά, τα φυτοβιοτικά θεωρείται ότι είναι περισσότερο φυσικά, λιγότερο τοξικά, ελεύθερα καταλοίπων, ιδιότητες που τα καθιστούν ιδανικές πρόσθετες ύλες ζωοτροφών, για την εκτροφή των ζώων. Ορισμένα από τα βασικά οφέλη που συνδέονται με τη χρήση των φυτοβιοτικών στη διατροφή των παραγωγικών ζώων, περιλαμβάνουν αυξημένη πρόσληψη τροφής, βελτιωμένη λειτουργία του εντέρου, πρόληψη διάρροιας, αυξημένη μικροβιακή αντοχή, και πολλαπλή αντιοξειδωτική δράση.[3]

Ανάλογα με την προέλευση, τη διαδικασία παραγωγής, και τη σύστασή τους, τα φυτοβιοτικά χωρίζονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες. Αυτές είναι τα βότανα (ολόκληρα αρωματικά φυτά ή τμήματα αυτών), τα καρυκεύματα (μπαχαρικά), τα αιθέρια έλαια (προϊόν απόσταξης από φυτά ή τμήματα αυτών) και οι ελαιορητίνες (φυσικός συνδυασμός ελαίου και ρητίνης που μπορεί να εξαχθεί από τα φυτά). Σημαντικότερη πηγή φυτοβιοτικών αποτελούν τα αρωματικά φυτά.[3]

2.1.1 Πηγές φυτοβιοτικών - Αρωματικά Φυτά-Αιθέρια Έλαια

Όπως προαναφέρθηκε τα φυτοβιοτικά αποτελούν μια ομάδα φυσικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα ζωοτροφών, με σκοπό την αύξηση των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων και τη βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων.

Σημαντικότερη πηγή φυτοβιοτικών θεωρούνται τα αρωματικά φυτά. Τα αρωματικά φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για εκατοντάδες χρόνια σε κάθε σημείο της γης από πολυάριθμους πολιτισμούς, όχι μόνο στη διατροφή αλλά και στην αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας. Στην Ελλάδα λόγω των ιδανικών κλιματολογικών και εδαφολογικών συνθηκών που επικρατούν, φύτευται ένας μεγάλος αριθμός αρωματικών φυτών. Υπάρχουν πολλές και διαφορετικές οικογένειες στις οποίες ανήκουν τα αρωματικά φυτά όπως π.χ το χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*) της οικογένειας Asteraceae, το βάλσαμο (*Hypericum perforatum* L.) της οικογένειας Hypericaceae, ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) της οικογένειας Lamiaceae, η δάφνη (*Laurus nobilis*) της οικογένειας Lauraceae, ο μάραθος (*Foeniculum vulgare*) της οικογένειας Apiaceae κ.ά.[3],[4]

Εξίσου σημαντικά και δραστικά, θεωρούνται και τα αιθέρια έλαια (essential oils, EOs) των φυτών. Τα αιθέρια έλαια, είναι πολυσύνθετα μείγματα οργανικών ουσιών, τα οποία υπό κανονικές θερμοκρασίες διαχέονται χωρίς να αφήνουν υπολείμματα. Συναντώνται συνήθως στα φύλλα, στους βλαστούς και στα αναπαραγωγικά όργανα (άνθη, καρπούς και σπόρους) των φυτών. Μυρίζουν χαρακτηριστικά και έχουν έντονα καυστική ή πικρή γεύση. Η επίδρασή τους, είναι εξαιρετικά πολύμορφη. Ασκούν δράση αντιβακτηριδιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, ηρεμιστική, κατασταλτική κ.α.[3]

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθησαν χάρη στις εξαιρετικές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και θεραπευτικές τους ιδιότητες, τα αρωματικά φυτά χαμομήλι και βάλσαμο, καθώς και τα αιθέρια έλαια ρίγανης, δενδρολίβανου, βάλσαμου, και χαμομηλιού (καθώς και το μείγμα αυτών), προκειμένου να μελετηθούν, να αξιολογηθούν και να χρησιμοποιηθούν ως φυτικές πρόσθετες ύλες, σε πρόμειγμα ζωοτροφής. Στη συνέχεια παρουσιάζονται συνοπτικά τα αρωματικά φυτά βάλσαμο και χαμομήλι που επιλέχθησαν και εκχυλίστηκαν μέσω πράσινων καινοτόμων μεθόδων.

2.1.1.1 Βάλσαμο

Το *Hypericum perforatum* L. γνωστό και ως βαλσαμόχορτο ή St. John's Wort, είναι ένα πολυετές ποώδες φυτό, εγγενές στην Ασία και την Ευρώπη. Ανήκει στην οικογένεια Hypericaceae και συγκεκριμένα στο γένος *Hypericum*. Στην Ελλάδα υπάρχουν αυτοφυή περίπου τα 15 είδη αυτού του γένους, με σπουδαιότερο από αυτά να είναι το *Hypericum perforatum*. [5]



Την δρόγη του φυτού αποτελούν οι αποξηραμένες ανθισμένες κορυφές του μαζί με τα φύλλα του. Είναι ένα καθαρά φαρμακευτικό φυτό με τη δρόγη του να αποτελεί την πρώτη ύλη στις φαρμακοβιομηχανίες προς παρασκευή διαφόρων σκευασμάτων για την αντιμετώπιση της ήπιας μορφής κατάθλιψης. Αυτό οφείλεται σε ορισμένες βιολογικά δραστικές ουσίες που περιέχει, κυρίως της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης. Επιπλέον εκτός από την αντικαταθλιπτική του δράση έχει ακόμα αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και διουρητικές ιδιότητες. Το έντονο αυτό ενδιαφέρον για το φυτό σχετικά με την αντιμετώπιση της ήπιας έως μέτριας μορφής κατάθλιψης, έχει οδηγήσει στην διερεύνηση των βιοδραστικών του ενώσεων.

Το βαλσαμόχορτο περιέχει μια ποικιλία συστατικών με τεκμηριωμένη βιολογική δράση που περιλαμβάνει ναφθοδιανθρόνες (υπερικίνη, ψευδοϋπερικίνη, πρωτοϋπερικίνη και πρωτοψευδοϋπερικίνη), φλορογλυκινόλες (υπερφορίνη και αδυπερφορίνη), φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, αιθέρια έλαια καθώς και άλλα δευτερεύοντα συστατικά. [5],[6],[7]

2.1.1.2 Χαμομήλι

Το χαμομήλι είναι γνωστό με την επιστημονική ονομασία *Matricaria recutita* L. ή αλλιώς *Matricaria Chamomilla* L. και ανήκει στην οικογένεια Asteraceae. Λέγεται επίσης και γερμανικό χαμαίμηλο. Είναι ένα βότανο που είναι εγγενές στην Ευρώπη, την Αφρική και την Ασία, ενώ η καλλιέργεια του αρχίζει να επεκτείνεται και σε άλλα μέρη του κόσμου. Στην Ελλάδα αυτοφύεται σχεδόν σε



όλη την επικράτεια σε χέρσα και σε καλλιεργούμενα μέρη. Είναι μονοετές, ποώδες φυτό και τη δρόγη του αποτελούν τα άνθη και οι κεφαλές των λουλουδιών του.

Το χαμομήλι χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς για χιλιάδες χρόνια και ήταν γνωστό από τους αρχαίους ελληνικούς, ρωμαϊκούς και αιγυπτιακούς πολιτισμούς. Είναι αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό, ενώ περιέχει μια μεγάλη ομάδα βιοδραστικών ενώσεων που περιλαμβάνει σεσκιτερπένια, флаβονοειδή, κουμαρίνες και πολυακετυλένια. Η δράση του χαμομηλιού καθώς και του αιθέριου ελαίου του είναι αντιφλεγμονώδης, κατασταλτική, ηρεμιστική, αντιβακτηριακή, και επούλωση.[8],[9]

2.1.2 Βιοδραστικά Συστατικά

Με τον όρο βιοενεργά ή βιοδραστικά συστατικά χαρακτηρίζονται τα συστατικά εκείνα που υπάρχουν στη φύση για τα οποία υπάρχουν επαρκώς τεκμηριωμένα επιστημονικά δεδομένα ότι μπορούν να επιτελέσουν μια συγκεκριμένη λειτουργία εντός του οργανισμού.[10]

Πρόκειται για ουσίες που βρίσκονται σε συμβατικά τρόφιμα και που αποδεικνύεται από μελέτες με ζώα, κλινικές και επιδημιολογικές, ότι συμβάλλουν στη βελτίωση της υγείας μέσω της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών ή της βελτίωσης της λειτουργίας των συστημάτων του οργανισμού. Τα εν λόγω συστατικά αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με το DNA, τις πρωτεΐνες και άλλα βιολογικά μόρια. Η λειτουργία τους αυτή τα καθιστά ιδανικά για το σχεδιασμό φυσικών προϊόντων, προερχόμενων από συστατικά με θεραπευτική δράση.[11]

Τα βιοδραστικά συστατικά αναφέρονται και ως «φαρμακοτρόφιμα», μια ορολογία που υποδηλώνει την ύπαρξη τους στην ανθρώπινη διατροφή και τη βιολογική τους δράση. Η προσθήκη βιοδραστικών συστατικών σε καλλυντικά, τρόφιμα ή φάρμακα αυξάνει τις ευεργετικές ιδιότητες αυτών των προϊόντων.[10],[11]

2.1.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

Με τον όρο αντιοξειδωτικά ή αντιοξειδωτικές ενώσεις, χαρακτηρίζονται μόρια που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου, προστατεύοντας τα κύτταρα από τις βλαπτικές δράσεις της οξειδωτικής καταπόνησης. Η οξείδωση είναι η διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ορισμένες από τις πιο συχνά απαντώμενες κατηγορίες αντιοξειδωτικών στα φυτά είναι οι βιταμίνες A, C και E, τα флаβονοειδή, τα καροτένια, οι флаβονόλες, οι φαινόλες, το καφεϊκό οξύ κ.α. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιοξειδωτικά έχει ανθίσει, λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων για την πρόληψη και την μείωση του κινδύνου διάφορων παθήσεων, όπως με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη, παχυσαρκίας, καρκίνου του εντέρου και εντερικών και σπλαχικών διαταραχών.[12]

2.1.2.2 Φαινολικό περιεχόμενο

Με τον όρο φαινολικά ή φαινολικές ενώσεις, στον κλάδο των φυσικών προϊόντων, εννοούμε έναν μεγάλο αριθμό κυρίως φυτικών ουσιών που έχουν στο μόριό τους ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι:

- Απλές μονοκυκλικές φαινόλες και φαινολικά οξέα, ενώσεις που σπάνια απαντώνται ελεύθερες στο φυτό και οι οποίες συνήθως βρίσκονται ενωμένες υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών.
- Φαινυλοπροπανοειδή, μια εξίσου σημαντική τάξη φαινολικών ενώσεων η οποία έχει στο φαινολικό δακτύλιο μια πλάγια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα.
- Φαινολικές κινόνες
- Φλαβονοειδή, ενώσεις δηλαδή που περιέχουν στο μόριό τους το σκελετό της φλαβόνης ή του χλωριούχου φλαβυλίου και αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα των φυσικών φαινολικών ενώσεων
- Πολυμερείς φαινολικές ενώσεις, όπως είναι οι λιγνίνες, οι μελανίνες και οι ταννίνες

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν βιολογικά δραστικές ουσίες και εμφανίζουν πολλές ευεργετικές ικανότητες για τον άνθρωπο. Η βασική ευεργετική συνέπεια που συνδέεται με τις φαινολικές ενώσεις είναι η αντιοξειδωτική τους δράση, καθώς προστατεύουν τον οργανισμό ενάντια στα βλαβερά αποτελέσματα των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορίων οξυγόνου που εκκινούν οξειδωτικές διαδικασίες. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, με πιο σημαντικό να αποτελεί η δομή τους, αφού ο αριθμός και η θέση των υδροξυλομάδων παίζουν σημαντικό ρόλο.[12],[13]

2.2 Ανάκτηση Βιοδραστικών Συστατικών

Η εκχύλιση αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο παραλαβής βιοδραστικών ενώσεων από στερεή ή υγρή πρώτη ύλη, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει κάποια διαφορετική φυσική ή χημική ιδιότητα ανάμεσα στο προσδιοριζόμενο συστατικό και τα άλλα συνυπάρχοντα στο δείγμα συστατικά. Για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου κατά την εκχύλιση, δίνεται έμφαση εκτός των άλλων και στην απόδοση της κάθε μιας από αυτές, καθώς και την καθαρότητα και την σταθερότητα των παραλαμβανόμενων συστατικών.

2.2.1 Μέθοδοι Εκχύλισης

Τα τελευταία χρόνια προηγμένες μέθοδοι εκχύλισης, εφαρμόζονται για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι εκχύλισης, είναι:

- η εκχύλιση Soxhlet (SE)
- η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)
- η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους (UAE)
- ο συνδυασμός των δύο τελευταίων (UMAΕ)

2.2.1.1 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση soxhlet είναι μια απλή και αποτελεσματική μέθοδος, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εξαγωγή πολύτιμων βιοδραστικών ενώσεων από διάφορες φυσικές πηγές. Αποτελεί την πλέον πιο διαδεδομένη εργαστηριακή ή μικρής κλίμακας τεχνική εκχύλισης που υπερτερεί σε απόδοση έναντι των υπόλοιπων εργαστηριακών τεχνικών και για το λόγο αυτό εφαρμόζεται συχνά για την αξιολόγηση άλλων μεθόδων εκχύλισης ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

Μια συνήθης πειραματική συσκευή εκχύλισης Soxhlet αποτελείται από μια φιάλη απόσταξης, και μια σφαιρική φιάλη, έναν δειγματοφορέα, ένα σιφόνι και έναν συμπυκνωτή. Αρχικά, το δείγμα τοποθετείται μέσα σε έναν ειδικό δειγματοφορέα (thimble-holder), συνήθως λιγνοκυταρρινούχας φύσης, με πορώδες τέτοιο που να μην επιτρέπει την μετακίνηση του υλικού. Στη συνέχεια, ο διαλύτης τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη, η οποία περιβάλλεται από έναν μανδύα θέρμανσης. Η θέρμανση που παρέχεται εξατμίζει τον διαλύτη, ο οποίος ανέρχεται μέσω του πλευρικού σωλήνα της συσκευής, συμπυκνώνεται με την βοήθεια ενός ψυκτήρα και πέφτει στο θάλαμο εκχύλισης. Όταν ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το υλικό τότε πραγματοποιείται η εκχύλιση σε θερμοκρασία κοντά στην θερμοκρασία συμπύκνωσης. Ο διαλύτης σταδιακά συσσωρεύεται στον θάλαμο με το δείγμα και μόλις το υγρό φτάσει στο επίπεδο υπερχειλίσσης ένα σιφόνι αναρροφά το διάλυμα και το υγρό πέφτει ξανά στη φιάλη απόσταξης, μεταφέροντας τις εκχυλισμένες διαλυμένες ουσίες στο υγρό. Ο διαχωρισμός της διαλυμένης ουσίας από το διαλύτη πραγματοποιείται στη φιάλη απόσταξης. Στη συνέχεια, η διαλυμένη ουσία αφήνεται στη φιάλη και οι νέοι ατμοί διαλύτη περνούν πίσω στη στερεή κλίνη του υλικού δείγματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί η πλήρης εκχύλιση που συνήθως αναγνωρίζεται είτε από τον αποχρωματισμό του δείγματος ή του ίδιου του διαλύτη που δεν ανακτά άλλες ουσίες.

Βασικό πλεονέκτημα της εκχύλισης Soxhlet, αποτελεί η δυνατότητα συνεχής επαφής του οργανικού διαλύτη με το προς εκχύλιση στερεό και η απουσία του επόμενου σταδίου απομάκρυνσης του στερεού για την παραλαβή του καθαρού εκχυλίσματος μέσω φυγοκέντρωσης ή διήθησης. Ωστόσο, η μεγάλη χρονική διάρκεια που απαιτείται για την πραγματοποίηση της εκχύλισης, η ανάγκη κατανάλωσης μεγάλης ποσότητας διαλύτη και η απουσία ανάδευσης κατά την εκχύλιση αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα της.[14],[15],[16]

2.2.1.2 Υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα αποτελεί μια μέθοδο που τα τελευταία χρόνια κερδίζει σημαντικό έδαφος κυρίως για την απομόνωση και ανάκτηση ουσιών από φυτικής προέλευσης υλικά. Η MAE αποτελεί μία νέα τεχνική που συνδυάζει τα μικροκύματα με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης και έχει εφαρμοσθεί επιτυχώς για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών, επιφέροντας αποδόσεις αντίστοιχες με αυτές των συμβατικών μεθόδων σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα.[17]

Οι βασικές αρχές λειτουργίας της MAE είναι διαφορετικές από εκείνες των συμβατικών μεθόδων επειδή η εκχύλιση συμβαίνει ως αποτέλεσμα μεταβολών στη κυτταρική δομή του στερεού δείγματος που προκαλούνται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Ένα βασικό σημείο διαφοροποίησης αυτής της τεχνικής είναι ότι στις περισσότερες μεθόδους εκχύλισης κατά την θέρμανση (με αγωγή ή συναγωγή), ένα μεγάλο ποσό θερμότητας χάνεται στο περιβάλλον, σε αντίθεση με τα μικροκύματα, όπου η θέρμανση μεταδίδεται με αυτόν τον τρόπο αποκλειστικά στο εκχυλιζόμενο διάλυμα χωρίς απώλειες.[18],[19]

Μία τυπική συσκευή εκχύλισης με μικροκύματα, αποτελείται από έναν περιέκτη με τον διαλύτη και την προς εκχύλιση ουσία, ο οποίος τοποθετείται στον ειδικό χώρο της συσκευής και συνδέεται με συμπυκνωτήρα και θερμόμετρο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Στη διεργασία της εκχύλισης με τη

χρήση μικροκυμάτων, η αλληλεπίδραση της στερεής μήτρας και του διαλύτη περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Διείσδυση του διαλύτη στη στερεή μήτρα
2. Διαλυτοποίηση των συστατικών
3. Μεταφορά της διαλυμένης ουσίας από τη στερεή μήτρα
4. Μετανάστευση της εξαγόμενης διαλυμένης ουσίας από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού στο κυρίως διάλυμα
5. Μετακίνηση του εκχυλίσματος σε σχέση με το στερεό
6. Διαχωρισμό του εκχυλίσματος και του στερεού.[18]

Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης με μικροκύματα είναι πολλοί και διαφορετικοί, όπως η ισχύς, η συχνότητα και ο χρόνος επίδρασης των μικροκυμάτων, το είδος, η σύσταση και τα χαρακτηριστικά του διαλύτη, το ποσοστό υγρασίας και η κοκκομετρία των σωματιδίων του δείγματος, η αναλογία οργανικού διαλύτη προς το στερεό δείγμα, η θερμοκρασία και η πίεση της εκχύλισης.

Η MAE θεωρείται σημαντική εναλλακτική μέθοδος για την εκχύλιση στερεού-υγρού, λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζει όπως: χαμηλότερος χρόνος εκχύλισης, μικρότερη χρήση διαλύτη, ομοιόμορφη εσωτερική και εξωτερική θέρμανση του υλικού, ποιοτικά καλύτερα εκχυλίσματα με υψηλή καθαρότητα και άρα υψηλή απόδοση των απομονωμένων ενώσεων. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η μειωμένη αποτελεσματικότητα εκχύλισης μη πολικών ή πτητικών συστατικών στόχων. Επίσης, δεν είναι κατάλληλη για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών. Η ακτινοβολία των μικροκυμάτων και άλλες συνθήκες λειτουργίας μπορούν να τροποποιήσουν την χημική δομή των επιθυμητών συστατικών. [20]

2.2.1.3 Υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους (UAE)

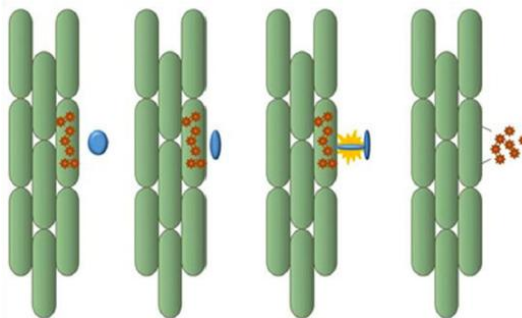
Μια άλλη εναλλακτική εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης αποτελεί η εκχύλιση με υπερήχους, UAE (Ultrasound Assisted Extraction), όπου τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση και την απομόνωση μιας ευρείας ποικιλίας βιοδραστικών ενώσεων από βότανα και φυτά.[21]

Οι υπέρηχοι αποτελούν μορφή ενέργειας που μεταδίδεται ως κύματα και έχουν κατώτερο όριο συχνότητας συνήθως τα 20 kHz. Ο μηχανισμός που ελέγχει την UAE γενικά αποδίδεται σε μηχανικές και θερμικές επιδράσεις που καταλήγουν στη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και στην ενισχυμένη μεταφορά μάζας μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Δύο είναι τα βασικά φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την επίδραση των υπερήχων σε ένα διάλυμα κατά την εκχύλιση: μεταβολή της πίεσης και μεταβολή της θερμοκρασίας. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης.[22]

Η αρχή των υπερήχων αποδίδεται στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης. Κατά τη διάρκεια εφαρμογής των υπερήχων, όταν ένα υπερηχητικό κύμα συναντά ένα υγρό μέσο, παράγονται διαμήκη κύματα, σχηματίζοντας έτσι περιοχές εναλλασσόμενων κυμάτων συμπίεσης και διαστολής, που επάγονται στα μόρια του μέσου. Η διαδικασία της διαστολής δημιουργεί στο υγρό μέσο κοιλότητες ή

μικροφουσαλίδες. Οι σχηματιζόμενες αυτές φουσαλίδες, απορροφούν την ενέργεια από τα ηχητικά κύματα και αναπτύσσονται κατά την διάρκεια των κύκλων διαστολής, ενώ επανασυμπίεζονται κατά τον κύκλο της συμπίεσης. Η συνεχής επανάληψη αυτών των κύκλων επιφέρει αλλαγές στη δομή του μέσου που υφίσταται την επίδραση των υπερηχητικών κυμάτων. Όταν το μέγεθος αυτών των φουσαλίδων φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή, οι φουσαλίδες σπηλαιώσης καταρρέουν κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα και η υψηλή πίεση και θερμοκρασία δημιουργούν μικροπίδακες και κύματα κρούσης που κατευθύνονται προς τη στερεή επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα και την αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας.[23],[24]

Στην Εικόνα 1, φαίνεται η διαδικασία κατάρρευσης της φουσαλίδας που δημιουργείται από τη σπηλαιώση και η απελευθέρωση ουσιών από το δείγμα.



Εικόνα 1: Κατάρρευση φουσαλίδας που δημιουργείται από τη σπηλαιώση και απελευθέρωση ουσιών από το δείγμα

Εκτεταμένες έρευνες στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων με τη δράση υπερήχων έχουν δείξει ότι η ανάκτηση καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των εν λόγω ενώσεων επηρεάζονται από παραμέτρους της εκχύλισης, όπως ο χρόνος, η θερμοκρασία και η συχνότητα των υπερήχων, ενώ διατηρείται η σταθερότητα των εκχυλιζόμενων συστατικών.[25]

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης είναι καταλληλότερη για την εκχύλιση των πολυφαινολών. Οδηγεί επίσης, σε αυξημένη μεταφορά μάζας, καλύτερη διείσδυση και μειωμένη κατανάλωση του διαλύτη, χαμηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης και μειωμένο κόστος επεξεργασίας.[25]

2.2.1.4 Συνδυασμένη μέθοδος με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE)

Η πλέον κατάλληλη και καινοτόμος μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων είναι η συνδυασμένη μέθοδος με μικροκύματα και υπερήχους (UMAE). Η MAE είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική χρησιμοποιώντας μηχανισμούς διηλεκτρικής θέρμανσης στα δείγματα για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων, ενώ η UAE λειτουργώντας με φαινόμενα σπηλαιώσης, αυξάνει τη μεταφορά μάζας και βελτιώνει την διείσδυση του διαλύτη μέσα στο δείγμα. Έτσι, ο συνδυασμός των δύο αποτελεί μια τεχνική που μπορεί να μειώσει σημαντικά το χρόνο εκχύλισης, καταναλώνοντας μικρότερες ποσότητες διαλυτών και οδηγώντας σε υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με την κάθε μέθοδο χωριστά.

2.2.2 Παράμετροι Εκχύλισης και Αριστοποίησης

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης έχει μελετηθεί σε διάφορες εφαρμογές. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας σχετίζεται άμεσα από τις επιλεγμένες συνθήκες λειτουργίας και για την αριστοποίησή τους επιλέγονται συνήθως μία ή περισσότερες παράμετροι ελέγχου. Οι παράμετροι που ρυθμίζονται κατά την εκχύλιση και μπορούν να επηρεάσουν την απόδοσή της, είναι αρκετές και διαφοροποιούνται σε μικρό βαθμό ανάλογα την μέθοδο και τον τρόπο που αυτή πραγματοποιείται.[26]

Ορισμένες παράμετροι αριστοποίησης είναι κοινές για όλες τις μεθόδους, ενώ άλλες είναι πιο ειδικές και αναφέρονται σε τεχνικές όπως είναι η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων ή υπερήχων. Αυτές οι παράμετροι μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης θετικά ή αρνητικά, ανάλογα με την επιλεγόμενη τιμή τους. Μερικές από τις πιο συνήθεις και μελετημένες παραμέτρους αριστοποίησης των τεχνικών εκχύλισης, αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

- **Διαμόρφωση κοκκομετρίας**

Η διαμόρφωση της κοκκομετρίας είναι μια παράμετρος που αφορά τα χαρακτηριστικά του δείγματος και συνεπώς επηρεάζει την απόδοση όλων των μεθόδων εκχύλισης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Είναι γνωστό ότι όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των κόκκων του εκχυλιζόμενου δείγματος που βρίσκεται σε μορφή σκόνης, τόσο αυξάνεται η επιφάνεια μεταφοράς μάζας με αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης της διεργασίας. Με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, αυξάνεται η επιφάνεια επαφής τους και μειώνεται η απόσταση διάχυσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και ο ρυθμός διάχυσης των επιθυμητών συστατικών από την κυτταρική δομή του στερεού. Ωστόσο, η υπερβολική μείωση του μεγέθους δυσκολεύει την κίνηση του υγρού και απαιτεί μεγάλη διαφορά πίεσης στον εκχυλιστήρα με αποτέλεσμα να προκαλούνται τεχνικά προβλήματα. Επίσης τα πολύ μικρά σωματίδια διαχωρίζονται δύσκολα από το υγρό μέσο μετά την εκχύλιση, δημιουργώντας πρόσθετες δυσκολίες στην παραλαβή του καθαρού εκχυλίσματος. Για να οριστεί η κοκκομετρία του δείγματος πριν την εκχύλιση, το δείγμα αλέθεται και ομογενοποιείται, και στη συνέχεια κοσκινίζεται σε ειδικά κόσκινα πλέγματος, ανάλογα με το εύρος των σωματιδίων που επιθυμείται να παραληφθεί. [27, 28]

- **Χρήση κατάλληλου διαλύτη**

Η χρήση του κατάλληλου διαλύτη, δηλαδή αυτού που παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τα επιθυμητά συστατικά, εξασφαλίζει μια πιο αποδοτική εκχύλιση ως προς τα συστατικά αυτά. Η επιλογή του βασίζεται στη διαλυτότητα των ενώσεων που επιθυμείται να εκχυλιστούν, τη διηλεκτρική σταθερά τους και τους παράγοντες σκέδασης/συντελεστές απωλειών τους. Τα δύο τελευταία κριτήρια επιλογής κατάλληλου διαλύτη, αφορούν αποκλειστικά την περίπτωση εκχύλισης με την χρήση μικροκυμάτων (MAE), υπερήχων (UAE) ή συνδυασμού των δύο τεχνικών (UMAE). Συγκεκριμένα, διαλύτες με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά, π.χ. το νερό και άλλοι πολικοί διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη), είναι ικανοί να απορροφούν μεγάλα ποσά ενέργειας από τα μικροκύματα και θεωρούνται συνήθως αποτελεσματικότεροι από τους μη πολικούς. Ο παράγον σκέδασης/συντελεστής απωλειών του διαλύτη -δηλαδή η αποτελεσματικότητα με την οποία οι διαφορετικοί διαλύτες θερμαίνονται κατά τη δράση των μικροκυμάτων- διαδραματίζει έναν εξίσου σημαντικό ρόλο κατά την επιλογή του. Από σχετικές έρευνες έχει προκύψει ότι είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται διαλύτες με μεγάλη διηλεκτρική

σταθερά και μεγάλο παράγοντα σκέδασης, το οποίο επιτυγχάνεται συνήθως με χρήση μιγμάτων νερού και άλλων διαλυτών, όπως είναι η αιθανόλη ή η μεθανόλη.[28-30]

- **Διάρκεια Εκχύλισης (duration)**

Η διάρκεια της εκχύλισης είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της διεργασίας εκχύλισης, δεδομένου ότι επηρεάζει σαφώς το κόστος και την απόδοση της. Παράλληλα ενδεχομένως να επηρεάζει και την ποιότητα του εκχυλίσματος μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, λόγω της έκθεσης του σε συνθήκες που είναι ικανές να υποβαθμίσουν τη δομή και τα αρχικά χαρακτηριστικά του. Η διάρκεια της εκχύλισης στις τεχνικές με μικροκύματα και υπερήχους δεν είναι ανεξάρτητη μεταβλητή δεδομένου ότι οι εντάσεις των μικροκυμάτων και των υπερήχων επηρεάζουν με τη σειρά τους την απόδοση σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης του δείγματος σε αυτές.

Μία ακόμη παράμετρος που επηρεάζει τη μέγιστη χρονική διάρκεια της εκχύλισης, κυρίως για θερμοευαίσθητες ενώσεις, είναι η αύξηση της θερμοκρασίας σε ορισμένες μεθόδους. Για παράδειγμα, η διάρκεια της εκχύλισης θερμοευαίσθητων ενώσεων με μικροκύματα, είναι μικρότερη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους και ποικίλει από μερικά λεπτά μέχρι μερικές ώρες. Έτσι αποφεύγεται μια πιθανή αλλοίωση ή οξειδωση των θερμοευαίσθητων αυτών συστατικών, λόγω της θερμότητας που αναπτύσσεται [31]. Συνεπώς, η διάρκεια της εκχύλισης για αυτές τις περιπτώσεις, επιλέγεται συνήθως με κριτήριο την εξασφάλιση της σταθερότητας των ενώσεων-στόχων που είναι θερμοευαίσθητες. Επιπρόσθετα, ύστερα από μελέτη παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, η περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης έχει μικρό αντίκτυπο στην απόδοση της εκχύλισης. [28, 29]

- **Αναλογία στερεού-υγρού** [30]

Ο παράγοντας αυτός θεωρείται σημαντικός για πολλές εφαρμογές και κυρίως για την εκχύλιση των καρροτενοειδών. Έχει αποδειχθεί ότι για την συμβατική εκχύλιση, η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας διαλύτη στην ίδια ποσότητα στερεού, αυξάνει την ανάκτηση της επιθυμητής ουσίας κατά την εκχύλιση. Ωστόσο ο όγκος του διαλύτη είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη, επειδή υπερβολικά μεγάλη χρήση διαλύτη εκχύλισης, σημαίνει ότι περισσότερη ενέργεια και χρόνος απαιτούνται για συμπύκνωση του διαλύματος εκχύλισης, ενώ μετέπειτα οδηγεί σε πιο χρονοβόρα διαδικασία καθαρισμού. Μια συνήθης αναλογία ανάμιξης στερεού : διαλύτη, που χρησιμοποιείται από αρκετούς ερευνητές για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων εκχύλισης, είναι 1:20 (w/v) [32] ή 1:30 (w/v) [33], ενώ από άλλες εφαρμογές, ο λόγος 1:10 και 1:20 (w/v), βρέθηκε να είναι ο βέλτιστος. [28]

- **Ένταση των υπερήχων (US)**

Η παράμετρος αυτή αφορά στην εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων (UAE) ή την συνδυασμένη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE) και αποτελεί τη βασικότερη παράμετρο που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας με αυτές τις τεχνικές. Ειδικότερα, από εκτεταμένες έρευνες που έχουν γίνει για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ενώσεων με τη δράση των υπερήχων, έχει διαπιστωθεί ότι η ανάκτηση καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των εν λόγω ενώσεων επηρεάζονται εκτός από την ένταση, και από άλλες παραμέτρους που αφορούν στη μορφή και στη χρήση των υπερήχων, όπως ο χρόνος έκθεσης, η θερμοκρασία και η συχνότητα τους, οι οποίες θα πρέπει να λαμβάνονται επίσης υπόψη όταν επιλέγεται η τιμή της ισχύς τους. Παρόλα αυτά, ο τρόπος που επιδρά η παράμετρος αυτή στην απόδοση της διεργασίας δεν είναι ίδιος για όλα τα δείγματα και εξαρτάται συνήθως και από

άλλες παραμέτρους της διεργασίας εκχύλισης (χρόνος έκθεσης, μορφή υπερήχων, υγρασία δείγματος κτλ.).[29, 34]

- **Ένταση των μικροκυμάτων (MW)** [29, 35, 36]

Η παράμετρος αυτή αφορά στην εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE) ή στην συνδυασμένη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE). Μαζί με την ένταση των υπερήχων, αποτελεί την βασικότερη παράμετρο που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας όταν εφαρμόζονται οι παραπάνω μέθοδοι.

Η ισχύς και η θερμοκρασία των μικροκυμάτων αλληλοσυνδέονται αφού η υψηλή ισχύς μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση στη θερμοκρασία του συστήματος και αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης μέχρι αυτή να γίνει ασήμαντη ή να μειωθεί. Είναι γνωστό ότι η θερμοκρασία ελέγχεται από την προσπίπτουσα ισχύ των μικροκυμάτων, που ελέγχει την ποσότητα ενέργειας που παρέχεται στο διάλυμα και η οποία μετατρέπεται σε θερμική ενέργεια στο διηλεκτρικό υλικό. Σε υψηλές θερμοκρασίες, η αποτελεσματικότητα του διαλύτη αυξάνεται εξαιτίας της πτώσης του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης, διευκολύνοντας έτσι τη διαλυτοποίηση των ουσιών του δείγματος και βελτιώνοντας την διαβροχή του και την διείσδυση του διαλύτη.

Από τα παραπάνω, θα ήταν αναμενόμενο η αύξηση των μικροκυμάτων να αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης, κάτι το οποίο συμβαίνει στην πραγματικότητα, μέχρι όμως κάποια οριακή τιμή, μετά την οποία υπερισχύουν τα φαινόμενα αποικοδόμησης των επιθυμητών θερμοευαίσθητων αντιοξειδωτικών συστατικών στο εκχύλισμα, με αποτέλεσμα τελικά τη μείωση της απόδοσης. Η οριακή αυτή τιμή της έντασης εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά του δείγματος και του διαλύτη, την μεταξύ τους αλληλεπίδραση καθώς και τη συχνότητα και το χρόνο επίδρασης των μικροκυμάτων.

Όπως αναφέρθηκε, οι τεχνικές εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα αποτελούν καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης επιθυμητών ουσιών που παρουσιάζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών (UMAE), αποτελεί μία νέα τάση στον τομέα των εκχυλίσεων, που έχει αποδειχθεί μάλιστα ότι αποδίδει πολύ καλύτερα από τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, όσον αφορά στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτά. Η ένταση των υπερήχων και των μικροκυμάτων είναι οι βασικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της διεργασίας της εκχύλισης σε αυτή την περίπτωση εκχύλισης. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι συνήθως η αύξηση της έντασης και στις δύο τεχνικές και εν κατακλείδι και του συνδυασμού αυτών υπό κάποιες προϋποθέσεις και συνθήκες, αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης και μειώνει τον χρόνο των πειραμάτων. [37]

Επομένως, η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποιείται από ένα σύνολο κριτηρίων, οι τιμές των οποίων θα πρέπει να επιλεγθούν σωστά και να διερευνηθεί η μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Έτσι κατά τον σχεδιασμό μιας σειράς πειραμάτων με σκοπό την αριστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης, θα πρέπει να επιλέγονται οι βασικές παράμετροι ως προς τις οποίες θα γίνεται η αριστοποίηση, καθώς και οι διαφορετικές τιμές που θα εξεταστούν για την διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών και την παραλαβή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, με βάση και τη σχετική έρευνα που υπάρχει στη βιβλιογραφία.

2.3 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών

Ο εγκλεισμός ουσιών σε μικροδομές ή νανοδομές είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση βιοδραστικών συστατικών σε μία μήτρα. Με τον όρο ενθυλάκωση (encapsulation) ή εγκλεισμός ορίζεται κάθε μέθοδος ή διεργασία, όπου μία ουσία ή ένα μείγμα ουσιών ενσωματώνεται σε ένα άλλο υλικό (μήτρα), το οποίο αποτελεί το μέσο ή φορέα εγκλεισμού.[38]

Το περίβλημα των σωματιδίων (μήτρα) αποτελείται από μια ουσία που χρησιμεύει ως «φράγμα» (barrier) ή προστατευτικό πλέγμα που είναι συνήθως ένα βιοαποικοδομήσιμο ή βιοσυμβατό πολυμερές και καθορίζει το ρυθμό αποδέσμευσης του δραστικού εγκλεισμένου συστατικού. Το φράγμα αυτό μπορεί να έχει είτε τη μορφή μεμβράνης, οπότε και διαμορφώνονται συστήματα μεμβράνης (membrane ή reservoir systems), είτε πολυμερικής ή κηρώδους μήτρας. Το ποσοστό συγκράτησης και κατά συνέπεια το ποσοστό προστασίας του ποιοτικά βιοενεργού συστατικού στο μέσο ενθυλάκωσης εξαρτάται τόσο από τη φύση του ίδιου του συστατικού (μοριακό βάρος, στερεοχημική δομή, λειτουργικές ομάδες, πολικότητα, πτητικότητα) όσο και από τη φύση και τη κατάσταση του επιλεγμένου μέσου ή φορέα εγκλεισμού.[39]

Η μέθοδος της ενθυλάκωσης εφαρμόζεται με σκοπό τη βελτίωση κυρίως των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (γεύση, οσμή, χρώμα, κλπ.) των ευαίσθητων ή/και ερεθιστικών βιοενεργών συστατικών. Επίσης, με τον εγκλεισμό ουσιών, εξασφαλίζεται η προστασία αυτών από εξάτμιση, οξειδωση, απορρόφηση υγρασίας, αντιδράσεις που καταλύονται από το φως καθώς και από αποικοδόμηση λόγω υψηλών θερμοκρασιών, δηλαδή από διάφορες φυσικοχημικές διεργασίες που μπορεί να συμβούν κατά την επεξεργασία που υφίστανται οι ουσίες μετά την προσθήκη τους στο τελικό προϊόν. [39],[40]

2.3.1 Μέθοδοι Εγκλεισμού

Μερικές από τις πλέον συχνά χρησιμοποιούμενες διεργασίες ενθυλάκωσης λειτουργικών συστατικών είναι οι παρακάτω:

- Ξήρανση με εκνέφωση (Spray Drying)
- Ηλεκτροστατική Ινοποίηση (Electrospinning)
- Ξήρανση με κατάψυξη (Freeze Drying)
- Φυγοκεντρική Εκβολή (Extrusion)

2.3.1.1 Ξήρανση με εκνέφωση (Spray Drying)

Η **ξήρανση με εκνέφωση (Spray Drying)** αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο μικροεγκλεισμού. Είναι μια ευέλικτη, συνεχής και οικονομική λειτουργία που παράγει μικρού μεγέθους σωματίδια. Επιπλέον, προστατεύει, σταθεροποιεί και ενισχύει τη διαλυτότητα και την ελεγχόμενη απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων που παρέχονται σε μορφή σκόνης.[41, 42]

Η διαδικασία ξήρανσης με εκνέφωση περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια. Αρχικά, η δραστική ουσία που πρόκειται να ενθυλακωθεί ομογενοποιείται με το υλικό φορέα σε δεδομένη αναλογία σε υγρό μέσο. Το μείγμα ή το γαλάκτωμα που αποτελεί το διάλυμα τροφοδοσίας στη συνέχεια αντλείται στον θάλαμο ξήρανσης μέσω ενός ακροφυσίου. Κατά την έξοδο από το άκρο του ακροφυσίου, τα σταγονίδια

ψεκάζονται και έρχονται σε επαφή με το ξηραντικό υγρό, ρεύμα θερμού αέρα, προκαλώντας ταχεία εξάτμιση του διαλύτη. Τέλος, οι ξηρές μικροκάψουλες με τη μορφή σκόνης ελεύθερης ροής συλλέγονται στον πυθμένα του στεγνωτηρίου ή στον συλλέκτη σκόνης του κυκλώνα.[43, 44] Οι καλύτερες συνθήκες ξήρανσης με εκνέφωση είναι ένας συμβιβασμός μεταξύ της υψηλής θερμοκρασίας αέρα, της υψηλής στερεάς συγκέντρωσης του διαλύματος και της εύκολης κονιοποίησης ξήρανσης χωρίς διαστολή και ρωγμές των τελικών σωματιδίων. Συνεπώς, κατά την διάρκεια λειτουργίας αυτής της μεθόδου, η τροφοδοσία προϊόντος, η ροή αερίου και η θερμοκρασία πρέπει να ελέγχονται συνεχώς.[45],[46],[47]

Η ξήρανση με εκνέφωση είναι μια διαδικασία, που χρησιμοποιείται κατά βάση στη φαρμακοβιομηχανία και στη βιομηχανία τροφίμων, για την επεξεργασία των μητρών προς παραγωγή ξηρών σκονών, κόκκων και σφαιριδίων από διαλύματα και αιωρήματα πολυσακχαριτών. Είναι μία πολύ ευπροσάρμοστη τεχνική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμοανθεκτικά τρόφιμα και φάρμακα, διαλυτά ή αδιάλυτα στο νερό και υδρόφιλα ή υδρόφοβα πολυμερή. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι άμεσα διαθέσιμος και το κόστος παραγωγής είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με άλλες μεθόδους. Συγκεκριμένα συγκριτικά με την ξήρανση με κατάψυξη, το κόστος της μεθόδου ξήρανσης με ψεκασμό είναι 30-50 φορές φθηνότερο. Το μειονέκτημα της είναι οι υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσει, οι οποίες μπορεί να καταστρέψουν ορισμένα βιοδραστικά συστατικά, γι' αυτό και χρησιμοποιείται περισσότερο σε θερμοσταθερά συστήματα.[41],[45]

2.3.1.2 Ηλεκτροστατική Ινοποίηση (Electrospinning)

Η μέθοδος του ηλεκτροστατικού εγκλεισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή είτε μικρο-νανοσωματιδίων μέσω του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying) είτε μικρο – νανοϊνών με εφαρμογή της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning).[43]

Η χρήση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων για την σύνθεση ινών είναι γνωστή εδώ και 100 χρόνια. Η μέθοδος της **ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning ή electrostatic spinning)** εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1930, ενώ το ενδιαφέρον για αυτήν έχει αναζωπυρωθεί τα τελευταία χρόνια, λόγω της ανάπτυξης νέων νανοτεχνολογιών.[48],[49]

Είναι μία αποδοτική, απλή, ευέλικτη και πολλά υποσχόμενη τεχνική, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολύ λεπτών ινών (νανοστοιχεία μίας διάστασης), από συνθετικά και φυσικά πολυμερή, με διάμετρο μερικών μικρομέτρων έως μερικών νανομέτρων. Οι ίνες αυτές παρασκευάζονται από διαλύματα ή τήγματα συνθετικών πολυμερών, φυσικά απαντώμενων βιοπολυμερών, sol-gels και σύνθετων υλικών που συχνά περιέχουν ενεργά συστατικά, όπως αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ουσίες, αρώματα και γεύσεις σε μορφή διαλυμάτων, γαλακτωμάτων ή διασπορών.[50] Η μέθοδος αυτή προσελκύει ευρέως το ενδιαφέρον καθώς οι ίνες που προκύπτουν εμφανίζουν μοναδικές ιδιότητες, όπως υψηλό πορώδες, μεγάλη επιφάνεια ανά μονάδα μάζας, υψηλή διαπερατότητα αερίου και μικρό μέγεθος ινώδους πόρου, με τις περισσότερες από αυτές τις ιδιότητες να είναι αρκετά σημαντικές όταν αυτά τα υλικά χρησιμοποιούνται ως φορείς για την παράδοση βιοδραστικών ενώσεων και την ανάπτυξη σύνθετων δομών βασισμένων στο βιοπολυμερές.[51]

Βασικό πλεονέκτημα της ηλεκτροστατικής ινοποίησης είναι πως αποτελεί μια μέθοδο απλούστερη και φθηνότερη με μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού έναντι άλλων τεχνικών εγκλεισμού. Σε σύγκριση με τη

μέθοδο της εκβολής, το διάλυμα δεν θερμαίνεται κατά τη δημιουργία των ινών, με αποτέλεσμα τα όποια φαινόμενα υποβάθμισης των ενεργών συστατικών από τη θερμότητα να περιορίζονται. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η παραγωγή πολύ λεπτών ινών μεγέθους μερικών νανομέτρων με μεγάλη επιφάνεια καθώς και η παραγωγή νανοϊνών σε μεγάλη κλίμακα.[50],[48]

Μια τυπική διάταξη της ηλεκτροστατικής ινοποίησης αποτελείται από μία βελόνα από ανοξείδωτο χάλυβα με αμβλύ άκρο, μία αντλία, η οποία μετακινεί τη σύριγγα τροφοδοσίας, που περιέχει το προς ινοποίηση διάλυμα, μία πηγή τάσης με αρνητική και θετική πολικότητα και από έναν γειωμένο συλλέκτη ινών. Η βασική αρχή της ηλεκτροστατικής ινοποίησης είναι η εφαρμογή ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Κατά την διάρκεια της διεργασίας, εφαρμόζεται υψηλή τάση μεταξύ της σύριγγας και του συλλέκτη της ουσίας και το εκάστοτε διάλυμα ή τήγμα πολυμερούς φορτίζεται ηλεκτρικά. Με την εφαρμογή μεγάλης τάσης (1 έως 30 kV), η σταγόνα του πολυμερούς που βρίσκεται στην άκρη της βελόνας ηλεκτρίζεται σε μεγάλο βαθμό και τα επαγωγικά φορτία κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνειά της. Ακολούθως, λόγω του ηλεκτροστατικού πεδίου, η σταγόνα μετατρέπεται από σφαιρικό σχήμα σε έναν κωνικό σχηματισμό, που ονομάζεται «κώνος Taylor». Όταν η τάση ξεπεράσει μία καθορισμένη για την κάθε ουσία τιμή, η ηλεκτρική δύναμη «υπερνικά» την επιφανειακή τάση της σταγόνας και ανάλογα με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου από την άκρη της βελόνας εγχύεται ένας πίδακας διαλύματος. Εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του πίδακα, του εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου και των δυνάμεων εξώθησης στο εσωτερικό του θαλάμου, ο πίδακας υποβάλλεται σε κάμψη και αποκτά πιο λεπτή μορφή. Καθώς ο πίδακας κινείται προς τον μεταλλικό συλλέκτη στόχο (αντίθετο ηλεκτρόδιο), ο διαλύτης εξατμίζεται και η ταχύτητα που αναπτύσσεται οδηγεί στην εναπόθεση ενός στρώματος πολύ λεπτών πολυμερικών ινών στο συλλέκτη.[52]

Είναι ευρέως γνωστό ότι η διάμετρος των ινών και η μορφολογία τους εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από έναν αριθμό παραμέτρων. Αυτές περιλαμβάνουν εγγενείς ιδιότητες του διαλύματος πολυμερούς όπως τύπος πολυμερούς, διαμόρφωση της αλυσίδας πολυμερούς, ιξώδες, ελαστικότητα, ηλεκτρική αγωγιμότητα, πολικότητα και επιφανειακή τάση της υγρής διασποράς. Επιπλέον, οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής ηλεκτροστατικής ινοποίησης όπως η ισχύς του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, η απόσταση μεταξύ του συλλέκτη ινών και της βελόνας καθώς και ο ρυθμός τροφοδοσίας του διαλύματος πολυμερούς, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της ίνας. Άλλες μεταβλητές, όπως η υγρασία και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος χώρου μπορεί επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της μορφολογίας και της διαμέτρου των ινών καθώς και της φυσικής τους κατάστασης.[43]

Λόγω του συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την νανοτεχνολογία και των μοναδικών τους ιδιοτήτων, οι νανοϊνες που παράγονται με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης αποτελούν πολλά υποσχόμενους παράγοντες για χρήση σε πληθώρα τομέων, όπως τα καλλυντικά, την φαρμακευτική, την βιοτεχνολογία, την κυτταρική μηχανική και την βιοϊατρική. Επίσης, οι νανοϊνες αυτές βρίσκουν εφαρμογή σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης ουσιών, σε υφάσματα, στη συσκευασία προϊόντων, σε δομικές εφαρμογές που απαιτούν υψηλή μηχανική αντοχή, στην κατάλυση κ.α. Πολλές από αυτές τις εφαρμογές όμως έχουν γίνει κατά βάση σε εργαστηριακό επίπεδο. Ως εκ τούτου, η αναγωγή της χρήσης των νανοϊνών από την εργαστηριακή στη βιομηχανική κλίμακα αποτελεί μελλοντική πρόκληση.[53],[52],[51]

2.3.1.2.1 Ομοαξονική Ηλεκτροστατική Ινοποίηση (Coaxial Electrospinning)

Προκειμένου να αυξηθεί η χρησιμότητα της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και να υπάρξει μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα των εκάστοτε νανοϊνών που παράγονται με την εν λόγω τεχνική, έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα μελετών σχετικά με την τροποποίηση του εξοπλισμού της συσκευής. Από τις τροποποιήσεις αυτές έχουν προκύψει διάφορες μέθοδοι ηλεκτροστατικής ινοποίησης μερικές από τις οποίες είναι η ομοαξονική ηλεκτροστατική ινοποίηση (coaxial electrospinning), η ηλεκτροστατική ινοποίηση πολλαπλών βελονών (multi – nozzle electrospinning), η ηλεκτροστατική ινοποίηση πολλαπλών στρωμάτων (multilayer electrospinning), η ηλεκτροστατική ινοποίηση ανάμιξης (mixing electrospinning) και η ηλεκτροστατική ινοποίηση πολλαπλών εγχύσεων (multi jet electrospinning).[54] Από τις διάφορες μεθόδους ηλεκτροστατικής ινοποίησης, στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε αυτή της **ομοαξονικής ηλεκτροστατικής ινοποίησης**.

Η **ομοαξονική ηλεκτροστατική ινοποίηση** αποτελεί μία καινούρια, προηγμένη μέθοδο νανοεγκλεισμού, όπου οι διάφορες βιοδραστικές ουσίες δύναται να ενθυλακώνονται σε μία πολυμερική συνήθως μήτρα και έτσι επιτυγχάνεται η ομαλή απελευθέρωσή τους στον επιθυμητό χρόνο. Αποτελεί μία ευέλικτη τεχνική, που επιτρέπει την επιλογή διαφορετικών, αναμίξιμων ή μη ουσιών για τον συνδυασμό μήτρα – εγκλεισμένη ουσία, ενώ παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα εγκλεισμού συγκριτικά με άλλες μεθόδους ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Επιπλέον, είναι αποτελεσματική μέθοδος στον εγκλεισμό υδατοδιαλυτών ουσιών, που δεν μπορούν να σχηματίσουν ίνες με την κλασσική τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.[55]

Η διάταξη της μεθόδου αυτής διαφοροποιείται από την κλασσική μονοαξονική διαδικασία ηλεκτροστατικής ινοποίησης, καθώς διαθέτει μία διπλή, ομοαξονική, τριχοειδή βελόνα, που εγχύει τα δύο υγρά ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, δημιουργώντας δομή μήτρας – πυρήνα. Δύο αναμίξιμα ή μη αναμίξιμα υγρά, διοχετεύονται στην εξωτερική και την εσωτερική βελόνα αντίστοιχα και η ογκομετρική παροχή τους ελέγχεται από δύο αντλίες. Μεταξύ του ηλεκτροδίου και του ακροφυσίου εφαρμόζεται τάση από 1 έως 30 kV. Υπό την αυξανόμενη ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, δημιουργείται ο «κώνος Taylor», στην άκρη του ακροφυσίου και ένας πίδακας υγρού εγχύεται απ' αυτό και συλλέγεται σε μεταλλικό συλλέκτη που βρίσκεται απέναντι από το ακροφύσιο σε συγκεκριμένη απόσταση.[56]

Οι πειραματικές παράμετροι της ηλεκτροστατικής ινοποίησης είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την κατανόηση της μεθόδου και της διαδικασίας μετατροπής των διαλυμάτων σε νανοϊνές. Οι παράμετροι αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

Πίνακας 1: Παράμετροι που επηρεάζουν τη δημιουργία των ηλεκτροστατικά ινοποιημένων ινών

Παράμετροι του διαλύματος	Παράμετροι της διαδικασίας	Περιβαλλοντικές παράμετροι
Συγκέντρωση και ιξώδες	Εφαρμοζόμενη τάση	Θερμοκρασία
Επιφανειακή τάση	Ρυθμός ροής διαλύματος	Υγρασία
Αγωγιμότητα	Απόσταση συλλέκτη-ακροφυσίου	

Παράμετροι του διαλύματος

➤ Συγκέντρωση και ιξώδες

Η συγκέντρωση του πολυμερούς στο προς ινοποίηση διάλυμα παίζει σημαντικό ρόλο καθώς επηρεάζει την παραγωγή ινών και την μορφολογία τους (μέγεθος, σχήμα). Η μικρή συγκέντρωση δε βοηθάει στην διαμόρφωση ινών καθώς η εκτόξευση του υγρού «σπάει» κατά τη διαδρομή μέχρι τον συλλέκτη. Αντίθετα η πολύ μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης δίνει ίνες με μεγάλες διαμέτρους, το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στο ιξώδες του διαλύματος καθώς παχύρρευστα διαλύματα δίνουν ίνες με μεγαλύτερες διαμέτρους ενώ λεπτόρρευστα δίνουν λεπτότερες ίνες. Η μορφή των ινών, δηλαδή εάν σχηματίζονται ή όχι συσσωματώματα στις παραγόμενες ίνες, εξαρτάται από το ιξώδες. Συγκεκριμένα ανομοιογενείς με συσσωματώματα νανοΐνες είναι λιγότερο πιθανό να δημιουργηθούν σε διαλύματα με υψηλό ιξώδες. Η διάμετρος των συσσωματωμάτων γίνεται μεγαλύτερη και η απόσταση μεταξύ τους πάνω στις ίνες μεγαλώνει καθώς μεγαλώνει το ιξώδες, και το σχήμα τους αλλάζει από σφαιρικό σε ατρακτοειδές. Σε διαλύματα με χαμηλό ιξώδες, η μείωση της επιφανειακής τάσης οδηγεί στην μείωση της πιθανότητα σχηματισμού αστοχιών.[52, 57]

➤ Επιφανειακή τάση

Η επιφανειακή τάση είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, καθώς καθορίζει την ιδανική συγκέντρωση και το είδος του διαλύτη του διαλύματος. Η επιφανειακή τάση του εκάστοτε διαλύτη είναι διαφορετική. Γενικά, όταν η συγκέντρωση παραμένει σταθερή, με μείωση της επιφανειακής τάσης, οι ανομοιογενείς με συσσωματώματα νανοΐνες, μετατρέπονται σε συνεχείς, ομαλές ίνες.[57]

➤ Αγωγιμότητα

Η αγωγιμότητα του διαλύματος αποτελεί ακόμη μια σημαντική παράμετρο για τον προσδιορισμό του μεγέθους και την μορφολογίας των ινών. Έχει αποδειχθεί ότι ένα διάλυμα μεγάλης αγωγιμότητας μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη ομοιομορφία μεταξύ των ινών. Η αγωγιμότητα του διαλύματος έχει επίσης συνδεθεί με το μέγεθος των ινών. Γενικά, η αύξηση της αγωγιμότητας του διαλύματος αποδίδει μικρότερης διαμέτρου ίνες, ωστόσο αυτό εξαρτάται από τις ιδιότητες του διαλύτη και του πολυμερούς.[57]

Παράμετροι της διαδικασίας

➤ Εφαρμοζόμενη τάση

Η ισχύς του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου επηρεάζει το μέγεθος των σχηματιζόμενων ινών. Η αλλαγή στην τάση προκαλεί και αλλαγή στο σχήμα της ίνας, το οποίο ανταποκρίνεται σε μια μείωση της σταθερότητας του αρχικού πίδακα διότι, καθώς η τάση αυξάνεται κατά συνέπεια αυξάνεται και ο αριθμός των συσσωματωμάτων που δημιουργούνται μαζί με τις ηλεκτροστατικά ινοποιημένες ίνες. Η μη βέλτιστη διαφορά δυναμικού οδηγεί σε σχηματισμό συσσωματωμάτων πάνω στις παραγόμενες ίνες ή ακόμη και σε αποτυχία μετατροπής του εγχύματος σε ίνες. Στη χαμηλότερη τάση που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του πίδακα, εμφανίζεται στην άκρη της βελόνας μία κωνική σταγόνα, γνωστή ως κώνος Taylor. Συγκεντρωτικά η χαμηλή τιμή τάσης δεν επιτρέπει την παραγωγή ινών, με την

αύξησή της σχηματίζεται ο λεγόμενος κώνος Taylor, όταν όμως η τάση ξεπεράσει ένα επιβαλλόμενο εύρος τιμών οδηγεί σε παραγωγή ινών με αστοχίες (beads).[57]

➤ Ρυθμός ροής διαλύματος

Ο ρυθμός ροής καθορίζει την ποσότητα του πολυμερικού διαλύματος που πρόκειται να ηλεκτροινοποιηθεί. Ένας ταχύς ρυθμός δεν επιτρέπει την εξάτμιση του διαλύτη κατά την πορεία του πίδακα, και άρα παράγονται ίνες υγρές ή με συσσωματώματα (αστοχίες – beads). Συγκεκριμένα, όταν ο ρυθμός ροής αυξάνεται, υπάρχει μια αντίστοιχη αύξηση στη διάμετρο των ινών που εμφανίζονται στις ινώδεις δομές. Αξίζει να σημειωθεί, ότι για μια δεδομένη τάση, υπάρχει συνήθως ένας αντίστοιχος ρυθμός ροής για τη διατήρηση ενός σταθερού κώνου Taylor.[57]

➤ Απόσταση συλλέκτη-ακροφυσίου

Η απόσταση μεταξύ του ακροφυσίου της βελόνας και του συλλέκτη παίζει μικρότερο ρόλο στη διάμετρο και την μορφολογία των ινών σε σχέση με τους άλλους παράγοντες. Συγκεκριμένα, η μικρή απόσταση μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή υγρών ινών, ή ινών που να περιέχουν ανομοιογενή συσσωματώματα (αστοχίες – beads). Αντίθετα, μια μεγάλη απόσταση θα πρέπει να επακολουθείται από αύξηση της τάσης προκειμένου να δημιουργηθεί σταθερή ροή.[57]

Περιβαλλοντικές παράμετροι

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες εντός του θαλάμου ινοποίησης, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η ταχύτητα του αέρα, μπορεί επίσης να επηρεάσουν τη διάμετρο των ινών και τη μορφολογία τους, ενώ ελέγχουν σε μεγάλο βαθμό την εξάτμιση του διαλύτη.

Η θερμοκρασία όσο αυξάνεται δίνει ίνες με μικρότερη διάμετρο και επομένως ευνοεί τη δημιουργία περισσότερο δαιδαλώδους συστήματος λεπτότερων νανοϊνών, ενώ αντίθετα η υψηλή υγρασία ενδέχεται να μειώσει τις επιβαλλόμενες στον πίδακα τάσεις, γεγονός που επηρεάζει το πορώδες των ινών και οδηγεί στη διαμόρφωση ασυνεχών ινών μεγάλης διαμέτρου.[58]

2.3.1.3 Ξήρανση με κατάψυξη (Freeze Drying)

Η **ξήρανση υπό κατάψυξη ή λυοφιλίωση (Freeze Drying ή Lyophilization)** είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης κατάλληλη ειδικά για τη διατήρηση βιολογικών προϊόντων. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, σε σύγκριση με άλλες διαδικασίες ξήρανσης, σχετίζεται με την υψηλή ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται για εμπορικούς σκοπούς για τη βελτίωση της διάρκειας ζωής του προϊόντος και την ταυτόχρονη διατήρηση των περισσότερων ιδιοτήτων της αρχικής πρώτης ύλης του, όπως εμφάνιση, σχήμα, χρώμα και γεύση.[59]

Η διαδικασία ξήρανσης με κατάψυξη αποτελείται από τρία στάδια: κατάψυξη, πρωτογενή ξήρανση και δευτερογενή ξήρανση. Το βήμα κατάψυξης γίνεται σε καταψύκτη πολύ χαμηλής θερμοκρασίας σε σύντομο χρονικό διάστημα για να διατηρηθεί το μέγεθος των κρυστάλλων πάγου όσο το δυνατόν μικρότερο, προκαλώντας έτσι λιγότερη φυσική ζημιά στη δομή του προϊόντος. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα σε αεροστεγή θάλαμο όπου μειώνεται η πίεση κάτω από το τριπλό σημείο του νερού (ή γενικότερα του διαλύτη, αν έχει χρησιμοποιηθεί άλλο υγρό) και έτσι το δείγμα μεταβαίνει από την στερεή στην αέρια φάση απευθείας με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής

φάσης. Συγκεκριμένα στην αρχική ξήρανση, το ελεύθερο νερό από κρυστάλλους πάγου εξαλείφεται από το κατεψυγμένο δείγμα, ενώ στη δευτεροβάθμια ξήρανση, αφαιρείται το δεσμευμένο νερό. Η δευτεροβάθμια ξήρανση απαιτεί περισσότερη ενέργεια ανά γραμμομόριο νερού που αφαιρείται και προχωρά αναλογικά πιο αργά.[60],[61]

Η λυοφιλίωση είναι γενικά πιο αργή διεργασία σε σχέση με τις συνήθεις μεθόδους αφυδάτωσης. Το ενεργειακό κόστος για την κατάψυξη είναι υψηλό και σ'αυτό προστίθεται το κόστος δημιουργίας και διατήρησης του απαραίτητου υψηλού κενού. Αυτοί οι λόγοι σε συνδυασμό με το υψηλή τιμή αγοράς των λυοφιλοποιητών, έχουν σαν αποτέλεσμα το υψηλό κόστος παραγωγής για τα λυοφιλοποιημένα προϊόντα. Κατά συνέπεια, εκτός από την εφαρμογή για βιολογικά δραστικά υλικά (βακτήρια, εμβόλιο), η χρήση ξήρανσης με κατάψυξη περιορίζεται στη βιομηχανία τροφίμων σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως ο καφές, συστατικά για έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (φρούτα και λαχανικά, κρέας και ψάρια) και αρωματικά βότανα.[59, 62]

2.3.1.4 Φυγοκεντρική Εκβολή (Extrusion)

Η **εκβολή** αποτελεί μία πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο εξαιτίας της ευκολίας της, του χαμηλού της κόστους και των ομαλών συνθηκών σύνθεσης, που εξασφαλίζουν υψηλή βιωσιμότητα των προϊόντων της διεργασίας.[63],[64] Μία παραλλαγή της εκβολής αποτελεί η **φυγοκεντρική εκβολή**, που είναι μια διεργασία συνεκβολής. Κατά την φυγοκεντρική εκβολή εκβάλλονται ταυτόχρονα από δύο έκκετρα ακροφύσια η ενεργός ουσία και το διάλυμα ή το τήγμα του πολυμερούς, που την περιβάλλει. Όταν το σύστημα περιστρέφεται, το εξωθούμενο υλικό μετατρέπεται σε σταγονίδια, που σχηματίζουν κάψουλες.[64]

Η μικροενθυλάκωση με εκβολή λαμβάνει χώρα σε υψηλές θερμοκρασίες, και περιλαμβάνει εκβολή ενός γαλακτώματος του πυρηνικού υλικού και του εξωτερικού καλύμματος μέσω ενός στομίου υπό υψηλή πίεση.[65] Συγκεκριμένα, η μέθοδος της φυγοκεντρικής εκβολής γίνεται με τη χρήση μιας συσκευής η οποία αποτελείται από μια περιστρεφόμενη κεφαλή εξώθησης που περιλαμβάνει έκκετρα ακροφύσια από τα οποία εκβάλλεται ταυτόχρονα η ενεργός ουσία που πρόκειται να εγκλειστεί και το διάλυμα ή το τήγμα του πολυμερούς. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τη φυγόκεντρο δύναμη για να εκτοξεύσει το υλικό του πυρήνα στη μεμβράνη που θα αποτελέσει το περίβλημα των μικροκαψουλών. Το υλικό που πρόκειται να εγκλειστεί και το οποίο μπορεί να είναι μόνο σε υγρή μορφή εκτοξεύεται από ένα ακροφύσιο ενώ ταυτόχρονα περιβάλλεται είτε από το διάλυμα του πολυμερούς το οποίο θα σχηματίσει το τοίχωμα των μικροκαψουλών είτε από τήγμα πολυμερούς.[65],[66]

Χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την ενθυλάκωση πτητικών και ασταθών αρωματικών συστατικών σε υδατάνθρακες που βρίσκονται στην υαλώδη κατάσταση. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη διάρκεια ζωής των παραγόμενων προϊόντων σε μόρια που είναι επιρρεπή στην οξειδωση. Από την άλλη πλευρά, ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ο σχηματισμός αρκετά μεγάλων σωματιδίων μεγέθους 500-1000μm, ο οποίος περιορίζει τη χρήση των εξωθημένων αρωματικών συστατικών σε ορισμένες εφαρμογές. Επιπλέον, υπάρχει περιορισμένος αριθμός υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξωτερικά καλύμματα για μικροενθυλάκωση με εξώθηση.[67]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.1 ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

3.1.1 Ανάκτηση Βιοδραστικών Συστατικών

Τα αρωματικά φυτά που επιλέχθηκαν να εκχυλιστούν προκειμένου να ανακτηθούν τα βιοδραστικά συστατικά τους και στη συνέχεια να εγκλειστούν είναι το βάλσαμο (*Hypericum perforatum L.*) και το χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*).

3.1.2 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών

3.1.2.1 Επιλογή Βιοδραστικών Συστατικών για Εγκλεισμό

Τα βιοδραστικά συστατικά που οδηγήθηκαν για εγκλεισμό, λόγω των πολύ καλών τους ιδιοτήτων και της χρήσης τους στη βιομηχανία των τροφίμων είναι:

- εκχύλισμα βαλσάμου που παρασκευάστηκε με την εφαρμογή υπερήχων και μικροκυμάτων όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1
- εκχύλισμα χαμομηλιού που παρασκευάστηκε με την εφαρμογή υπερήχων και μικροκυμάτων όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1
- εμπορικό αιθέριο έλαιο βαλσάμου (*hypericum EO*)
- εμπορικό αιθέριο έλαιο χαμομηλιού (*chamomile EO*)
- εμπορικό αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (*rosemary EO*)
- εμπορικό αιθέριο έλαιο ρίγανης (*oregano EO*)
- μείγμα αιθέριων ελαίων (*oil mix*), σε αναλογία: 50% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 20% αιθέριο έλαιο βαλσάμου, 15% αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου και 15% αιθέριο έλαιο χαμομηλιού.

3.1.2.2 Επιλογή κατάλληλης μήτρας για τον εγκλεισμό των βιοδραστικών συστατικών

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση βιοπολυμερών ως μήτρες για τον εγκλεισμό βιοδραστικών ουσιών, λόγω της βιοσυμβατότητας και της βιοαποικοδομησιμότητάς τους. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η ενθυλάκωση βιοδραστικών συστατικών, μέσω ηλεκτροστατικής ινοποίησης, ξήρανσης με εκνέφωση και ξήρανσης με κατάψυξη σε μήτρες ζεΐνης και πουλλουλάνης με πρωτεΐνη ορού γάλακτος.

Ζεΐνη (Zein)

Η ζεΐνη είναι μια φυσική πρωτεΐνη, συγκεκριμένα είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών προλαμίνης που βρίσκεται στον αραβόσιτο, και χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών. Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1897, λόγω της διαλυτότητάς της σε υδατικό διάλυμα αλκοόλης. Συνήθως, οι εμπορικές πηγές της ζεΐνης κατασκευάζονται από ένα μείγμα πρωτεϊνών των τεσσάρων

κατηγοριών της: α, β, γ και δ. Εκφράζονται διαδοχικά στον αραβόσιτο και βρέθηκε να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να επιτευχθεί σταθεροποίηση.[68],[69]

Η ζεΐνη διαθέτει το πλεονέκτημα να είναι μη τοξική, ανανεώσιμη και βιοαποικοδομήσιμη. Επειδή είναι μία από τις πιο υδρόφοβες πρωτεΐνες έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως υλικό επίστρωσης για καραμέλες, ρύζι, αποξηραμένα φρούτα και καρύδια. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη φαρμακευτική βιομηχανία για την επικάλυψη καψουλών, παρέχοντας προστασία, ελεγχόμενη απελευθέρωση και κάλυψη γεύσεων και αρωμάτων.[69]

Τα τελευταία χρόνια έχει διερευνηθεί εκτενώς η χρήση της ζεΐνης ως ίνα και έχει διαπιστωθεί πως ίνες από ζεΐνη διαθέτουν βασικές ιδιότητες φυσικών ινών, όπως του βαμβακιού, του μαλλιού, του μεταξιού κ.α.[70]

Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey Protein Isolate) με πουλλουλάνη (pullulan) (WPI:pul)

Λόγω της αμφίφιλης φύσης τους και των καλών χαρακτηριστικών γαλακτωματοποίησης, οι πρωτεΐνες προσφέρουν τις απαιτούμενες κατάλληλες ιδιότητες για μικροενθυλάκωση βιοδραστικών συστατικών. Η εγγενής ή μετουσιωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι η πιο ευρέως μελετημένη πρωτεΐνη για μικροενθυλάκωση. Κατά τη θερμική επεξεργασία, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος υφίσταται μετουσίωση και ορισμένες δομικές αλλαγές. [71],[72] Μελέτες έχουν δείξει ότι, λόγω του ξεδιπλώματος μέσω της προθέρμανσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος, έχουν βελτιωθεί οι λειτουργικές της ιδιότητες καθώς και οι ιδιότητες ενθυλάκωσης όπως η ζελατινοποίηση και η προσρόφηση στη διεπαφή. Η πρωτεΐνη έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας εγκλεισμού σε κάψουλες λόγω της ικανότητάς της να σχηματίζει εύκολα μικροκάψουλες κάτω από ήπιες συνθήκες χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές.[73]

Από την άλλη πλευρά, μελέτες αποκάλυψαν ότι οι πολυσακχαρίτες δείχνουν καλή διαλυτότητα στο νερό και έχουν χαμηλό ιξώδες σε υψηλές συγκεντρώσεις, σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες. Οι εξαιρετικές ιδιότητες φραγμού οξυγόνου και υγρασίας ορισμένων πολυσακχαριτών παρέχουν επίσης καλή προστασία για τα εγκλεισμένα βιοδραστικά υλικά. [74],[75] Η πουλλουλάνη είναι ένας εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από το *Aureobasidium pullulans*. Αυτός ο πολυσακχαρίτης χρησιμοποιείται ειδικά ως υλικό επίστρωσης στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων λόγω των μη τοξικών, υδατοδιαλυτών, άχρωμων, άγευστων, άοσμων και θερμοσταθερών χαρακτηριστικών του.[76]

Ως εκ τούτου, στη παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε ως μήτρα για την ενθυλάκωση αιθέριων ελαίων η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε συνδυασμό με την πουλλουλάνη, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης και κατά συνέπεια την βιωσιμότητα του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου.[73]

3.1.3 Χαρακτηρισμός Βιοδραστικών Συστατικών

Για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των βιοδραστικών συστατικών στα διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu
- κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου, Na_2CO_3 , που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοδραστικών συστατικών που προέκυψαν από τις μεθόδους εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα της ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-picrylhydrazyl (DPPH) σε μεθανόλη (MeOH).

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ-ΟΡΓΑΝΑ

3.2.1 Εκχύλιση Βιοδραστικών Συστατικών

Τα αρωματικά φυτά που επιλέχθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία για να μελετηθούν κατά πόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυτικές πρόσθετες ύλες σε πρόμειγμα για ζωοτροφές είναι το χαμομήλι και το βάλσαμο. Η παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών από το βάλσαμο και το χαμομήλι πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε κατάλληλο πρωτόκολλο εκχύλισης και πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός κεντρικού σημείου για την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών. Επιπλέον, προκειμένου να προσδιοριστεί στα αρωματικά φυτά η μέγιστη περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά εφαρμόστηκε και η συμβατική εκχύλιση Soxhlet.

Αρχικά, προκειμένου να παραχθούν τα εκχυλίσματα βαλσάμου και χαμομηλιού πραγματοποιήθηκε μια προεπεξεργασία των αρωματικών φυτών. Αφού πρώτα παρελήφθησαν στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη, Panasonic, MDF-U3386S, (Εικόνα 2I), σε θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 72 ώρες και έπειτα μεταφέρθηκαν σε συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη, Leybold – Heraeus, GT 2A, (Εικόνα 2II), για 24 ώρες, όπου πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κενό. Τέλος, τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας.



Εικόνα 2: I)Καταψύκτης Panasonic, II)Συσκευή ξήρανσης υπό κενό

Τα αποξηραμένα πλέον αρωματικά φυτά οδηγήθηκαν για εκχύλιση με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό που ακολουθήθηκε. Για τον πειραματικό σχεδιασμό, αρχικά επιλέχθηκαν με βάση την ανασκόπηση της επιστημονικής βιβλιογραφίας και αρχικά δοκιμαστικά πειράματα, οι βασικότερες παράμετροι προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της εκχύλισης, ενώ οι υπόλοιπες παρέμειναν σταθερές. Οι σταθερές αυτές τιμές προέκυψαν και πάλι βιβλιογραφικά και έπειτα από την διεξαγωγή δοκιμαστικών πειραμάτων, ως οι πιο αποδοτικές για την μέθοδο που εφαρμόζεται.

Κατά συνέπεια, επιλέχθηκαν οι εξής σταθερές παράμετροι με τις αντίστοιχες τιμές τους:

- κοκκομετρία του δείγματος: 500 – 630 μ m
- είδος διαλύτη: 100% αιθανόλη
- αναλογία στερεού-διαλύτη: 1:20

Η αιθανόλη επιλέχθηκε ως διαλύτης με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA). Συγκεκριμένα, θεωρείται ως ένας οικολογικός, μη τοξικός και άρα ασφαλής για κατανάλωση διαλύτης, με αποτέλεσμα το εκχύλισμα που προκύπτει να είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως πρόσθετο στη βιομηχανία ζωοτροφών.[77]

Για την επιλογή των πειραμάτων ακολουθήθηκε στη συνέχεια, πειραματικός σχεδιασμός κεντρικού σημείου με εφαρμογή των τριών διαφορετικών παραμέτρων που παρουσιάζονται παρακάτω:

- Ένταση Μικροκυμάτων (MW): 0, 200, 500 W
- Ένταση Υπερήχων (US): 0, 450, 700 W
- Διάρκεια Εκχύλισης (duration): 5, 8, 12 min

Ο αριθμός των συνδυασμών που προκύπτουν για τις τρεις παραμέτρους αριστοποίησης και τις τρεις διαφορετικές τιμές για την κάθε παράμετρο, που ουσιαστικά ισοδυναμεί με τον αριθμό των απαιτούμενων πειραμάτων, αντιστοιχεί σε 27. Για τη μείωση των πειραμάτων αυτών στον ελάχιστο δυνατό αριθμό και την εξαγωγή ταυτόχρονα, ασφαλών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων, εφαρμόστηκε η μέθοδος του *Πειραματικού Σχεδιασμού Κεντρικού Σημείου (Central Composite Design)*. Με τον σχεδιασμό και τη χρήση του στατιστικού εργαλείου JMP 13, ο αριθμός των πειραμάτων μειώθηκε τελικά στους 16 συνδυασμούς. Συνεπώς, προέκυψαν 16 δείγματα ανά αρωματικό φυτό (βάλσαμο και χαμομήλι), τα οποία παρουσιάζονται μαζί με τις τιμές των παραμέτρων τους στους Πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα.

➤ Για το βάλσαμο:

Πίνακας 2: Συνδυασμοί τιμών παραμέτρων για τα πειράματα αριστοποίησης των εκχυλίσεων βάλσαμου

Δείγμα (no)	MW (Watt)	US (Watt)	Διάρκεια Εκχύλισης (min)
1	0	0	5
2	200	0	5
3	0	450	5

4	0	700	5
5	500	700	5
6	500	0	8
7	200	450	8
8	200	450	8
9	500	450	8
10	200	700	8
11	500	700	8
12	0	0	12
13	500	0	12
14	200	450	12
15	200	450	12
16	0	700	12

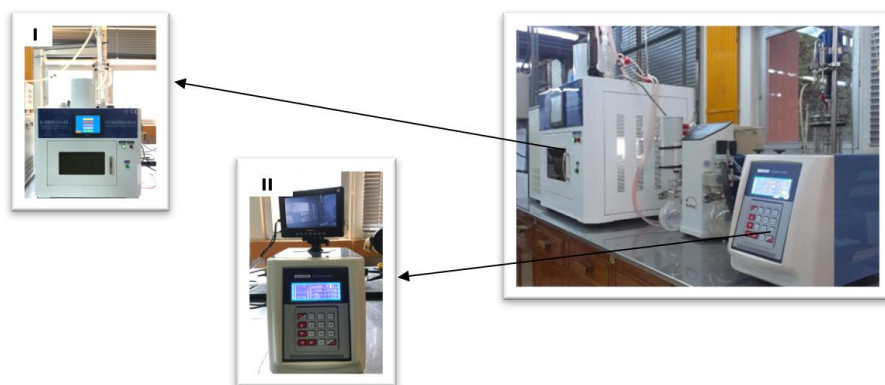
➤ Για το χαμομήλι:

Πίνακας 3: Συνδυασμοί τιμών παραμέτρων για τα πειράματα αριστοποίησης των εκχυλίσεων χαμομηλιού

Δείγμα (no)	MW (Watt)	US (Watt)	Διάρκεια Εκχύλισης (min)
17	0	0	5
18	200	0	5
19	0	450	5
20	0	700	5
21	500	700	5
22	500	0	8
23	200	450	8
24	200	450	8

25	500	450	8
26	200	700	8
27	500	700	8
28	0	0	12
29	500	0	12
30	200	450	12
31	200	450	12
32	0	700	12

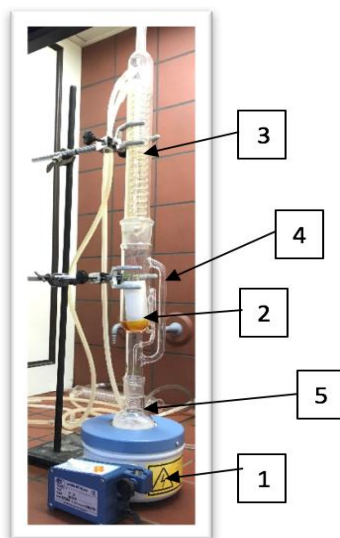
Τα δείγματα που προέκυψαν τοποθετήθηκαν στη συσκευή εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (Ultrasonic/Microwave Reaction System, XO-SM Series). Συγκεκριμένα, η διαδικασία εκχύλισης περιελάμβανε το δοχείο εκχύλισης να τοποθετείται στον θάλαμο της συσκευής όπου εφαρμόζονταν τα μικροκύματα (Εικόνα 3.Ι) και αντίστοιχα οι υπέρηχοι να ενεργοποιούνται, όπου απαιτείται, από την αντίστοιχη συσκευή (Εικόνα 3.ΙΙ). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διήθηση για την απομάκρυνση της στερεής μήτρας και την παραλαβή του εκχυλίσματος.



Εικόνα 3 : Διάταξη εκχύλισης UMAE, Ι) Συσκευή MAE, ΙΙ) Συσκευή UAE

Επιπλέον, εφαρμόστηκε η συμβατική εκχύλιση Soxhlet προκειμένου να υπολογισθεί η περιεχόμενη περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά για κάθε φυτό, ώστε να υπολογισθεί η απόδοση της εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE) για την αριστοποίηση της διεργασίας. Η διάταξη της συσκευής περιλάμβανε μια σφαιρική φιάλη τοποθετημένη σε θερμαντικό μανδύα, με προσαρτημένο οριζόντιο θάλαμο εκχύλισης και συμπυκνωτήρα στο πάνω μέρος της. Ο συμπυκνωτήρας συνδέθηκε με παροχή νερού ως ψυκτικό. Τα αποξηραμένα δείγματα χαμομηλιού και βαλσάμου τοποθετήθηκαν σε δειγματοφορείς στον ειδικό θάλαμο της εκχυλιστικής διάταξης και εκχυλίστηκαν με 90 mL διαλύτη

(μεθανόλη) σε αναλογία στερεού - διαλύτη 1:20. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για 4 - 5 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση 13 κύκλων συμπύκνωσης και ανακύκλωσης του διαλύτη (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Διάταξη της εκχύλισης Soxhlet, όπου 1: Θερμαντικός μανδύας, 2: Εκχύλισμα πριν από κάθε σιφωνισμό, 3: Συμπυκνωτήρας, 4: Θάλαμος εκχύλισης και 5: Σφαιρική φιάλη με το μείγμα διαλύτη και εκχυλίσματος

3.2.2 Χαρακτηρισμός Βιοδραστικών Συστατικών

Συνολικό Φαινολικό Φορτίο (Total Phenolic Content-TPC)

Το συνολικό φαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Εν συντομία, 100 μL από το κάθε δείγμα προστέθηκε σε 7,9 mL απεσταγμένου νερού και 500 μL Folin-Ciocalteu. Μετά από ανάδευση σε vortex και παραμονή των διαλυμάτων για 30 λεπτά σε σκοτάδι, προστέθηκαν 1,5 mL διαλύματος 20% (w/v) ανθρακικού νατρίου, Na_2CO_3 . Τα αντιδραστήρια αναμίχθηκαν και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε λουτρό θέρμανσης στους 40°C . Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 765 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο (Helios Unicam, USA) (Εικόνα 5). Τέλος, οι τιμές τους παρεμβλήθηκαν σε καμπύλη βαθμονόμησης γαλλικού οξέος από όπου υπολογίστηκε το συνολικό φαινολικό φορτίο και εκφράστηκε ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος (Gallic acid equivalents, GAE) σε g αρχικού ξηρού δείγματος.



Εικόνα 5: Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 765 nm

Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Η μελέτη της ικανότητας των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες έγινε χρησιμοποιώντας την σταθερή ρίζα 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλϋδραζυλ (DPPH). Συγκεκριμένα, 0,1 mL από κάθε δείγμα προστέθηκαν σε 3,9 mL διαλύματος DPPH (0,03 mg DPPH σε 100mL μεθανόλης). Η απορρόφηση στα 515 nm των δειγμάτων μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο Helios Unicam για χρονικό διάστημα 60 λεπτών.

Το αποτέλεσμα για την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε ως IC50 (mg εκχυλίσματος/ g πρώτης ύλης). Το ποσοστό της δέσμευσης της DPPH ρίζας εκτιμώμενο από το ποσοστό του εναπομένουτος αντιδραστηρίου DPPH είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50% ορίζεται ως IC50. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων κατασκευάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης.

Αρχικά υπολογίστηκε το ποσοστό της εναπομείναντας ρίζας (% DPPH rem) με την χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$DPPH_{rem}\% = 100 - [DPPH_{control} - DPPH_{extract} / DPPH_{control}] \times 100\% \text{ Εξ. (1)}$$

Στη συνέχεια, με απλή ανάλυση παλινδρόμησης συσχετίστηκε το ποσοστό της εναπομείναντας ρίζας DPPH με την συγκέντρωση των εκχυλισμάτων. Από τις καμπύλες που δημιουργήθηκαν υπολογίστηκαν γραφικά οι συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% αναστολή της ρίζας (Inhibition Concentration 50%, IC50). Η δραστηριότητα των δειγμάτων εκφράστηκε μέσω της αποτελεσματικής συγκέντρωσης (IC50) , όσο μικρότερη η τιμή αυτής, τόσο πιο λίγη ποσότητα εκχυλίσματος χρειάζεται για να εξουδετερωθεί η ρίζα, ανά τόσο πιο δραστικό είναι το δείγμα.[78]

3.2.3 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών

Με βάση την περιεκτικότητά τους σε βιοδραστικά συστατικά, το φαινολικό τους περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, επιλέχθηκαν για εγκλεισμό δύο βέλτιστα εκχυλίσματα, ένα εκχύλισμα βαλσάμου και ένα χαμομηλιού αντίστοιχα. Επιπλέον, μελετήθηκε ο εγκλεισμός εμπορικών αιθέριων ελαίων βαλσάμου, χαμομηλιού, δενδρολίβανου, ρίγανης και μείγματός τους σε αναλογία 50% αιθέριου ελαίου ρίγανης, 20% αιθέριου ελαίου βαλσάμου, 15% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 15% αιθέριου ελαίου χαμομηλιού, λόγω της ευρείας χρήσης τους στη βιομηχανία των τροφίμων. Για τον εγκλεισμό των παραπάνω βιοδραστικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Ομοαξονικού Ηλεκτροστατικού Μικρο/Νανοεγκλεισμού (FLUIDNATEK LE-10, BioInicia), (Εικόνα 6). Ύστερα από πληθώρα δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για την βέλτιστη παραγωγή νανοϊνών, επιλέχθηκαν ως κατάλληλες μήτρες, το υδατικό διάλυμα πουλλουλάνης με πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI:pu1) για την ενθυλάκωση των αιθέριων ελαίων και του μείγματός τους και η ζεΐνη για την ενθυλάκωση των εκχυλισμάτων βαλσάμου και χαμομηλιού.



Εικόνα 6: Συσκευή Ομοαξονικής Ηλεκτροστατικής Ινοποίησης - FLUIDNATEK LE-10, Biolnicia

Αρχικά, τοποθετήθηκε αλουμινόχαρτο στον μεταλλικό συλλέκτη, για τη συλλογή των παραγόμενων ινών. Ακολούθως, ετοιμάστηκαν οι σύριγγες ανάλογα με την εκάστοτε ουσία εγκλεισμού.

Για την ενθυλάκωση των εκχυλισμάτων βαλσάμου και χαμομηλιού σε μήτρα ζεΐνης, χρησιμοποιήθηκε μία σύριγγα όπου περιείχε ομογενοποιημένο μείγμα μήτρας με την προς εγκλεισμό ουσία. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκε στη σύριγγα (Liquid 1) διάλυμα εκχυλίσματος – νερού (90:10), συγκέντρωσης 20%w/v για τη ζεΐνη. Ενώ για την ενθυλάκωση των αιθέριων ελαίων σε μήτρα πουλλουάνης με πρωτεΐνη ορού γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν δύο σύριγγες, όπου η μια περιείχε την ουσία προς εγκλεισμό και η άλλη την μήτρα. Συγκεκριμένα στη μια σύριγγα (Liquid 1) τοποθετήθηκε το αιθέριο έλαιο που πρόκειται να εγκλειστεί και στην άλλη (Liquid 2) το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος – πουλλουάνης, WPI:puI (30:70) συγκέντρωσης 20%w/v.

Έπειτα από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, προκειμένου να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός συνθηκών για την παραγωγή νανοϊνών, επιλέχθηκαν ξεχωριστά για κάθε μήτρα οι παρακάτω συνθήκες για την εφαρμογή της ηλεκτροστατικής ινοποίησης:

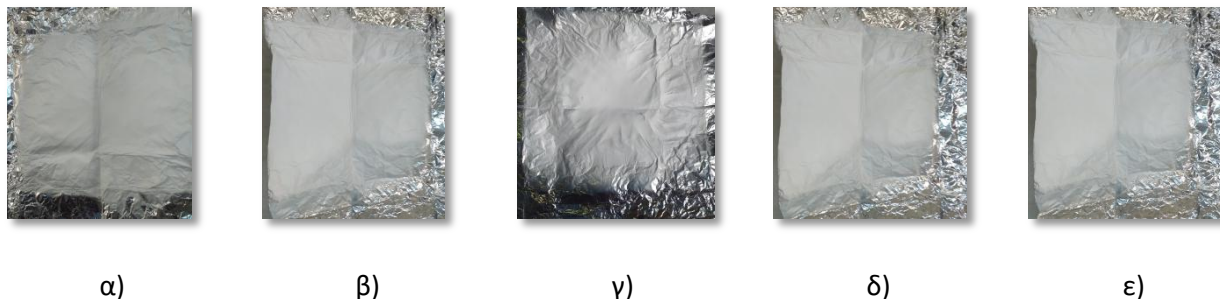
Μήτρα ζεΐνης (zein)

- ογκομετρική παροχή Liquid 1: 1 mL/h
- επιβαλλόμενη τάση: 27.5 kV
- απόσταση ακροφυσίου και συλλέκτη ινών: 17 cm

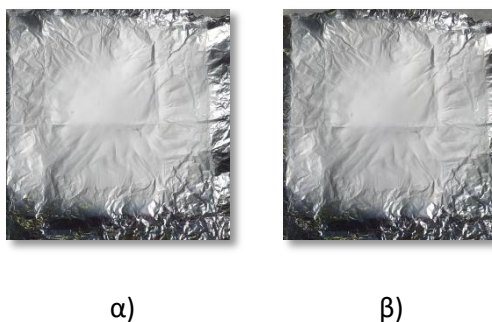
Μήτρα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-πουλλουάνης (WPI:puI)

- ογκομετρική παροχή Liquid 1: 0.1 mL/h
- ογκομετρική παροχή Liquid 2: 1.5 mL/h
- επιβαλλόμενη τάση: 25 Kv
- απόσταση ακροφυσίου και συλλέκτη ινών: 18 cm

Παρακάτω παρουσιάζονται οι νανοΐνες που προέκυψαν για κάθε δείγμα μετά την εφαρμογή της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. (Εικόνες 7 και 8)



Εικόνα 7: Νανοΐνες που προέκυψαν από την ηλεκτροστατική ινοποίηση σε μήτρα *polyimide* για αιθέριο έλαιο : α) βαλσάμου, β) χαμομηλιού, γ) δενδρολίβανου, δ) ρίγανης και ε) μείγματος ελαίων(mix)



Εικόνα 8: Νανοΐνες που προέκυψαν από την ηλεκτροστατική ινοποίηση σε μήτρα ζεΐνης για τα εκχυλίσματα α)βαλσάμου και β) χαμομηλιού

3.2.4 Χαρακτηρισμός νανοϊνών

Προκειμένου να αξιολογηθεί το αποτέλεσμα της ομοαξονικής ηλεκτροστατικής ινοποίησης και να διερευνηθούν οι πιθανές εφαρμογές των εγκλεισμένων συστατικών, είναι απαραίτητος ο χαρακτηρισμός των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των νανοϊνών. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε σειρά μεθόδων, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

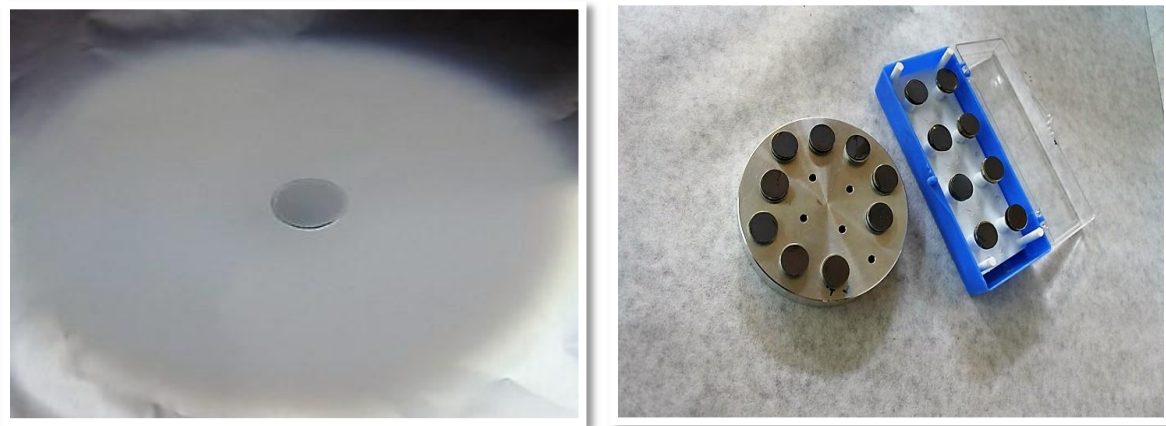
3.2.4.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης – Scanning Electron Microscopy (SEM)

Η απεικόνιση της δομής των νανοϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση της τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy – SEM).

Τα εγκλεισμένα δείγματα που προέκυψαν με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης οδηγήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) προκειμένου να επιλεγούν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής νανοϊνών με εγκλεισμένα βιοδραστικά συστατικά.

Για την παραλαβή των δειγμάτων, ο μεταλλικός συλλέκτης καλύφθηκε με αλουμινοχαρτό και από αυτόν λήφθηκαν δείγματα που τοποθετήθηκαν σε κατάλληλους για το SEM δειγματοφορείς (Εικόνα 9). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή επιχρύσωσης (SC7620 Mini Sputter Coater, Quorum Technologies) για 105 sec (Εικόνα 10), μια διαδικασία που αποσκοπεί στο να καταστούν τα

δείγματα αγώγιμα, ώστε η δέσμη ηλεκτρονίων του μικροσκοπίου να μπορεί να σαρώσει την επιφάνεια και τα ηλεκτρόνια να έχουν δίοδο διέλευσης.



Εικόνα 9: Λήψη δειγμάτων από αλουμινόχαρτο και τοποθέτησή τους σε κατάλληλους δειγματοτοφορείς για το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)



Εικόνα 10: Επιχρύσωση δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση στο SEM

3.2.4.2 Ποσοστό εγκλεισμού

Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού εκχυλισμάτων no7 και no27

Για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλεισμού των εκχυλισμάτων no7 και no27, βαλσάμου και χαμομηλιού αντίστοιχα, σε μήτρα ζεΐνης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά παραλήφθηκαν οι νανοΐνες κάθε δείγματος και στη συνέχεια αναμίχθηκαν με 10 mL διαλύματος αιθανόλης : H₂O (90:10). Μετά από ανάδευση λήφθηκαν δείγματα και οδηγήθηκαν για φωτομέτρηση με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm

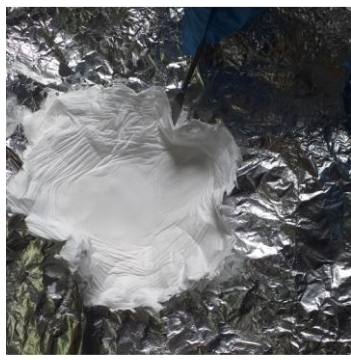
Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού αιθέριων ελαίων

Για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλεισμού αιθέριων ελαίων σε πολυμερική μήτρα WPI:pu1, αρχικά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ώστε να εξακριβωθεί η ακριβής ποσότητα εκχυλίσματος, που έχει φτάσει στον μεταλλικό στόχο (εγκλεισμένη και μη εγκλεισμένη). Έτσι, για καθεμία από τις εγκλεισμένες ουσίες πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα.

- Υπολογισμός μη εγκλεισμένης ποσότητας που φτάνει στο μεταλλικό στόχο

Για τον υπολογισμό της μη εγκλεισμένης ποσότητας κάθε δείγματος που φτάνει στον μεταλλικό στόχο, ακολουθήθηκε μια σειρά διαδικασιών που παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω.

Αρχικά παρελήφθη από κάθε δείγμα όλη η ποσότητα νανοϊνών (Εικόνα 11) και στη συνέχεια αναμίχθηκαν οι νανοΐνες κάθε δείγματος ξεχωριστά με 20 mL εξανίου. Μετά από ανάδευση το υπερκείμενο κάθε διαλύματος οδηγήθηκε προς εξάτμιση. Από τα εξατμισμένα πλέον δείγματα, αφού πρώτα διαλυτοποιήθηκαν σε 1 mL αιθανόλης, λήφθηκαν δείγματα, που φωτομετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm (3.2.2).



Εικόνα 11 : Παραλαβή νανοϊνών

- Υπολογισμός εγκλεισμένης ποσότητας που φτάνει στο μεταλλικό στόχο

Για τον υπολογισμό της εγκλεισμένης ποσότητας κάθε δείγματος που φτάνει στον μεταλλικό στόχο, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

Η ποσότητα νανοϊνών κάθε δείγματος αφού πρώτα διαλυτοποιήθηκε σε 12 mL νερό, 8 mL εξανίου και 20 mL αιθανόλης, τα οποία προστίθονταν διαδοχικά στο διάλυμα, στη συνέχεια αναδεύτηκε για αρκετή ώρα και οδηγήθηκε στη φυγόκεντρο, όπου και παραλήφθηκε το υπερκείμενο υγρό που περιέχει την εγκλεισμένη ουσία. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης πραγματοποιήθηκε με ταχύτητα περιστροφής 3000 rpm για 10 min και επαναλήφθηκε 3-4 φορές έως ότου να παραληφθεί όλη η υπερκείμενη ποσότητα από το διάλυμα. Έπειτα η υπερκείμενη ουσία οδηγήθηκε προς εξάτμιση από όπου λήφθηκε δείγμα, προκειμένου να φωτομετρηθεί με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm (3.2.2).

3.2.5 Εγκλεισμός βέλτιστου δείγματος

Από τα εγκλεισμένα δείγματα, με βάση τη δομή των νανοϊνών τους, το ποσοστό εγκλεισμού που επιτεύχθηκε, καθώς και τα ολικά φαινολικά που μετρήθηκαν στο καθένα ξεχωριστά, επιλέχθηκε ως βέλτιστο δείγμα αυτό του μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix).

Προκειμένου να παραχθεί το δείγμα αυτό σε ποσότητα ικανή για να ενσωματωθεί στη συνέχεια ως πρόσθετη ύλη στο τελικό προϊόν, ακολουθήθηκαν δύο νέες μέθοδοι εγκλεισμού: η ξήρανση με εκνέφωση (spraydrying) και η ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying). Η διαδικασία εγκλεισμού του μείγματος αιθέριων ελαίων με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν περιγράφεται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους.

3.2.5.1 Εγκλεισμός βέλτιστου δείγματος με ξήρανση υπό κατάψυξη – Freeze Drying

Για τον εγκλεισμό του μείγματος ελαίων με ξήρανση υπό κατάψυξη ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά παρασκευάστηκε γαλάκτωμα με την υδατική μήτρα και το μείγμα ελαίων. Αφού πρώτα παρασκευάστηκε η υδατική φάση που αποτελούνταν από διάλυμα WPI:pu1 (80:20) συγκέντρωσης 20%w/v, στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε συσκευή γαλακτωματοποίησης, όπου ενσωματώθηκε σταδιακά σ'αυτή διάλυμα που περιείχε 15%w/w της επιθυμητής ουσίας προς εγκλεισμό (μείγμα αιθέριων ελαίων-mix), 1.5%w/w πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) και οξικό οξύ. Το γαλάκτωμα ελήφθη με ομογενοποίηση για 15 λεπτά και ταχύτητα περιστροφής 1100 rpm χρησιμοποιώντας έναν ομογενοποιητή υψηλής διάτμησης. Στο τελικό γαλάκτωμα η συγκέντρωση WPI:pu1 σε ποσοστό 80:20 βρέθηκε να είναι 6%w/w.

Αφού παρασκευάστηκε γαλάκτωμα με την υδατική μήτρα και το μείγμα ελαίων στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε καταψύκτη (Panasonic, MDF-U3386S) σε θερμοκρασία -80 °C για 72 ώρες. Έπειτα τοποθετήθηκε σε συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη (Leybold – Heraeus, GT 2A) και πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κενό για 72 περίπου ώρες, έως ότου το δείγμα μας να είναι έτοιμο να παραληφθεί σε μορφή σκόνης. Στη συνέχεια λήφθηκαν δείγματα της εγκλεισμένης σκόνης τα οποία οδηγήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) για μελέτη της δομής τους και για φωτομέτρηση με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm προκειμένου να προσδιοριστεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους.

3.2.5.2 Εγκλεισμός βέλτιστου δείγματος με ξήρανση με εκνέφωση – Spray Drying

Για τον εγκλεισμό του μείγματος ελαίων με ξήρανση με εκνέφωση ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά παρασκευάστηκε γαλάκτωμα υδατικής μήτρας και μείγματος αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης 6%w/w ολικού πολυμερικού περιεχομένου (WPI:pu1-80:20), ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε και στη μέθοδο της ξήρανσης με κατάψυξη.

Στη συνέχεια, το γαλάκτωμα ξηράνθηκε με ψεκασμό (spray drying) σε πιλοτικό ξηραντήρα ψεκασμού. (Εικόνα 12). Για την πραγματοποίηση της ξήρανσης με εκνέφωση χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός τροχός με ταχύτητα περιστροφής 12.1 rpm. Ο αέρας εκνέφωσης λήφθηκε από το περιβάλλον από έναν ανεμιστήρα (25 Hz), ενώ η θερμοκρασία εισόδου Tinlet σταθεροποιήθηκε στους 170°C και η θερμοκρασία εξόδου κυμαινόταν από 80°C έως 110°C. Από τη μέθοδο αυτή προέκυψε εγκλεισμένο μείγμα αιθέριων ελαίων σε πολυμερική μήτρα σε μορφή σκόνης. Ακολούθως, λήφθηκαν δείγματα της

εγκλεισμένης σκόνης τα οποία οδηγήθηκαν προς περαιτέρω μελέτη της δομής τους στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) και για φωτομέτρηση με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm για προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου τους.



Εικόνα 12: Συσκευή ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying)

3.2.6 Προσθήκη εγκλεισμένου μείγματος ελαίων σε πρόμειγμα για ζωοτροφές - Extrusion

Τα δείγματα εγκλεισμένης σκόνης μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) που προέκυψαν με τις μεθόδους της ξήρανσης με κατάψυξη, και της ξήρανσης με εκνέφωση, οδηγήθηκαν για περαιτέρω μελέτη στο SEM και για φωτομέτρηση με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.

Στη συνέχεια, οδηγήθηκαν και τα δύο δείγματα εγκλεισμένης σκόνης μείγματος ελαίων (oil mix) στη συσκευή του εκβολέα, για ενσωμάτωση σε πρόμειγμα αλεύρων κατάλληλων προδιαγραφών, και παραγωγή των καινοτόμων εμπλουτισμένων πέλλετ, που αποτελούν και το τελικό στάδιο της συνολικής διεργασίας παραγωγής της ζωοτροφής.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της εκβολής και να συλλεχθεί το τελικό προϊόν ζωοτροφής, προετοιμάστηκαν 4 διαφορετικά δείγματα συγκεκριμένων προδιαγραφών (A,B,C,D), τα οποία παρουσιάζονται συνοπτικά στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 4, 5).

Πίνακας 4 : Κωδικοί δειγμάτων προς εκβολή

Κωδικός	Δείγματα
Βάση άλευρου με εγκλεισμένο μείγμα αιθέριων ελαίων (spray drying)	A
Βάση άλευρου με εγκλεισμένο μείγμα αιθέριων ελαίων (freeze drying)	B
Βάση άλευρου με μη εγκλεισμένο μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix)	C
Βάση άλευρου, χωρίς πρόσθετο	D

Πίνακας 5 : Προδιαγραφές δειγμάτων προς εκβολή

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ			
	A	B	C	D
Υγρασία Καλαμποκάλευρου (%)	11.50%	11.50%	11.50%	11.50%
Υγρασία Σογιάλευρου (%)	7.74%	7.74%	7.74%	7.74%
Καλαμποκάλευρο (%)	50%	50%	50%	50%
Σογιάλευρο (%)	24.67%	25%	30%	33%
Πρόμειγμα (%)	8%	8%	0.00%	0.00%
Περιεκτικότητα δραστικής ουσίας (%)	3.48%	3.48%	3.48%	0.00%
Υγρασία Μείγματος (%)	17%	17%	17%	17%

Από τα παραπάνω δείγματα (A,B,C), συλλέχθηκε σε πρώτη φάση μια μικρή ποσότητα (30g), προκειμένου να ελεγχθεί και στη συνέχεια να συγκριθεί ως προς το ολικό φαινολικό του περιεχόμενο, πριν και μετά τη διεργασία της εκβολής στην οποία και οδηγήθηκαν. Το τέταρτο δείγμα (D) το οποίο αποτελεί τη σκέτη βάση αλεύρων (πρόμειγμα), εξυπηρέτησε στη μελέτη της συμπεριφοράς των

υπόλοιπων δειγμάτων με αυτές τις προδιαγραφές κατά τα προκαταρκτικά πειράματα που διεξήχθησαν, με σκοπό τη δοκιμή των βέλτιστων ήδη επιλεγμένων συνθηκών λειτουργίας του οργάνου του εκβολέα.

Η παραγωγή των προϊόντων εκβολής πραγματοποιήθηκε σε εκβολέα διπλού κοχλία συμπεριστροφής (Εικόνα 13). Κατά μήκος του κοχλία υπάρχουν τέσσερις ζώνες με διαφορετικά προφίλ θερμοκρασιών. Το δείγμα εισάγεται στην τελευταία ζώνη. Η εκβολή πραγματοποιήθηκε με ταχύτητα περιστροφής των κοχλιών 200 rpm και ροή δείγματος 60%-70%. Από την διαδικασία της εκβολής προέκυψαν τρία εμπλουτισμένα δείγματα πέλλετ ζωοτροφής τα οποία απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 14).



Εικόνα 13: Συσκευή εκβολής - extruder



Εικόνα 14: Δείγματα πέλλετ ζωοτροφής μετά την εκβολή

3.2.7 Χαρακτηρισμός τελικού προϊόντος-πέλλετ ζωοτροφών

Τα τελικά δείγματα Α, Β, Γ που προέκυψαν από τη διεργασία της εκβολής, αφού πρώτα θρυμματίστηκαν, στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με σκοπό να μελετηθούν ως προς τα ολικά φαινολικά τους. Για κάθε δείγμα ακολουθήθηκε διαφορετική μεθοδολογία που αναφέρεται στη συνέχεια.

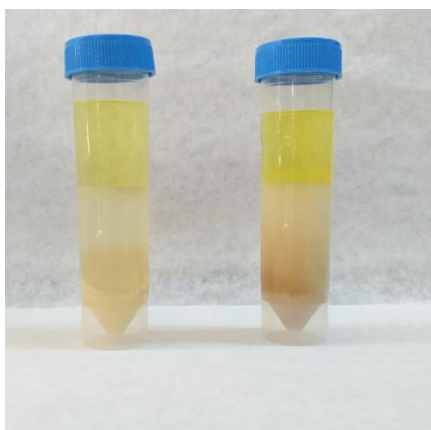
Από το δείγμα Α πριν και μετά την εκβολή συλλέχθηκε ποσότητα 10g σκόνης και διαλυτοποιήθηκε σε 50mL H₂O, 20mL εξανίου και 10mL αιθανόλης. Μετά από ανάδευση το υπερκείμενο κάθε διαλύματος οδηγήθηκε προς εξάτμιση. Από τα εξατμισμένα πλέον δείγματα, αφού πρώτα διαλυτοποιήθηκαν σε 1

mL αιθανόλης, λήφθηκαν δείγματα, που φωτομετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm. Όμοια, η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για το δείγμα Β.

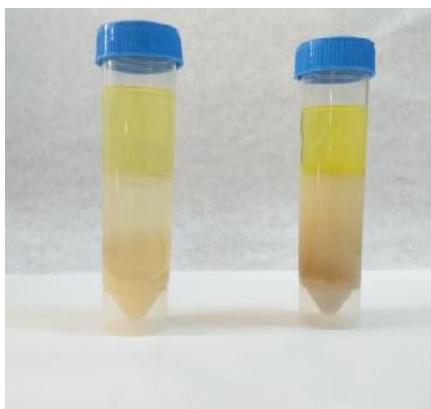
Παρομοίως, από το δείγμα C συλλέχθηκε ποσότητα 10g, η οποία λήφθηκε πριν και μετά την εκβολή, διαλυτοποιήθηκε σε 20mL εξανίου, αναδεύτηκε και οδηγήθηκε προς φυγοκέντρηση. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλήφθηκε 3 φορές έως ότου παραλήφθηκε όλη η υπερκείμενη ποσότητα. Στη συνέχεια τα υπερκείμενα οδηγήθηκαν προς εξάτμιση και τα εξατμισμένα πλέον δείγματα, αφού πρώτα διαλυτοποιήθηκαν σε 1 mL αιθανόλης, έπειτα φωτομετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm.

Από τις μετρήσεις που προέκυψαν για κάθε δείγμα πριν και μετά την εκβολή τους, υπολογίστηκε τελικώς η απώλεια δραστικής ουσίας για καθένα από τα δείγματα Α, Β και C.

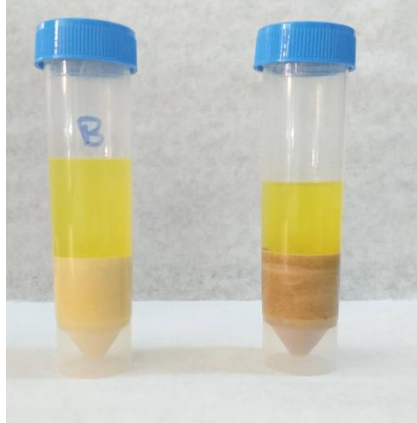
Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 15-17) παρουσιάζεται κάθε ένα από τα παραπάνω εμπλουτισμένα με βιοδραστικά συστατικά δείγματα (Α,Β,С), φυγοκεντρημένα, πριν και μετά την διαδικασία της εκβολής.



Εικόνα 15: Φυγοκεντρημένο δείγμα Α πριν την εκβολή (αριστερά) και μετά την εκβολή (δεξιά)



Εικόνα 16: Φυγοκεντρημένο δείγμα Β πριν την εκβολή (αριστερά) και μετά την εκβολή (δεξιά)



Εικόνα 17: Φυγοκεντρημένο δείγμα C πριν την εκβολή (αριστερά) και μετά την εκβολή (δεξιά)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εφαρμόσθηκαν ως τεχνικές εκχύλισης η εκχύλιση Soxhlet (SE) και η συνδυασμένη εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα (Ultrasound/Microwave Assisted Extraction - UMAE).

Για την αριστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε ως κρίσιμη παράμετρος αριστοποίησης το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και η αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH) κάθε δείγματος, ενώ παράλληλα υπολογίστηκε και η απόδοση τους, θεωρώντας πως τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση Soxhlet έχουν απόδοση 100%. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε φυτό (βάλσαμο, χαμομήλι) παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 6 και 7 αντίστοιχα.

➤ Για το βάλσαμο:

Πίνακας 6: Αποτελέσματα TPC, DPPH και απόδοσης για τα εκχυλίσματα βάλσαμου

Δείγμα (no)	DPPH – IC50 (mg εκχυλ./g πρώτης ύλης)	TPC (mg GAE/g πρώτης ύλης)	Απόδοση %
1	74.9407	2.9950	26.10%
2	72.3852	3.0621	19.87%
3	34.3343	3.3693	27.92%
4	63.1220	3.4068	23.64%
5	31.7505	3.3054	40.38%
6	148.4400	2.4423	19.42%
7	31.0580	3.7291	38.10%
8	31.9828	3.6940	37.42%
9	32.0965	3.3220	35.41%
10	32.8737	3.3220	23.58%
11	32.0228	3.4331	40.49%
12	96.8081	2.6969	24.07%
13	67.5824	3.0448	35.35%

14	34.7846	3.3593	32.83%
15	34.0157	3.4783	32.70%
16	51.6322	3.2378	36.23%

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 3.2.2, η δραστηκότητα των δειγμάτων εκφράστηκε μέσω της αποτελεσματικής συγκέντρωσης IC50. Δηλαδή, όσο μικρότερη είναι η τιμή αυτή, τόσο πιο λίγη ποσότητα εκχυλίσματος χρειάζεται για να εξουδετερωθεί η ρίζα DPPH, αρά τόσο πιο μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει το δείγμα. Συνεπώς, από τον Πίνακα 6 γίνεται φανερό πως το δείγμα βαλάμου με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (χαμηλότερη τιμή) και το περισσότερο φαινολικό περιεχόμενο (υψηλότερη τιμή), είναι το δείγμα **no7**. Επιπλέον, παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 6 διαπιστώνεται πως το δείγμα 7 είναι το τρίτο καλύτερο σε απόδοση εκχύλισης, με πρώτο να βρίσκεται το δείγμα 11. Παρ'όλα αυτά, αποδεικνύεται βιβλιογραφικά πως δεν αντιστοιχεί πάντα το δραστηκότερο δείγμα και σε αυτό με την καλύτερη απόδοση. Είναι πιθανό, ένα δείγμα με μικρή απόδοση να έχει υψηλό βιοδραστηκικό περιεχόμενο, καθιστώντας το εν τέλει πολύ πιο δραστηκικό συγκριτικά με τα υπόλοιπα, γεγονός που συμβαίνει και στην περίπτωση μας.

➤ Για το χαμομήλι:

Πίνακας 7: Αποτελέσματα TPC, DPPH και απόδοσης για τα εκχυλίσματα χαμομηλιού

Δείγμα (no)	DPPH – IC50 (mg εκχυλ./g raw material)	TPC (mg GAE/g raw material)	Απόδοση %
17	191.9951	0.0925	5.86%
18	146.8733	0.1394	8.54%
19	48.3450	2.1639	11.89%
20	51.4168	2.2025	13.93%
21	60.5824	2.4340	8.64%
22	117.1365	1.0019	8.64%
23	106.4871	0.3116	9.40%
24	92.9959	0.3919	9.11%
25	70.0052	2.0747	8.62%
26	50.9715	2.0022	15.03%

27	47.1187	3.0518	19.65%
28	200.1353	0.1092	5.39%
29	174.5728	0.8438	11.67%
30	55.8247	2.2594	17.60%
31	53.2082	2.1207	12.41%
32	49.5695	2.2464	9.92%

Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν από τον Πίνακα 7 και για τα δείγματα χαμομηλιού, με το δείγμα **no27** να παρουσιάζει την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, την καλύτερη απόδοση και τα περισσότερα ολικά φαινολικά συστατικά.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα βέλτιστα δείγματα που προέκυψαν από την εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE) σε αντιστοιχία α) με τις ιδιότητές τους (Πίνακας 8), και β) με τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας τους (Πίνακας 9).

Πίνακας 8: Ιδιότητες βέλτιστων δειγμάτων εκχύλισης UMAE

Δείγμα (no)	Φυτό	DPPH – IC50 (mg εκχυλ./g raw material)	TPC (mg GAE/g raw material)
7	Βάλσαμο	31.0580	3.7291
27	Χαμομήλι	47.1187	3.0518

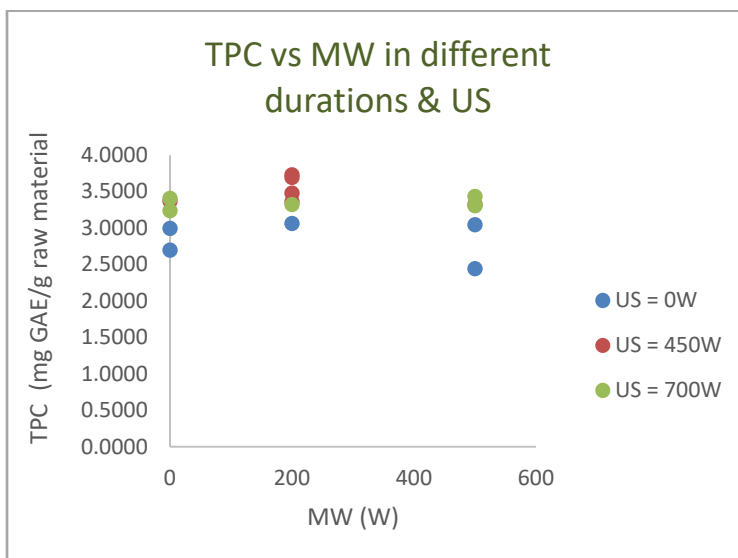
Πίνακας 9: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας βέλτιστων δειγμάτων εκχύλισης UMAE

Δείγμα (no)	Φυτό	Ένταση Μικροκυμάτων (Watt)	Ένταση Υπερήχων (Watt)	Διάρκεια Εκχύλισης (min)
7	Βάλσαμο	200	450	8
27	Χαμομήλι	500	700	8

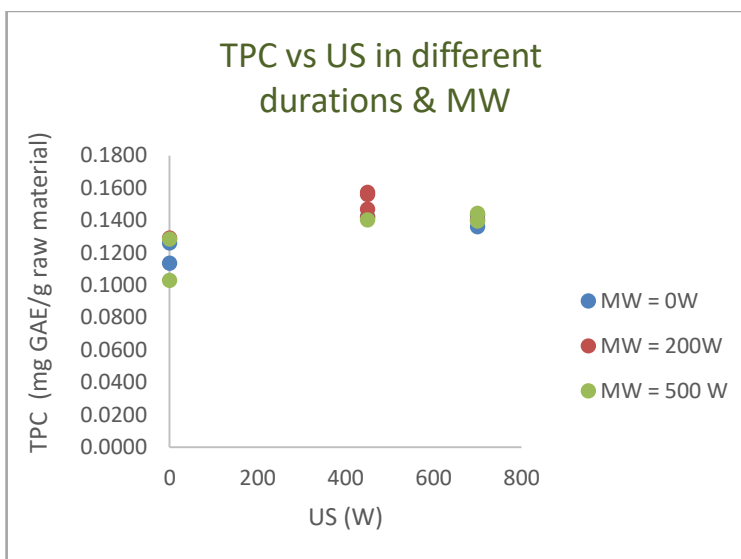
Ακολούθως, παρουσιάζονται ομαδοποιημένα τα παραπάνω αποτελέσματα, σε ξεχωριστά διαγράμματα για κάθε αρωματικό φυτό, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της κάθε μεταβλητής στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων.

4.1.1 Επίδραση των τριών μεταβλητών παραμέτρων εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για το βάσλαμο.

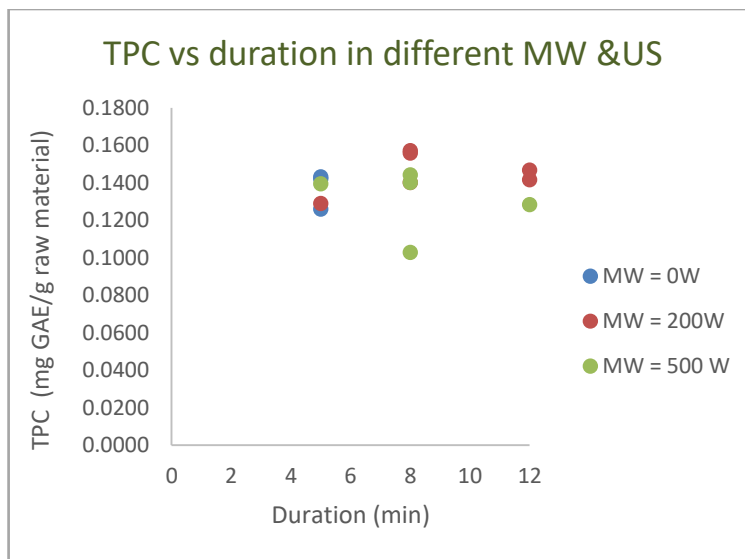
Στα Διαγράμματα 1, 2 και 3 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι σχέσεις των τριών κρίσιμων παραμέτρων της εκχύλισης (ένταση μικροκυματων, ένταση υπερήχων, διάρκεια εκχύλισης) και η επίδρασή τους στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC), για το αρωματικό φυτό βάσλαμο.



Διάγραμμα 1: Επίδραση της έντασης μικροκυμάτων (MW) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο



Διάγραμμα 2: Επίδραση της έντασης υπερήχων (US) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

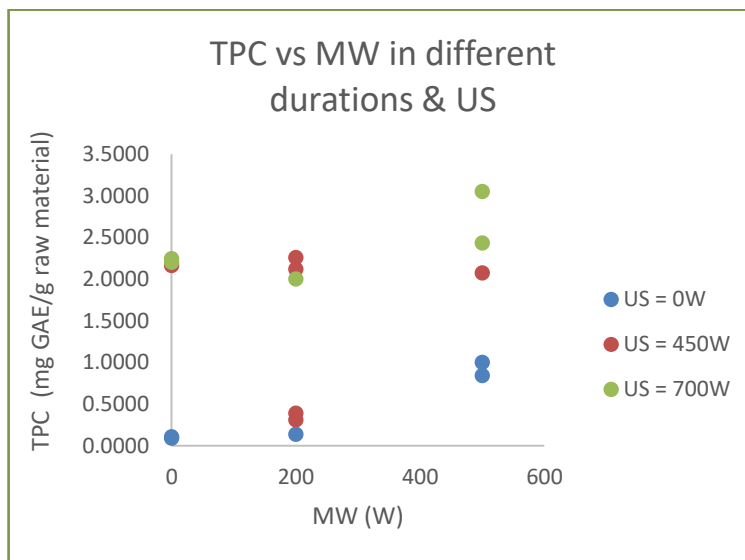


Διάγραμμα 3: Επίδραση της διάρκειας εκχύλισης (duration) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

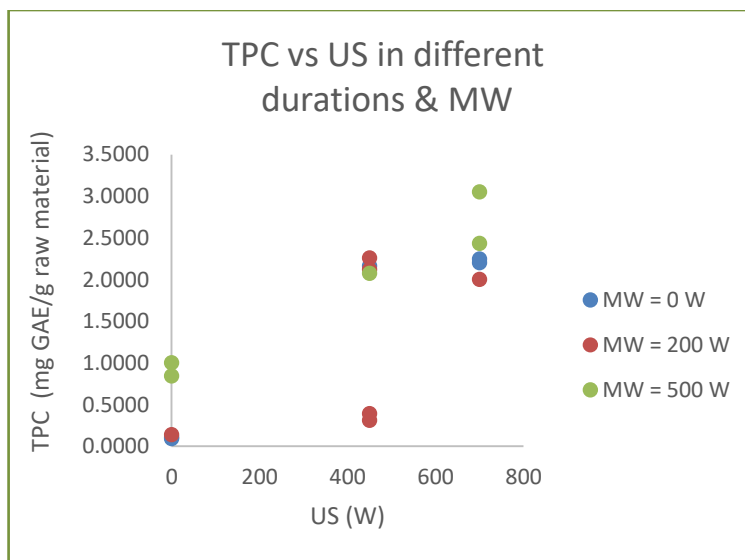
Παρατηρώντας το διάγραμμα 1 βλέπουμε ότι για σταθερή τιμή της έντασης υπερήχων (US) και σταθερό χρόνο διάρκειας της εκχύλισης, με αύξηση της έντασης μικροκυμάτων (MW) προκύπτουν εκχυλίσματα βαλσάμου με μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο. Αντίστοιχα, από το διάγραμμα 2 διαπιστώνεται ότι στα περισσότερα δείγματα, αυξάνοντας την ένταση των υπερήχων (US) και διατηρώντας σταθερές τις άλλες δύο παραμέτρους, προκύπτουν επίσης δείγματα με μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο. Συνδυαστικά όμως, από τα διαγράμματα 1 και 2, προκύπτει πως όταν εφαρμόζεται σε δείγμα βαλσάμου ταυτόχρονα υψηλή τιμή έντασης μικροκυμάτων (MW) και υπερήχων (US), προκύπτουν λιγότερο δραστικά δείγματα, συγκριτικά με τα δείγματα που προκύπτουν από διαφορετικούς συνδυασμούς εντάσεων MW-US (πχ. για MW=0, US=700W). Τελικώς, παρατηρώντας στο διάγραμμα 3 την επίδραση της διάρκειας εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, διαπιστώνεται ότι όσο αυξάνεται η διάρκεια της εκχύλισης, αναλογικά αυξάνεται και το TPC, μέχρι να φτάσει σε μια οριακή τιμή, η οποία όταν ξεπεραστεί η ποιότητα του εκχυλίσματος υποβαθμίζεται. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση που μελετάται, η οριακή τιμή της διάρκειας εκχύλισης είναι τα 8 min, και η περαιτέρω αύξησή της αρχίζει να δρα καταστροφικά για το δείγμα, επηρεάζοντας αρνητικά τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά (μείωση βιοδραστικού περιεχομένου). Συνεπώς από τα διαγράμματα 1, 2 και 3, καταλήγουμε πως το βέλτιστο και πιο δραστικό εκχύλισμα βαλσάμου (no7), προκύπτει με εφαρμογή ενδιάμεσων τιμών των τριών παραμέτρων εκχύλισης, οι οποίες είναι : MW=200W, US=450W, duration=8min.

4.1.2 Επίδραση των τριών μεταβλητών παραμέτρων εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για το χαμομήλι

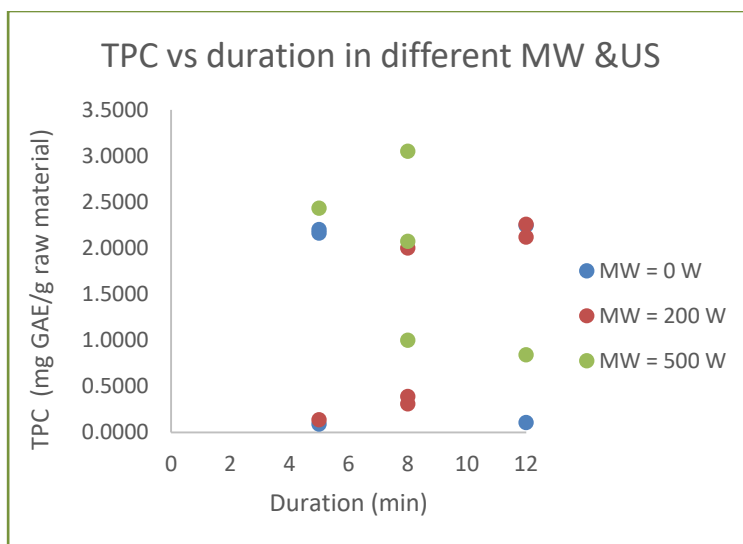
Παρομοίως, στα Διαγράμματα 4, 5 και 6 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι σχέσεις των τριών κρίσιμων παραμέτρων εκχύλισης (ένταση μικροκυμάτων, ένταση υπερήχων, διάρκεια εκχύλισης) και η επίδραση αυτών στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC), για το αρωματικό φυτό χαμομήλι.



Διάγραμμα 4: Επίδραση της έντασης μικροκυμάτων (MW) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο



Διάγραμμα 5: : Επίδραση της έντασης υπερήχων (US) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο



Διάγραμμα 6: Επίδραση της διάρκειας εκχύλισης (duration) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά του βαλσάμου, προέκυψαν και για τα εκχυλίσματα χαμομηλιού. Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα 4 παρατηρείται ότι για σταθερή τιμή της έντασης υπερήχων (US) και σταθερό χρόνο διάρκειας της εκχύλισης, η αύξηση της έντασης μικροκυμάτων (MW) οδηγεί σε δείγματα με υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο. Επιπλέον, από το διάγραμμα 5 διαπιστώνεται ότι αυξάνοντας την ένταση υπερήχων (US) όσο διατηρούνται σταθερές οι άλλες δύο παράμετροι (MW, duration), προκύπτουν ως επί το πλείστον δείγματα με μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο. Συμπερασματικά, η διάρκεια της εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων χαμομηλιού, έχει ακριβώς την ίδια επίδραση με αυτή στα εκχυλίσματα βαλσάμου όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Όμοια, διαπιστώνεται ότι όσο αυξάνεται η διάρκεια της εκχύλισης (duration) αυξάνεται η τιμή του TPC μέχρι ένα οριακό σημείο (8 min), μετά το οποίο η αύξηση της διάρκειας εκχύλισης αρχίζει να δρα καταστροφικά για το εκχύλισμα, υποβαθμίζοντας το βιοδραστικό του περιεχόμενο. Συνεπώς από τα διαγράμματα 4, 5 και 6 καταλήγουμε πως το βέλτιστο και πιο δραστικό εκχύλισμα χαμομηλιού (no27), προκύπτει με εφαρμογή υψηλών εντάσεων MW και US σε ενδιάμεση διάρκεια εκχύλισης, δηλαδή: MW=500W, US=700W, duration=8min).

4.2 Εγκλεισμός Βιοδραστικών Συστατικών με τη μέθοδο της Ηλεκτροστατικής Ινοποίησης

Η μελέτη εγκλεισμού των βέλτιστων αιθανολικών εκχυλισμάτων, βαλσάμου (no7) και χαμομηλιού (no27), προηγήθηκε της μελέτης εγκλεισμού των απομονωμένων δραστικών αιθέριων ελαίων και του μείγματός τους. Εφόσον τα εκχυλίσματα που προέκυψαν στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι αιθανολικά, επιλέχθηκε η μήτρα της ζεΐνης (20%w/w διαλυμένη σε μείγμα EtOH:H₂O - 90:10 v/v) για τον εγκλεισμό τους, η οποία είναι πολύ αποτελεσματική σε τέτοια διαλύματα και παράλληλα κατάλληλη για βρώση, μιας και τα παραγόμενα φιλμ προορίζονται για προσθήκη σε προμείγματα ζωοτροφών.

Προκειμένου να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός ογκομετρικής παροχής (των εκάστοτε ουσιών) και επιβαλλόμενης τάσης (βέλτιστες συνθήκες παραγωγής νανοϊνών/νανοσφαιριδίων), πραγματοποιήθηκε πληθώρα δοκιμών, αρχικά στις σκέτες μήτρες (ζεΐνη, WPI:pu1) και στη συνέχεια σε καθέναν από τους συνδυασμούς μήτρα – συστατικό που μελετήθηκαν (ζεΐνη – βέλτιστα εκχυλίσματα, WPI:pu1 – αιθέρια έλαια).

- **Ζεΐνη (Zein)**

Η αναζήτηση βέλτιστων συνθηκών εγκλεισμού ξεκίνησε δοκιμάζοντας διαλύματα ζεΐνης διαφορετικής συγκέντρωσης (10%, 20% και 30%) σε μείγμα EtOH:H₂O 90:10v/v. Την καλύτερη συμπεριφορά στα προκαταρκτικά πειράματα ηλεκτροστατικής ινοποίησης παρουσίασε το διάλυμα περιεκτικότητας 20%w/w, το οποίο και επιλέχθηκε ως μήτρα των βέλτιστων αιθανολικών εκχυλισμάτων για τη συνέχεια των πειραμάτων. Στα πειράματα αυτά, επιλέχθηκε και η τιμή της απόστασης του συλλέκτη από το ακροφύσιο στα 17cm, η οποία παρέμεινε σταθερή στα ακολουθούμενα πειράματα με τη συγκεκριμένη μήτρα.

Επομένως, για το αιθανολικό διάλυμα ζεΐνης συγκέντρωσης 20%, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για παραγωγή νανοϊνών με εύρος τιμών της επιβαλλόμενης τάσης 17 – 29 kV και εύρος τιμών ογκομετρικής παροχής 0.7 – 1.3 mL/h. Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν, συνοψίζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα ζεΐνης συγκέντρωσης 20%

Ζεΐνη (20% σε μείγμα EtOH:H ₂ O 90:10v/v)		
Τάση (kV)	Παροχή (mL/h)	Παρατήρηση
17	0.7	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
18	0.8	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
20	0.8	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
21	0.8	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.

22	0.8	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
23	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24.5	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
26 - 28	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
28.5 - 29	1.3	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.

Ο συνδυασμός παροχής-τάσης-απόστασης που επιλέχθηκε για το συγκεκριμένο δείγμα, ήταν 1mL/h – 27.5kV – 17cm , διότι αφενός παρουσίασε την καλύτερη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση και την ποιότητα του φιλμ των νανοϊνών, και αφετέρου διότι προτιμήθηκε η χαμηλότερη δυνατή τιμή τάσης που προσέφερε αυτή την απόδοση. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα που οδήγησαν στην επιλογή των βέλτιστων συνδυασμών παραμέτρων εγκλεισμού για όλα τα δείγματα. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα βαλσάμου και χαμομηλιού, το εύρος συνθηκών που δοκιμάστηκε ήταν μικρότερο λόγω της πρωτύτερης επιλογής συνθηκών του σκέτου διαλύματος της μήτρας. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και στα δείγματα της υδατικής μήτρας πρωτεΐνης ορού γάλακτος : πουλλουλάνης που παρατείθενται στη συνέχεια.

- **Ζεΐνη – βέλτιστο εκχύλισμα βαλσάμου (no7)**

Πίνακας 11: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα ζεΐν 20%w/w σε μείγμα no7:H₂O - 90:10 v/v

Ζεΐνη 20%w/w σε μείγμα no7:H ₂ O - 90:10 v/v		
Τάση (kV)	Παροχή (mL/h)	Παρατήρηση
23	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24,5	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
27.5	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
28.5 - 29	1.3	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.

- **Ζεΐνη – βέλτιστο εκχύλισμα χαμομηλιού**

Πίνακας 12: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα ζεΐν 20%w/w σε μείγμα no27:H₂O - 90:10 v/v

Ζεΐνη 20%w/w σε μείγμα no27:H ₂ O - 90:10 v/v		
Τάση (kV)	Παροχή (mL/h)	Παρατήρηση
26	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
27.5	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
28.5 - 29	1.3	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.

- **Πρωτεΐνη ορού γάλακτος : πουλλουλάνη (WPI:puI)**

Η επιλογή της συγκέντρωσης του υδατικού διαλύματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος: πουλλουλάνης (WPI: puI) έγινε μετά από ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα κατά τα οποία απορρίφθηκαν κάποιες άλλες αναλογίες (20:80, 40:60, 50:50w/w), σε σταθερή συνολική συγκέντρωση πολυμερούς 20%w/w.

Την καλύτερη συμπεριφορά στα προκαταρκτικά πειράματα ηλεκτροστατικής ινοποίησης παρουσίασε το διάλυμα περιεκτικότητας WPI:puI (30:70)w/w, το οποίο και επιλέχθηκε ως μήτρα εγκλεισμού των απομονωμένων ελαίων και του μείγματός τους στα υπόλοιπα πειράματα. Επιπλέον, επιλέχθηκε και διατηρήθηκε σταθερή στη συνέχεια, η τιμή των 18cm, ως απόσταση του συλλέκτη από το ακροφύσιο.

Η διαφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση των δειγμάτων που εγκλείστηκαν στην υδατική μήτρα WPI:puI (30:70)w/w, είναι ότι το βιοδραστικό συστατικό και το διάλυμα της μήτρας, διοχετεύονταν από διαφορετικές σύριγγες, με διαφορετικές ομοαξονικές παροχές (LIQ 1, LIQ 2). Είναι φανερό πως η εύρεση των ιδανικών συνθηκών εγκλεισμού για αυτή τη σειρά πειραμάτων ήταν πιο απαιτητική και χρονοβόρα. Αρχικά διεξήχθησαν πειράματα που αφορούσαν το σκέτο διάλυμα μήτρας WPI:puI, και την επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων του (παροχής-τάσης). Στη συνέχεια, κρατώντας περίπου σταθερές τις τιμές αυτές, ρυθμίστηκε η παροχή του βιοδραστικού συστατικού σε κάθε πείραμα, με βάση την επιθυμητή συγκέντρωση αυτού στις παραγόμενες νανοΐνες.

Έτσι, για το υδατικό διάλυμα WPI:puI (30:70)w/w, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για παραγωγή νανοϊνών με εύρος τιμών της επιβαλλόμενης τάσης 17 – 29 kV και εύρος τιμών ογκομετρικής παροχής 0.5 – 1.8 mL/h. Στους παρακάτω πίνακες 13 – 18, καταγράφονται δύο ογκομετρικές παροχές, στο LIQ 1 αντιστοιχούν οι τιμές του βιοδραστικού συστατικού κάθε πειράματος, και στο LIQ 2 παρουσιάζονται οι τιμές παροχής της μήτρας (LIQ 1: βιοδραστικό συστατικό, LIQ 2: μήτρα εγκλεισμού).

Πίνακας 13: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:puI συγκέντρωσης (30:70)%

WPI:puI (30:70)w/w, 20% total polymer content		
Τάση (kV)	Παροχή (mL/h)	Παρατήρηση
17-21	0.5	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
17-21	0.7	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
17-21	0.8	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
17-21	0.9	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα.
21	0.9	Μη καλοσηματισμένος κώνος Taylor.
21	1.1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
22	1.1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24	1.3	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
25	1.3	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
25	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
27	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
27.5 - 29	1.8	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, μη σταθερή διάρκεια έγχυσης.

- Πρωτεΐνη ορού γάλακτος : πουλλουάνη (WPI:pul) – αιθέριο έλαιο χαμομηλιού

Πίνακας 14: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – chamomile EO

WPI:pul (30:70)w/w – chamomile EO			
Τάση (kV)	Παροχή LIQ 1 (mL/h)	Παροχή LIQ 2 (mL/h)	Παρατήρηση
23	0.1	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24.5	0.1	1.2	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
25	0.1	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
27.5 – 29	0.2	1.5	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα

- Πρωτεΐνη ορού γάλακτος : πουλλουάνη (WPI:pul) – αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου

Πίνακας 15: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w –rosemary EO

WPI:pul (30:70)w/w – rosemary EO			
Τάση (kV)	Παροχή LIQ 1 (mL/h)	Παροχή LIQ 2 (mL/h)	Παρατήρηση
23	0.1	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24.5	0.1	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
25	0.1	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
27.5 - 29	0.2	1.5	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα

- Πρωτεΐνη ορού γάλακτος : πουλλουλάνη (WPI:pul) – αιθέριο έλαιο ρίγανης

Πίνακας 16: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – oregano EO

WPI:pul (30:70)w/w – oregano EO			
Τάση (kV)	Παροχή LIQ 1 (mL/h)	Παροχή LIQ 2 (mL/h)	Παρατήρηση
23	0.1	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24.5	0.1	1.2	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
25	0.1	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
27.5 - 29	0.2	1.5	Κώνος Taylor χωρίς σταθερότητα στην έγχυση.

- Πρωτεΐνη ορού γάλακτος : πουλλουλάνη (WPI:pul) – αιθέριο έλαιο βαλσάμου

Πίνακας 17: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – hypericum EO

WPI:pul (30:70)w/w – hypericum EO			
Τάση (kV)	Παροχή LIQ 1 (mL/h)	Παροχή LIQ 2 (mL/h)	Παρατήρηση
23	0.1	1	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24.5	0.1	1.2	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
25	0.1	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
27.5 - 29	0.2	1.8	Μη αποδεκτό αποτέλεσμα

- Πρωτεΐνη ορού γάλακτος : πουλλουλάνη (WPI:pul) – μείγμα αιθέριων ελαίων

Πίνακας 18: Δοκιμές επιβαλλόμενης τάσης και παροχής για το διάλυμα WPI:pul 30:70w/w – oil mix

WPI:pul (30:70)w/w – oil mix			
Τάση (kV)	Παροχή LIQ 1 (mL/h)	Παροχή LIQ 2 (mL/h)	Παρατήρηση
23	0.1	0.8	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor, χωρίς διάρκεια στην έγχυση.
24.5	0.1	1.2	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
25	0.1	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor και ικανοποιητική διάρκεια έγχυσης.
27.5 - 29	0.2	1.5	Καλοσηματισμένος κώνος Taylor

Τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα, που προέκυψαν από όλους τους συνδυασμούς παραμέτρων, για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, συνοψίζονται στους παραπάνω Πίνακες 13 – 18. Από τις διάφορες τιμές ογκομετρικής παροχής και επιβαλλόμενης τάσης, οι συνδυασμοί που τελικά επιλέχθηκαν λόγω της καλύτερης συμπεριφοράς που παρουσίασαν στη συμπλοκοποίηση με τις ουσίες εγκλεισμού, παρουσιάζονται στον συγκεντρωτικό πίνακα 19, όπου LIQ 1: βιοδραστικό συστατικό, LIQ 2: μήτρα εγκλεισμού. Οι επιλογές αυτές της παροχής και της επιβαλλόμενης τάσης, επιβεβαιώθηκαν φυσικά και μετά από έλεγχο των φαινομενικά ιδανικών δομών στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης – SEM (4.3.1).

Πίνακας 19: Συνθήκες επιβαλλόμενης τάσης, παροχής και απόστασης που εφαρμόστηκαν στην ηλεκτροστατική ινοποίηση

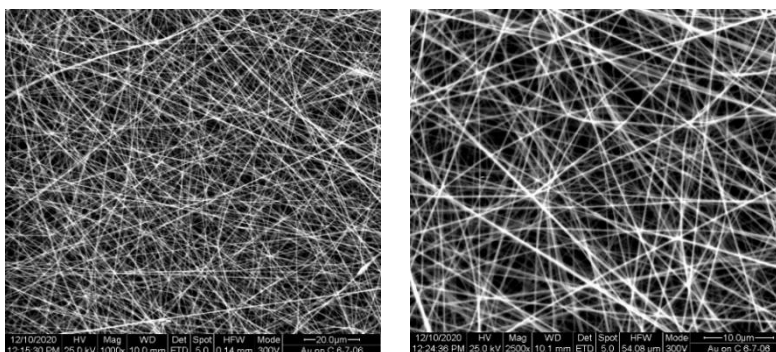
Δείγμα	Παροχή (mL/h)		Τάση (kV)	Απόσταση (cm)
Ζεΐνη (zein)	1		27.5	17
Zein – no7	1		27.5	17
Zein – no27	1		27.5	17
	LIQ 1	LIQ 2		
WPI-pul (30:70w/w)	0.1	1.5	25	18
WPI-pul – chamomile EO	0.1	1.5	25	18
WPI-pul – rosemary EO	0.1	1.5	25	18
WPI-pul – oregano EO	0.1	1.5	25	18
WPI-pul – hypericum EO	0.1	1.5	25	18
WPI-pul – oil mix	0.1	1.5	25	18

4.3 Χαρακτηρισμός Νανοϊνών

4.3.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης – Scanning Electron Microscopy (SEM)

Στις Εικόνες 18-24, παρουσιάζεται η μορφολογία των νανοϊνών, που προέκυψαν για καθένα από τα δείγματα που εγκλείστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και μελετήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM).

- **Εγκλεισμός σκέτης μήτρας WPI:pul (30:70)%w/w**



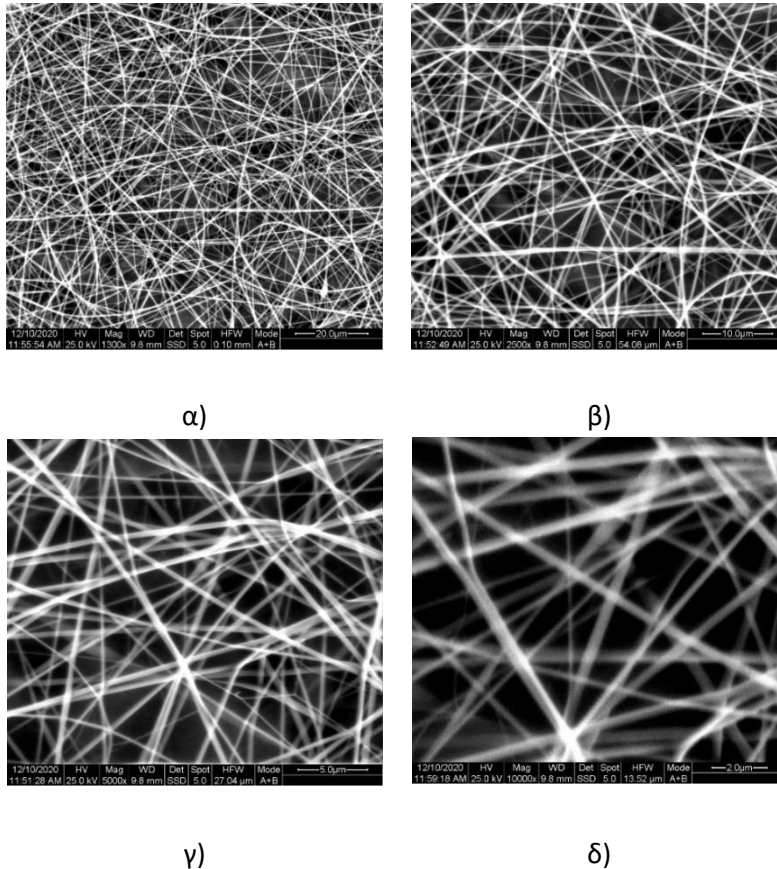
α)

β)

Εικόνα 18: Εικόνες από SEM για Νανοΐνες σκέτης μήτρας wpi:pul με επιβαλλόμενη τάση 25 kV και παροχή 1,5 mL/h σε κλίμακα α)20μm και β)10μm

Οι νανοϊνες που σχηματίστηκαν από την ηλεκτροστατική ινοποίηση του σκέτου διαλύματος της υδατικής μήτρας WPI:pul(30:70)%w/w, που χαρακτηρίζονται από τυχαίο προσανατολισμό, είναι συμπαγείς, ομοιόμορφες, και απαλλαγμένες από συσσωματώματα και σφαιρικούς σχηματισμούς-αστοχίες (beads). Επιπλέον, παρατηρούνται πως οι ίνες είναι ελαφρώς μικρότερης διαμέτρου από αυτές που παρουσιάζονται στις επόμενες εικόνες, γεγονός που οφείλεται στην απουσία συγκέντρωσης βιοδραστικών ελαίων στο δείγμα.

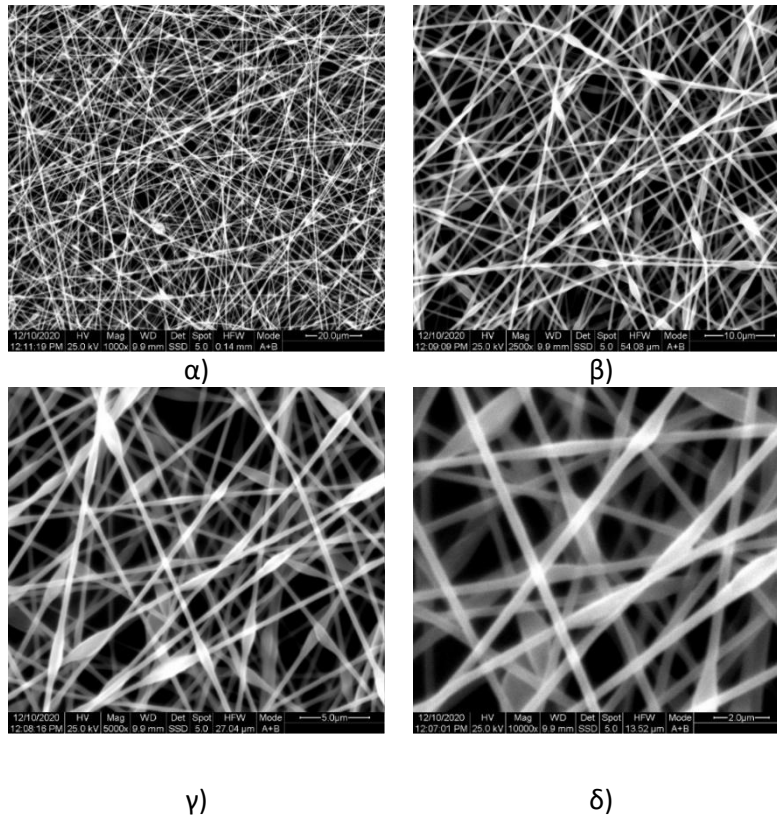
- **Εγκλεισμός μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μήτρα WPI:pul (30:70)%w/w**



Εικόνα 19: Εικόνες από SEM για νανοϊνες mix oil-WPI:pul με παροχές 0.1 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm

Όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες, τα αποτελέσματα του εγκλεισμού του μείγματος των αιθέριων ελαίων (oil mix) στην υδατική μήτρα WPI:pul (30:70)%w/w, μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning/electrospraying) είναι πολύ ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, οι νανοϊνες που παρήχθησαν χαρακτηρίζονται από τυχαίο προσανατολισμό, ομοιομορφία, καλή διασπορά των συστατικών, και απαλλαγμένες από συσσωματώματα και σφαιρικούς σχηματισμούς-αστοχίες (beads).

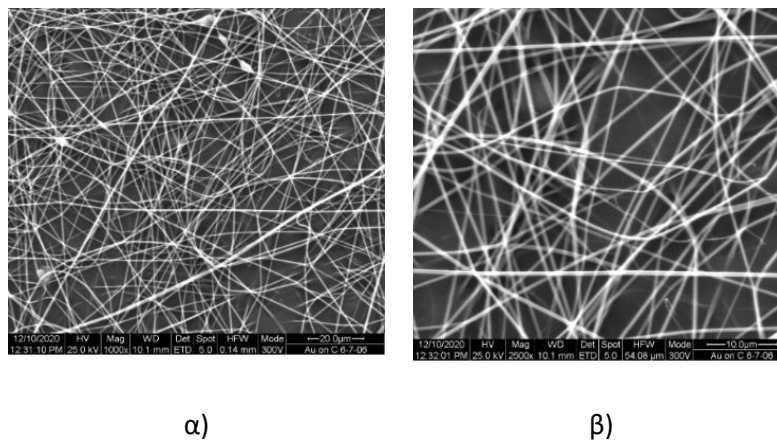
- **Εγκλεισμός αιθέριου ελαίου βαλσάμου σε μήτρα WPI:ριυι (30:70)%w/w**

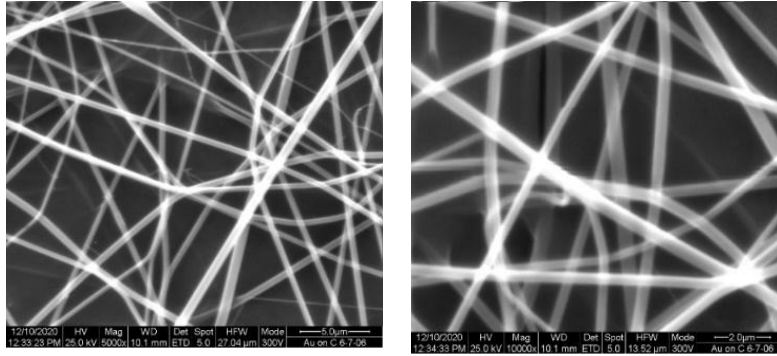


Εικόνα 20: Εικόνες από SEM για Νανοΐνες ελαίου βαλσάμου-WPI:ριυι με παροχές 0.1 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm

Παρομοίως, οι ίνες που σχηματίστηκαν από τον εγκλεισμό του αιθέριου ελαίου βαλσάμου στην υδατική μήτρα WPI:ριυι (30:70)%w/w, εμφανίζουν πλέγμα αντίστοιχο του δείγματος μίχ ελαίων, αλλά με περισσότερους σφαιρικούς σχηματισμούς, που οφείλονται στο μεγαλύτερο ιξώδες και την επιφανειακή τάση του συγκεκριμένου συστατικού.

- **Εγκλεισμός αιθέριου ελαίου χαμομηλιού σε μήτρα WPI:ριυι (30:70)%w/w**





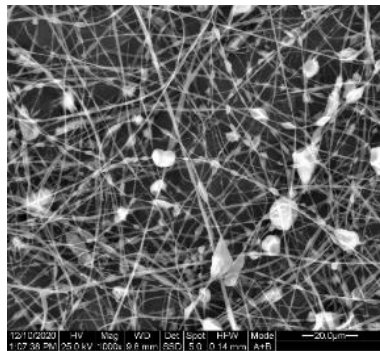
γ)

δ)

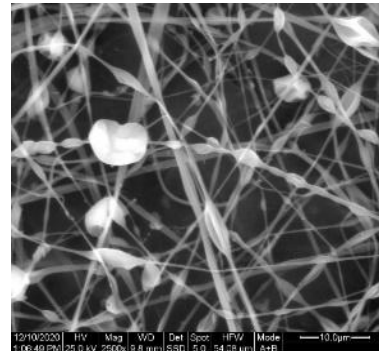
Εικόνα 21: Εικόνες από SEM για Νανοϊνες ελαίου χαμομηλιού-WPI:ριυ με παροχές 0.1 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm

Ο εγκλεισμός των εμπορικών αιθέριων ελαίων (χαμομήλι, δενδρολίβανο, ρίγανη) στην υδατική μήτρα WPI:ριυ (30:70)%w/w, παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα στα συγκεκριμένα δείγματα. Ενδεικτικά, επιλέχθηκε να παρουσιαστούν οι ίνες που δημιουργήθηκαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης για το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού, οι οποίες είναι ομοιόμορφες, με καλή διασπορά, σχηματίζοντας ένα πυκνό πλέγμα που παρουσιάζει λιγότερους σφαιρικούς σχηματισμούς συγκριτικά με το φιλμ που σχημάτισε το δείγμα ελαίου βαλσάμου-WPI:ριυ.

- **Εγκλεισμός σκέτης μήτρας ζεΐνης 20%w/w**



α)

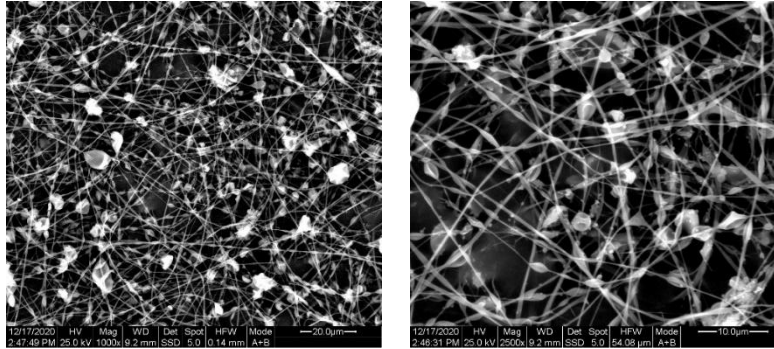


β)

Εικόνα 22 : Εικόνες από SEM για Νανοϊνες σκέτης μήτρας ζεΐνης με επιβαλλόμενη τάση 27.5 kV και παροχή 1 mL/h σε κλίμακα α)20μm και β)10μm

Όσον αφορά την ηλεκτροστατική ινοποίηση που πραγματοποιήθηκε στο διάλυμα της μήτρας ζεΐνης 20%w/w σε μείγμα EtOH:H₂O (90:10), παρατηρούμε ότι οι ίνες είναι τυχαία προσανατολισμένες, με αρκετούς σφαιρικούς σχηματισμούς. Επιπλέον, παρατηρείται πως οι ίνες είναι ελαφρώς μικρότερης διαμέτρου από αυτές που προέκυψαν από τον εγκλεισμό των εκχυλισμάτων, γεγονός που οφείλεται στην απουσία δραστικής ουσίας από το δείγμα.

- **Εγκλεισμός δείγματος no7 σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w**



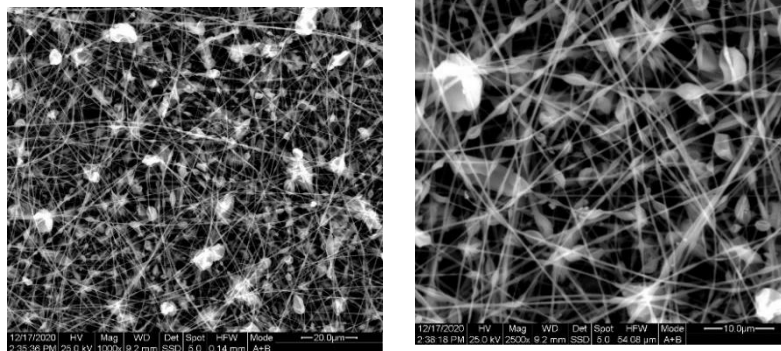
α)

β)

Εικόνα 23 : Εικόνες από SEM για Νανοΐνες του δείγματος no7 σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w με παροχή 1 mL/h και επιβαλλόμενη τάση 27.5 kV σε κλίμακα α) 20μm και β)10μm

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον εγκλεισμό του βέλτιστου εκχυλίσματος βαλσάμου (no7), σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w διαλυμένη σε μείγμα EtOH:H₂O (90:10), διαπιστώνεται πως δεν είναι τόσο ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται πολλά συσσωματώματα και σφαιρικοί σχηματισμοί (beads), γεγονός που καθιστούν το δείγμα λιγότερο επιθυμητό συγκριτικά με τα εγκλεισμένα έλαια σε μήτρα WPI:ru1.

- **Εγκλεισμός δείγματος no27 σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w**



α)

β)

Εικόνα 24: Εικόνες από SEM για νανοΐνες του δείγματος no27 σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w με παροχή 1 mL/h και επιβαλλόμενη τάση 27.5 kV σε κλίμακα α) 20μm και β)10μm

Αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά του δείγματος no7, παρουσιάζονται και για το εκχύλισμα χαμομηλιού no27 που επιλέχθηκε για εγκλεισμό σε μήτρα ζεΐνης 20%w/w διαλυμένη σε μείγμα EtOH:H₂O (90:10). Παρόμοια εμφανίζονται πολλά συσσωματώματα, αστοχίες και σφαιρικοί σχηματισμοί (beads), που μπορεί να οφείλονται είτε στις παραμέτρους που εφαρμόστηκαν τελικά είτε ακόμα και σε λανθασμένη επιλογή της μήτρας.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τον εγκλεισμό των εκχυλισμάτων σε μήτρα ζεΐνης μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, Εικόνες 23 και 24, παρατηρείται ότι τα φιλμ που δημιουργήθηκαν αποτελούνται από ίνες με πολλούς σφαιρικούς σχηματισμούς, τα οποία δεν αποτελούν την επιθυμητή δομή λόγω ανομοιομορφίας, επομένως πρέπει να διερευνηθούν και άλλες μήτρες με δυνητικά καλύτερα αποτελέσματα. Αντιθέτως, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον εγκλεισμό των αιθέριων ελαίων σε υδατική μήτρα WPI:pu1, Εικόνες 18-21, ήταν πολύ ικανοποιητικά. Συνολικά, από την σύγκριση των αποτελεσμάτων του SEM προκύπτει πως το μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μήτρα WPI:pu1 (Εικόνα 19) αντιστοιχεί στο βέλτιστο εγκλεισμένο δείγμα με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, το οποίο και επιλέχθηκε να εγκλειστεί στη συνέχεια με τις μεθόδους spray-drying και freeze-drying, προκειμένου να ενσωματωθεί τελικώς ως πρόσθετο για την παραγωγή πέλλετ ζωοτροφής.

4.3.2 Ποσοστό Εγκλεισμού

Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού εκχυλισμάτων no7 και no27

Για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλεισμού των δειγμάτων no7 και no27 σε μήτρα ζεΐνης, μετρήθηκαν τα ολικά φαινολικά των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, πριν και μετά τον εγκλεισμό με ηλεκτροστατική ινοποίηση.

Από τη φωτομέτρηση των δειγμάτων, προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού εκχυλισμάτων no7 και no27

Δείγμα (no)	TPC (mg GAE/g εκχυλ.) πριν	TPC (mg GAE/g εκχυλ.) μετά	Ποσοστό Εγκλεισμού
7	43.3023	9.5995	23%
27	62.7430	16.9406	27%

Το ποσοστό εγκλεισμού των εκχυλισμάτων no7 και no27, υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση.

$$\text{Ποσοστό εγκλεισμού (\%)} = \frac{\text{mg GAE εγκλεισμένης ουσίας}}{\text{mg GAE στο αρχικό εκχύλισμα (πριν τον εγκλεισμό)}} \%$$

Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού αιθέριων ελαίων

Για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στη πολυμερική μήτρα WPI:pu1, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ώστε να εξακριβωθεί η ακριβής ποσότητα ουσίας εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης, που έχει φτάσει στον μεταλλικό στόχο μετά το πέρας της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Μετά από φωτομέτρηση με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, προέκυψαν για κάθε εγκλεισμένο δείγμα ξεχωριστά, τα αποτελέσματα του Πίνακα 21.

Πίνακας 21: Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού αιθέριων ελαίων

Δείγμα	Εγκλεισμένη ουσία (mg GAE/mL ουσίας)	Μη εγκλεισμένη ουσία (mg GAE/mL ουσίας)	Ποσοστό Εγκλεισμού
Hypericum EO	0.7505	0.5540	58%
Chamomile EO	0.6807	0.4519	60%
Rosemary EO	0.3046	0.1365	69%
Oregano EO	8.5212	4.7983	64%
oil mix	13.6660	5.0310	73%

Το ποσοστό εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων, υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση.

$$\text{Ποσοστό εγκλεισμού (\%)} = \frac{\text{mg GAE εγκλεισμένης ουσίας}}{\text{mg GAE συνολικής ουσίας(εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης)}} \%$$

Από τα παραπάνω, παρατηρείται ότι τα ποσοστά εγκλεισμού των εκχυλισμάτων βαλσάμου και χαμομηλιού no7 και no27 αντίστοιχα σε μήτρα ζεΐνης είναι σημαντικά μικρότερα από τα ποσοστά εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων σε υδατική μήτρα WPI:pu1. Εν συνεχεία, από τα αποτελέσματα του πίνακα 21, διαπιστώνεται ότι καλύτερο ποσοστό εγκλεισμού με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης για τα δείγματα των αιθέριων ελαίων αλλά και συνολικά για τα δείγματα που εγκλείστηκαν παρουσιάζει το μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix).

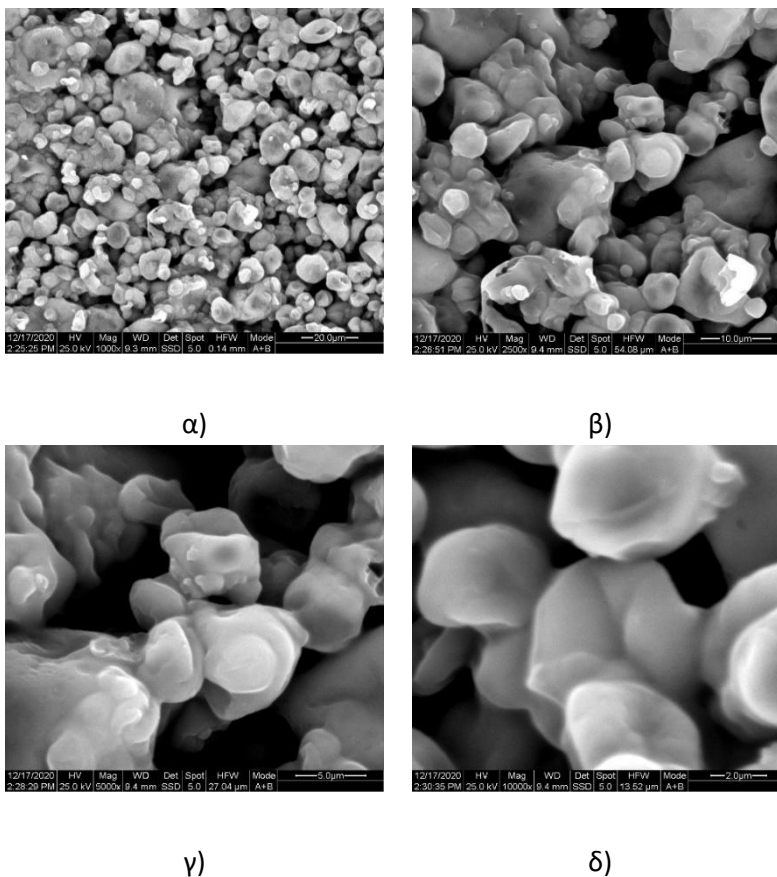
4.4 Χαρακτηρισμός Βέλτιστου Δείγματος (oil mix)

Από τον παραπάνω χαρακτηρισμό των ναοϊνών, που προέκυψαν με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, διαπιστώθηκε με βάση την δομή των ναοϊνών του και το ποσοστό εγκλεισμού του πως το μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) αντιστοιχεί στο βέλτιστο εγκλεισμένο δείγμα. Εν συνεχεία, το μείγμα αιθέριων ελαίων οδηγήθηκε για εγκλεισμό με τις μεθόδους spray-drying και freeze-drying, προκειμένου να παραληφθεί μεγάλη ποσότητα εγκλεισμένου μείγματος ελαίων και να ενσωματωθεί τελικώς ως πρόσθετο για την παραγωγή πέλλετ ζωτροφής.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δύο εγκλεισμένα δείγματα μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) που προέκυψαν από τον εγκλεισμό τους με ξήρανση με εκνέφωση και ξήρανση υπό κατάψυξη.

4.4.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης – Scanning Electron Microscopy (SEM)

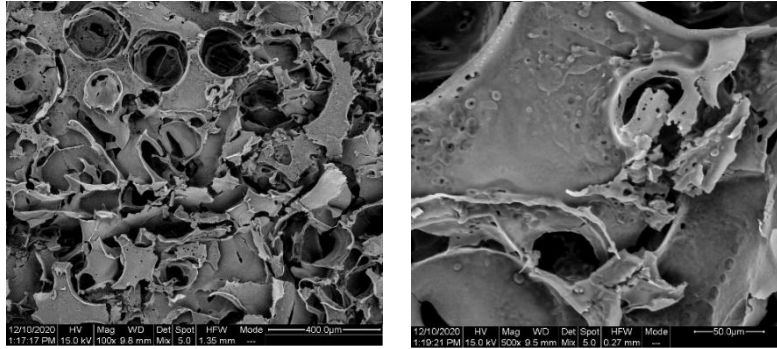
- Spray-drying mix ελαίων – WPI:pul (80:20) %w/w



Εικόνα 25: Εικόνες από SEM για σκόνη μείγματος ελαίων (oil mix) σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm, γ) 5μm και δ) 2μm

Όπως παρατηρείται, τα προϊόντα εγκλεισμού που λήφθηκαν από την ξήρανση με εκνέφωση (spray drying), αποτελούνται από δομές που προσομοιάζουν το σχήμα των κόκκων, με καλή διασπορά, και απουσία ρωγμών στα σωματίδια. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον επιτυχημένο εγκλεισμό των ενώσεων στόχων, εφόσον δεν μπορεί να διαχυθεί το συστατικό από το εσωτερικό της εγκλεισμένης δομής στην επιφάνειά του.

- Freeze-drying mix ελαίων – WPI:pul (80:20) %w/w



α)

β)

Εικόνα 26 : Εικόνες από SEM για σκόνη μείγματος ελαίων (oil mix) σε κλίμακα α) 20μm και β)10μm

Παρατηρώντας την εικόνα 26 διαπιστώνεται, ότι οι εγκλεισμένες δομές που προκύπτουν από την ξήρανση υπό κατάψυξη χαρακτηρίζονται από ακανόνιστο σχήμα με πορώδη δομή, χαμηλή πυκνότητα και μειωμένη συρρίκνωση με μέγεθος σωματιδίων της τάξης των μερικών μικρομέτρων. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από μια υαλώδη και σπογγώδη δομή παρουσία ρωγμών ή και εσοχών (βαθουλωμάτων) στην επιφάνεια των λυοφιλιωμένων σωματιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη βιβλιογραφίες σχετικά με τη δομή ναοίνων που προκύπτουν με τη μέθοδο του freeze drying διαπιστώνεται, ότι τα αποτελέσματα που παραλήφθηκαν από το SEM για την εγκλεισμένη σκόνη mix ελαίων με freeze drying είναι πολύ ικανοποιητικά.[79]

4.4.2 Ποσοστό εγκλεισμού

Για τα δύο δείγματα σκόνης ελαίων (oil mix) που προέκυψαν από τις μεθόδους spray-drying και freeze-drying μελετήθηκε το ποσοστό εγκλεισμού τους. Αρχικά υπολογίστηκε για το μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) το ολικό φαινολικό του περιεχόμενο (TPC) πριν εγκλειστεί και προέκυψε ίσο με **199.252 mgGAE/g μήτρας**. Στη συνέχεια, μετρήθηκε αντίστοιχα το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) των δύο εγκλεισμένων δειγμάτων σκόνης μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) και προέκυψαν οι παρακάτω τιμές για κάθε μέθοδο εγκλεισμού ξεχωριστά.

TPC για εγκλεισμένο μείγμα αιθ. ελαίων (oil mix) με spray drying: **21.277 mgGAE/g μήτρας**

TPC για εγκλεισμένο μείγμα αιθ. ελαίων (oil mix) με freeze drying: **58.634 mgGAE/g μήτρας**

Το ποσοστό εγκλεισμού για τα εγκλεισμένα δείγματα υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο.

$$\text{Ποσοστό εγκλεισμού (\%)} = \frac{\text{mg GAE (μετά τον εγκλεισμό)}}{\text{mg GAE (πριν τον εγκλεισμό)}} \%$$

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δύο εγκλεισμένα δείγματα mix αιθέριων ελαίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 22:

Πίνακας 22: Ποσοστό εγκλεισμού μείγματος αιθέριων ελαίων με spray drying και freeze drying

Εγκλεισμένο δείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix)	Ποσοστό εγκλεισμού
Με ξήρανση με εκνέφωση (Spray-drying)	29.43%
Με ξήρανση υπό κατάψυξη (Freeze drying)	10.68%

Από τον χαρακτηρισμό των εγκλεισμένων δειγμάτων μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) με τις μεθόδους ξήρανση με εκνέφωση και ξήρανση υπό κατάψυξη προέκυψαν παραπλήσια αποτελέσματα και για τις δύο μεθόδους εγκλεισμού. Παρόλα αυτά παρατηρείται πως το δείγμα εγκλεισμένης σκόνης μείγματος αιθέριων ελαίων με τη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying) εμφανίζει πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα με μεγαλύτερο ποσοστό εγκλεισμού (29.43%) συγκριτικά με τη μέθοδο του freeze drying.

4.5 Χαρακτηρισμός τελικού προϊόντος - πέλλετ ζωοτροφών

Στη συνέχεια, αφού ενσωματώθηκαν σε προμείγματα συγκεκριμένων προδιαγραφών, τα δείγματα (A,B) που περιείχαν εγκλεισμένη σκόνη μείγματος ελαίων (oil mix), καθώς και το δείγμα που περιείχε το μη εγκλεισμένο oil mix (C), οδηγήθηκαν στη συσκευή του εκβολέα για παραγωγή των πέλλετ, που αποτελούν και το τελικό στάδιο της συνολικής διεργασίας παραγωγής της ζωοτροφής.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εκβολή των δειγμάτων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 23).

Πίνακας 23: Απώλεια βιοδραστικής ουσίας των δειγμάτων κατά την διαδικασία της εκβολής

Δείγματα	Απώλεια βιοδραστικής ουσίας (%)
A	31.66%
B	34.42%
C	57.52%

Συνεπώς, παρατηρώντας τον πίνακα 23 διαπιστώνεται ότι τα δείγματα A και B που αποτελούνται από μείγμα άλευρου και εγκλεισμένου μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) εμφανίζουν λιγότερη απώλεια βιοδραστικών ουσιών μετά την διαδικασία της εκβολής, συγκριτικά με το δείγμα C που περιέχει μείγμα άλευρου με μη εγκλεισμένο oil mix. Επομένως, γίνεται φανερό πως ο εγκλεισμός των δειγμάτων που οδηγήθηκαν για εκβολή και παραγωγή πέλλετ ζωοτροφής, συνέβαλε στην διατήρηση της βιοδιαθεσιμότητας του τελικού προϊόντος, καθώς προέκυψαν δείγματα με μικρότερη απώλεια βιοδραστικής ουσίας συγκριτικά με το μη εγκλεισμένο δείγμα που οδηγήθηκε για εκβολή.

Το δείγμα D που αποτελεί τη σκέτη βάση αλεύρων (βάση προμείγματος) οδηγήθηκε και αυτό στη συσκευή του εκβολέα, και χαρακτηρίστηκε ως προς το ολικό φαινολικό του περιεχόμενο πριν και μετά την εκβολή, με την τεχνική που αναφέρθηκε προηγουμένως (3.2.7), για να επαληθεύσει τη βιβλιογραφική του τιμή η οποία ήταν μηδενική. Δηλαδή, το συγκεκριμένο δείγμα εφόσον δεν περιείχε

καθόλου βιοδραστικά συστατικά, δεν παρουσίασε και αντίστοιχη απώλεια αυτών στην εκβολή, διότι εξ'αρχής το ολικό φαινολικό του περιεχόμενο που μετρήθηκε ήταν μηδενικό.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τα δείγματα A (μείγμα άλευρου και εγκλεισμένου oil mix που προέκυψε με spray drying) και B (μείγμα άλευρου και εγκλεισμένου oil mix που προέκυψε με freeze drying), διαπιστώνεται πως ο εγκλεισμός με τη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση ήταν πιο αποδοτικός από αυτόν της ξήρανσης με κατάψυξη, εξασφαλίζοντας την διατήρηση του βιοδραστικού περιεχομένου στο τελικό προϊόν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον στον τομέα της παραγωγής ζωοτροφών και κατ'επέκταση στον κλάδο της κτηνοτροφικής βιομηχανίας, έγκειται στην ανάπτυξη ολοένα και περισσότερο καινοτόμων προϊόντων. Συγκεκριμένα, μελετάται η ελαχιστοποίηση της χρήσης αντιβιοτικών και ορμονών στα ζώα, μέσω της παραγωγής ζωοτροφών εμπλουτισμένων με βιοδραστικά συστατικά φυτικής προέλευσης, με αντιβιοτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Συνεπώς, στην παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης των ωφελειών της βιολογικής δράσης ολικών αιθανολικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών καθώς και αιθέριων ελαίων, από επιλεγμένα βότανα με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μετέπειτα στην ανάπτυξη καινοτόμων λειτουργικών ζωοτροφών με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα αρωματικά φυτά βάλσαμο (*hypericum perforatum*) και χαμομήλι (*matricaria chamomilla*), τα οποία αφού ανακτήθηκαν μέσω καινοτόμων, φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών εκχύλισης (εκχύλιση παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων – UMAE), χαρακτηρίστηκαν ως προς τα βιοδραστικά τους συστατικά. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αριστοποίηση των συνθηκών της UMAE για κάθε αρωματικό φυτό. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν τεχνικές ενθυλάκωσης (ηλεκτροστατική ινοποίηση, ξήρανση με εκνέφωση, ξήρανση υπό κατάψυξη) στα επιλεγμένα βιοδραστικά εκχυλίσματα, καθώς και σε εμπορικά αιθέρια έλαια από βιβλιογραφικά επιλεγμένα βότανα με υψηλό βιοδραστικό περιεχόμενο (βάλσαμο, χαμομήλι, δενδρολίβανο, ρίγανη, και μείγμα αυτών). Ακολούθως, το εγκλεισμένο μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix), το οποίο και εμφάνισε τα βέλτιστα αποτελέσματα συγκριτικά με όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετο ύλης για την παραγωγή ζωοτροφών με τη μέθοδο της φυγοκεντρικής εκβολής. Ερευνήθηκαν περαιτέρω και τυχόν μεταβολές στο βιοδραστικό περιεχόμενο των τελικών προϊόντων σε σχέση με αυτό των δειγμάτων πριν τη διεργασία της εκβολής.

Από την εφαρμογή και τη **μελέτη των σύγχρονων, πράσινων τεχνολογιών εκχύλισης (εκχύλιση παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων – UMAE)** για την ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών από τα αρωματικά φυτά βάλσαμο και χαμομήλι, προέκυψαν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Τα εκχυλίσματα βαλσάμου και χαμομηλιού προέκυψαν με εφαρμογή της εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE) και χρησιμοποιώντας ως κρίσιμες παραμέτρους α) την ένταση μικροκυμάτων (MW), β) την ένταση υπερήχων (US), και γ) την διάρκεια εκχύλισης (duration).
- Από τα εκχυλίσματα βαλσάμου που προέκυψαν, διαπιστώθηκε ότι στα περισσότερα δείγματα, αυξάνοντας την ένταση των υπερήχων (US) και διατηρώντας σταθερές τις άλλες δύο παραμέτρους ή αντίστοιχα αυξάνοντας την ένταση των μικροκυμάτων (MW) και διατηρώντας σταθερές τις άλλες δύο μεταβλητές, προκύπτουν δείγματα με μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο. Συνδυαστικά όμως, όταν εφαρμόζοταν ταυτόχρονα υψηλή τιμή έντασης μικροκυμάτων (MW) και υπερήχων (US), προέκυπταν λιγότερο δραστικά δείγματα, συγκριτικά με τα δείγματα που λήφθηκαν από εφαρμογή διαφορετικών συνδυασμών εντάσεων MW-US (πχ. για MW=0, US=700W). Τέλος, μελετώντας την

επίδραση της διάρκειας εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνεται η διάρκεια της εκχύλισης, αναλογικά αυξάνεται και το TPC μέχρι να φτάσει σε μια οριακή τιμή, η οποία όταν ξεπεραστεί, η ποιότητα του εκχυλίσματος υποβαθμίζεται. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του βαλσάμου, η οριακή τιμή της διάρκειας εκχύλισης ήταν τα 8 min, και η περαιτέρω αύξησή της άρχισε να δρα καταστροφικά για το δείγμα, αλλοιώνοντας τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά (μείωση βιοδραστικού περιεχομένου).

- Το βέλτιστο και πιο δραστικό εκχύλισμα βαλσάμου (**no7**), προέκυψε με εφαρμογή ενδιάμεσων τιμών των τριών παραμέτρων εκχύλισης, οι οποίες είναι : MW=200W, US=450W, duration=8min
- Αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά του βαλσάμου, προέκυψαν και για τα εκχυλίσματα χαμομηλιού. Πιο αναλυτικά, για σταθερή τιμή της έντασης υπερήχων (US) και σταθερό χρόνο διάρκειας της εκχύλισης, η αύξηση της έντασης μικροκυμάτων (MW) οδηγούσε σε δείγματα με υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο. Αντίστοιχα, διαπιστώθηκε ότι αυξάνοντας την ένταση υπερήχων (US) και διατηρώντας σταθερές τις άλλες δύο παραμέτρους (MW, duration), προέκυπταν ως επί το πλείστον δείγματα με μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο. Επιπλέον, η διάρκεια της εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων χαμομηλιού, είχε ακριβώς την ίδια επίδραση με αυτή στα εκχυλίσματα βαλσάμου όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Όμοια, διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνεται η διάρκεια της εκχύλισης (duration) αυξάνεται η τιμή του TPC μέχρι ένα οριακό σημείο (8 min), μετά το οποίο η αύξηση της διάρκειας εκχύλισης αρχίζει να δρα καταστροφικά για το εκχύλισμα, υποβαθμίζοντας το βιοδραστικό του περιεχόμενο.
- Το βέλτιστο και πιο δραστικό εκχύλισμα χαμομηλιού (**no27**), προέκυψε με εφαρμογή υψηλών εντάσεων MW και US σε συνδυασμό με ενδιάμεση διάρκεια εκχύλισης, δηλαδή: MW=500W, US=700W, duration=8min.
- Το δείγμα βαλσάμου no7 ήταν το πιο δραστικό συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα με υψηλό ολικό φαινολικό φορτίο TPC=3.7291 (mg GAE/g raw material) και ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα IC50=31.0580 (mg εκχυλ./g raw material). Αντίστοιχα, το δείγμα no27 ήταν το δραστικότερο από τα εκχυλίσματα χαμομηλιού με ολικό φαινολικό φορτίο TPC=3.0518 (mg GAE/g raw material) και αντιοξειδωτική ικανότητα IC50=47.1187 (mg εκχυλ./g raw material).

Από την εφαρμογή και τη **μελέτη της τεχνικής της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning)** για τον εγκλεισμό των βέλτιστων βιοδραστικών αιθανολικών εκχυλισμάτων βαλσάμου και χαμομηλιού (no7 και no27), και των αιθέριων ελαίων (hypericum E.O., chamomile E.O., rosemary E.O., oregano E.O. και του μείγματός τους oil mix), προέκυψαν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Υψηλό βιοδραστικό περιεχόμενο διέθεταν εκτός από τα αιθανολικά εκχυλίσματα βαλσάμου και χαμομηλιού, no7 και no27 αντίστοιχα, και τα εμπορικά διαθέσιμα αιθέρια έλαια βαλσάμου, χαμομηλιού, δενδρολίβανου, ρίγανης και του μείγματός τους, που χρησιμοποιήθηκαν για εγκλεισμό μέσω electrospinning.
- Για τη μελέτη εγκλεισμού των αιθανολικών εκχυλισμάτων βαλσάμου (no7) και χαμομηλιού (no27), επιλέχθηκε η μήτρα της ζεΐνης (20%w/w διαλυμένη σε μείγμα EtOH:H₂O (90:10)), η οποία είναι πολύ αποτελεσματική σε τέτοια διαλύματα και παράλληλα κατάλληλη για βρώση, μιας και τα παραγόμενα φιλμ προορίζονται για προσθήκη σε προμείγματα ζωοτροφών. Αντίστοιχα, για το νανοεγκλεισμό των απομονωμένων δραστικών αιθέριων ελαίων και του μείγματός της, επιλέχθηκε

η υδατική μήτρα πρωτεΐνης ορού γάλακτος:πουλλουλόνης (WPI:puI), καθώς διαθέτει λιπόφιλη κοιλότητα που συμπλοκοποιείται άριστα με υδρόφοβα συστατικά, της τα αιθέρια έλαια.

- Από πληθώρα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψε, αρχικά ότι καταλληλότερο για χρήση στον νανοεγκλεισμό των εκχυλισμάτων no7 και no27, ήταν το αιθανολικό διάλυμα ζεΐνης περιεκτικότητας 20%w/w, καθώς τα διαλύματα χαμηλότερης συγκέντρωσης δεν ευνοούσαν τη δημιουργία κώνου Taylor και τη συνεχόμενη έγχυση. Ο συνδυασμός παροχής-τάσης-απόστασης που επιλέχθηκε για τον εγκλεισμό της, ήταν 1mL/h – 27.5kV – 17cm, διότι αφενός παρουσίασε την καλύτερη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση και την ποιότητα του φιλμ των νανοϊνών, και αφετέρου διότι προτιμήθηκε η χαμηλότερη δυνατή τιμή τάσης που προσέφερε αυτήν την απόδοση.
- Αντίστοιχα, για την ενθυλάκωση των αιθέρων ελαίων και του μείγματός της, προέκυψε ως καταλληλότερο το υδατικό διάλυμα WPI:puI συγκέντρωσης 30:70%w/w (σε συνολική συγκέντρωση πολυμερούς στο διάλυμα 20%w/w). Τα αποτελέσματα αυτά, συνάδουν και με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία όταν η συγκέντρωση της πολυμερικής μήτρας είναι πολύ χαμηλή, ο εγκλεισμός συντελείται με μεγαλύτερη δυσκολία και δημιουργούνται μικρο ή νανοσφαιρίδια (electrospraying), αντί για μικρο- ή νανο- ίνες (electrospinning), εξαιτίας του χαμηλού ιξώδους και της υψηλής επιφανειακής τάσης του διαλύματος. Ο συνδυασμός παροχής (LIQ 1-LIQ 2)-τάσης-απόστασης ήταν: 0.1mL/h – 1.5 mL/h – 25kV – 18cm αντίστοιχα, όπου LIQ 1: το βιοδραστικό συστατικό-LIQ 2: η μήτρα εγκλεισμού, καθώς παρουσίασε καλύτερη συμπεριφορά κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση, δημιουργώντας ομοιόμορφες ίνες με επιθυμητή δομή.
- Από την εξέταση των νανοϊνών στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM), προέκυψε πως κατά τον εγκλεισμό των εκχυλισμάτων με μήτρα ζεΐνης, τα φιλμ που δημιουργήθηκαν αποτελούνται από ίνες με πολλούς σφαιρικούς σχηματισμούς και διακλαδώσεις, τα οποία δεν αποτελούν την επιθυμητή δομή λόγω ανομοιομορφίας, επομένως πρέπει να διερευνηθούν και της μήτρες με δυνητικά καλύτερα αποτελέσματα. Συνολικά, διαπιστώθηκε καλύτερη ομοιομορφία ινών, και διασπορά των βιοδραστικών ουσιών, της δομές με υδατική μήτρα WPI:puI (30:70%w/w) συγκριτικά με της δομές που σχημάτισε η αιθανολική μήτρα ζεΐνης (20%w/w).
- Παρατηρώντας τα ποσοστά εγκλεισμού των εκχυλισμάτων βαλσάμου και χαμομηλιού no7 και no27 σε μήτρα ζεΐνης, διαπιστώνεται ότι είναι σημαντικά μικρότερα από τα ποσοστά εγκλεισμού των αιθέρων ελαίων σε υδατική μήτρα WPI:puI. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να διερευνηθούν και άλλες διαφορετικές μήτρες με δυνητικά καλύτερα αποτελέσματα. Το καλύτερο ποσοστό εγκλεισμού με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης για τα δείγματα των αιθέρων ελαίων, αλλά και συνολικά για τα δείγματα που εγκλείστηκαν, παρουσίασε το μείγμα αιθέρων ελαίων (oil mix) με ποσοστό εγκλεισμού 73%.
- Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε πως ο εγκλεισμός με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning) για μείγμα αιθέρων ελαίων (oil mix) με αναλογία 50% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 20% αιθέριο έλαιο βαλσάμου, 15% αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου και 15% αιθέριο έλαιο χαμομηλιού, σε μήτρα WPI:puI, παρουσιάζει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Καταλήγοντας, προτείνεται η μέθοδος αυτή για μελλοντικές εφαρμογές της στον τομέα της έρευνας και ανάπτυξης, αλλά όχι στον τομέα της παραγωγής, διότι ακόμη αποτελεί μια χρονοβόρα και υψηλού κόστους διεργασία, η οποία συνεπώς δε συνιστάται για χρήση σε μεγάλη κλίμακα.

Από την εφαρμογή και τη **μελέτη των τεχνικών ενθυλάκωσης ξήρανση με εκνέφωση (spray-drying) και ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze-drying)** για το μείγμα αιθέριων ελαίων (oil mix), καθώς και της **τεχνικής φυγοκεντρικής εκβολής (extrusion)** για την ενσωμάτωση του oil mix σε πρόμειγμα κατάλληλων προδιαγραφών, και στη συνέχεια παραγωγή των τελικών πέλλετ ζωοτροφής, προέκυψαν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Οι εγκλεισμένες δομές του δείγματος oil mix που λήφθηκαν από την ξήρανση με εκνέφωση (spray drying), αποτελούνταν από δομές που προσομοιάζουν το σχήμα των κόκκων, με καλή διασπορά, και απουσία ρωγμών στα σωματίδια, γεγονός που υποδηλώνει επιτυχημένο εγκλεισμό των ενώσεων στόχων, εφόσον δεν μπορεί να διαχυθεί το συστατικό από το εσωτερικό της εγκλεισμένης δομής στην επιφάνειά του. Αντίστοιχα, οι εγκλεισμένες δομές που προέκυψαν από την ξήρανση υπό κατάψυξη χαρακτηρίζονταν από μια υαλώδη και σπογγώδη δομή παρουσία ρωγμών ή και εσοχών (βαθουλωμάτων) στην επιφάνεια των λυοφιλιωμένων σωματιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη βιβλιογραφίες σχετικά με τη δομή ναοϊνών που προκύπτουν με τη μέθοδο του freeze drying, διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα που παραλήφθηκαν από το SEM για την εγκλεισμένη σκόνη του μείγματος ελαίων με freeze drying, είναι πολύ ικανοποιητικά.
- Από τον χαρακτηρισμό των εγκλεισμένων δειγμάτων μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) με τις μεθόδους ξήρανση με εκνέφωση και ξήρανση υπό κατάψυξη, προέκυψαν παραπλήσια αποτελέσματα και για τις δύο μεθόδους εγκλεισμού. Παρόλα αυτά παρατηρείται πως το δείγμα εγκλεισμένης σκόνης μείγματος αιθέριων ελαίων με τη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying) εμφανίζει τα επιθυμητά αποτελέσματα με μεγαλύτερο ποσοστό εγκλεισμού (29.43%), συγκριτικά με τη μέθοδο του freeze drying (ποσοστό εγκλεισμού 10.68%).
- Τα εγκλεισμένα δείγματα μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) που οδηγήθηκαν για εκβολή και παραγωγή τελικού πέλλετ ζωοτροφής, παρατηρήθηκε ότι εμφάνιζαν λιγότερη απώλεια βιοδραστικών ουσιών μετά την διαδικασία της εκβολής, συγκριτικά με το μη εγκλεισμένο oil mix που οδηγήθηκε σε εκβολή. Επομένως, γίνεται φανερό πως ο εγκλεισμός των δειγμάτων διατήρησε τις ιδιότητές τους καθώς και τη βιοδιαθεσιμότητα του τελικού προϊόντος.
- Επιπλέον, συγκρίνοντας τα δείγματα Α και Β που προορίζονταν για εκβολή, όπου Α μείγμα άλευρου και εγκλεισμένου oil mix που προέκυψε με spray drying και Β μείγμα άλευρου και εγκλεισμένου oil mix που προέκυψε με freeze drying, διαπιστώθηκε πως ο εγκλεισμός με τη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση ήταν πιο αποδοτικός από αυτόν της ξήρανσης με κατάψυξη, εξασφαλίζοντας την διατήρηση του βιοδραστικού περιεχομένου στο τελικό προϊόν, γεγονός που επαληθεύτηκε και από το ποσοστό εγκλεισμού των δύο μεθόδων ενθυλάκωσης.
- Τελικώς, προκύπτει πως και οι δύο μέθοδοι ενθυλάκωσης, ξήρανση με εκνέφωση και ξήρανση υπό κατάψυξη, του μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) παρουσίασαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παρόλ' αυτά, για παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα, προτιμάται η μέθοδος της ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying), καθώς συνδυάζει την παραγωγή ικανής ποσότητας εγκλεισμένης βιοδραστικής ουσίας, με μικρό χρόνο και λογικό κόστος, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η συνολική διαδικασία παραγωγής ζωοτροφών, με τελικό στάδιο την εκβολή και δημιουργία των επιθυμητών πέλλετ. Η διαφορά με τη μέθοδο του freeze drying εντοπίζεται στο πολύ υψηλό ενεργειακό κόστος που απαιτείται για να επιτευχθεί η κατάψυξη της ποσότητας που πρόκειται να λυοφιλοποιηθεί, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται μέχρι να πραγματοποιηθεί αυτό.

Κατά συνέπεια η εφαρμογή της ξήρανσης υπό κατάψυξη δεν προτείνεται για μεγάλους όγκους παραγωγής.

Εν γένει, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε, προέκυψε ότι η προσθήκη εγκλεισμένου μείγματος αιθέριων ελαίων (oil mix), σε αναλογία: 50% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 20% αιθέριο έλαιο βαλσάμου, 15% αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου και 15% αιθέριο έλαιο χαμομηλιού, με τη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying) σε πρόμειγμα αλεύρων με συγκεκριμένες προδιαγραφές για ζωοτροφές, και η μετέπειτα παραγωγή πέλλετ ζωοτροφής μέσω εκβολής (extrusion), προσέδωσε ιδιαίτερες ιδιότητες στο τελικό προϊόν με διατήρηση του βιοδραστικού του περιεχομένου. Έτσι, δημιουργήθηκε ένα καινοτόμο, πρωτότυπο και με μοναδικά χαρακτηριστικά προϊόν, του οποίου η εφαρμογή στον τομέα παραγωγής ζωοτροφών μπορεί μελλοντικά να αποβεί καθοριστική.

Εν κατακλείδι, οι μεθοδολογίες και τα επιστημονικά ευρήματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ενδείκνυται να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για αντίστοιχα πειράματα από άλλους ερευνητές, ούτως ώστε η παραγωγή των προϊόντων που μελετήθηκαν σε καθαρά πειραματικό πλαίσιο, να εδραιωθεί και σε βιομηχανική κλίμακα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Amad, A.A., et al., *Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens*. Poultry Science, 2011. **90**(12): p. 2811-2816.
2. GmbH, D.B. <https://www.delacon.com/phytoGENICS> *PhytoGENICS-Discover the power of nature*. [cited 2020 30/12/2020].
3. Μανώλα, Κ., *Η χρήση των φυτοβιοτικών στη διατροφή των μεγάλων μηρυκαστικών*, in *Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων*. 2020, Σχολή Γεωπονίας.
4. Steflitsch, W. and M. Steflitsch, *Clinical aromatherapy*. Journal of Men's Health, 2008. **5**(1): p. 74-85.
5. Στριγγλογιάννη, Μ.Ι., *Μελέτη των συστατικών του βαλσαμόχορτου (Hypericum perforatum L.) και εκχυλισμάτων του σε ελαιόλαδο*, in *Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου*. 2018, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας & Ανάπτυξης.
6. Greeson, J.M., B. Sanford, and D.A. Monti, *St. John's wort (Hypericum perforatum): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature*. Psychopharmacology, 2001. **153**(4): p. 402-414.
7. Filipiak-Szok, A., M. Kurzawa, and E. Szyk, *Optimization of extraction procedure and determination by high performance liquid chromatography of flavonols and phenolic acids from Hypericum Perforatum L.* Copernican Letters, 2010. **1**: p. 63.
8. Singh, O., et al., *Chamomile (Matricaria chamomilla L.): An overview*. Pharmacognosy reviews, 2011. **5**(9): p. 82-95.
9. Sarris, J., et al., *Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence*. European Neuropsychopharmacology, 2011. **21**(12): p. 841-860.
10. medNutrition.gr. <https://www.mednutrition.gr/portal/lifestyle/systaseis-diatrofis/9375-ta-viodrastika-systatika-tis-diatrofis>, "Τα βιοδραστικά συστατικά της διατροφής". 2015 [cited 2020 29/12/2020].
11. Joana Gil-Chávez, G., et al., *Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview*. 2013. **12**(1): p. 5-23.
12. *Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress*. Polish Journal of Environmental Studies, 2006. **15**(4): p. 523-530.
13. Cheyner, V., *Phenolic compounds: from plants to foods*. Phytochemistry Reviews, 2012. **11**(2): p. 153-177.
14. Rakhee, et al., *Chapter 9 - Characterization Techniques for Herbal Products*, in *Management of High Altitude Pathophysiology*, K. Misra, P. Sharma, and A. Bhardwaj, Editors. 2018, Academic Press. p. 171-202.

15. Zygler, A., M. Słomińska, and J. Namieśnik, *2.04 - Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press: Oxford. p. 65-82.
16. Luque de Castro, M.D. and L.E. García-Ayuso, *Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future*. *Analytica Chimica Acta*, 1998. **369**(1): p. 1-10.
17. Destandau, E., T. Michel, and C. Elfakir, *CHAPTER 4 Microwave-assisted Extraction*, in *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. 2013, The Royal Society of Chemistry. p. 113-156.
18. Veggi, P., et al., *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds theory and practice*, *Fundamentals of Microwave Extraction*. Food Engineering Series 4, 2013. **2**: p. 15-53.
19. Azadmard-Damirchi, S., K. Alirezalu, and B. Fathi-Achachlouei, *Microwave pretreatment of seeds to extract high quality vegetable oil*. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2011. **81**: p. 72-75.
20. Zhang, L., et al., *Microwave-assisted extraction of polyphenols from Camellia oleifera fruit hull*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2011. **16**(6): p. 4428-4437.
21. Azmir, J., et al., *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*. *Journal of Food Engineering*, 2013. **117**(4): p. 426-436.
22. Leonelli, C. and T.J. Mason, *Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry*. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2010. **49**(9): p. 885-900.
23. Pingret, D., A.-S. Fabiano-Tixier, and F. Chemat, *Ultrasound-assisted extraction*. *RSC Green Chemistry*, 2013: p. 89-112.
24. Mason, T., et al., *Application of Ultrasound*. 2005. p. 323-352.
25. Wang, L. and C. Weller, *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. *Trends in Food Science & Technology*, 2006. **17**: p. 300-312.
26. Poojary, M.M. and P. Passamonti, *Optimization of extraction of high purity all-trans-lycopenes from tomato pulp waste*. *Food Chemistry*, 2015. **188**: p. 84-91.
27. Sparr Eskilsson, C. and E. Björklund, *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **902**(1): p. 227-250.
28. Veggi, P.C., J. Martinez, and M.A.A. Meireles, *Fundamentals of Microwave Extraction, in Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, F. Chemat and G. Cravotto, Editors. 2013, Springer US: Boston, MA. p. 15-52.
29. Μισυρλή, Θ.-Β., *Αξιοποίηση παραπροϊόντων ελαιολιβερίου για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων με χρήση καινοτόμων μεθόδων εκχύλισης: Διερεύνηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης*, in *Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας ΙΙ: Ανάλυση*,

- Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Διεργασιών και Συστημάτων. 2015, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα.
30. Στρατή, Ε.Φ., Μελέτη μεθόδων παραλαβής καροτενοειδών από παραπροϊόντα τομάτας, in *Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών*. 2014, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών
 31. Salvador, M.D., et al., *Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability*. Food Chemistry, 2001. **74**(3): p. 267-274.
 32. Naviglio, D., et al., *Extraction of pure lycopene from industrial tomato by-products in water using a new high-pressure process*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008. **88**(14): p. 2414-2420.
 33. Perretti, G., et al., *Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide*. The Journal of Supercritical Fluids, 2013. **82**: p. 177-182.
 34. Μπαμπούλη, Α. and Μ. Κροκίδα, *Επίδραση μεθόδων εκχύλισης στην αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων μαστιχόδεντρου απο τη Χίο*, in *Σχολή Χημικών Μηχανικών* Φεβρουάριος 2014, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα.
 35. Wang, L., P. Qin, and Y. Hu, *Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea*. Frontiers of Chemical Engineering in China, 2010. **4**(3): p. 307-313.
 36. Lo Presti, M., et al., *A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(3): p. 273-280.
 37. Vinatoru, M., *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*. Ultrasonics Sonochemistry, 2001. **8**(3): p. 303-313.
 38. Gibbs, B.F., et al., *Encapsulation in the food industry: a review*. Int J Food Sci Nutr, 1999. **50**(3): p. 213-24.
 39. Augustin, M.A. and Y. Hemar, *Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(4): p. 902-12.
 40. Madene, A., et al., *Flavour encapsulation and controlled release – a review*. 2006. **41**(1): p. 1-21.
 41. Gharsallaoui, A., et al., *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview*. Food Research International, 2007. **40**(9): p. 1107-1121.
 42. Zhang, W.F., et al., *Preparation and Characterization of Carboxymethyl Chitosan and β-Cyclodextrin Microspheres by Spray Drying*. Drying Technology, 2007. **26**(1): p. 108-115.
 43. Drosou, C.G., M.K. Krokida, and C.G. Biliaderis, *Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications*. Drying Technology, 2017. **35**(2): p. 139-162.
 44. Adamiec, J., *Moisture Sorption Characteristics of Peppermint Oil Microencapsulated by Spray Drying*. Drying Technology, 2009. **27**(12): p. 1363-1369.

45. Ray, S., U. Raychaudhuri, and R. Chakraborty, *An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology*. Food Bioscience, 2016. **13**: p. 76-83.
46. Hernandez Sanchez, M.d.R., M.-E. Cuvelier, and C. Turchiuli, *Design of liquid emulsions to structure spray dried particles*. Journal of Food Engineering, 2015. **167**: p. 99-105.
47. Özdikicierler, O., N. Dirim, and F. Pazir, *The effects of spray drying process parameters on the characteristic process indices and rheological powder properties of microencapsulated plant (Gypsophila) extract powder*. Powder Technology, 2014. **253**: p. 474-480.
48. Cui, W., Y. Zhou, and J. Chang, *Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery*. Science and Technology of Advanced Materials, 2010. **11**(1): p. 014108.
49. Chaudhri, N., et al., *Nanotechnology: An Advance Tool for Nano-cosmetics Preparation*. 2015. **4**.
50. Celebioglu, A., T.J.J.o.c. Uyar, and i. science, *Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: electrospun nanofibers from native cyclodextrins*. 2013. **404**: p. 1-7.
51. Drosou, C., M. Krokida, and C.G. Biliaderis, *Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties*. Food Hydrocolloids, 2018. **77**: p. 726-735.
52. Raghavan, P., et al., *Electrospun polymer nanofibers: The booming cutting edge technology*. Reactive and Functional Polymers, 2012. **72**(12): p. 915-930.
53. Kayaci, F. and T. Uyar, *Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins*. Carbohydrate Polymers, 2012. **90**(1): p. 558-568.
54. A., Π., *Εγκλεισμός αμοξικιλίνης σε ινώδη ικρίωματα οξικής κυτταρίνης*, in *Τμήμα Φυσικής*. 2008, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης: Θεσσαλονίκη.
55. Díaz, J.E., et al., *Fabrication of structured micro and nanofibers by coaxial electrospinning*. Journal of Physics: Conference Series, 2008. **127**: p. 012008.
56. Khajavi, R. and M. Abbasipour, *Electrospinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers*. Scientia Iranica, 2012. **19**(6): p. 2029-2034.
57. Sill, T.J. and H.A. von Recum, *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.
58. Casper, C.L., et al., *Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process*. Macromolecules, 2004. **37**(2): p. 573-578.
59. Ισαακ, Μ. and Π. Νικόλαος, *Υπολογισμός του χρόνου λυοφιλίωσης τροφίμων υπολογιστικά και πειραματικά*, in *Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων*. 2010, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης: Θεσσαλονίκη.

60. Durance, T. and P. Yaghmaee, *4.51 - Microwave Dehydration of Food and Food Ingredients*, in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, M. Moo-Young, Editor. 2011, Academic Press: Burlington. p. 617-628.
61. Μαύρος, Π., *Κεφάλαιο 12- Κρυοξήρανση ή Λυοφιλίωση*, in *Στοιχεία Φυσικών Διεργασιών*.
62. Marin, M., *FREEZE-DRYING | Structural and Flavor (Flavour) Changes*, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Editor. 2003, Academic Press: Oxford. p. 2701-2705.
63. Krasaekoopt, W., B. Bhandari, and H. Deeth, *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt*. International Dairy Journal, 2003. **13**(1): p. 3-13.
64. Rokey, G., B. Plattner, and E. Souza, *Feed extrusion process description*. Revista Brasileira De Zootecnia-brazilian Journal of Animal Science - REV BRAS ZOOTECHN, 2010. **39**.
65. Augustin, M.A., et al., *Encapsulation of food ingredients*. Food Australia, 2001. **53**: p. 220-223.
66. Ντίνη, Ε.Δ., *Συστήματα Εγκλεισμού και Απόδοσης Βιοενεργών Ουσιών σε Μικρο- και Νανο- Κλίμακα*, in *Τμήμα Χημικών Μηχανικών*. Φεβρουάριος, 2004, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης: Θεσσαλονίκη.
67. Κ., Κ., *Εφαρμογή της Μικροενθυκάκωσης στην Παραγωγή Διατροφικών Συμπληρωμάτων*, in *Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής- Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής*. 2014, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο: Αθήνα.
68. Torres-Giner, S., E. Gimenez, and J.M. Lagaron, *Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning*. Food Hydrocolloids, 2008. **22**: p. 601-614.
69. Torres-Giner, S., E. Gimenez, and J.M. Lagaron, *Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning*. Food Hydrocolloids, 2008. **22**(4): p. 601-614.
70. Miyoshi, T., K. Toyohara, and H. Minematsu, *Preparation of ultrafine fibrous zein membranes via electrospinning*. 2005. **54**(8): p. 1187-1190.
71. Dissanayake, M., et al., *Influence of heat and pH on structure and conformation of whey proteins*. International Dairy Journal, 2013. **28**: p. 56-61.
72. Dissanayake, M. and T. Vasiljevic, *Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing*. Journal of dairy science, 2009. **92**(4): p. 1387-1397.
73. Çabuk, B. and Ş. Harsa, *Whey Protein-Pullulan (WP/Pullulan) Polymer Blend for Preservation of Viability of Lactobacillus acidophilus*. Drying Technology, 2015. **33**(10): p. 1223-1233.
74. SHEU, T.-Y. and M. ROSENBERG, *Microencapsulation by Spray Drying Ethyl Caprylate in Whey Protein and Carbohydrate Wall Systems*. 1995. **60**(1): p. 98-103.

75. Murano, E., *Use of natural polysaccharides in the microencapsulation techniques*. 1998. **14**(3-4): p. 245-249.
76. Wu, P. and M. Imai, *Food polymer pullulan- κ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition*. Desalination and Water Treatment - DESALIN WATER TREAT, 2011. **34**: p. 239-245.
77. ADMINISTRATION, U.S.F.D. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list#ftnE>, " Food Additive Status List". 2019.
78. Antolovich, M., et al., *Methods for testing antioxidant activity*. Analyst, 2002. **127**(1): p. 183-198.
79. Rezvankhah, A., Z. Emam-Djomeh, and G. Askari, *Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review*. Drying Technology, 2020. **38**(1-2): p. 235-258.

