



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ II: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ &
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

Διπλωματική Εργασία

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΑ ΦΥΣΙΚΑ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

ΜΕΣΣΗΝΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Υπεύθυνη καθηγήτρια

ΚΡΟΚΙΔΑ Μ.

Ιούνιος, 2023

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, στη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2022 – 2023.

Με την ολοκλήρωσή της, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Μαγδαληνή Κροκίδα, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τον τομέα των διεργασιών σε τρόφιμα, την καθοδήγησή της και όλες τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Νάντια Λαϊνά, για τις αμέτρητες ώρες πειραμάτων και συζητήσεων, την εμπιστοσύνη της σε μένα, τη βοήθεια και τη στήριξή της, που αποτέλεσαν βασικό παράγοντα για την περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια της διαδρομής μου στο ΕΜΠ. Τους φίλους μου, εντός και εκτός σχολής, που μοιράστηκαν μαζί μου πολλές ωραίες στιγμές, καθιστώντας τα φοιτητικά μου χρόνια μια από τις ομορφότερες περιόδους της έως τώρα ζωής μου, και την οικογένειά μου για τη συμπαράσταση και υπομονή που έδειξαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην ανάπτυξη ζωοτροφών εμπλουτισμένων με βιοδραστικά συστατικά από φαρμακευτικά φυτά και βότανα της μεσογειακής χλωρίδας, με εφαρμογή στον τομέα των λειτουργικών ζωοτροφών. Σκοπός είναι η υποκατάσταση των συνθετικών προσθέτων από συστατικά φυσικής προέλευσης. Τα φαρμακευτικά φυτά της Μεσογείου (πχ. ρίγανη, βαλσαμόχορτο, δενδρολίβανο, χαμομήλι κ.α) καθώς και τα παράγωγα αυτών (εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια) είναι ευρέως γνωστά για τις ευεργετικές τους ιδιότητες και κρίνονται απαραίτητα για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού των ζώων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ένα μίγμα αιθερίων ελαίων των παραπάνω βοτάνων, το οποίο παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα, χάρη στις βιοδραστικές ουσίες που εμπεριέχει (φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, τερπένια). Ωστόσο, η ευαίσθητη και ασταθής φύση των ενώσεων αυτών, τις καθιστά δύσχρηστες για τη βιομηχανία. Η διαδικασία της ενθυλάκωσης σε βιοπολυμερείς μήτρες, που θα διερευνηθεί πειραματικά έχει σκοπό τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και της σταθερότητας των φυσικών βιοενεργών συστατικών στην τελική ζωοτροφή. Έγινε χρήση διαφορετικών τεχνικών εγκλεισμού (ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, ξήρανση με ψεκασμό), καθώς και σύγκριση αυτών. Οι ενθυλακωμένες δομές που θα αναπτύχθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή και τη μορφολογία τους με εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών (ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), εξασθενημένη ολική ανακλαστικότητα με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ATR-FTIR). Επιπλέον χαρακτηρίστηκαν ως προς το βιοδραστικό τους περιεχόμενο και υπολογίστηκε η αποδοτικότητα της κάθε μεθόδου. Στη συνέχεια, το βιοδραστικό μίγμα, σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή, προχώρησε στη διεργασία της εκβολής μέσω της οποίας ενσωματώθηκε στη ζωοτροφή και αναπτύχθηκαν τα τελικά πέλλετ. Τα βιοενεργά πέλλετ ζωοτροφών που προέκυψαν, μελετήθηκαν περεταίρω ως προς την απελευθέρωση του συστατικού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα συμβάλλουν στην προσπάθεια εξάλειψης συνθετικών πρόσθετων στη διατροφή των ζώων, μέσω μιας βιώσιμης προσέγγισης τόσο για το περιβάλλον όσο και για τη βιομηχανία.

Λέξεις- κλειδιά:

Ζωοτροφές, αντιοξειδωτικά, αιθέρια έλαια, βιοδραστικά συστατικά, φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική δράση, εγκλεισμός, βιοδιαθεσιμότητα, γαστρεντερικό περιβάλλον, εκβολή, πέλλετ.

ABSTRACT

The present diploma thesis focuses on the development of animal feed enriched with bioactive ingredients from medicinal plants and herbs of the Mediterranean flora, addressing the field of functional animal feed. The aim is to replace synthetic feed additives with ingredients of natural origin. The Mediterranean medicinal plants (eg. oregano, hypericum, rosemary, chamomile, etc.) as well as their derivatives (extracts, essential oils) are widely known for their beneficial properties and are considered essential for animal welfare. More specifically, a mixture of the essential oils of the above herbs was studied, exhibiting strong antimicrobial, antifungal and antioxidant activity, attributed to the bioactive substances it contains (phenolic acids, polyphenols, terpenes). However, the sensitive and unstable nature of these compounds makes difficult their industrial exploitation. The process of encapsulation in biopolymer matrices, which was investigated experimentally, improved the bioavailability and stability of natural bioactive components in the final animal feed. Different encapsulation techniques (electrohydrodynamic process, spray drying) were applied and compared. The encapsulated structures developed, were characterized in terms of morphology and composition by applying several techniques (scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)). Moreover, their bioactivity was evaluated and the efficiency of each method was calculated. Afterwards, the bioactive mixture, in free and encapsulated form, was proceeded to the extrusion process through which it was incorporated into the feed, developing the final pellets. The resulting bioactive feed pellets were further studied, and the release profile of the active ingredients was investigated under conditions simulating the gastrointestinal tract. The results of this diploma thesis will contribute to the effort towards the elimination of synthetic additives in animal nutrition, through a sustainable approach for both the environment and the industry.

Keywords:

Feed, antioxidants, essential oils, bioactive ingredients, phenolic content, antioxidant activity, encapsulation, bioavailability, gastrointestinal environment, extrusion, pellet.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
ABSTRACT.....	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	ix
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	xiii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	xv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	xvii
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.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ-ΠΡΟΣΘΕΤΑ-ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ.....	5
2.2 ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ-ΑΙΘΕΡΑΙΑ ΕΛΑΙΑ-ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ.....	6
2.2.1 ΡΙΓΑΝΗ	7
2.2.2 ΒΑΛΣΑΜΟΧΟΡΤΟ.....	7
2.2.3 ΧΑΜΟΜΗΛΙ	8
2.2.4 ΔΕΝΔΡΟΛΙΒΑΝΟ.....	8
2.3 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	9
2.3.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ-ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	9
2.4 ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ	10
2.5 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	10
2.5.1 ΦΟΡΕΑΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ	12
2.5.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ.....	13
2.6 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗ.....	18
2.6.1 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΚΒΟΛΗ (EXTRUSION)	18
2.7 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΩΝ ΔΟΜΩΝ	20
2.7.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)).....	20
2.7.2 ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ (TOTAL PHENOLIC CONTENT-TPC)	21

2.7.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ	21
2.7.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΦΗΣ	22
2.8 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	24
3.1 ΥΛΙΚΑ	24
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ-ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΚΕΥΕΣ	24
3.2.1 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	24
3.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΜΩΝ	26
3.3.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)).....	26
3.3.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (ENCAPSULATION EFFICIENCY, ΕΕ)	27
3.3.3 ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ (TOTAL PHENOLIC CONTENT-TPC)	29
3.3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	30
3.4 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ	36
3.5 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΥ ΟΙΛ-ΜΙΧ ΣΕ ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΓΙΑ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ (ΕΚΒΟΛΗ).....	32
3.6 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ	33
3.6.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	33
3.6.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΚΒΟΛΗΣ (ΧΕ)	34
3.6.3 ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ (TPC)	34
3.6.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (DPPH)	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
3.6.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ	35
3.6.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑΣ	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
4.1 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	38
4.1.1 Απόδοση εγκλεισμού (encapsulation efficiency, ΕΕ)	38
4.1.2 Αξιολόγηση Βιοδραστικότητας εγκλεισμένων δομών	38
4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΜΩΝ.....	39
4.2.1 Χαρακτηρισμός δομής - Μορφολογία των προϊόντων εγκλεισμού	39
4.2.2 Αξιολόγηση ελεγχόμενης αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών ..	39
4.2.3 Προσδιορισμός θερμικών χαρακτηριστικών μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC).....	48

4.2.4 Προσδιορισμός ελεγχόμενης αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών	55
4.3 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΥ ΟΙΛ-ΜΙΧ ΣΕ ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΓΙΑ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ (ΕΚΒΟΛΗ)	58
4.3.1 Απόδοση Ενσωμάτωσης (ΧΕ%)	58
4.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ	59
4.4.1 Μορφολογία.....	59
4.4.2 Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο	60
4.4.3 Εφαρμογή της τεχνικής ATR-FTIR.....	60
4.4.4 Προσδιορισμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών	62
4.5 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΖΩΗΣ	63
4.5.1 Μέτρηση Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου	64
4.5.2 Μεταβολή χρώματος	65
4.5.3 Μεταβολή σκληρότητας.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση μικροσφαιρών και μικροκάψουλων [22].....	11
Εικόνα 2.2: Προσομοίωση ηλεκτροϊνοποίησης.....	14
Εικόνα 2.3: Προσομοίωση ξήρανσης με ψεκασμό.....	16
Εικόνα 2.4: Προσομοίωση ξήρανσης με κατάψυξη	17
Εικόνα 2.5: Απεικόνιση διαγραμμάτος φάσεων στην ξήρανση υπό κατάψυξη	18
Εικόνα 2.6: Προσομοίωση φυγοκεντρικού εκβολέα (extruder).....	19
Εικόνα 2.7: Προσομοίωση εκβολέα διπλού κοχλία	20
Εικόνα 2.8: Απεικόνιση συστήματος CIELAB.....	21
Εικόνα 3.1: Συσκευή ομοαξονικής Ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας	25
Εικόνα 3.2: Συσκευή ξήρανσης με εκνέφωση.....	26
Εικόνα 3.3: Συσκευή ξήρανσης με κατάψυξη.....	26
Εικόνα 3.4: Συσκευή SEM/ EDAX	27
Εικόνα 3.5: Φασματοφωτόμετρο UV-VIS.....	28
Εικόνα 3.6: Φυγόκεντρος.....	29
Εικόνα 3.7: Περιστροφικός εξατμιστήρας.....	29
Εικόνα 3.8: Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Perkin Elmer DSC 6).....	31
Εικόνα 3.9: Φυγοκεντρικός εκβολέας διπλού κοχλία	32
Εικόνα 3.10: Φούρνος κενού.....	32
Εικόνα 3.11: Φυγοκεντρημένα δείγμα τα (πριν και μετά την εκβολή).....	35
Εικόνα 3.12: Πέλλετ ζωτροφής.....	35
Εικόνα 3.13: Χρωματόμετρο και πλακίδια βαθμονόμησης για τη μέτρηση του χρώματος των δειγμάτων.....	36
Εικόνα 3.14: Συσκευή μηχανικών δοκιμών.....	36

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3-1: Δείγμα τα προς εκβολή και οι κωδικοί τους.....	33
Πίνακας 3-2: Σύσταση δειγμάτων προς εκβολή.....	33
Πίνακας 4-1: Απόδοση εγκλεισμού των ανεπτυγμένων δομών.....	38
Πίνακας 4-3: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) για τις δομές εγκλεισμού WPI:PUL με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων που αναπτύχθηκαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C, 45°C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$).....	53
Πίνακας 4-4: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) για τις δομές εγκλεισμού WPI:PUL με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων που αναπτύχθηκαν μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C, 45°C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$).....	54
Πίνακας 4-5: Απόδοση ενσωμάτωσης (XE%) των καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών	58
Πίνακας 4-7: Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών.....	60
Πίνακας 4-8: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης των καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών.....	62
Σχήμα 4-27: Παράμετροι χρώματος L (α), a (β), και b (γ) για τα τελικά προϊόντα ζωοτροφής 1 και 2, καθώς και για τη συμβατική ζωοτροφή.....	62
Πίνακας 4-9: Βιοδραστικό περιεχόμενο καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφής σε χρόνους t=0 και t=90 ημερών	64

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3-1: Πρότυπη καμπύλη oil mix με διαλύτη εξάνιο.....	28
Σχήμα 4-1: Εικόνες SEM για νανοΐνες μίγματος αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:pul με παροχές 0.12 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm.....	39
Σχήμα 4-2: Εικόνες SEM για εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων μέσω της ξήρανσης με ψεκάσμο σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm.....	39
Σχήμα 4-3: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 7 days.....	40
Σχήμα 4-4: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού XE-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 7 days.....	41
Σχήμα 4-5: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού XE-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 30 days.....	42
Σχήμα 4-6: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού XE-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 30 days.....	43
Σχήμα 4-7: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 7 days.....	44
Σχήμα 4-8: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 7 days.....	45
Σχήμα 4-9: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 30 days.....	46
Σχήμα 4-10: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 30 days.....	47
Σχήμα 4-11: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού XE-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 7 days.....	48
Σχήμα 4-12: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού XE-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 45°C για 7 days.....	49
Σχήμα 4-13: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού XE-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 30 days.....	49
Σχήμα 4-14: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού XE-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 45°C για 30 days.....	50
Σχήμα 4-15: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 7 days.....	50
Σχήμα 4-16: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 45°C για 7 days.....	51
Σχήμα 4-17: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 30 days.....	51

Σχήμα 4-19: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού ΧΕ-WPI:PUL (30:70) κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασίες 25°C και 45°C σε ενεργότητες νερού 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ).....	55
Σχήμα 4-20: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού ΧS-WPI:PUL (80:20) κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασίες 25°C και 45°C σε ενεργότητες νερού 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ).....	56
Σχήμα 4-21: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού ΧΕ-WPI:PUL (30:70) κατά την αποθήκευσή τους σε ενεργότητες νερού 0,33, 0,64, 0,75 σε θερμοκρασίες 25°C (α) και 45°C (β).	57
Σχήμα 4-22: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού ΧS-WPI:PUL (80:20) κατά την αποθήκευσή τους σε ενεργότητες νερού 0,33, 0,64, 0,75 σε θερμοκρασίες 25°C (α) και 45°C (β).	57
Σχήμα 4-23: Εικόνες SEM της συμβατικής ζωτροφής (control) (α), του προϊόντος 1 (β), και του προϊόντος 2 (γ).	59
Σχήμα 4-24: Στερεοσκοπική απεικόνιση της διατομής της συμβατικής ζωτροφής (α), του προϊόντος 1 (β), και του προϊόντος 2 (γ).....	59
Σχήμα 4-25: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) (α), της συμβατικής ζωτροφής (β), και του τελικού προϊόντος ζωτροφής με ενσωματωμένο το μη εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (προϊόν 2) κατά την αποθήκευσή του στους 25°C και $a_w=0.54$ για 90 ημέρες.	61
Σχήμα 4-26: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (α), των εγκλεισμένων δομών SP-WPI:pu με το εγκλεισμένο μίγμα μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (β), της συμβατικής ζωτροφής (γ), και του τελικού προϊόντος ζωτροφής με ενσωματωμένο το εγκλεισμένο μίγμα μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (δ) (προϊόν 1) κατά την αποθήκευσή του στους 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες.....	61
Σχήμα 4-28: Προσδιορισμός σκληρότητας (N/mm ²) των καινοτόμων προϊόντων ζωτροφής σε σύγκριση με τη συμβατική ζωτροφή.....	63
Σχήμα 4-29: Μεταβολή βιοδραστικότητας σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης (90 ημέρες) για τα νέα τελικά προϊόντα ζωτροφών.....	64
Σχήμα 4-31: Μεταβολή της παραμέτρου a^* στα τελικά προϊόντα ζωτροφής 1 και 2, καθώς και στη συμβατική ζωτροφή κατά την κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες.....	66
Σχήμα 4-32: Μεταβολή της παραμέτρου b^* στα τελικά προϊόντα ζωτροφής 1 και 2, καθώς και στη συμβατική ζωτροφή κατά την κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες.....	66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντικείμενο και Στόχοι

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη νέων φυσικών προϊόντων ζωοτροφής με ενσωματωμένα φυσικά αντιοξειδωτικά συστατικά.

Η ανάγκη αυξημένων αποδόσεων για τη θρέψη του παγκόσμιου πληθυσμού έχει οδηγήσει στην μετάβαση από ένα εκτατικό σύστημα κτηνοτροφίας σε ένα εντατικό. Η κτηνοτροφία είναι σήμερα από τους μεγαλύτερους οικονομικούς κλάδους παγκοσμίως: 80 δισεκατομμύρια ζώα εκτρέφονται και σφάζονται κάθε χρόνο για την παραγωγή κρέατος και άλλων ζωικών προϊόντων. Πάω από 70% από αυτά εκτρέφονται με εντατική κτηνοτροφία, προσανατολισμένη στη μέγιστη δυνατή συμπίεση του κόστους: τα ζώα εκτρέφονται σε βιομηχανική κλίμακα σε μεγάλες κλειστές εγκαταστάσεις, με μαζική χορήγηση ζωοτροφών από εντατικές καλλιέργειες. Η διαρκής επέκτασή της στηρίζεται σε ανοδική ζήτηση ζωικών προϊόντων, κυρίως στις πλούσιες χώρες και στις ανερχόμενες οικονομίες. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι στα κτηνοτροφικά ζώα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις (σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, παθήσεις των αρθρώσεων, φλεγμονή της αναπνευστικής οδού) στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με τη ζωική παραγωγή και την ευζωία). Πολλές έρευνες έδειξαν ότι η **χορήγηση αντιοξειδωτικών** μπορεί να προστατεύσει τα ζώα από τέτοιες ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά συμπτώματά τους.

Τα τελευταία χρόνια, **το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί σε μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική** υποκατάστασης των συνθετικών προσθέτων από συστατικά φυσικής προέλευσης. Τα φαρμακευτικά φυτά της Μεσογείου (πχ. ρίγανη, βαλσαμόχορτο, δενδρολίβανο, χαμομήλι κ.α) καθώς και τα παράγωγα αυτών (εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια) είναι ευρέως γνωστά για τις ευεργετικές τους ιδιότητες και κρίνονται απαραίτητα για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού των ζώων.

1.2 Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας – Μεθοδολογική προσέγγιση

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ανάπτυξη ζωοτροφών εμπλουτισμένων με βιοδραστικά συστατικά από φυτά και βότανα (ρίγανη, βαλσαμόχορτο, δενδρολίβανο, χαμομήλι κ.α) με εφαρμογή στον τομέα των λειτουργικών ζωοτροφών.

Η μεθοδολογική προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν απόρροια λεπτομερής βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Πιο συγκεκριμένα, θα μελετηθεί ένα μίγμα των εκχυλισμάτων των παραπάνω βοτάνων, το οποίο παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα, χάρη στις βιοδραστικές ουσίες που εμπεριέχει (φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, τερπένια). Έπειτα, με τη βοήθεια σύγχρονων, 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 ηλεκτροϋδροδυναμικής ινοποίησης, ξήρανση με κατάψυξη και ξήρανση

με ψεκάσμο) στα βέλτιστα εκχυλίσματα και στα αιθέρια έλαια, με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Στη συνέχεια, οι ενθυλακωμένες βιοδραστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα υλών για την παραγωγή ζωοτροφών με τη μέθοδο της φυγοκεντρικής εκβολής (extrusion), και μελετήθηκαν μεταβολές ως προς το βιοδραστικό τους περιεχόμενο, μεταβολές στις μηχανικές ιδιότητες του pellet που προκύπτει από την φυγοκεντρική εκβολή καθώς επίσης και μελέτη ως προς την απελευθέρωση του συστατικού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος.

1.3 Επιμέρους στόχοι – Αναμενόμενη συνεισφορά

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

- Μελέτη του συστατικού δηλαδή του μίγματος των αιθέριων ελαίων, το οποίο παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα.
- χρήση διαφορετικών τεχνικών εγκλεισμού (ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, ξήρανση με ψεκάσμο, ξήρανση με κατάψυξη, φυγοκεντρική εκβολή), καθώς και σύγκριση αυτών.
- Χαρακτηρισμός των ενθυλακωμένων δομών που θα αναπτυχθούν ως προς τη δομή και τη μορφολογία τους με εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών (DSC, ATR-FTIR).
- Ενσωμάτωση των εγκλεισμένων δομών και του σκέτου συστατικού, με τη διεργασία της εκβολής σε συνταγή συμβατικής ζωοτροφής.
- Μελέτη απελευθέρωσης του συστατικού σε προσομοίωση γαστρικών υγρών από όλες τις ανεπτυγμένες εγκλεισμένες δομές και τα πέλλετ που θα έχουν προκύψει από την εκβολή και μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων του πέλλετ (με σκέτο συστατικό και εγκλεισμένο συστατικό με τους τρεις τρόπους).
- Ανάπτυξη μοντέλων απελευθέρωσης και σύγκριση αποτελεσμάτων.

Καθώς όλοι οι προαναφερθέντες στόχοι 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, ωστόσο πολύ σημαντικά είναι και τα επιστημονικά ευρήματα καθώς δημιουργήθηκε ένα καινοτόμο, με μοναδικά χαρακτηριστικά προϊόν, του οποίου η εφαρμογή στη βιομηχανία καλλυντικών 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 παρουσιάζεται το συνολικό θεωρητικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.
- ❖ Στο τρίτο κεφάλαιο, περιγράφεται η πειραματική διαδικασία, που ακολουθήθηκε.
- ❖ Στο τέταρτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται, αναλύονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.
- ❖ Στο πέμπτο κεφάλαιο, τέλος συντελείται η εξαγωγή των συμπερασμάτων και προτείνονται μελλοντικές προοπτικές για την εξέλιξη του μελετώμενου θέματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ-ΠΡΟΣΘΕΤΑ-ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ

Η σύνθεση των ζωοτροφών είναι ένα άλλο βασικό στοιχείο για τη διασφάλιση της υγείας και της καλής μεταχείρισης των ζώων στην κτηνοτροφία. Η διατροφή πρέπει να προσαρμοστεί για την ηλικία του ζώου, καθώς οι διατροφικές απαιτήσεις αλλάζουν καθώς ωριμάζουν και αναπτύσσονται.

Οι ζωοτροφές μπορούν να μορφοποιηθούν με ειδικά συστατικά όπως πρόσθετα, συμπληρώματα και ενεργά συστατικά ζωοτροφών που μπορούν να βοηθήσουν στη στήριξη της υγείας των ζώων και του ανοσοποιητικού τους συστήματος. Αυτά έρχονται σε διάφορες μορφές:

- **Πρεβιοτικά:** ενώσεις τροφοδοσίας που διεγείρουν την ανάπτυξη ευνοϊκών συνηθισμένων βακτηρίων του εντέρου παρέχοντας το υπόστρωμα προκειμένου να αναπτυχθεί για να βοηθήσει στη διατήρηση ενός υγιούς πληθυσμού μικροβίων του εντέρου. Αυτές περικλύουν διαιτητικές ίνες, όπως ολιγοσακχαρίτες φυτικής προέλευσης όπως φρουκτάνες και γαλακτάνες, ανθεκτικό άμυλο, β-γλυκάνες και ξυλοολιγοσακχαρίτες και άλλα.
- **Ένζυμα:** Αυτές είναι κυρίως πρωτεΐνες που επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις και δρουν ως βιοκαταλύτες. Τα ένζυμα προστίθενται στις ζωοτροφές για να υποστηρίξουν την πέψη των ζωοτροφών που είναι δύσκολο να αφομοιώσουν ή είναι πλήρως αβλαβή από τα φυσικά πεπτικά ένζυμα των ζώων. Τα προϊόντα που παράγουν και η επακόλουθη προώθηση μικροβιακών πληθυσμών μπορούν να συμβάλλουν στη ρύθμιση της ανοσοποιητικής κατάστασης του ζώου.
- **Αντιμικροβιακά πεπτίδια:** μια ποικίλη κατηγορία φυσικών μορίων που παράγονται από όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς ως κομμάτι της έμφυτης ανοσοαπόκρισης ως πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων παραγόντων. Αυτά τα μόρια μπορούν να καταστρέψουν άμεσα τα βακτηρίδια, τις ζύμες, τους μύκητες, τους ιούς και ακόμη και τα καρκινικά κύτταρα.
- **Χιτοζάνη:** ένας φυσικός παρούσα γραμμικός πολυσακχαρίτης με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση που παράγεται από το εξωσκελετό καρκινοειδών.
- **Λυσοζύμη:** ένα ένζυμο που υποβαθμίζει το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηριδίων, προκαλώντας την αποσύνθεσή τους. Οι λυσοζύμες είναι μέρος της έμφυτης ανοσοαπόκρισης και είναι φυσικά παρούσες σε αυγά, δακρυϊκά υγρά, βλέννα, αίμα και παράγονται από λευκοκύτταρα.
- **Λιπαρά οξέα / τριγλυκερίδια μέσης αλύσου:** οργανικά οξέα που έχουν αποδειχθεί ότι είναι ικανά να θανατώνουν τα βακτηρίδια, αλλά ο μηχανισμός γι' αυτό δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Είναι πιθανό τα οξέα να μεταβάλλουν τη διαπερατότητα των βακτηριακών κυττάρων ή να μεταβάλλουν το pH στα βακτηριακά κύτταρα.
- **Εκχυλίσματα φυτών ή φυτογενετικά:** Αυτές περιλαμβάνουν βιοενεργές ενώσεις προερχόμενες από φυτά, φυσικούς προωθητές ανάπτυξης και αιθέρια έλαια που μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση της παθογένειας και της λοιμογόνου δράσης των μικροβίων και να τροποποιήσουν τις αντιδράσεις φλεγμονής και ανοσίας στα ζώα [1].

2.2 ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ-ΑΙΘΕΡΑΙΑ ΕΛΑΙΑ-ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Τα **αρωματικά φυτά**, γνωστά και ως βότανα και μπαχαρικά, χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα ως λαϊκή ιατρική και ως συντηρητικά στα τρόφιμα. Τα πιο γνωστά αρωματικά φυτά, όπως η ρίγανη, το δεντρολίβανο, το φασκόμηλο, ο γλυκάνισος, ο βασιλικός και άλλα, τα οποία κατάγονται από την περιοχή της Μεσογείου, περιέχουν πολλές βιολογικά ενεργές ενώσεις, κυρίως πολυφαινολικές, οι οποίες έχει βρεθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιπαρασιτικές, αντιπρωτοζωικές, αντιμυκητιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επί του παρόντος, η ζήτηση για αυτά τα φυτά και τα παράγωγά τους έχει αυξηθεί επειδή είναι φυσικά, φιλικά προς το περιβάλλον και γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή προϊόντα. Ως εκ τούτου, τα αρωματικά φυτά και τα εκχυλίσματά τους έχουν τη δυνατότητα να γίνουν ουσίες νέας γενιάς για τη διατροφή και την υγεία των ανθρώπων και των ζώων [2].

Τα **αιθέρια έλαια** είναι συμπυκνωμένα υδρόφοβα υγρά που προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών και εμπεριέχουν πτητικές αρωματικές ενώσεις. Η χρήση αιθέριων ελαίων διερευνάται ολοένα και περισσότερο μεταξύ των καινούριων θεραπευτικών προσεγγίσεων που βασίζονται στα φαρμακευτικά φυτά και τα εκχυλίσματά τους. Με την ευρεία χρήση συνθετικών και ημι-συνθετικών αντιμικροβιακών φαρμάκων, η εξάπλωση των ανθεκτικών στα φάρμακα κλινικών απομονώσεων έχει αυξηθεί και η έρευνα κατευθύνεται πλέον προς φυσικούς πόρους, όπως τα αιθέρια έλαια, που διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση. Επίσης, έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την ανάπτυξη μιας ποικιλίας παθογόνων μικροοργανισμών λόγω της παρουσίας φυσικών ενώσεων που παράγονται από τα όργανα των φυτών. Είναι σημαντικό ότι το μοναδικό άρωμα και άλλες βιοδραστικές ιδιότητες ενός αιθέριου ελαίου εξαρτώνται από τα χημικά του συστατικά [3].

Τα **φυτικά εκχυλίσματα** είναι πλούσιοι φορείς των αρωματικών και φαινολικών ενώσεων που προσδίδουν τη χαρακτηριστική γεύση σε συγκεκριμένα τρόφιμα. Εκτός από το ότι είναι φορείς ενώσεων πλούσιων σε γεύση, τα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμεύουν επίσης ως αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά και μπορούν να ασκήσουν θεραπευτικές ιδιότητες όπως ακριβώς και τα αιθέρια έλαια. Όπως προαναφέρθηκε, τα φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμεύουν και ως γευστικά συστατικά στα συστήματα τροφίμων έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία τις τελευταίες ημέρες λόγω της αυξημένης ζήτησης των καταναλωτών [4]. Οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δραστηριότητες των αρωματικών φυτών έχουν διερευνηθεί ευρέως και έχει βρεθεί ότι έχουν εφαρμογές στην υγεία στην πρόληψη και τη μείωση του κινδύνου ασθενειών όπως η φλεγμονή, η αθηροσκλήρωση, τα καρδιαγγειακά και ο καρκίνος. Διάφορες οικογένειες φυτών έχουν εξεταστεί σε βάθος για τη φαρμακευτική τους αξία λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Η αντιοξειδωτική δράση των αρωματικών φυτών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως οι συνθήκες ανάπτυξης και οι μέθοδοι επεξεργασίας/εκχύλισης. Οι μέθοδοι που εμπλέκονται στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς και η εκχύλιση διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο [5].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκαν χάρη στις εξαιρετικές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και θεραπευτικές τους ιδιότητες, τα αρωματικά φυτά χαμομήλι, δεντρολίβανο και βάλσαμο, καθώς και τα αιθέρια έλαια ρίγανης, δεντρολίβανου, βαλσάμου, και χαμομηλιού (καθώς και το μίγμα αυτών), προκειμένου να μελετηθούν, να αξιολογηθούν και να χρησιμοποιηθούν ως φυτικές πρόσθετες ύλες, σε πρόμιγμα ζωοτροφής. Στη συνέχεια παρουσιάζονται συνοπτικά τα αρωματικά φυτά **βάλσαμο, χαμομήλι** και **δεντρολίβανο** που επιλέχθηκαν και εκχυλίστηκαν.

2.2.1 ΡΙΓΑΝΗ

Η **ρίγανη** είναι ένα φυτό που χρησιμοποιείται ως καρύκευμα τροφίμων από τα αρχαία χρόνια. Οι καταναλωτές και οι βιομηχανίες τροφίμων προτρέπουν την ανάγκη για φυσικές εναλλακτικές λύσεις για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων. Ως απάντηση, η χρήση φυσικών ενώσεων από βότανα και μπαχαρικά είναι μια εναλλακτική λύση στα συνθετικά πρόσθετα που σχετίζονται με τοξικά προβλήματα. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης (ΟΕΟ) έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες αποτελεσματικές στην επιβράδυνση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στα λιπαρά τρόφιμα και στην εξάλειψη των ελεύθερων ριζών. Επίσης, το ΟΕΟ έχει βρεθεί ότι είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς αντιμικροβιακούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Τα πρόσθετα ζωοτροφών ρίγανης μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε δίαιτες κουνελιών ως εναλλακτική λύση σε αντιβιοτικά και άλλες ουσίες, όπως χημικά αντιοξειδωτικά και αντικοκκιδιακά [6]. Οι ενώσεις της ρίγανης μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως ενεργοποιητές του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ρίγανη είναι εγγενής στη βόρεια Ευρώπη όπου καλλιεργείται εμπορικά. Τόσο τα φρέσκα όσο και τα αποξηραμένα φύλλα του φυτού χρησιμοποιούνται ως πηγή αρώματος. Ταυτόχρονα έχει αποδειχθεί ότι έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τις ίδιες ποσότητες φρέσκου άνηθου, θυμαριού, φασκόμηλου και μαϊντανού. Γενικά, η φρέσκια ρίγανη με βάση το βάρος για το βάρος η ρίγανη έχει 42 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα μήλα, 30 φορές μεγαλύτερη από τις πατάτες, 12 φορές περισσότερο από πορτοκάλια και τέσσερις φορές περισσότερα από τα βατόμουρα. **Το πιο ενεργό συστατικό φαίνεται να είναι το ροσμαρινικό οξύ και η θυμόλη.** Ως μέτρο της αντιοξειδωτικής της δύναμης, η ρίγανη έχει επιδείξει ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από οποιοδήποτε συνθετικό αντιοξειδωτικό που συνήθως προστίθενται σε επεξεργασμένα τρόφιμα. [7].



2.2.2 ΒΑΛΣΑΜΟΧΟΡΤΟ

Το **υπερικό το διάτρητο** (*hypericum perforatum*), γνωστό και ως βάλσαμο, βαλσαμόχορτο ή σπαθόχορτο, είναι ένα ανθοφόρο πολυετές ζιζάνιο που ευδοκμεί κυρίως σε ξηρές περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας και της Β. Αφρικής. Πάνω στα χρυσοκίτρινα άνθη του, τα οποία συγκεντρώνονται στις κορυφές των βλαστών του μπορεί κανείς να δει διάσπαρτα τα μικροσκοπικά ημιδιαφανή στίγματα που δίνουν την αίσθηση πως είναι διάτρητα. Το σπαθόχορτο χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Τα ενεργά συστατικά του φυτού πιστεύεται πως είναι η **υπερικήνη** και η **υπερφορίνη**, δύο ενώσεις που συναντώνται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις ανθισμένες κορυφές του φυτού και οι οποίες πιστεύεται πως έχουν αξιοσημείωτες αντικαταθλιπτικές, αντιικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. 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 υπερικήνης και της ψευδοϋπερικήνης [8]. Επιπλέον εκτός από την αντικαταθλιπτική του δράση έχει ακόμα αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και διουρητικές ιδιότητες. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι γαστρεντερικά συμπτώματα, αλλεργικές αντιδράσεις, ζάλη, σύγχυση, ανησυχία, λήθαργος, ξηρότητα στόματος, φωτοδερματίτιδα, επίταση της φωτοτοξικής δράσης του φωτός, ιδιαίτερα στους



οφθαλμούς. Μεμονωμένες περιπτώσεις οξείας τοξικής νευροπάθειας με μανία έχουν αναφερθεί. Τα άτομα που λαμβάνουν το βότανο πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεχτικά από την υπερβολική έκθεση στο φως του ήλιου [9].

2.2.3 ΧΑΜΟΜΗΛΙ

Γνωστό από την αρχαιότητα το χαμομήλι (*Matricaria recutita*, ή *Matricaria chamomilla*) εκτιμάται για τα πολλαπλά οφέλη που παρέχει στην υγεία μας. Το όνομά του προέρχεται από το μέγεθος και το άρωμα. Αποτελεί ένα πολύ γνωστό είδος φαρμακευτικών φυτών από την οικογένεια των Asteraceae που συχνά αναφέρεται ως το «αστέρι μεταξύ των φαρμακευτικών ειδών». Στις μέρες μας είναι ένα ιδιαίτερα ευνοημένο και πολύ χρησιμοποιούμενο φαρμακευτικό φυτό στη λαϊκή και παραδοσιακή ιατρική. Οι πολυθεραπευτικές, καλλυντικές και διατροφικές του αξίες έχουν εδραιωθεί μέσα από χρόνια παραδοσιακής και επιστημονικής χρήσης και έρευνας. Το χαμομήλι έχει μια καθιερωμένη εγχώρια (ινδική) και διεθνή αγορά, η οποία αυξάνεται μέρα με τη μέρα. Το φυτό που διατίθεται στην αγορά πολλές φορές νοθεύεται και αντικαθίσταται από στενούς συγγενείς του χαμομηλιού. Αυτό το άρθρο ανασκοπεί εν συντομία τις φαρμακευτικές χρήσεις μαζί με τη βοτανική και τις τεχνικές καλλιέργειας. Δεδομένου ότι το χαμομήλι είναι μια πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων, περιλαμβάνονται λεπτομέρειες σχετικά με τα χημικά συστατικά των αιθέριων ελαίων και των φυτικών μερών καθώς και τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Επιπλέον, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη βιοχημεία, τη βιοτεχνολογία, τη ζήτηση της αγοράς και το εμπόριο του φυτού. Αυτή είναι μια προσπάθεια συλλογής και τεκμηρίωσης πληροφοριών σχετικά με διάφορες πτυχές του χαμομηλιού και να τονιστεί η ανάγκη για έρευνα και ανάπτυξη [10].



2.2.4 ΔΕΝΤΡΟΛΙΒΑΝΟ

Το δεντρολίβανο είναι ένας ξυλώδης αειθαλής θάμνος ιθαγενής στη Μεσόγειο και τώρα καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό σε όλο τον κόσμο. Τα φύλλα του έχουν τη μορφή κηρώδεις, ελαφρώς κυρτές βελόνες. Είναι αρκετά ανθεκτικό στο αλάτι και στην ξηρασία. Η επιλεκτική αναπαραγωγή στο δεντρολίβανο για αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικά είναι δύσκολη, επομένως οι καλλιεργητές έπρεπε να επιλέξουν και να συμβιβαστούν με τις καλύτερες διαθέσιμες ποικιλίες για το σκοπό τους. Ακόμα κι έτσι, το «αντιοξειδωτικό» δεντρολίβανο που καλλιεργείται στο εμπόριο έχει γενικά υψηλότερα επίπεδα σημαντικών φαινολικών ενώσεων από αυτό που καλλιεργείται στη φύση). Στη βιομηχανία τροφίμων, το αιθέριο έλαιο δεντρολίβανου έχει πολλές εφαρμογές λόγω της αντιμικροβιακής του δράσης, της αντιμυκητιακής και αντιοξειδωτικής του δράσης. Σε σύγκριση με άλλα αντιοξειδωτικά, όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη και το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο, το πτητικό έλαιο δεντρολίβανου έχει υψηλότερη θερμική αντίσταση, γεγονός που καθιστά ελκυστική τη χρήση του σε προϊόντα που υπόκεινται σε υψηλές θερμοκρασίες [11]. Οι κύριες βιοδραστηριότητες που σχετίζονται με το δεντρολίβανο είναι αντιφλεγμονώδεις, χημειοπροληπτικές, αντιπολλαπλασιαστικές, αντιμικροβιακές, προστατευτικές έναντι νευρολογικών διαταραχών καθώς και μείωση των κινδύνων που σχετίζονται με την παχυσαρκία, τον διαβήτη και το μεταβολικό σύνδρομο. Μεταξύ αυτών, δύο κύριες ομάδες συστατικών με ποικίλες πολικότητες μπορούν να βρεθούν, συγκεκριμένα, φαινολικά οξέα και φαινολικά διτερπένια. [12]



2.3 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Με τον όρο **βιοενεργά** ή **βιοδραστικά** συστατικά εννοούμε τα συστατικά εκείνα των τροφίμων για τα οποία υπάρχουν επαρκώς τεκμηριωμένα επιστημονικά δεδομένα ότι μπορούν να επιτελέσουν μια συγκεκριμένη λειτουργία εντός του οργανισμού. Πρόκειται για ουσίες που βρίσκονται σε συμβατικά τρόφιμα και που αποδεικνύεται από μελέτες με ζώα, κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες ότι συμβάλλουν στη βελτίωση της υγείας μέσω της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών ή της βελτίωσης της λειτουργίας των συστημάτων του οργανισμού. Τέτοιες ουσίες αποτελούν τα γνωστά μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά (βιταμίνες, λιπαρά οξέα κ.ά.) ή οι φυτοχημικές ουσίες, οι πολυφαινόλες, οι ταννίνες κ.ά. Τα βιοενεργά συστατικά βρίσκονται σε πληθώρα συμβατικών φυτικών και ζωικών λειτουργικών τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί σύγχρονες τεχνολογίες απομόνωσης και ενσωμάτωσης πολλών βιοενεργών συστατικών κάποιων τροφίμων εντός άλλων τροφίμων στα οποία δεν βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες. 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 σημαντικά τις ευεργετικές ιδιότητες αυτών των προϊόντων [13].

2.3.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ-ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Τα **φαινολικά οξέα** είναι αρωματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, ευρέως διαδεδομένοι σε όλο το φυτικό βασίλειο. Οι υπάρχουσες αναλυτικές μέθοδοι για τα φαινολικά οξέα προήλθαν από το ενδιαφέρον για τους βιολογικούς τους ρόλους ως δευτερογενείς μεταβολίτες και από το ρόλο τους στην ποιότητα των τροφίμων και τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες [14]. Οι φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φυτοχημικών που συνδέονται με το στρες, έχουν συσχετιστεί με ευνοϊκές επιπτώσεις, οι οποίες προκαλούνται από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, ιδιαίτερα λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η εμφάνιση και οι λανθάνουσες χρήσεις των φαινολικών ενώσεων σε φυτά και αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα με. Οι φυτικές πολυφαινόλες ως διατροφικά αντιοξειδωτικά στην ανθρώπινη υγεία και ασθένειες έχουν την δυνατότητα να προστατεύουν από την οξειδωτική βλάβη. Ως φυσικά αντιοξειδωτικά, οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε αφθονία σε φυτικές τροφές και ποτά, τα οποία παίζουν ζωτικούς ρόλους στην τροφή και στην υγειονομική περίθαλψη. Ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις είναι οι πιο πλούσιες στη συνηθισμένη ανθρώπινη δίαιτα μεταξύ των διαιτητικών αντιοξειδωτικών. Πρόσφατα, οι φαινολικές ενώσεις έχουν αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον με βάση τις ενεργές αναφορές για το εικαστικό ρόλο τους στην αναχαίτιση μιας ποικιλίας ανθρώπινων ασθενειών. Είναι γνωστό ότι τα φρέσκα και επεξεργασμένα φρούτα που καταναλώνονται κανονικά, για παράδειγμα τα σμέουρα, τα κράνμπερι, τα μήλα, τα σταφύλια, τα αχλάδια και οι μαρμελάδες, είναι οι κύριες πηγές φαινολικών ενώσεων και οι φράουλες και τα παράγωγά τους προϊόντα, όπως οι χυμοί. Αυτή η ανασκόπηση επικεντρώνεται στην παρούσα κατανόηση της πιθανής αποτελεσματικότητας των πολυφαινολών στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και την ομοιοστάση της γλυκόζης, η οποία έχει μελετηθεί αξιόπαινα *in vitro*, ορισμένα κλινικά πειράματα και ζωικά μοντέλα [15]. Οι **πολυφαινόλες** έχουν χημειοπροστατευτική δράση. Κύρια ιδιότητα τους ως προς τη χημική δομή τους είναι ότι περιέχουν μία ή περισσότερες φαινολικές ομάδες. Στις πολυφαινόλες ανήκουν ενώσεις που έχουν απλή φαινολική δομή, καθώς επίσης και ενώσεις που έχουν πολύπλοκότερη δομή και αποτελούνται από πολλές και διαφορετικές χημικές ομάδες (π.χ ταννίνες). Πολυφαινόλες, που υπάρχουν σε ένα ευρύ

φάσμα φυτών, θεωρείται ότι είναι υπεύθυνα για πολλές ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία, όπως ένα αντικαταθλιπτικό φάρμακο. Εκτός από αυτόπολυφαινόλες μπορούν να απορροφηθούν απευθείας στο λεπτό έντερο, τα περισσότερα από αυτά έχουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και φτάνουν στο παχύ έντερο χωρίς καμία τροποποίηση λόγω των πολύπλοκων δομών τους. Η αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβιακών κοινοτήτων και πολυφαινόλες στο έντερο αποτελεί σημαντικό για το τελευταίο να ασκεί αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα. Η μικροχλωρίδα του εντέρου μπορεί να βελτιώσει τη βιοδιαθεσιμότητα του. Οι πολυφαινόλες με τη σειρά τους, μπορούν να διατηρήσουν τον εντερικό φραγμό καθώς και την κοινότητα της μικροχλωρίδας του εντέρου σε φυσιολογική κατάσταση. Επιπλέον, τα μικρόβια του εντέρου καταβολίζονται πολυφαινόλες σε πιο ενεργούς, καλύτερα απορροφούμενους μεταβολίτες, βελτιώνοντας περαιτέρω την κατάθλιψη μέσω του άξονα μικροβίου-εντέρου-εγκεφάλου (MGB). Με βάση αυτά τα στοιχεία, η ανασκόπηση απεικονίζει τον πιθανό ρόλο της μικροχλωρίδας του εντέρου στις διαδικασίες πολυφαινόλες ή τους μεταβολίτες τους που δρουν ως αντικαταθλιπτικά και περαιτέρω οραματίζεται τη μικροχλωρίδα του εντέρου ως θεραπευτικούς στόχους για την κατάθλιψη [16]

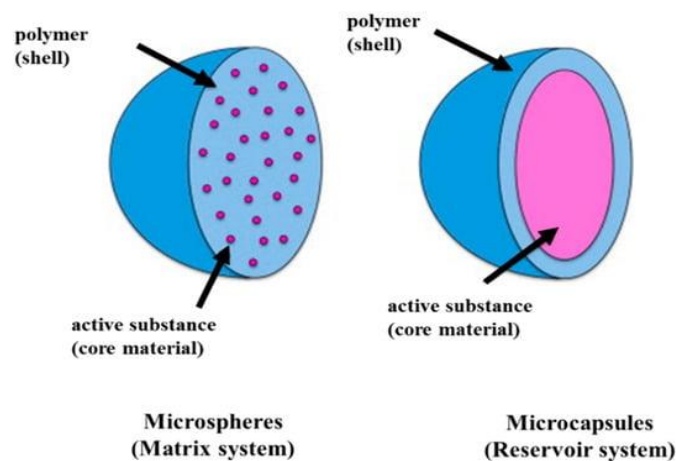
2.4 ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές για περίπου 50 χρόνια από τότε που ανακαλύφθηκαν όχι μόνο ως αντιμικροβιακός παράγοντας, αλλά και ως παράγοντας που προάγει την ανάπτυξη και βελτιώνει την απόδοση των ζωοτροφών. Ωστόσο η χρήση τους στις ζωοτροφές ενέχει και κινδύνους. Πιο συγκεκριμένα, αφού τα ζώα έχουν τραφεί με αντιβιοτικά για κάποιο χρονικό διάστημα, διατηρούν τα στελέχη των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Αυτά τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται στο ζώο. Μέσω της αλληλεπίδρασης, τα ανθεκτικά βακτήρια μεταδίδονται στα άλλα ζώα, σχηματίζοντας έτσι έναν αποικισμό βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Τα βακτήρια ευδοκιμούν στην εντερική χλωρίδα του ζώου, καθώς και στους μυς. Για αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια, εφαρμόζεται η **χρήση των βιοδραστικών συστατικών** στις ζωοτροφές προκειμένου να αποφευχθούν τα φαινόμενα που προαναφέρθηκαν παραπάνω [17]. Τα βιοδραστικά συστατικά, λοιπόν, παρέχουν ορισμένα φυσιολογικά οφέλη, τα οποία κατευθύνουν τη βιομηχανία τροφίμων να επικεντρώσει την έρευνά της σε προϊόντα αυτής της φύσης. Οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή και τα πεπτίδια είναι οι πιο μελετημένες βιοδραστικές ενώσεις. Βιοενεργά συστατικά, όπως χιτοζάνη, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ασταξανθίνη από θαλάσσια ζώα και τοκοφερόλες ελαίων φυτικής προέλευσης έχουν εξαιρετικές δυνατότητες ως λειτουργικά συστατικά τροφίμων, αφού έχουν οφέλη για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Με την προσθήκη βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα, πολλοί παράγοντες εμπλέκονται στη βιοδιαθεσιμότητά τους, μεταξύ των οποίων είναι τα συστατικά της μήτρας που μπορούν είτε να βοηθήσουν είτε να επηρεάσουν, τη συγκέντρωση του βιοδραστικού, τη διαδικασία παραγωγής τροφίμων και τις συνθήκες στις οποίες θα αποθηκευτεί το προϊόν. Ως εκ τούτου, μια δίαιτα που περιέχει βιοενεργά συστατικά είναι εξαιρετικά σημαντική και αποτελεί έναν τομέα πρόκλησης σήμερα, προκειμένου να βελτιωθεί η υγεία και η ποιότητα ζωής του ανθρώπου αλλά και των ζώων [18]

2.5 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Η αξιοποίηση των βιοδραστικών συστατικών αποτελεί μείζον ζήτημα εξαιτίας της πολύ ευαίσθητης φύσης τους στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό η **ενθυλάκωση** εισήχθη ως μια αποτελεσματική και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση και ειδικότερα ως μια

διαδικασία παγίδευσης ενεργών παραγόντων μέσα σε ένα υλικό φορέα και είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη βελτίωση της παροχής βιοδραστικών μορίων και ζωντανών κυττάρων στα τρόφιμα. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό του προστατευτικού κελύφους των ενθυλακωμάτων πρέπει να είναι κατάλληλα για τρόφιμα, βιοαποδομήσιμα και ικανά να σχηματίζουν ένα φράγμα μεταξύ της εσωτερικής φάσης και του περιβάλλοντος χώρου. Τα συστήματα ενθυλάκωσης έχουν αναπτυχθεί ταχέως και ευρέως και προσέλκυσαν μεγάλη προσοχή λόγω των ειδικών πλεονεκτημάτων τους, όπως η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και της διαλυτότητας των βιοδραστικών συστατικών καθώς και ενίσχυση του χρόνου παραμονής τους στο γαστρεντερικό σωλήνα, της ικανότητας εισόδου και διείσδυσης σε ζωντανούς ιστούς και κύτταρα λόγω των μεγεθών τους σε νανοκλίμακα και η επίτευξη υψηλότερης σταθερότητας στις σκληρές συνθήκες των περιοχών του γαστρεντερικού σωλήνα [19]. 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 ένα συστατικό (ουσία) ή ένα μίγμα ουσιών ενσωματώνεται σε ένα άλλο υλικό (μήτρα), το οποίο αποτελεί το μέσο ή φορέα εγκλεισμού. Η **ενθυλάκωση** είναι η διαδικασία σταθεροποίησης ενεργών ενώσεων μέσω της δόμησης



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση μικροσφαιρών και μικροκάψουλων [20]

συστημάτων ικανών να διατηρούν τις χημικές, φυσικές και βιολογικές τους ιδιότητες, καθώς και την απελευθέρωση ή την απελευθέρωσή τους υπό καθιερωμένες ή επιθυμητές συνθήκες. Είναι πολύ γνωστό ότι τα φυσικά φυτά, τα βότανα και τα υλικά διατροφής έχουν πολύτιμες ενώσεις και έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για διάφορες εφαρμογές, όπως στη θεραπεία ασθενειών όπως ο καρκίνος. Ως εναλλακτική λύση στα συνθετικά συντηρητικά και αρωματικούς παράγοντες έχει χρησιμοποιηθεί από την αρχή της ιατρικής για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών ή στις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων ως εναλλακτική λύση στα συνθετικά συντηρητικά και αρωματικούς παράγοντες. Ωστόσο, αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις υποβάλλονται σε αποικοδόμηση με περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία και η υγρασία. Επομένως, είναι απαραίτητο να εξαχθούν και να αποθηκεύονται αυτές οι πολύτιμες ενώσεις. Η ενθυλάκωση είναι ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος διατήρησης αυτών των δραστικών ενώσεων. Στη διαδικασία της ενθυλάκωσης, είτε ένα είτε το μίγμα βιοδραστικού υλικού επικαλύπτεται με ένα άλλο απλό ή συνδυασμό υλικών. Στην ενθυλάκωση, δύο κύριες ορολογίες χρησιμοποιούνται συχνά το υλικό που

επικαλύπτεται ονομάζεται ενεργό υλικό ή υλικό πυρήνα, και ένα άλλο είναι το υλικό κελύφους που ονομάζεται επίσης υλικό φορέα (κέλυφος). Το υλικό του κελύφους μπορεί να έχει τη μορφή στερεών, υγρών σταγονιδίων και φυσαλίδων αερίου για να εγκλωβίσει υγρό ή αέριο μέσα ως πυρήνα. Ο πυρήνας και η δομή του κελύφους μπορεί να έχουν διάφορα σχήματα όπως η σφαίρα, οι μικροκάψουλες, τα μικροσφαιρίδια, τα μονοπύρηνα, τα πολυπύρηνα, τα μήτρα και τα πολλαπλά κελύφη. Ο πυρήνας και το υλικό του κελύφους της ενθυλάκωσης ποικίλλουν ανάλογα με τις εφαρμογές και διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, για παράδειγμα, τα υλικά πυρήνα που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα είναι αιθέρια έλαια (που ενεργούν ως συντηρητικό και γευστικός παράγοντας) και τα υλικά του κελύφους είναι πρωτεΐνη ορού γάλακτος, αραβικό κόμμι, μαλτοδεξτρίνη, και λοιπά [21].

2.5.1 ΦΟΡΕΑΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Η ενθυλάκωση είναι μία από τις καλύτερες μεθόδους για την παράταση της διάρκειας ζωής αυτών των βιοδραστικών συστατικών. Η επιλογή υλικών ενθυλάκωσης ή αλλιώς φορέων εγκλεισμού είναι μείζονος σημασίας. Τα συστήματα νανοφορέων εγκλεισμού (μήτρα) έχουν αναπτυχθεί γρήγορα και ευρέως και προσέλκυσαν μεγάλη προσοχή λόγω των ειδικών πλεονεκτημάτων τους, όπως η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και της διαλυτότητας των βιοδραστικών συστατικών καθώς και η ενίσχυση του χρόνου παραμονής τους στο γαστρεντερικό σωλήνα, της ικανότητας εισόδου και διείσδυσης σε ζωντανούς ιστούς και κύτταρα λόγω των μεγεθών τους σε νανοκλίμακα και υψηλότερη σταθερότητα στις σκληρές συνθήκες των περιοχών του γαστρεντερικού σωλήνα. Διαφορετικοί τύποι βιοπολυμερών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων πολυσακχαριτών, λιπιδίων, πρωτεϊνών και συζυγών τους έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος νανοφορέων ενθυλάκωσης για την προστασία, την παγίδευση, την ενθυλάκωση και την ελεγχόμενη παροχή βιοδραστικών ενώσεων και θρεπτικών ουσιών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, λοιπόν, 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 oil-mix [22].

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

Πρόσφατα, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν αναγνωρισθεί ως αποτελεσματικά υλικά τοιχώματος για την ενθυλάκωση δραστικών ενώσεων εκτός από τη χρήση τους ως λειτουργικά συστατικά σε μια ποικιλία προϊόντων διατροφής λόγω των ανώτερων πηκτωματικών, γαλακτωματοποιητικών και θρεπτικών ιδιοτήτων τους. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών που είναι διαφανείς, εύκαμπτες και άοσμες και αυξάνουν τη διάρκεια ζωής και τη θρεπτική αξία των τροφίμων. Αν και οι πρωτεϊνικές μεμβράνες έχουν σχετικά φτωχούς φραγμούς υδρατμών, λόγω των υδρόφιλων αμινοξέων στη δομή τους, έχουν εξαιρετικές ιδιότητες φραγμού αερίων σε χαμηλή και ενδιάμεση σχετική υγρασία και αδιαλυτότητα στο νερό εάν τα συστατικά πρωτεΐνης στη μήτρα είναι μετουσιωμένα. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος καλές υποψήφιες για την ανάπτυξη βιοαποδομήσιμων δομών νανοϊνών. 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 [23]. Η πουλλουλάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που χαρακτηρίζεται από την υδατοδιαλυτότητα

του και τις εξαιρετικές του ιδιότητες σχηματισμού φιλμ. Ένα πλεονέκτημα της χρήσης της πουλλουλάνης ως υλικού συσκευασίας είναι η βιοαποδόμησή της, η θερμική σταθερότητα της, η ελαστικότητα και οι ιδιότητες υψηλού φραγμού έναντι του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα. Επιπλέον, οι επικαλύψεις με βάση την πουλλουλάνη δεν έχουν γεύση ή άρωμα και είναι άχρωμες και γυαλιστερές. Συμπερασματικά λοιπόν, στη παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε ως μήτρα για την ενθυλάκωση oil-mix 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 oil-mix.[24]

2.5.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

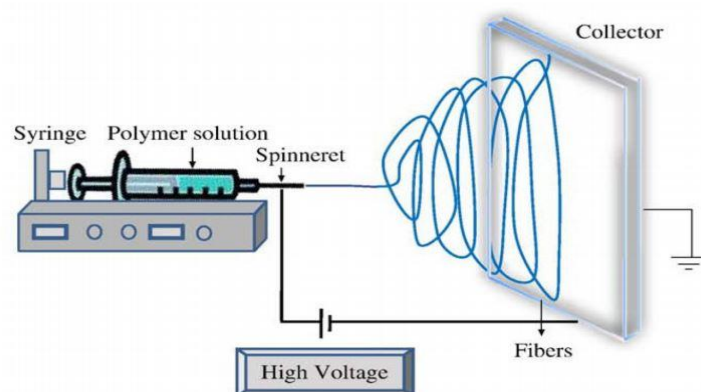
Οι διεργασίες ενθυλάκωσης λειτουργικών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι οι παρακάτω:

- Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία (Electrospinning)
- Ξήρανση με εκνέφωση (Spray Drying)
- Ξήρανση με κατάψυξη (Freeze Drying)
- Φυγοκεντρική Εκβολή (Extrusion)

2.5.2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΪΔΡΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ (electrospinning)

Η νανοτεχνολογία είναι η μελέτη και ανάπτυξη υλικών σε νανοεπίπεδα. Είναι ένας από τους ταχέως αναπτυσσόμενους επιστημονικούς κλάδους λόγω των τεράστιων δυνατοτήτων του στη δημιουργία νέων υλικών που έχουν προηγμένες εφαρμογές. Αυτή η τεχνολογία έχει επηρεάσει τρομερά πολλούς διαφορετικούς κλάδους της επιστήμης και της μηχανικής, όπως η ηλεκτρονική, η επιστήμη των υλικών και η μηχανική πολυμερών. Σε σύγκριση με άλλες διαδικασίες κατασκευής νανοϊνών, η ηλεκτροϊνοποίηση είναι ευέλικτη και ανώτερη στην παραγωγή και κατασκευή παραγγελλθέντων ή πιο περίπλοκων νανοϊνωδών συγκροτημάτων. Εκτός από τις παραδοσιακές δισδιάστατες (2D) νανοϊνώδεις δομές, η ηλεκτροϊνοποίηση είναι ισχυρή στην κατασκευή τρισδιάστατων (3D) ινωδών μακροδομών, ειδικά για εφαρμογές μηχανικής ιστών [25]. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι η διαδικασία ηλεκτροϊνοποίησης είναι ικανή να παράγει ίνες στην περιοχή υπομικρών. Η ηλεκτρονηματοποίηση έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή την τελευταία δεκαετία όχι μόνο λόγω της ευελιξίας της στην κλώση μιας μεγάλης ποικιλίας πολυμερικών ινών αλλά και λόγω της συνέπειας της στην παραγωγή ινών στην περιοχή υπομικρών. Στη βιβλιογραφία που σχετίζεται με την επιστήμη των ινών, οι ίνες με διάμετρο κάτω των 100 nm ταξινομούνται γενικά ως νανοϊνες. Αυτές οι ίνες, με μικρότερους πόρους και μεγαλύτερη επιφάνεια από τις κανονικές ίνες, έχουν τεράστιες εφαρμογές στη νανοκατάλυση, σε ικριώματα ιστού, προστατευτικά ρούχα, φιλτράρισμα και οπτικά ηλεκτρονικά. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιεί ένα ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης για να παράγει ηλεκτρικά φορτισμένους πίδακες από διάλυμα πολυμερούς ή τήγματα, τα οποία κατά την ξήρανση μέσω της εξάτμισης του διαλύτη παράγουν νανοϊνες. Οι πολύ φορτισμένες ίνες κατευθύνονται πεδίου προς τον αντίθετα φορτισμένο συλλέκτη, ο οποίος μπορεί να είναι μια επίπεδη επιφάνεια ή ένα περιστρεφόμενο τύμπανο, για τη συλλογή των ινών. Στις συνήθεις συμβατικές τεχνικές κλώσης, η ίνα υποβάλλεται σε μια ομάδα δυνάμεων εφελκυσμού, βαρύτητας, αεροδυναμικής, ρεολογικής και αδρανειακής δύναμης. Στην ηλεκτροϊνοποίηση, η περιδίνηση των ινών επιτυγχάνεται κυρίως από τις δυνάμεις εφελκυσμού που δημιουργούνται στην αξονική κατεύθυνση της ροής του πολυμερούς από τα επαγόμενα

φορτία παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροϊνοποίηση είναι μια μοναδική προσέγγιση που χρησιμοποιεί ηλεκτροστατικές δυνάμεις για να παραχθούν λεπτές ίνες. Οι ηλεκτροστατικοί κατακρημνιστές και οι ψεκασθήρες φυτοφαρμάκων είναι μερικές από τις πολύ γνωστές εφαρμογές που λειτουργούν παρόμοια με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης. Η παραγωγή ινών με χρήση ηλεκτροστατικών δυνάμεων έχει προκαλέσει τη λάμψη και την προσοχή λόγω της δυνατότητάς της να σχηματίζει λεπτές ίνες. Οι ηλεκτροκίνητες ίνες έχουν μικρό μέγεθος πόρων και μεγάλη επιφάνεια. Υπάρχουν επίσης στοιχεία για σημαντικά στατικά φορτία σε ηλεκτροϊνοποιημένες ίνες που θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά για την παραγωγή τρισδιάστατων δομών. Η ηλεκτροϊνοποίηση είναι μια διαδικασία με την οποία ένα διάλυμα ή τήγμα πολυμερούς μπορεί να περιδινηθεί σε ίνες μικρότερης διαμέτρου χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρικό πεδίο υψηλού δυναμικού. Αυτή η γενική περιγραφή είναι κατάλληλη καθώς καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ινών με διάμετρο υπομικρών που παράγονται συνήθως με ηλεκτροϊνοποίηση. Η μέση διάμετρος των ινών με ηλεκτροϊνοποίηση κυμαίνεται από 100 nm έως 500 nm. Στην επιστημονική βιβλιογραφία που σχετίζεται με την επιστήμη της κλωστοϋφαντουργίας και των ινών, οι ίνες με διάμετρο στην περιοχή 100 nm–500 nm αναφέρονται γενικά ως νανοϊνες. Τα πλεονεκτήματα της διαδικασίας ηλεκτροϊνοποίησης είναι η τεχνική απλότητα και η εύκολη προσαρμοστικότητά της. Η συσκευή που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροϊνοποίηση είναι απλή στην κατασκευή και αποτελείται από μια ηλεκτρική πηγή υψηλής τάσης με θετική ή αρνητική πολικότητα, μια αντλία σύριγγας με τριχοειδή αγγεία ή σωλήνες για τη μεταφορά του διαλύματος από τη σύριγγα ή την πιπέτα στην κλωστήρα και έναν αγωγίμο συλλέκτη όπως το αλουμίνιο. Ο συλλέκτης μπορεί να κατασκευαστεί από οποιοδήποτε σχήμα σύμφωνα με τις απαιτήσεις, όπως μια επίπεδη πλάκα, περιστρεφόμενο τύμπανο και λοιπά. Το διάλυμα πολυμερούς ή το τήγμα που πρέπει να περιδινηθεί εξαναγκάζεται μέσω μιας αντλίας σύριγγας για να σχηματίσει μια κρεμαστή σταγόνα του πολυμερούς στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα. Δυναμικό υψηλής τάσης εφαρμόζεται στο διάλυμα πολυμερούς μέσα στη σύριγγα μέσω ενός βυθισμένου ηλεκτροδίου, επάγοντας έτσι ελεύθερα φορτία στο διάλυμα πολυμερούς. Αυτά τα φορτισμένα ιόντα κινούνται ως απόκριση στο εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο προς το ηλεκτρόδιο αντίθετης πολικότητας, μεταφέροντας έτσι δυνάμεις εφελκυσμού στο πολυμερές υγρό. Στην άκρη του τριχοειδούς, η κρεμαστά ημισφαιρική σταγόνα πολυμερούς παίρνει έναν κώνο προβολής παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Και, όταν το εφαρμοζόμενο δυναμικό φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή που απαιτείται για να ξεπεραστεί η επιφανειακή τάση του υγρού, ένας πίδακας υγρού εκτοξεύεται από το άκρο του κώνου.



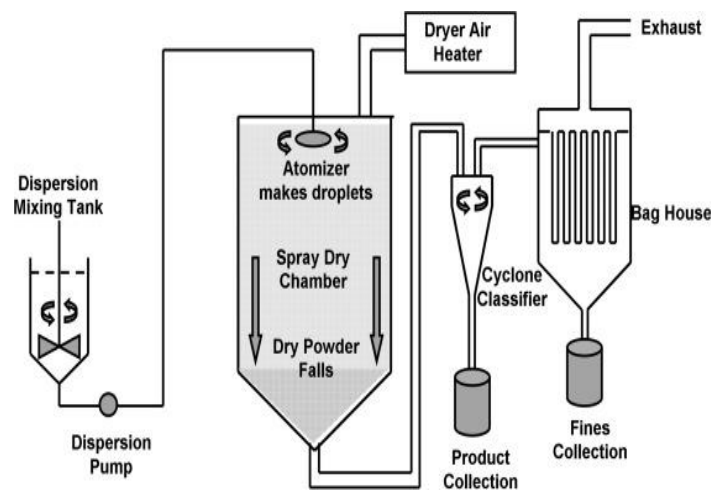
Εικόνα 2.2: Προσομοίωση ηλεκτροϊνοποίησης

Οι περισσότεροι φορείς φορτίου σε οργανικούς διαλύτες και πολυμερή έχουν χαμηλότερη κινητικότητα, και ως εκ τούτου το φορτίο αναμένεται να μετακινηθεί μέσω του υγρού για μεγαλύτερες αποστάσεις μόνο εάν του δοθεί αρκετός χρόνος. Μετά την εκκίνηση από τον κώνο, ο πίδακας υφίσταται μια χαοτική κίνηση ή αστάθεια κάμψης και κατευθύνεται πεδίου προς τον αντίθετα φορτισμένο συλλέκτη, ο οποίος συλλέγει τις φορτισμένες ίνες. Καθώς ο πίδακας ταξιδεύει στην ατμόσφαιρα, ο διαλύτης εξατμίζεται, αφήνοντας πίσω του μια ξηρή ίνα στη συσκευή συλλογής. Για διαλύματα χαμηλού ιξώδους, ο πίδακας διασπάται σε σταγονίδια, ενώ για διαλύματα υψηλού ιξώδους ταξιδεύει στον συλλέκτη ως πίδακες ινών. παραγωγή νανοϊνών με τη διαδικασία ηλεκτροϊνοποίησης επηρεάζεται τόσο από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις όσο και από την ιξωδοελαστική συμπεριφορά του πολυμερούς. Οι παράμετροι διεργασίας, όπως ο ρυθμός τροφοδοσίας διαλύματος, η εφαρμοζόμενη τάση, η απόσταση ακροφυσίου-συλλέκτη και το περιβάλλον περιδίνησης, και οι ιδιότητες του υλικού, όπως η συγκέντρωση διαλύματος, το ιξώδες, η επιφανειακή τάση, η αγωγιμότητα και η πίεση ατμών διαλύτη, επηρεάζουν τη δομή και τις ιδιότητες των ηλεκτροϊνοποιημένων νανοϊνών. Πιο συγκεκριμένα, ποικίλοι τρόποι αστάθειας που εμφανίζονται κατά τη διαδικασία σχηματισμού ινών αναμένεται να προκύψουν από τη συνδυασμένη επίδραση τόσο του ηλεκτροστατικού πεδίου όσο και των ιδιοτήτων του υλικού του πολυμερούς. Έχει προταθεί ότι η έναρξη διαφορετικών τρόπων αστάθειας στη διαδικασία ηλεκτροϊνοποίησης εξαρτάται από το σχήμα της επιφάνειας εκκίνησης του πίδακα και τον βαθμό αστάθειας, που ουσιαστικά προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία των ινών. Στην ηλεκτροϊνοποίηση, η μεταφορά φορτίου λόγω της εφαρμοζόμενης τάσης οφείλεται κυρίως στη ροή του πίδακα πολυμερούς προς τον συλλέκτη και η αύξηση ή μείωση του ρεύματος αποδίδεται στη ροή μάζας του πολυμερούς από το άκρο του ακροφυσίου. Επιστήμονες έχουν συμπεράνει ότι η αλλαγή στο ρεύμα περιστροφής σχετίζεται με την αλλαγή στη λειτουργία αστάθειας. Έδειξαν πειραματικά ότι μια αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης προκαλεί αλλαγή στο σχήμα του σημείου εκκίνησης του πίδακα, και ως εκ τούτου στη δομή και τη μορφολογία των ινών. Ακόμα, η δομή και η μορφολογία των ηλεκτροϊνοποιημένων ινών επηρεάζεται εύκολα από την απόσταση του ακροφυσίου από τον συλλέκτη λόγω της εξάρτησής τους από τον χρόνο εναπόθεσης, τον ρυθμό εξάτμισης και το διάστημα κτυπήματος ή αστάθειας. Μελετήθηκαν οι μορφολογικές αλλαγές στις ίνες με διακυμάνσεις στην απόσταση μεταξύ του ακροφυσίου και της οθόνης συλλέκτη και αποδείχθηκε ότι ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του διαλύματος, μικρότερη απόσταση ακροφυσίου-συλλέκτη παράγει υγρές ίνες και δομές με σφαιρίδια. Η μορφολογία των ινών άλλαξε από στρογγυλό σε επίπεδο σχήμα με μείωση της απόστασης συλλέκτη ακροφυσίων από 2 cm σε 0,5 cm. Αυτό το αποτέλεσμα εκφράζει την επίδραση της απόστασης συλλέκτη ακροφυσίων στη μορφολογία των ινών. Καθώς η ηλεκτροϊνοποίηση περιλαμβάνει ταχεία εξάτμιση διαλύτη και διαχωρισμούς φάσεων λόγω της αραίωσης με πίδακα, η πίεση ατμών διαλύτη καθορίζει κρίσιμο τον ρυθμό εξάτμισης και τον χρόνο στεγνώματος. Επιπλέον, η πτητικότητα των διαλυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό νανοδομών επηρεάζοντας τη διαδικασία διαχωρισμού φάσεων [26].

2.5.2.2 ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΕΚΝΕΦΩΣΗ (SPRAY DRYING)

Η διαδικασία ξήρανσης με ψεκασμό θεωρείται μια συμβατική μέθοδος για τη μετατροπή υγρών σε σκόνες με κάποια αλλά σε αποδεκτό επίπεδο αποικοδόμησης και οξειδωσης πτητικών ενώσεων. Η ξήρανση με ψεκασμό βασίζεται στην παρασκευή, ομογενοποίηση, ψεκασμό, διασπορά και στη συνέχεια αφυδάτωση του διαλύματος. Η εναπόθεση στον τοίχο είναι ένα βασικό πρόβλημα επεξεργασίας στα σωματίδια του στεγνωτηρίου ψεκασμού που

επηρεάζει έμμεσα την ποιότητα και την ποσότητα του προϊόντος. Η ξήρανση με ψεκάσμο είναι μια διαδικασία που μετατρέπει την πρώτη ύλη από μια ρευστή κατάσταση σε μια μορφή ξηρού σωματιδίου ψεκάζοντας την τροφοδοσία σε ένα θερμό μέσο ξήρανσης. Η τροφοδοσία μπορεί να είναι είτε σε μορφή διαλύματος, εναιωρήματος, γαλακτώματος ή πάστας. Οι ιδιότητες του αποξηραμένου προϊόντος εξαρτώνται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της τροφοδοσίας και του σχεδιασμού του στεγνωτηρίου και της λειτουργίας. Τα οφέλη της τεχνικής ξήρανσης με ψεκάσμο περιλαμβάνουν την ικανότητα παραγωγής σκονών συγκεκριμένου μεγέθους σωματιδίων και περιεκτικότητας σε υγρασία, ανεξάρτητα από την ικανότητα του στεγνωτηρίου. Είναι μια συνεχής και εύκολη λειτουργία, η οποία ελέγχεται πλήρως αυτόματα με γρήγορο χρόνο απόκρισης και μπορεί επίσης να εφαρμοστεί τόσο σε θερμοευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στη θερμότητα υλικά. Ο μηχανισμός ξήρανσης με ψεκάσμο βασίζεται στην εξάλειψη της υγρασίας χρησιμοποιώντας για αυτό μια θερμαινόμενη ατμόσφαιρα στην οποία υποβάλλεται το προϊόν τροφοδοσίας. Η διαδικασία μπορεί να περιγραφεί από τρεις κύριες φάσεις (ατομοποίηση, μετατροπή σταγονιδίων σε σωματίδιο και συλλογή σωματιδίων).



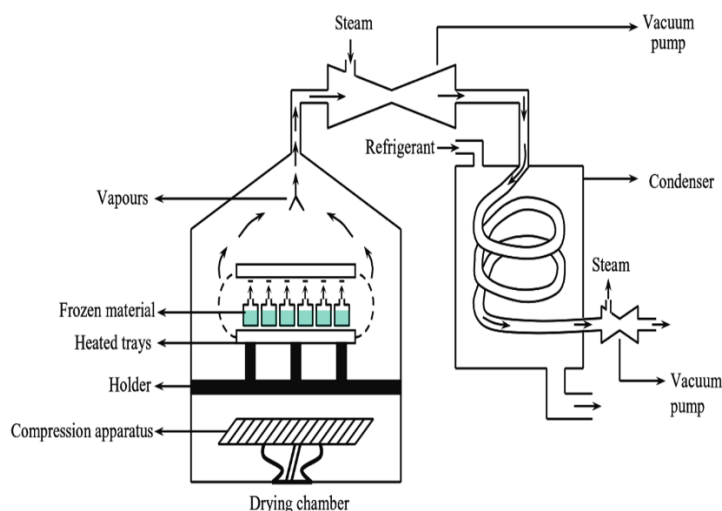
Εικόνα 2.3: Προσομοίωση ξήρανσης με ψεκάσμο

Στο πλαίσιο της ατομοποίησης η διαδικασία ξήρανσης με ψεκάσμο ξεκινά με τον ψεκάσμο του διαλύματος τροφοδοσίας σε μικρά σταγονίδια λόγω μείωσης της επιφανειακής τάσης. Αυτό θεωρείται ένα κρίσιμο βήμα για τις επόμενες φάσεις, ειδικά κατά την έκθεση του θαλάμου ξήρανσης. Στην πραγματικότητα, η διάσπαση του αρχικού διαλύματος σε πολλά σταγονίδια αυξάνει την επιφάνεια τους, βελτιστοποιώντας επομένως τη μεταφορά θερμότητας και μάζας μεταξύ του θερμαινόμενου αερίου ξήρανσης και των υγρών σωματιδίων. Με άλλα λόγια, αυτό συγκεντρώνει τις ιδανικές συνθήκες για την εξάτμιση, η οποία θα είναι κυρίαρχη για το σχηματισμό ξηρών σωματιδίων. Η θεμελιώδης αρχή ή θεωρία πίσω από τη διαδικασία μετασχηματισμού ψεκασμού βασίζεται στο φαινόμενο της αποσύνθεσης του υγρού. Μετά τον ψεκάσμο, ο μηχανισμός ξήρανσης με ψεκάσμο προχωρά στη φάση σχηματισμού σωματιδίων, ένα κρίσιμο στάδιο που χαρακτηρίζεται από δύο γεγονότα: επαφή με αέρα με ψεκάσμο και στάδιο ξήρανσης σταγονιδίων, με αποτέλεσμα, στο σύνολό του, την απομάκρυνση της περιεκτικότητας των σταγονιδίων σε διαλύτη και κατά συνέπεια μετατροπή τους σε αποξηραμένα σωματίδια. [27]

2.5.2.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΚΑΤΑΨΥΞΗ (FREEZE DRYING)

Η ξήρανση με κατάψυξη, γνωστή και ως λυοφιλοποίηση, είναι μια διαδικασία κατά την οποία το νερό με τη μορφή πάγου υπό χαμηλή πίεση απομακρύνεται από ένα υλικό με εξάχνωση. Αυτή η διαδικασία έχει βρει πολλές εφαρμογές για την παραγωγή τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Λυοφιλοποίηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το νερό εξαχνώνεται με την άμεση μεταβολή του νερού από στερεό (πάγο) σε ατμό, παραλείποντας έτσι την υγρή κατάσταση και στη συνέχεια εκροφώντας νερό από το ξηρό στρώμα. Χρησιμοποιείται ευρέως για τη σταθεροποίηση τροφίμων υψηλής ποιότητας, βιολογικών υλικών και φαρμακευτικών προϊόντων, όπως πρωτεΐνες, εμβόλια, βακτήρια και κύτταρα θηλαστικών. Στη διαδικασία, η ποιότητα του αποξηραμένου προϊόντος (βιολογικές, θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες) διατηρείται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η κατάψυξη του νερού στο υλικό πριν από τη λυοφιλοποίηση αναστέλλει σε πολύ σημαντικό βαθμό χημικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές διεργασίες. Η λυοφιλοποίηση είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη διεργασία και αποτελείται από τα εξής επιμέρους στάδια:

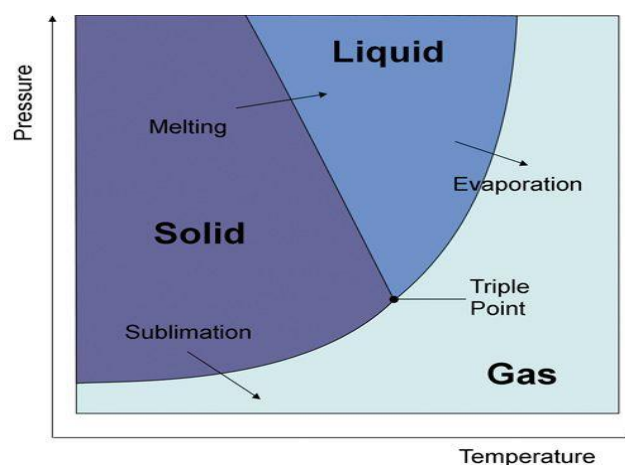
1. Η κατάψυξη του προϊόντος, τις περισσότερες φορές υπό ατμοσφαιρική πίεση.
2. Πρωτογενής ξήρανση - σωστή λυοφιλίωση - εξάχνωση πάγου, πιο συχνά σε μειωμένη πίεση.
3. Δευτερεύουσα ξήρανση—ξήρανση με εκρόφηση—ξήρανση του προϊόντος στην απαιτούμενη τελική υγρασία.



Εικόνα 2.4: Προσομοίωση ξήρανσης με κατάψυξη

Οι παράμετροι της διαδικασίας και οι άλλες συνθήκες της πορείας της συχνά ρυθμίζονται έτσι ώστε ο χρόνος της να ελαχιστοποιείται όσο το δυνατόν περισσότερο. Η ρύθμιση παραμέτρων για την επιτάχυνση της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση των ιδιοτήτων του προϊόντος. Για παράδειγμα, η αύξηση της θερμοκρασίας στο ράφι μπορεί να οδηγήσει σε απόψυξη του προϊόντος και κατάρρευση της δομής ή σε θερμική υποβάθμιση των ευαίσθητων στη θερμότητα συστατικών τροφίμων. Οι συνθήκες της διαδικασίας λυοφιλοποίησης πρέπει να επιλέγονται με τρόπο που να μην λιώνει το νερό. Το υγρό νερό είναι το μέσο αντίδρασης και αλλάζει τις ρεολογικές ιδιότητες του προϊόντος. Η παρουσία υγρού νερού είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης των προϊόντων διατροφής και μπορεί να οδηγήσει σε πολλές μεταβολές στη σύνθεση, τη μορφολογία και τις φυσικές ιδιότητες των τροφίμων. Υπάρχει πιθανότητα επίσης να μειώσει την περίοδο διασφάλισης υψηλής ποιότητας κατά την αποθήκευση. Οι ιδιότητες χρώματος και δομής-

υφής είναι ζωτικής σημασίας για την αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων από τους καταναλωτές. Επομένως, η εξάρτηση αυτών των ιδιοτήτων των τροφίμων από τις παραμέτρους της λυοφιλοποίησης είναι εξαιρετικά σημαντική. Το κύριο χαρακτηριστικό της λυοφιλοποίησης, το μόνο που τη διακρίνει από την ξήρανση υπό κενό, είναι η ανάγκη διατήρησης του ελεύθερου νερού παγωμένο. Αυτό είναι ένα από τα πιο δύσκολα προβλήματα στην λυοφιλίωση. Η λυοφιλοποίηση είναι μια διεργασία ανταλλαγής μάζας που απαιτεί μεταφορά θερμότητας. Η θερμότητα της εξάχνωσης είναι 2885 kJ/kg. Εάν η παροχή θερμότητας είναι χαμηλή, η διαδικασία θα είναι αργή, γεγονός που θα αυξήσει το κόστος της. Εάν η παρεχόμενη ροή θερμότητας είναι πολύ υψηλή, θα προκαλέσει συσσώρευση θερμότητας στο υλικό και αύξηση της θερμοκρασίας του, οδηγώντας κατά συνέπεια στην πιθανότητα εμφάνισης υγρού νερού. Επομένως, θεωρείται εξαιρετικά σημαντικό να διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ της ποσότητας



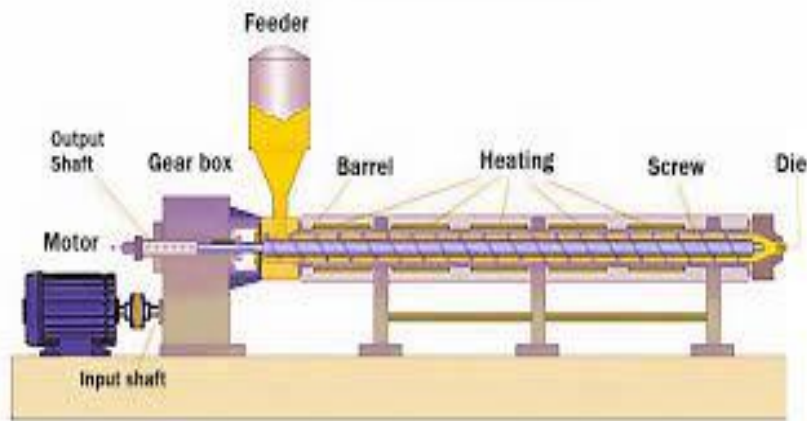
Εικόνα 2.5: Απεικόνιση διαγραμμάτος φάσεων στην ξήρανση υπό κατάψυξη

θερμότητας που παρέχεται και χρησιμοποιείται. Ένας τρόπος για να εκτιμηθεί εάν η ποσότητα της παρεχόμενης θερμότητας είναι πολύ υψηλή είναι η παρακολούθηση της θερμοκρασίας του λυοφιλοποιημένου υλικού. Η τιμή του δεν πρέπει να υπερβαίνει την τιμή της κρυοσκοπικής θερμοκρασίας για ένα δεδομένο υλικό ή της θερμοκρασίας μετάπτωσης υάλου για μια δεδομένη περιεκτικότητα σε νερό. Σε περίπτωση υπέρβασης της θερμοκρασίας μετάπτωσης γυαλιού, η δομή μπορεί να καταρρεύσει (μείωση πορώδους), κάτι που είναι εξαιρετικά μειονέκτημα λόγω της μείωσης της ειδικής επιφάνειας του προϊόντος[28].

2.6 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗ

2.6.1 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΚΒΟΛΗ (EXTRUSION)

Η **εκβολή** ή **εξώθηση** (extrusion cooking) είναι μία διεργασία με την οποία ένα υλικό, συνήθως κοκκώδες, μετατρέπεται σε συνεχές στερεό ή ημιστερεό προϊόν και συνήθως τελικό-έτοιμο τρόφιμο. Συνδυάζει μια σειρά από βασικές φυσικές διεργασίες, όπως ανάμιξη, θέρμανση, μάλαξη, σχηματοποίηση, παστερίωση, βιοχημικές διεργασίες, μορφοποίηση και αφύγρανση.

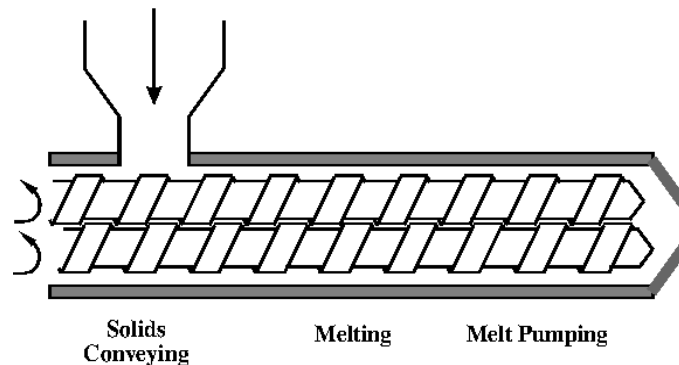


Εικόνα 2.6: Προσομοίωση φυγοκεντρικού εκβολέα (extruder)

Η τεχνολογία εξώθησης κερδίζει ολοένα και μεγαλύτερη δημοτικότητα στην παγκόσμια βιομηχανία επεξεργασίας αγροτικών προϊόντων, η οποία χρησιμοποιεί τεχνικές (ανάμειξη, διαμόρφωση) για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος διατροφής. Η ανάπτυξη προϊόντος με φυγοκεντρική εκβολή είναι μια διαδικασία σύντομου χρόνου υψηλής θερμοκρασίας που αδρανοποιεί τα ένζυμα και μειώνει τη μικροβιακή μόλυνση και συνιστάται κυρίως, καθώς έχει υψηλή παραγωγικότητα και σημαντική κατακράτηση θρεπτικών συστατικών σε σύγκριση με άλλες τεχνικές. Η τεχνολογία εξώθησης έχει γίνει μια σημαντική τεχνική στις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων με τα πολυάριθμα πλεονεκτήματά της σε σχέση με άλλες μεθόδους επεξεργασίας. Είναι μια από τις οικονομικά αποδοτικές μεθόδους και προσφέρει μια πλατφόρμα για την επεξεργασία διαφορετικών προϊόντων από διάφορες ομάδες τροφίμων, τροποποιώντας δευτερεύοντα ή κύρια συστατικά και συνθήκες επεξεργασίας. Η τεχνολογία εξώθησης εφαρμόζεται στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων για την ανάπτυξη ποικιλίας σνακ, ζυμαρικών, δημητριακών πρωινού, τροφών για κατοικίδια, συμπληρωματικών τροφίμων και άλλων τροφίμων για ζώα, κυρίως πτηνά, και ανθρώπους. Είναι μια οικονομική τεχνολογία για την ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών σε τρόφιμα προκειμένου να αναβαθμιστεί η διατροφική τους αξία. Η ευελιξία της τεχνολογίας αυτής το καθιστά βολικό για την ανάπτυξη διατροφικά πλούσιων ενισχυμένων προϊόντων και προϊόντων προστιθέμενης αξίας με συνδυασμό διαφορετικών φθηνών πρώτων υλών. Τα προϊόντα εξώθησης έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε υγρασία, μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και είναι μικροβιολογικά ασφαλή. Η μεταβλητότητα και η υψηλή ποιότητα των τροφίμων και ο ελάχιστος χρόνος επεξεργασίας είναι τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας [29]. Στην **παρούσα** διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε εκβολέας διπλού κοχλία. Η εξώθηση διπλού κοχλία χωρίζεται λόγω της κατεύθυνσης περιστροφής της βίδας σε συν-περιστρεφόμενη εξώθηση, όταν οι βίδες περιστρέφονται προς την ίδια κατεύθυνση, και εξώθηση με αντίθετη περιστροφή, όταν οι βίδες περιστρέφονται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η εξώθηση διπλού κοχλία μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους βαθμούς πλέγματος. Και έτσι, ξεχωρίζει σε εξωθητές με βίδες χωρίς εμπλοκή, επαπτομενικές ή διαχωρισμένες, και εξωθητές με βίδες παρεμβολής, μερικώς ή στενά εμπλεκόμενες (με ειδικό τύπο βιδών αυτοσκοπίσματος). Τρεις πρακτικά



χρησιμοποιούμενες τεχνικές εξώθησης διπλού κοχλία μπορούν να διακριθούν ως παρεμπλεκόμενες λειτουργίες συν-περιστροφής (συμπεριλαμβανομένου του αυτοσκοπίσματος), λειτουργίες εφαλτομενικής αντίστροφης περιστροφής χωρίς εμπλοκή και λειτουργίες αντίστροφης περιστροφής εμπλοκής. εταξύ των υφιστάμενων συστημάτων εξώθησης, οι εξωθητήρες διπλού κοχλία είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι στην αντιδραστική διέλαση, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με τις μηχανές μονού κοχλία. Πιο συγκεκριμένα, οι εξωθητήρες διπλού κοχλία έχουν μια αρθρωτή γεωμετρία, η οποία επιτρέπει σε κάποιον να προσαρμόσει το προφίλ του κοχλία στην αντίδραση που θα πραγματοποιηθεί. Το προφίλ μπορεί να χωριστεί σε διαδοχικά ανεξάρτητα τμήματα, με συγκεκριμένες λειτουργίες: τροφοδοσία και τήξη του πολυμερούς, έγχυση των αντιδραστηρίων, ανάμειξη, ανάπτυξη αντίδρασης, αποπτέρωση, άντληση και διαμόρφωση. Οι εξωθητήρες διπλής βίδας τροφοδοτούνται από την πείνα. Η αναλογία πλήρωσης των βιδών είναι μόνο μερική, που επιτρέπει την εύκολη εισαγωγή ή αφαίρεση διαφορετικών συστατικών κατά μήκος της κάννης, είτε σε υγρή είτε σε στερεή μορφή. Οι ικανότητες ανάμειξης είναι πιο σημαντικές σε έναν εξωθητήρα διπλού κοχλία και οι συνθήκες ανάμειξης (διανομής ή διασποράς) μπορούν εύκολα να ελεγχθούν σύμφωνα με τη γεωμετρία των τμημάτων των δίσκων ζύμωσης (αριθμός δίσκων, πάχος δίσκου, γωνία κλιμάκωσης) [30]



Εικόνα 2.7: Προσομοίωση εκβολέα διπλού κοχλία

2.7 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΩΝ ΔΟΜΩΝ

2.7.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM))

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) χρησιμοποιείται από καιρό για την κατανόηση της μικροδομής των φυτικών ιστών, των ζωικών ιστών και των μικροοργανισμών μέσω εικόνων. Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση και τον χαρακτηρισμό επιφανειών. Το αρχικό μέρος δείχνει τη γενική διάταξη του εξοπλισμού ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης, δίνοντας έμφαση στο είδος της πηγής ηλεκτρονίων και στα κύρια σήματα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ της δέσμης ηλεκτρονίων και του δείγματος. Το δεύτερο κομμάτι αφορά τις αρχές της τεχνικής της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης και τις λύσεις που προσφέρονται από τις νέες τεχνολογίες που διατίθενται στην αγορά εξοπλισμού ηλεκτρονικών μικροσκοπίων σάρωσης για μορφολογικούς και δομικούς χαρακτηρισμούς, συμπεριλαμβανομένων των υγρών δειγμάτων. Στη σύγχρονη εποχή, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) είναι ένα ισχυρό και αποτελεσματικό όργανο απεικόνισης. Χρησιμοποιείται για τη σάρωση της επιφάνειας σε μεγέθη 1 μm έως 1 nm ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή δέσμης ηλεκτρονίων με διάφορους φακούς και σύστημα κενού. Ένα όργανο SEM

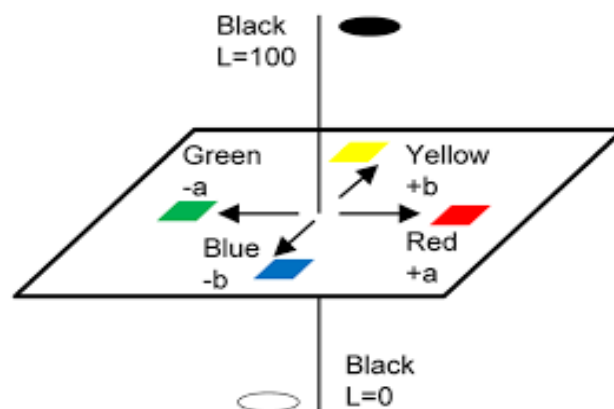
είναι ενσωματωμένο με φασματόμετρο διασποράς ενέργειας για να ενσωματώσει το δυναμικό της στοιχειακής ανάλυσης στην επιφάνεια του δείγματος. Η τεχνική χρησιμεύει ως μια πολλά υποσχόμενη και αξιόπιστη μέθοδος για ανάλυση μικροδομών, ιδιαίτερα σε νέα σκευάσματα, καινοτομίες με ιδιαίτερες ιδιότητες, υφές τροφίμων και επίσης ανίχνευση ελαττωμάτων στα τρόφιμα [31]

2.7.2 ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ (TOTAL PHENOLIC CONTENT-TPC)

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από τα φυτά υπό συνθήκες πίεσης. Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και τη θεραπεία ορισμένων ασθενειών και αξιοποιούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Τα φαινολικά θεωρούνται ως τα μόρια με την υψηλότερη δυνατότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών. Ως εκ τούτου, η ποσοτικοποίηση τους είναι μια κοινή πρακτική σε διάφορους τομείς της έρευνας τροφίμων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης Folin–Ciocalteu (FC) για προσδιορισμούς ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικό περιεχόμενο (TPC). Η αντίδραση Folin–Ciocalteu (FC) είναι μια αντιοξειδωτική ανάλυση που βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, η οποία μετρά την αναγωγική ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινόλη/πολυφαινόλη σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης και βιολογικά δείγματα. Δηλαδή, η ανάλυση F-C δεν μετρά την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ενός δείγματος, αλλά προσδιορίζει, όπως προαναφέρθηκε, την αναγωγική του ικανότητα [32].

2.7.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ

Το σύστημα χρωμάτων CIELAB, ή CIE $L^* a^* b^*$, εκφράζει την ποσοτική σχέση των χρωμάτων σε τρεις άξονες: η τιμή L^* δηλώνει φωτεινότητα και τα a^* και b^* είναι συντεταγμένες χρωματικότητας. Οι τιμές CIELab (σημειογραφία L^*C^*h) επιτρέπουν έναν αντικειμενικό και ανεξάρτητο προσδιορισμό των τριών οπτικών χαρακτηριστικών του χρώματος: απόχρωση (h), κορεσμός (Chroma, C^*) και Lightness (L^*). Στο διάγραμμα χρωματικού χώρου, το L^* αναπαρίσταται σε κατακόρυφο άξονα με τιμές από 0 (μαύρο) έως 100 (λευκό). Η τιμή a^* υποδηλώνει κόκκινο-πράσινο στοιχείο ενός χρώματος, όπου ba^* (θετικό) και λa^* (αρνητικό) δηλώνουν τις κόκκινες και πράσινες τιμές, αντίστοιχα.



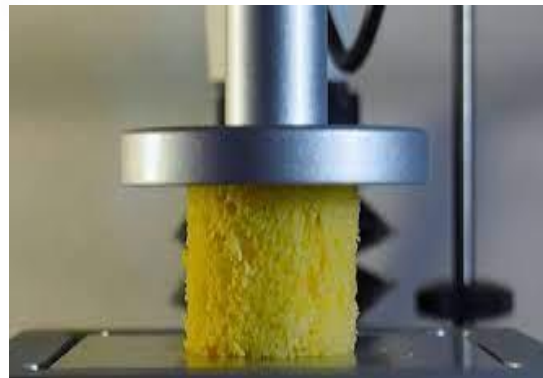
Εικόνα 2.8: Απεικόνιση συστήματος CIELAB

Τα κίτρινα και μπλε στοιχεία αντιπροσωπεύονται στον άξονα b^* ως τιμές ba^* (θετική) και λb^* (αρνητική) αντίστοιχα. Στο κέντρο του επιπέδου είναι ουδέτερο ή αχρωματικό. Η

απόσταση από τον κεντρικό άξονα αντιπροσωπεύει το χρώμα (C^*) ή τον κορεσμό του χρώματος. Η γωνία στους άξονες χρωματικότητας εκφράζει την απόχρωση (h°). Οι τιμές L^* , a^* και b^* μπορούν να μεταγραφούν σε δερματολογικές παραμέτρους. Η τιμή L^* συσχετίζεται με το επίπεδο μελάγχρωσης του δέρματος. Η τιμή a^* συσχετίζεται με το ερύθημα. Η τιμή b^* συσχετίζεται με τη απόχρωση και το μαύρισμα [33].

2.7.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΦΗΣ

Η συμπίεση είναι μια από τις πιο κοινές δοκιμές υφής, ειδικά για προϊόντα διατροφής. Στην παρούσα διπλωματική εργασία τα πέλλετ που σχηματίστηκαν μετά το πέρας της φυγοκεντρικής εκβολής (extrusion) υπέστησαν συμπίεση προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για την υφή τους μελετώντας έτσι τις μηχανικές ιδιότητές τους. Η υφή είναι η αισθητηριακή και λειτουργική εκδήλωση των δομικών, μηχανικών και επιφανειακών ιδιοτήτων των τροφίμων που ανιχνεύονται μέσω των αισθήσεων όρασης, ακοής, αφής και κιναισθητικής. Εξαρτάται από τις φυσικές και φυσικοχημικές ιδιότητες του προϊόντος και από τα μοναδικά, πολύπλοκα χαρακτηριστικά των ανθρώπινων αισθήσεων. Η υφή αναγνωρίζεται επίσης ευρέως ως ένα σημαντικό ποιοτικό χαρακτηριστικό για την αποδοχή του προϊόντος που επηρεάζει την αντίληψη και την άποψη των καταναλωτών για το εκάστοτε τρόφιμο. Σύμφωνα με μια μηχανική προσέγγιση της επεξεργασίας τροφίμων, τα χαρακτηριστικά υφής είναι ένα μέτρο απόδοσης όταν τα τρόφιμα αλληλεπιδρούν με τον καταναλωτή. Είναι η απόρροια της δομής και της σύνθεσης που λαμβάνονται με την υποβολή των συστατικών σε μια ακολουθία λειτουργιών, οι οποίες περιλαμβάνουν μια δεδομένη τροφική διαδικασία. Από αυτή την άποψη, όπως η απόδοση οποιουδήποτε άλλου υλικού μηχανικής, τα χαρακτηριστικά υφής των τροφίμων μπορούν να περιγραφούν από εγγενείς ιδιότητες υλικού, οι οποίες, σύμφωνα με τις υπάρχουσες θεωρίες, μπορούν ακόμη και να οριστούν με την κατάλληλη επιλογή των συνθέσεων συστατικών και των παραμέτρων της διαδικασίας τροφίμων. Τα ερεθίσματα της αντίληψης της υφής είναι κυρίως μηχανικής φύσης. Οι πιο κύριες παράμετροι μεταξύ των χαρακτηριστικών της υφής των στερεών τροφίμων είναι η σκληρότητα, η ελαστικότητα, η συνοχή και η ευθραστότητα [34].



2.8 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ

Ένας από τους στόχους της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη απελευθέρωσης του συστατικού oil mix σε προσομοίωση γαστρικών υγρών από όλες τις ανεπτυγμένες εγκλεισμένες δομές και τα πέλλετ που θα έχουν προκύψει από την φυγοκεντρική εκβολή. Τα μοντέλα γαστρεντερικού συστήματος χρησιμοποιούνται να κατανοήσουμε πώς διασπώνται τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της πέψης στο γαστρεντερικό σωλήνα και στην συγκεκριμένη διπλωματική μελέτη για να υπολογιστεί το ποσοστό του oil-mix στο τελικό πέλλετ το οποίο απελευθερώθηκε στο στομάχι και έπειτα στο έντερο μετά το

πέρας της επεξεργασίας. Το στομάχι είναι ένα σημαντικό διαμέρισμα όπου το μέγεθος των σωματιδίων της τροφής μειώνεται μετά τη στοματική μάσηση. Από μηχανολογική άποψη, το στομάχι είναι ένας αναμείκτης και μια αντλία που ελέγχει τη διαδικασία πέψης. Η γνώση και κάθε ικανότητα πρόβλεψης του τρόπου με τον οποίο ένα τρόφιμο μπορεί να αποσυντεθεί στο στομάχι είναι σημαντικές για την ανάπτυξη νέων προϊόντων διατροφής με νέα οφέλη για την υγεία. Μελέτες στην ιατρική, τη φαρμακευτική και τη διατροφή έχουν δείξει ότι η αποσύνθεση της τροφής στο στομάχι είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Τα τρόφιμα διασπώνται σε μικρά σωματίδια και μόρια τόσο λόγω φυσικών δυνάμεων όσο και λόγω χημικών αντιδράσεων. Οι φυσικές δυνάμεις είναι μηχανικές και υδροδυναμικές δυνάμεις που υπάρχουν στο στομάχι, που προκύπτουν από την περισταλτική κίνηση του τοιχώματος του στομάχου. Οι συσπάσεις του στομάχου δημιουργούν ροή υγρού του γαστρικού περιεχομένου που προκαλεί διατμητική επίδραση στην επιφάνεια της τροφής. Η κινητική της πέψης της τροφής εξαρτάται από τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά της τροφής. Στο στομάχι, ο γαστρικός χυμός εκκρίνεται από τους αδένες που επενδύουν το στομάχι που περιέχουν γαστρικό οξύ (HCl) και πεπτικά ένζυμα. Το HCl βοηθά στην όξινη μετουσίωση των χωνεμένων τροφών και ενεργοποιεί την πεψίνη. Ο κατακερματισμός και η διάβρωση αποτελούν τους 2 κύριους τρόπους αποσύνθεσης τροφίμων σε ένα προσομοιωμένο γαστρικό περιβάλλον. Ο θρυμματισμός είναι η θραύση ενός δείγματος τροφής σε πολλά κομμάτια σχετικά μεγάλου μεγέθους. επιφανειακή διάβρωση ορίζεται ως η φθορά της επιφάνειας του τροφίμου από ένα προσκρουόμενο γαστρικό υγρό που περιέχει στερεά τροφής και προκαλεί κανονικές δυνάμεις πρόσκρουσης, τριβής και διάτμησης που δρουν στην επιφάνεια του τροφίμου [35], [36].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.1 ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι τα εξής:

- εμπορικό αιθέριο έλαιο βαλσάμου (hypericum EO)
- εμπορικό αιθέριο έλαιο χαμομηλιού (chamomile EO)
- εμπορικό αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (rosemary EO)
- εμπορικό αιθέριο έλαιο ρίγανης (oregano EO)
- μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix), σε αναλογία: 50% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 20% αιθέριο έλαιο βαλσάμου, 15% αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου και 15% αιθέριο έλαιο χαμομηλιού.

Για το σχηματισμό της **μήτρας** τα υλικά που αναμείχθηκαν είναι τα εξής:

- απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος γνωστή στο εμπόριο ως Whey Protein Isolate (WPI)
- πουλουλάνη (**pullulan**)
- απιονισμένο νερό (**H₂O**)

σε περιεκτικότητα, συνήθως, WPI:pull 30:70 w/w.

Για την παραγωγή των καινοτόμων εμπλουτισμένων **πέλλετ** μέσω φυγοκεντρικής εκβολής, που αποτελεί και το τελικό στάδιο της συνολικής διεργασίας παραγωγής της ζωτροφής χρησιμοποιήθηκαν τα επιμέρους άλευρα:

- εμπορικό καλαμποκάλευρο
- εμπορικό σογιάλευρο

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ-ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΚΕΥΕΣ

3.2.1 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Για τον εγκλεισμό του oil-mix πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω τρεις (3) μέθοδοι εγκλεισμού, καθώς συγκρίθηκαν και τα αποτελέσματα αυτών.

1. Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία (ηλεκτροστατική ινοποίηση/ηλεκτροψεκασμός)
2. Ξήρανση με εκνέφωση
3. Ξήρανση με κατάψυξη

3.2.1.1 Εγκλεισμός δείγμα τος oil-mix με ηλεκτροστατική ινοποίηση

Για την ενθυλάκωση του oil-mix σε μήτρα πουλλουλάνης 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 oil-mix που πρόκειται να εγκλειστεί και στην άλλη (liquid 2) το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-πουλλουλάνης, WPI:pull (30:70) συγκέντρωσης 20%w/v. Μετά από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκαν ξεχωριστά για κάθε μήτρα οι παρακάτω συνθήκες για την εφαρμογή της ηλεκτροστατικής ινοποίησης:

Μήτρα πρωτεΐνης ορού γάλακτος-πουλλουάνης (WPI:pu1)

- ογκομετρική παροχή Liquid 1: 0.12 mL/h (συστατικό)
- ογκομετρική παροχή Liquid 2: 1.5 mL/h (μήτρα)
- επιβαλλόμενη τάση: $V=22,5\text{ Kv}$
- απόσταση ακροφυσίου και συλλέκτη ινών: 18 cm



Εικόνα 3.1: Συσκευή ομοαξονικής Ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας

3.2.1.2 Εγκλεισμός δείγμα τος oil-mix με ξήρανση με εκνέφωση (Spray Drying)

Για τον εγκλεισμό του oil-mix με ξήρανση με εκνέφωση ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά παρασκευάστηκε γαλάκτωμα υδατικής μήτρας και oil-mix συγκέντρωσης 6%w/w ολικού πολυμερικού περιεχομένου (WPI:pu1-80:20). Πιο αναλυτικά για τον εγκλεισμό του oil-mix με ξήρανση με εκνέφωση αρχικά παρασκευάστηκε γαλάκτωμα με την υδατική μήτρα και το oil-mix. 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 oil-mix, 1.5% w/w πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) και περίπου 4,5 ml οξικό οξύ. Το γαλάκτωμα ελήφθη με ομογενοποίηση για 5 λεπτά και ταχύτητα περιστροφής 11000 rpm χρησιμοποιώντας έναν ομογενοποιητή υψηλής διάτμησης. Στο τελικό γαλάκτωμα η συγκέντρωση WPI:pu1 σε ποσοστό 80:20 βρέθηκε να είναι 6% w/w. Στη συνέχεια, το γαλάκτωμα ξηράνθηκε με ψεκασμό (spray drying) σε πιλοτικό ξηραντήρα ψεκασμού (εικόνα 2). Για την πραγματοποίηση της ξήρανσης με εκνέφωση χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός τροχός με ταχύτητα περιστροφής (ροή) 12.1 rpm. Ο αέρας εκνέφωσης λήφθηκε από το περιβάλλον από έναν ανεμιστήρα (blower) 25 Hz, ενώ η θερμοκρασία εισόδου Tin σταθεροποιήθηκε στους 170°C και η θερμοκρασία εξόδου κυμαινόταν από 80°C έως 110°C. Από τη μέθοδο αυτή προέκυψε εγκλεισμένο oil-mix σε πολυμερική μήτρα σε μορφή σκόνης.



Εικόνα 3.2: Συσκευή ξήρανσης με εκνέφωση

3.2.1.3 Εγκλεισμός δείγματος oil-mix με ξήρανση με κατάψυξη (Freeze Drying) και προετοιμασία γαλακτώματος

Για τον εγκλεισμό του oil-mix με ξήρανση με κατάψυξη ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά παρασκευάστηκε γαλάκτωμα υδατικής μήτρας και oil-mix συγκέντρωσης 6%w/w ολικού πολυμερικού περιεχομένου (WPI:pul-80:20), ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε και στη μέθοδο της ξήρανσης με εκνέφωση. Αφού παρασκευάστηκε το γαλάκτωμα με την υδατική μήτρα και το oil-mix, στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κατάψυκτη (Panasonic, MDF-U3386S) σε θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 72 ώρες. Έπειτα τοποθετήθηκε σε συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη (εικόνα 3) και πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κενό για 72 περίπου ώρες, έως ότου το δείγμα μας να είναι έτοιμο να παραληφθεί σε μορφή σκόνης.



Εικόνα 3.3: Συσκευή ξήρανσης με κατάψυξη

3.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΜΩΝ

3.3.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM))

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

Ηλεκτρονίων αποτελεί μία σύγχρονη και ευέλικτη μέθοδο ανάλυσης, σχεδιασμένη για απευθείας παρατήρηση επιφανειών στερεών δειγμάτων. Η τεχνική είναι κατάλληλη για μελέτη μορφολογίας και μικροδομής δειγμάτων καθώς και στοιχειακής ανάλυσης σημείου ή μικρής επιφάνειας. Η λειτουργία του οργάνου βασίζεται στην αλληλεπίδραση του δείγματος με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (στο οπτικό μικροσκόπιο το δείγμα αλληλεπιδρά με φωτόνια) με αποτέλεσμα απεικονίσεις μεγάλων μεγεθύνσεων [37].



Εικόνα 3.4: Συσκευή SEM/ EDAX

Τα εγκλεισμένα δείγματα που προέκυψαν με τις 2 μεθόδους ενθυλάκωσης οδηγήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) έτσι ώστε να επιλεγθούν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής νανοϊνών με εγκλεισμένα βιοδραστικά συστατικά. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, μελέτη της μορφολογίας και σύστασης της μικροδομής στερεών δειγμάτων δηλαδή στις ίνες που προέκυψαν από την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία. Επιπλέον, όσον αφορά τα στερεά δείγματα της ξήρανσης με εκνέφωση που είναι σε μορφή σκόνης αρχικά τοποθετήθηκαν σε συσκευή επιχρύσωσης για περίπου 2 λεπτά, μια απαραίτητη διαδικασία που αποσκοπεί στο να καταστούν τα δείγματα αγωγικά, ώστε η δέσμη ηλεκτρονίων του μικροσκοπίου να μπορεί να σαρώσει την επιφάνεια και τα ηλεκτρόνια να έχουν δίοδο διέλευσης. Σε αντίθετη περίπτωση υπάρχει κίνδυνος **σοβαρής βλάβης**.

3.3.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (ENCAPSULATION EFFICIENCY, EE)

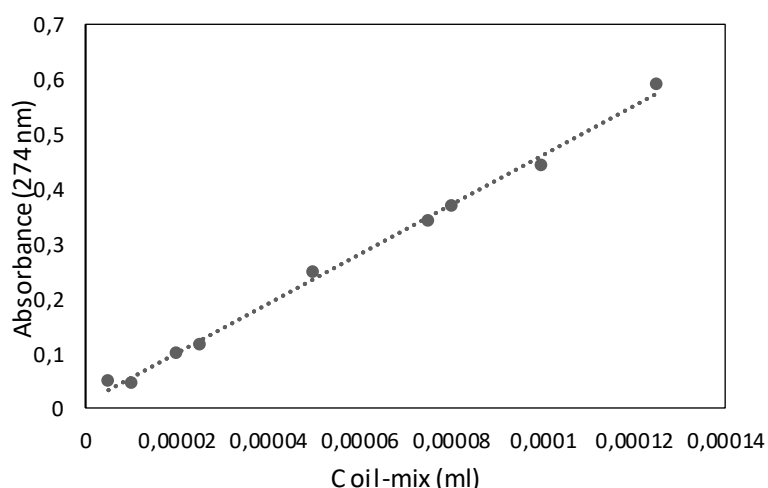
Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού μέσω της πρότυπης καμπύλης oil-mix

Για την κατασκευή της συγκεκριμένης πρότυπης καμπύλης, που χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλεισμού για κάθε μια από τις 2 μεθόδους ενθυλάκωσης, κατασκευάστηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης για το μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix). Αρχικά φτιάχτηκε ένα διάλυμα συγκέντρωσης oil-mix: εξάνιο 1:1000 (v/v), από το οποίο δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες επιμέρους αραιώσεις. Στη συνέχεια τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 274 nm και μετρήθηκε η απορρόφηση τους χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο UV-VIS (Εικόνα 3.5) έχοντας ως τυφλό δείγμα (blank) σκέτο διαλύτη-εξάνιο.



Εικόνα 3.5: Φασματοφωτόμετρο UV-VIS

Από την διαδικασία που προαναφέρθηκε σχηματίστηκε το παρακάτω διάγραμμα πρότυπης καμπύλης oil-mix με διαλύτη εξάνιο.



Σχήμα 3-1: Πρότυπη καμπύλη oil mix με διαλύτη εξάνιο

Για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλεισμού του oil-mix σε πολυμερική μήτρα WPI:ru1 και στις 2 τεχνικές εγκλεισμού μέσω της **πρότυπης καμπύλης oil-mix** υπολογίστηκαν και οι εγκλεισμένες ποσότητες και οι μη εγκλεισμένες.

- Για τον υπολογισμό της **μη εγκλεισμένης ποσότητας** κάθε δείγματος (εκτός) ακολουθήθηκε μια σειρά διαδικασιών που παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω. Αρχικά παρελήφθη από κάθε δείγμα ποσότητα ίση με 0,15 g και στη συνέχεια αναμίχθηκε κάθε δείγμα ξεχωριστά με 5 mL εξανίου. Μετά από ανάδευση συλλέχθηκε το υπερκείμενο κάθε διαλύματος το οποίο στην συνέχεια αραιώθηκε και φωτομετρήθηκε στα 274 nm χρησιμοποιώντας UV-VIS (blank=σκέτο εξάνιο).
- Για τον υπολογισμό της **εγκλεισμένης ποσότητας** (εντός) παραλαμβάνω το κάθε δείγμα που πρόσθεσα εξάνιο 5 ml (για την μέτρηση μη εγκλεισμένης ποσότητας) και του προσθέτω 10 ml (απιονισμένου) νερού. Στην συνέχεια κάθε δείγμα οδηγείται σε σύστημα περιδίνησης Vortex και αμέσως μετά σε φυγόκεντρο για 10 λεπτά (εικόνα 5).



Εικόνα 3.6: Φυγόκεντρος

Αφού τελειώσει η φυγόκεντρος, από την φιάλη συλλέγω το υπερκείμενο υγρό σε γυάλινο φιαλίδιο. Επαναλαμβάνω την ίδια διαδικασία της περιδίνησης και της φυγόκεντρος άλλη μια φορά προσθέτοντας επιπλέον 2 ml εξανίου και συλλέγω το δεύτερο υπερκείμενο υγρό στο ίδιο γυάλινο φιαλίδιο. Τέλος τα δείγματα οδηγούνται στο φασματοφωτόμετρο UV και μετρείται η απορρόφησή τους στα 274 nm έχοντας υποστεί την απαραίτητα αραιώση για να μετρηθούν αν χρειάζεται.

3.3.3 ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ (TOTAL PHENOLIC CONTENT-TPC)

Υπολογισμός ποσοστού εγκλεισμού μέσω TPC (Total Phenolic Content-TPC)

Για τον υπολογισμό της **μη εγκλεισμένης ποσότητας** κάθε δείγματος (εκτός) αρχικά ζυγίστηκαν περίπου 0,3 g δείγματα (spray ή electrospinning) και προστέθηκαν σε αυτό 5 ml εξανίου. Στην συνέχεια αφού αναδεύτηκε καλά μέσω Vortex φυγοκεντρήθηκε για περίπου 10 λεπτά. Η υπερκείμενη φάση που συλλέχθηκε οδηγήθηκε στον εξατμιστήρα (εικόνα 5) σε μία σφαιρική φιάλη.



Εικόνα 3.7: Περιστροφικός εξατμιστήρας

Στη σφαιρική φιάλη αμέσως μετά την εξάτμιση, έχοντας μείνει μέσα ποσότητα oil-mix, προστέθηκαν 2 ml αιθανόλης. Το συνολικό φαινολικό φορτίο υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Εν συντομία, συλλέχθηκαν 0,1 μL από το κάθε δείγμα (με τα 2 αιθανόλης) και προστέθηκε σε 7,9 mL απεσταγμένου νερού και 0,5 ml Folin-Ciocalteu. Μετά από ανάδευση σε Vortex και παραμονή των διαλυμάτων για 30 λεπτά σε σκοτάδι, προστέθηκαν 1,5 mL διαλύματος 7,5% (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 UV-VIS. Τέλος, οι τιμές τους παρεμβληθήκαν σε καμπύλη βαθμονόμησης γαλλικού οξέος από όπου υπολογίστηκε το συνολικό φαινολικό φορτίο και εκφράστηκε ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος σε g αρχικού ξηρού δείγματος.

- Για τον υπολογισμό της **εγκλεισμένης ποσότητας** κάθε δείγματος (εντός) επίσης ζυγίστηκαν περίπου 0,3 gr δείγματος (spray ή electrospraying) προστέθηκαν σε αυτό 5 ml εξανίου και 5 ml νερού. Στην συνέχεια, αφού αναδεύτηκε καλά μέσω Vortex φυγοκεντρήθηκε για περίπου 10 λεπτά. Συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση σε μία σφαιρική φιάλη και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία 2 ακόμα φορές συλλέγοντας άλλα 2 υπερκείμενα στην ίδια φιάλη με την ίδια ποσότητα εξανίου. Έπειτα η σφαιρική οδηγήθηκε στον εξατμιστήρα. Ομοίως στην σφαιρική φιάλη αμέσως μετά την εξατμισμό, έχοντας μείνει μέσα ποσότητα oil-mix, προστέθηκαν 2 ml αιθανόλης και το συνολικό φαινολικό φορτίο υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ίδια ακριβώς μέθοδο Folin-Ciocalteu όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

3.3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Για να προσδιοριστεί η ελεγχόμενη αποδέσμευση των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών στις δομές που προέκυψαν μέσω των τεχνικών EL και SP, οι εγκλεισμένες δομές αποθηκεύτηκαν σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας (25 και 45 °C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$) για 7 και 30 μέρες. Στην συνέχεια, στα αποθηκευμένα δείγματα πραγματοποιήθηκε Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (DSC), Φασματοσκοπία Υπερύθρου (ATR-FTIR) και προσδιορισμός της αποδέσμευσης των ενεργών συστατικών μέσω φασματοφωτομετρίας UV-VIS. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

3.3.4.1 Εφαρμογή της Τεχνικής Φασματοσκοπίας Σάρωσης Μειωμένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR)

Η φασματοσκοπία Υπερύθρων μετασχηματισμού Fourier (ATR-FTIR) είναι μια τεχνική μη καταστροφική που μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών εφαρμογών, από την απεικόνιση καρκινικών ιστών και ζωντανών κυττάρων, έως τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και της δευτερογενούς δομής πρωτεΐνης σύνθεση. Είναι μια τεχνική ανάλυσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων με φθινό, οικονομικό τρόπο. Αυτή η μέθοδος ανάλυσης λειτουργεί με τη μέτρηση τυχόν αλλαγών που συμβαίνουν σε μια εσωτερικά ανακλώμενη δέσμη υπερύθρων όταν έρχεται σε επαφή με ένα βιολογικό δείγμα. Μια δέσμη υπερύθρων οδηγείται σε έναν κρύσταλλο με υψηλό δείκτη διάθλασης, υπό καθορισμένη γωνία. Οι προκύπτουσες εσωτερικές ανακλάσεις αυτής της δέσμης έχουν ως αποτέλεσμα ένα παροδικό κύμα που φτάνει στο δείγμα από την επιφάνεια του κρυστάλλου [38]. Οι σχηματισμοί συμπλέγματος, οι τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών της μήτρας εγκλεισμού και των εγκλεισμένων ουσιών καθώς και οι αλλαγές στη μοριακή διάταξη των προϊόντων εγκλεισμού μελετήθηκαν μέσω της συσκευής φασματοσκοπίας σάρωσης (FT/IR-4200, JASCO International Co., Ltd. Japan) η οποία περιλάμβανε τη μονάδα μειωμένης ολικής ανάκλασης (ATR PRO-410-S, JASCO International Co., Ltd. Japan). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σάρωση σε μήκη κύματος μεταξύ 4000 και 700 cm^{-1} . Η κάθε μέτρηση αποτελούνταν από 32 σαρώσεις σε ανάλυση 4 cm^{-1} .

3.3.4.2 Προσδιορισμός Θερμικών Χαρακτηριστικών μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης προσδιορίστηκε με χρήση συσκευής διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) (Perkin Elmer DSC 6, CT, USA), η οποία χρησιμοποιεί λογισμικό Pyris 6 (Software, Perkin Elmer). Δείγματα (20–30 mg) τοποθετήθηκαν σε διγματοφορείς (καψύλια) αλουμινίου και εισήχθησαν σε ξηραντήρες καθορισμένης ενεργότητας ύδατος ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$) στους 25°C και 45°C. Έπειτα από παραμονή των δειγμάτων στους θαλάμους για καθορισμένες χρονικούς περιόδους (0, 7, 30 days), οι διγματοφορείς αλουμινίου σφραγίστηκαν ερμητικά και εισήχθησαν στη συσκευή DSC. Ένας κενός, σφραγισμένος διγματοφορέας χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς. Για τη δημιουργία αδρανούς ατμόσφαιρας χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο, με παροχή 20 L/min. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε θερμοκρασιακό πρόγραμμα το οποίο περιλάμβανε θέρμανση με σταθερό ρυθμό 5°C/min. Οι συνθήκες σάρωσης περιλάμβαναν παραμονή των δειγμάτων για 2 min στους 0°C, θέρμανση με σταθερό ρυθμό 5°C/min από τους 0°C έως και 10-15°C πάνω από τη θερμοκρασία εμφάνισης της ενδόθερμης μετάβασης, ακαριαία ψύξη με υγρό άζωτο και θέρμανση με σταθερό ρυθμό 5°C/min από τους 0°C-200°C. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης προσδιορίστηκε από το δεύτερο κύκλο θέρμανσης. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις.



Εικόνα 3.8: Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Perkin Elmer DSC 6).

3.4 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΥ OIL-MIX ΣΕ ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΓΙΑ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ (ΕΚΒΟΛΗ)

Τα δείγμα τα εγκλεισμένης σκόνης και ινών oil-mix που προέκυψαν με τις μεθόδους της ξήρανσης με εκνέφωση και της ηλεκτροστατικής ισοποίησης οδηγήθηκαν στη συσκευή του εκβολέα διπλού κοχλία (εικόνα 3.9), για ενσωμάτωση σε πρόμιγμα αλεύρων κατάλληλων προδιαγραφών, και παραγωγή των καινοτόμων εμπλουτισμένων πέλλετ, τα οποία αποτελούν και το τελικό στάδιο της συνολικής διεργασίας παραγωγής της ζωοτροφής.



Εικόνα 3.9: Φυγοκεντρικός εκβολέας διπλού κοχλία

Για την παρασκευή των δειγμάτων προς εκβολή θεωρήθηκε απαραίτητη η μέτρηση της υγρασίας των περιεχόμενων άλευρων (καλαμποκάλευρο, σογιάλευρο). Ο προσδιορισμός της υγρασίας πραγματοποιήθηκε μέσω της αναλυτικής μεθόδου **Moisture Content** [39], [40]. Συγκεκριμένα, αρχικά, ξηράνθηκε το άδειο σκεύος και το καπάκι στο φούρνο στους 105°C για 3 ώρες και μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα για να κρυώσουν. Ζυγίστηκαν το άδειο πιάτο και το καπάκι. Έπειτα ζυγίστηκαν περίπου 3 g δείγμα τος στο πιάτο. Απλώνεται το δείγμα με σπάτουρα. Τοποθετήθηκε το σκεύος με το δείγμα στο φούρνο. Ξηράνθηκε για 3 ώρες στους 105°C. Μετά την ξήρανση, μεταφέρθηκε το σκεύος με μερικώς καλυμμένο καπάκι στον ξηραντήρα για να κρυώσει. Τέλος, ζυγίστηκε ξανά το πιάτο και το αποξηραμένο δείγμα του.



Εικόνα 3.10: Φούρνος κενού

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της φυγοκεντρικής εκβολής και να συλλεχθεί το τελικό προϊόν ζωοτροφής, προετοιμάστηκαν 5 διαφορετικά δείγμα τα συγκεκριμένων προδιαγραφών (τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 3-1).

Πίνακας 3-1: Δείγμα τα προς εκβολή και οι κωδικοί τους

No	ΔΙΓΜΑ ΤΑ	Κωδ/ση
1	ΜΙΓΜΑ ΑΛΕΥΡΩΝ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ	XC
2	ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΜΕ ΜΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟ OIL-MIX	XP
3	ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟ OIL-MIX (ELECTROSPINNING)	XE
4	ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟ OIL-MIX (SPRAY DRYING)	XS

Τα 4 αυτά διαφορετικά δείγμα τα διαθέτουν συγκεκριμένες προδιαγραφές οι οποίες παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα 3-2.

Πίνακας 3-2: Σύσταση δειγμάτων προς εκβολή

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ				
	XC	XP	XE	XS	XF
Υγρασία Καλαμποκάλευρο (%)	8,06%	8,06%	8,06%	8,06%	8,06%
Υγρασία Σογιάλευρο (%)	6,58%	6,58%	6,58%	6,58%	6,58%
Καλαμποκάλευρο	55%	55%	55%	55%	55%
Σογιάλευρο	28%	28%	23%	23%	17%
Εγκλεισμένη σκόνη (%)	0%	0%	5%	5%	11%
Περιεκτικότητα δραστικής (%)	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%
Υγρασία Μίγματος (%)	17%	17%	17%	17%	17%
Συνολικό Βάρος (g)	100	100	100	100	100

Η παραγωγή των προϊόντων εκβολής πραγματοποιήθηκε σε εκβολέα διπλού κοχλίου συμπεριστροφής (εικόνα 8). Το κάθε δείγμα εισάγεται στην τελευταία ζώνη. Η εκβολή πραγματοποιήθηκε με ταχύτητα περιστροφής των κοχλίων 200 rpm και ροή δείγμα τος 70%-80%.

3.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ

3.5.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Η ανάλυση μικροδομής των πέλлет πραγματοποιήθηκε με την χρήση της τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy – SEM). Προέκυψαν, έτσι, απεικονίσεις από την χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), για τα καινοτόμα προϊόντα εκβολής με ενσωματωμένα φυσικά βιοδραστικά συστατικά σε εγκλεισμένη και μη εγκλεισμένη μορφή. Τα αφυδατωμένα δείγμα τα επικαλύφθηκαν με ένα

μίγμα χρυσού-παλλαδίου υπό κενό χρησιμοποιώντας συσκευή επικάλυψης διασκορπισμού, με ρεύμα πλάσματος 18 mA για 105 δευτερόλεπτα. Επιπλέον τα προϊόντα ζωοτροφών που αναπτύχθηκαν παρατηρήθηκαν και μέσω στερεοσκοπικής απεικόνισης.

3.5.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΚΒΟΛΗΣ (ΧΕ)

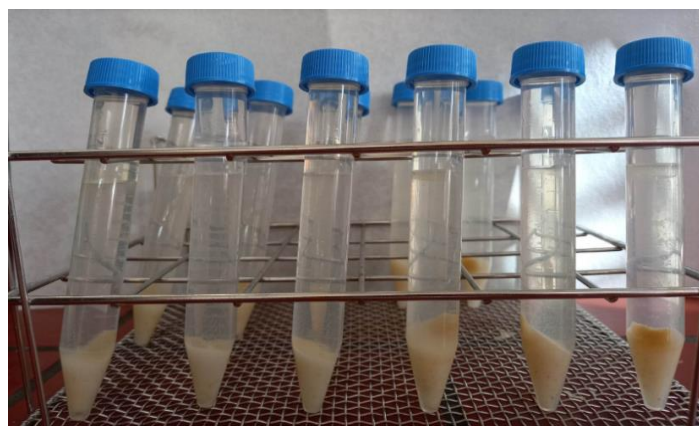
Η απόδοση εκβολής (ΧΕ%) υπολογίστηκε με την ποσοτική μείωση του oil mix στο τελικό προϊόν, ως προς το αρχικό περιεχόμενο oil mix του δείγματος πριν από την εκβολή. Ο προσδιορισμός του oil mix στα πέλλετ ζωοτροφής, απαιτεί την εφαρμογή μιας διαδικασίας εκχύλισης με διαλύτη εξάνιο, απαραίτητη για την απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών, τόσο σε εγκλεισμένη όσο και σε μη εγκλεισμένη μορφή, η οποία περιγράφεται παρακάτω. Μια ποσότητα δείγματος περίπου 1 g θρυμματισμένων προϊόντων εκβολής, τοποθετήθηκε σε σωλήνα Falcon με 10 mL απεσταγμένου νερού, ανακινήθηκε έντονα για 10 λεπτά, και προστέθηκαν 5 mL ψυχρού εξανίου και 1 mL αιθανόλης. Στη συνέχεια, τα δείγματα ανακινήθηκαν ξανά για 2 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 10 λεπτά, ώστε να διαχωριστεί η οργανική φάση από την υδατική. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο συλλέχθηκε συλλέχθηκε και το ίζημα εναιωρήθηκε επανειλημμένα σε 5 ml εξανίου και φυγοκεντρήθηκε, όπως εξηγήθηκε προηγουμένως, μέχρις ότου δεν ανιχνεύθηκε απορρόφηση από το μίγμα oil mix. Η οργανική φάση των φυγοκεντρημένων δειγμάτων (ένα μίγμα εξανίου και oil mix) συλλέχθηκε και υποβλήθηκε σε εξάτμιση με περιστροφικό εξάτμιστήρα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του oil mix επιτεύχθηκε με μετρήσεις απορρόφησης στα 274 nm χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του oil mix με εξάνιο. Η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικό περιεχόμενο, μετρήθηκε για να εξακριβωθεί η σταθερότητα των λειτουργικών ενώσεων στα τελικά προϊόντα.

Η απόδοση ενσωμάτωσης (ΧΕ%) υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση (Εξ.1):

$$\text{ΧΕ(\%)} = \frac{\text{ml oil mix τελικού προϊόντος}}{\text{συνολικά ml oil mix}} \% \quad (\text{Εξ.1})$$

3.5.3 ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ (TPC)

Τα τελικά δείγματα που προέκυψαν από τη διεργασία της εκβολής, αφού πρώτα θρυμματίστηκαν, στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με σκοπό να μελετηθούν ως προς τα ολικά φαινολικά τους. Κρατήθηκαν επίσης και τα προμίγματα τους, αυτά δηλαδή που δεν υπέστησαν φυγοκεντρική εκβολή προκειμένου να συγκριθούν με τα λεγόμενα ως extruded. Από το κάθε δείγμα πριν (προμίγματα) και μετά την εκβολή συλλέχθηκε ποσότητα 1g σκόνης και διαλυτοποιήθηκε σε 10ml νερού, 5ml εξανίου και 2ml αιθανόλης. Μετά από ανάδευση και φυγόκεντρο το υπερκείμενο κάθε διαλύματος οδηγήθηκε προς εξάτμιση. Από τα εξάτμισμένα πλέον δείγματα, αφού πρώτα διαλυτοποιήθηκαν σε 1 mL αιθανόλης, λήφθηκαν δείγματα, που φωτομετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS [41].



Εικόνα 3.11: Φυγοκεντρημένα δείγματα (πριν και μετά την εκβολή)

3.5.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ

Αρχικά τα τελικά δείγματα που προέκυψαν από τη διεργασία της εκβολής, αφού πρώτα κόπηκαν σε μικρότερα κομμάτια (εικόνα 3.12) μελετηθήθηκαν ως προς την μεταβολή της μάζας (υγρασία) τους για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων σε 2 επιλεγμένες θερμοκρασίες $T=25^{\circ}\text{C}$ και $T=45^{\circ}\text{C}$ και ταυτόχρονα σε τρεις επιλεγμένες τεχνητές υγρασίες $a_w=0,33$, $a_w=0,64$ και $a_w=0,75$. Στην παρακολούθηση της ποιότητας των τροφίμων, το χρώμα είναι ένας σημαντικός ποιοτικός δείκτης.



Εικόνα 3.12: Πέλλετ ζωοτροφής

Ακολουθώντας την ίδια λογική με πριν, δηλαδή σε 2 επιλεγμένες θερμοκρασίες $T=25^{\circ}\text{C}$ και $T=45^{\circ}\text{C}$ και ταυτόχρονα σε τρεις επιλεγμένες τεχνητές υγρασίες $a_w=0,33$, $a_w=0,64$ και $a_w=0,75$ με την βοήθεια χρωματομέτρου (εικ 12), πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του χρώματος των πέλλετ ζωοτροφής σε μονάδες $L^* a^* b^*$ κάθε 7 μέρες για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων.



Εικόνα 3.13: Χρωματόμετρο και πλακίδια βαθμονόμησης για τη μέτρηση του χρώματος των δειγμάτων.

3.5.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑΣ

Η σκληρότητα των προϊόντων εκβολής προσδιορίστηκε με πειραματικές δοκιμές μονοαξονικής συμπίεσης στη συσκευή μηχανικών δοκιμών Zwick, η οποία φαίνεται στην Εικόνα 3.14. Η συσκευή περιλαμβάνει δύο παράλληλες πλάκες για τη μονοαξονική συμπίεση, μία σταθερή και μία κινούμενη. Ο χειρισμός της συσκευής γίνεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Πριν την έναρξη του κάθε πειράματος, μετρήθηκαν οι διαστάσεις κάθε δοκιμίου (μήκος, ύψος, πλάτος) με χρήση παχυμέτρου. Οι τιμές της δύναμης και της παραμόρφωσης καταγράφονταν ηλεκτρονικά με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού (Zwick PC Software, Version 3.1.)



Εικόνα 3.14: Συσκευή μηχανικών δοκιμών

3.6 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ

Απελευθέρωση συστατικού σε γαστρικά υγρά στομάχου (Simulated Gastric Juice)

Τα προσομοιωμένα υγρά στομάχου ετοιμάστηκαν αφού αναμειχθούν τα εξής διαλύματα των 100 ml γνωστής συγκέντρωσης:

- 0,125 mol/l NaCl,
- 0,007 mol/l KCl και
- 0,045 mol/l NaHCO₃.

Αφού λοιπόν αναμείχθηκαν μεταξύ τους ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος στο 3 με την βοήθεια άλλου διαλύματος συγκέντρωσης HCl 12 mol/l και τέλος προσθέτοντας μικρή ποσότητα πεψίνης 0,3 g. Ακολούθως, συλλέγονται 0,2 g από κάθε δείγμα (XS, XE) και προστίθενται στο καθένα 10 ml προσομοίωσης στομάχου (SGJ) σε ποτήρι ζέσεως το οποίο αναδεύεται. Στους χρόνους **2, 5, 10, 20, 30, 45, 60 min** λαμβάνεται 1 ml από το διάλυμα που είναι σε ανάδευση και ταυτόχρονα προστίθεται 1 ml διαλύματος SGJ στο διάλυμα που αναδεύεται. Σε κάθε 1 ml διαλύματος που αντιστοιχεί σε κάθε χρόνο προστίθενται 5 ml εξανίου. Ακολουθεί περιδίνηση (Vortex) για να αναδευτεί καλύτερα και συλλέγεται η υπερκείμενη φάση. Προστίθενται ξανά στο διάλυμα 2 ml εξάνιο, αναδεύεται καλά, συλλέγεται το καινούριο υπερκείμενο μαζί με το προηγούμενο και είναι πλέον έτοιμο για φωτομέτρηση στο UV-VIS στα 274 nm (blank = σκέτο εξάνιο) [35].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

4.1.1 Απόδοση εγκλεισμού (encapsulation efficiency, EE)

Η επίτευξη υψηλής απόδοσης εγκλεισμού είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τον εγκλεισμό ενεργών συστατικών καθώς έτσι ελαχιστοποιείται η έκθεσή τους σε εξωγενείς παράγοντες οι οποίοι επιταχύνουν την υποβάθμισή τους και μειώνουν σημαντικά τον χρόνο ζωής τους.[42]

Πίνακας 4-1: Απόδοση εγκλεισμού των ανεπτυγμένων δομών

No	Δείγμα	Κωδ/ση	EE%
1	Μίγμα αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:pul (30:70)% w/w, μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης	EL-WPI:PUL (30:70)	86,88%
2	Μίγμα αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:pul (80:20)% w/w, μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό	SP-WPI:PUL (80:20)	73,34%
3	Μίγμα αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:pul (80:20)% w/w, μέσω της ξήρανσης με κατάψυξη	FZ-WPI:PUL (80:20)	37,98%

Όσον αφορά την μελέτη εγκλεισμού με την μέθοδο της ξήρανσης με κατάψυξη (freeze drying), η συγκεκριμένη τεχνική εμφάνισε τη χειρότερη συμπεριφορά κατά τον εγκλεισμό, σε συνδυασμό με χαμηλότερο βιοδραστικό περιεχόμενο των εγκλεισμένων δομών, και για το λόγο αυτό δεν προχώρησε σε περαιτέρω μελέτη όπως τα δείγματα που προέκυψαν από τον εγκλεισμό με τις υπόλοιπες δύο τεχνικές.

4.1.2 Αξιολόγηση Βιοδραστικότητας εγκλεισμένων δομών

Πίνακας 4-2: Συνολικό Φαινολικό περιεχόμενο εγκλεισμένων δομών

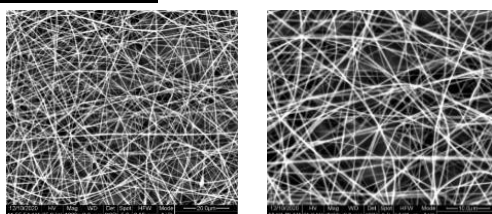
No	Δείγμα	Κωδ/ση	mg GAE/ mg δείγμα τος
1	Μίγμα αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:pul (30:70)% w/w, μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης	EL-WPI:PUL (30:70)	0,0141
2	Μίγμα αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:pul (80:20)% w/w, μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό	SP-WPI:PUL (80:20)	0,0281
3	Μίγμα αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:pul (80:20)% w/w, μέσω της ξήρανσης με κατάψυξη	FZ-WPI:PUL (80:20)	0,0098

4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΜΩΝ

4.2.1 Χαρακτηρισμός δομής - Μορφολογία των προϊόντων εγκλεισμού

Η μελέτη της μορφολογίας των δομών αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική παράμετρο καθώς η δομή της συστήματος εγκλεισμού παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκράτηση των βιοδραστικών ενώσεων. Στην Εικόνα 4.1 και 4.2, παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των δομών που προέκυψαν με χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου SEM που αναπτύχθηκαν μέσω της μεθόδου της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας και της ξήρανσης με ψεκασμό, αντίστοιχα, του μίγματος αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:puI.

- **Εγκλεισμός μίγματος αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:puI (30:70)% w/w – Ηλεκτροϋδροδυναμική Διεργασία**



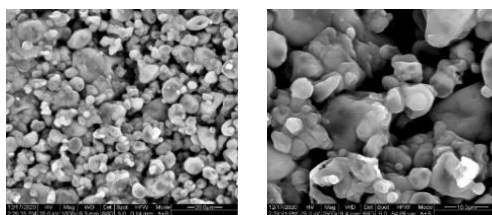
α)

β)

Σχήμα 4-1: Εικόνες SEM για νανοϊνες μίγματος αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:puI με παροχές 0.12 mL/h και 1.5 mL/h αντίστοιχα και επιβαλλόμενη τάση 25 kV σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm

Όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες, τα αποτελέσματα του εγκλεισμού του μίγματος αιθέριων ελαίων στην υδατική μήτρα WPI:puI (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 μίγματος αιθέριων ελαίων σε μήτρα WPI:puI (80:20)-20%w/w – Ξήρανση με ψεκασμό**



α)

β)

Σχήμα 4-2: Εικόνες SEM για εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό σε κλίμακα α) 20μm, β)10μm

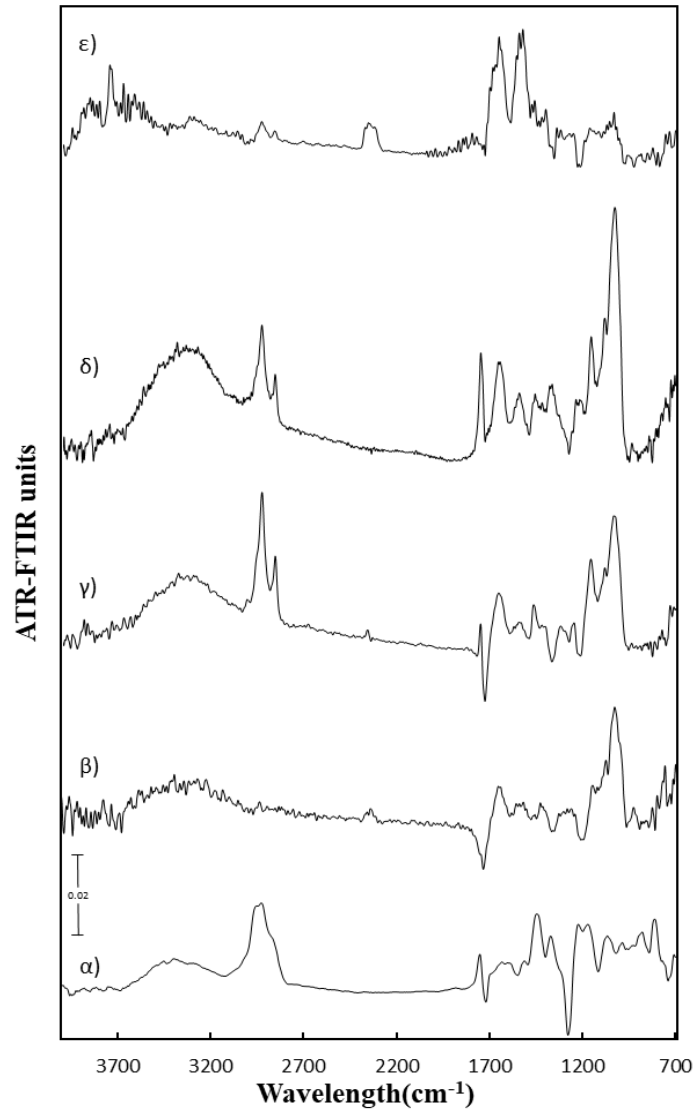
Όπως παρατηρείται, τα προϊόντα εγκλεισμού που λήφθηκαν από την ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), αποτελούνται από δομές που προσομοιάζουν το σχήμα των κόκκων, με αρκετά καλή διασπορά, και απουσία ρωγμών στα σωματίδια. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον επιτυχημένο εγκλεισμό των ενώσεων στόχων, εφόσον δεν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

4.2.2 Αξιολόγηση ελεγχόμενης αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών

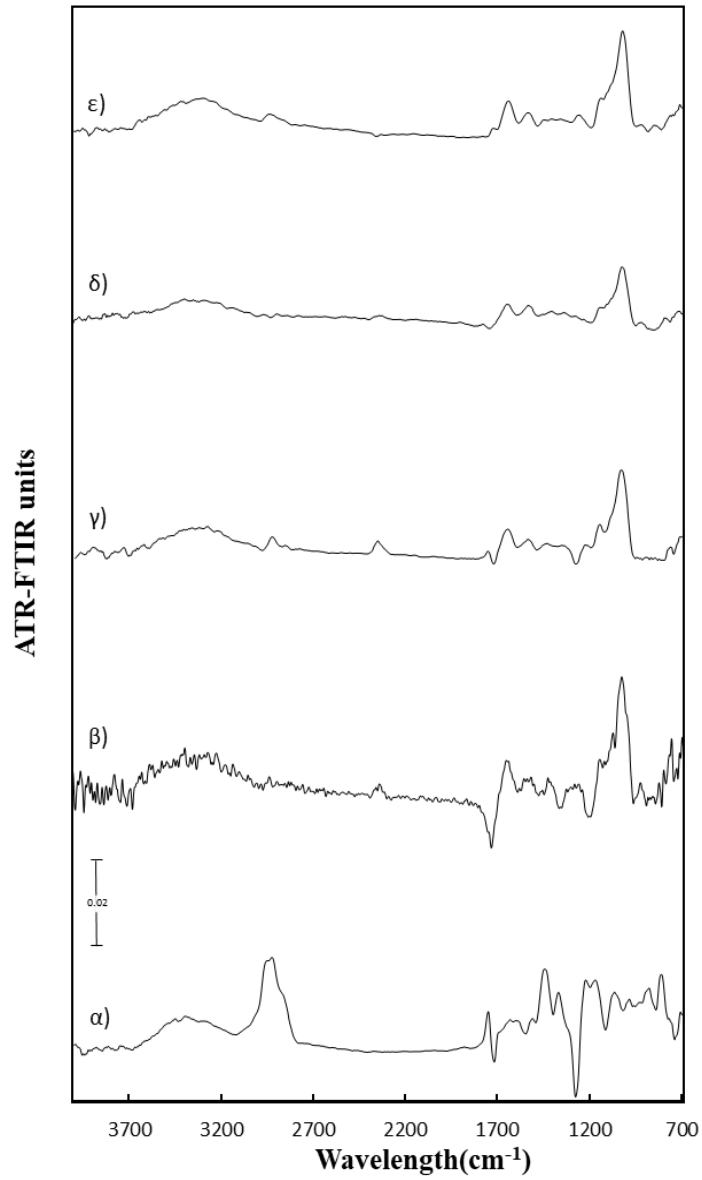
4.2.2.1 Εφαρμογή της τεχνικής ATR-FTIR

Η εφαρμογή της τεχνικής ATR-FTIR, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τους χημικούς δεσμούς, επιτρέπει τον έλεγχο της παρουσίας της προς εγκλεισμό ουσίας στο σύστημα

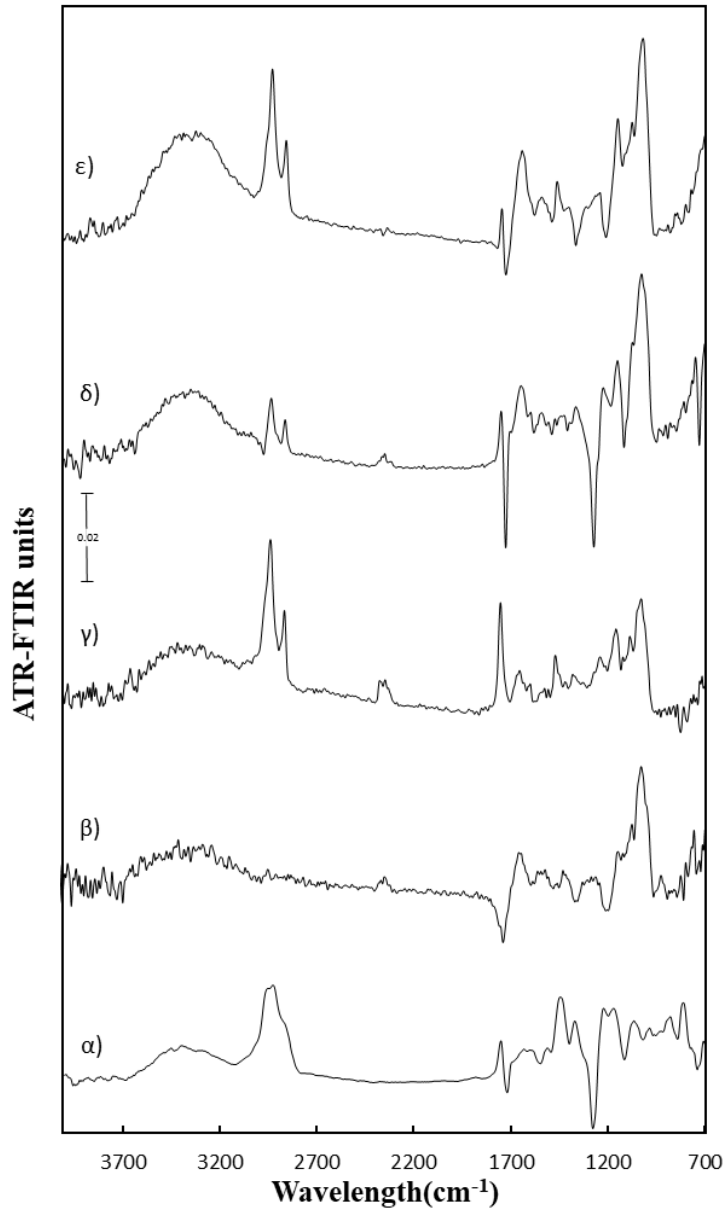
εγκλεισμού καθώς και την επιβεβαίωση του εγκλεισμού. Επομένως, μέσω αυτής της τεχνικής, ήταν η δυνατή η αξιολόγηση της ύπαρξης των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C, 45°C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$). Η φασματοσκοπία ATR-FTIR εφαρμόστηκε στις δομές WPI:pul (Ελ και SP) χωρίς και με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων, όπως και στο μίγμα αιθέριων ελαίων (υλικό πυρήνα) για λόγους σύγκρισης. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα φάσματα που ελήφθησαν για τα προϊόντα εγκλεισμού.



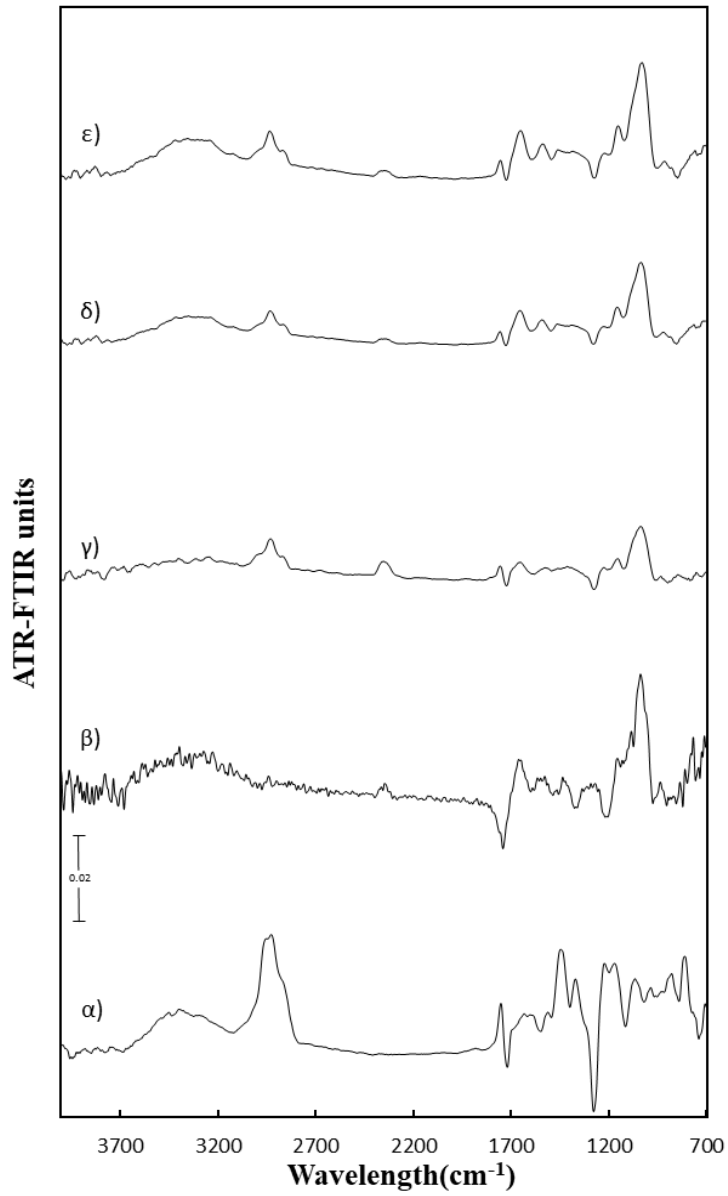
Σχήμα 4-3: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρας εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 7 days.



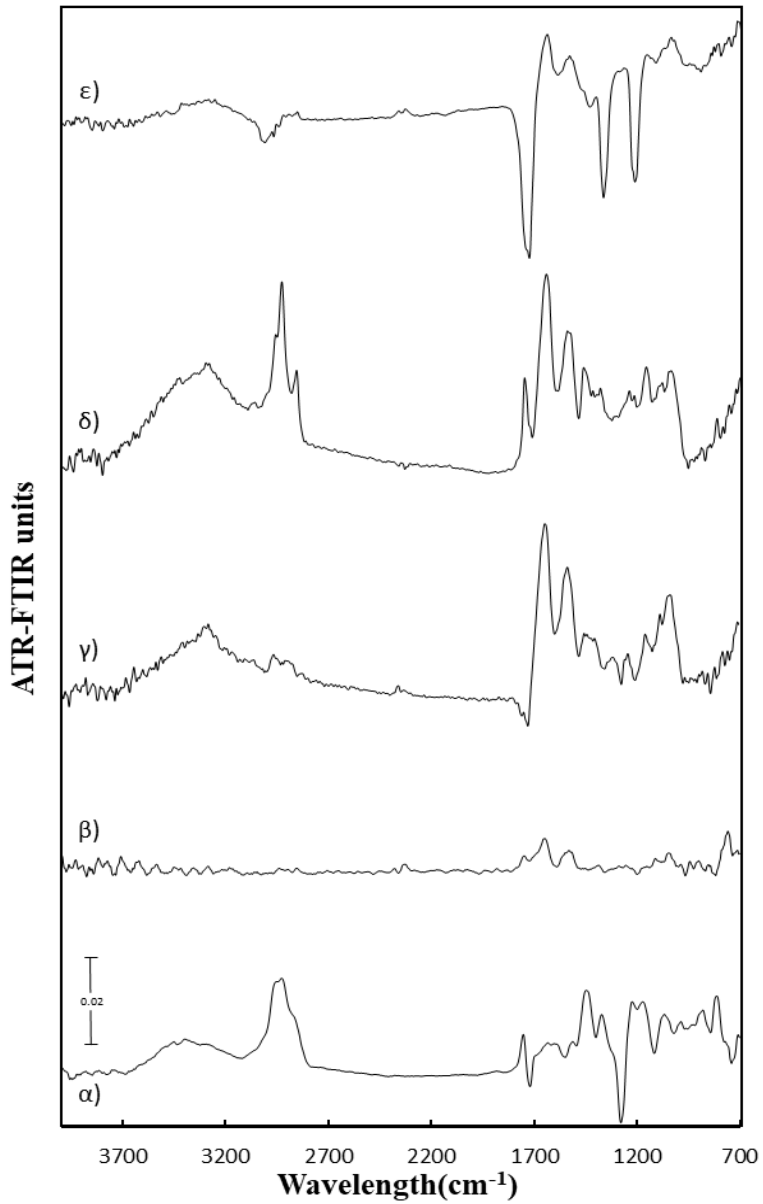
Σχήμα 4-4: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρα εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 7 days.



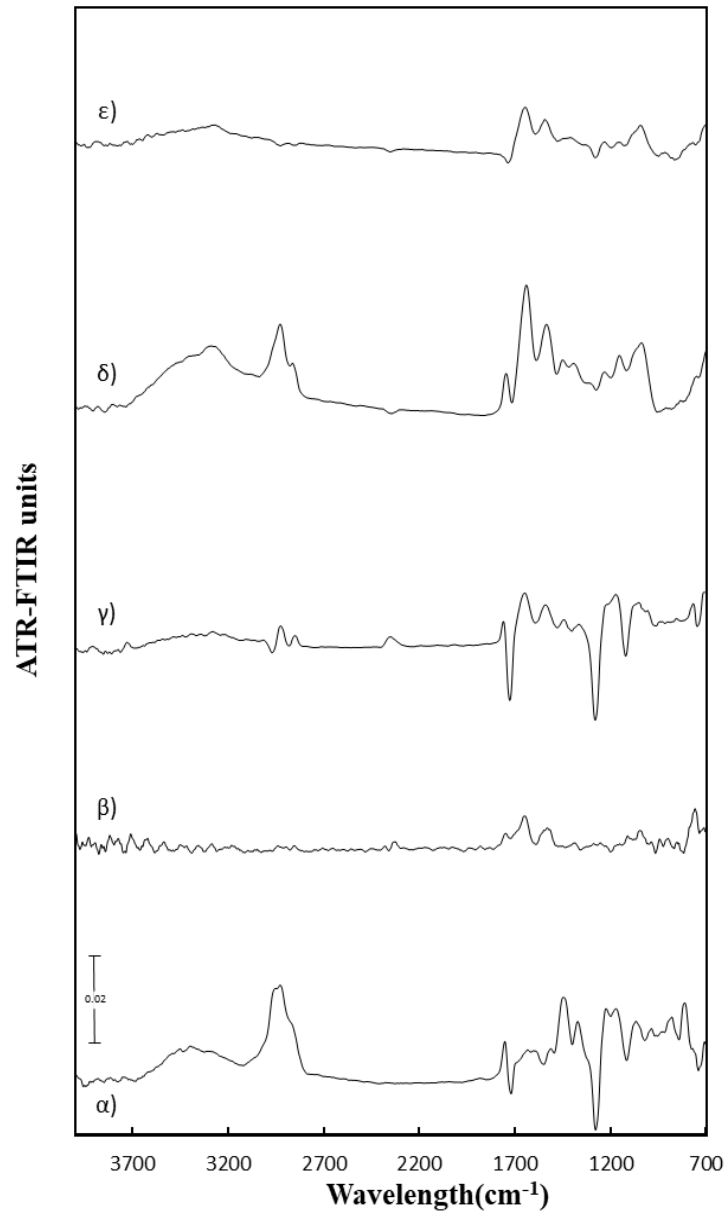
Σχήμα 4-5: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρα εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 30 days.



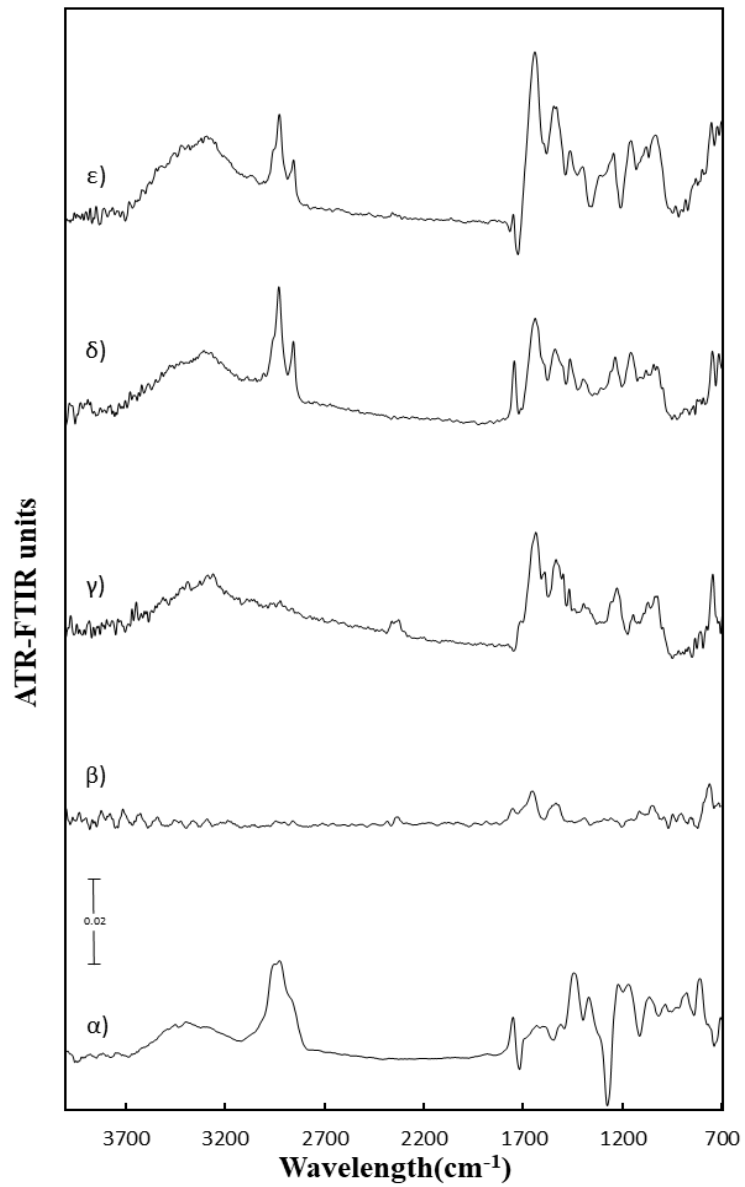
Σχήμα 4-6: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρα εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 30 days.



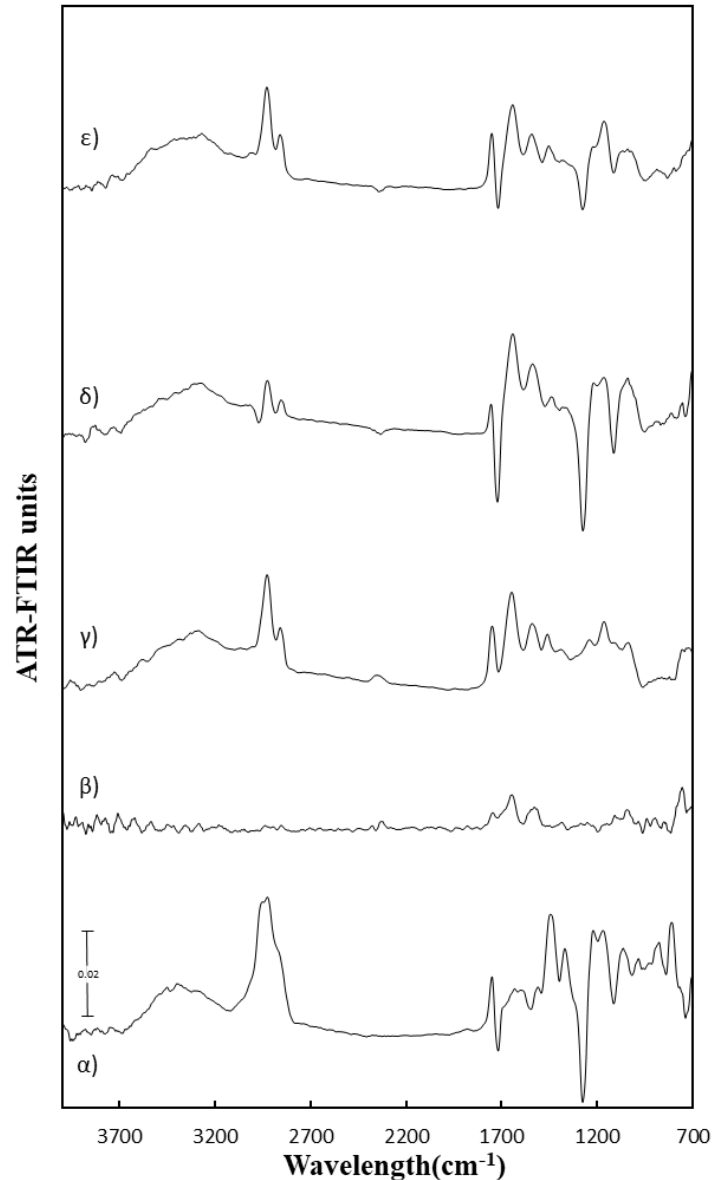
Σχήμα 4-7: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρα εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα ειχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 7 days.



Σχήμα 4-8: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρα εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 7 days.



Σχήμα 4-9: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρα εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα ειχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 25°C για 30 days.



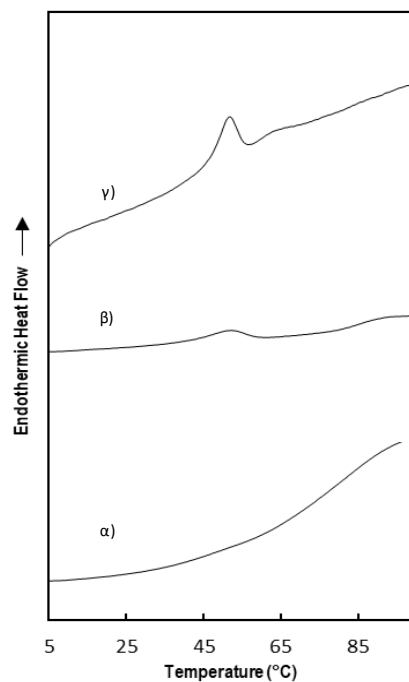
Σχήμα 4-10: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (α), της μήτρα εγκλεισμού WPI:PUL (β) και των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα ειχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (γ), 0,64 (δ), 0,75 (ε) στους 45°C για 30 days.

Με βάση τα Σχήματα 4-3 έως 4-10, τα φάσματα των προϊόντων εγκλεισμού WPI:PUL με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων παρουσίασαν χαρακτηριστικές κορυφές τόσο του φορέα εγκλεισμού όσο και του μίγματος αιθέριων ελαίων. Συγκεκριμένα, οι χαρακτηριστικές κορυφές της WPI στον κυματαριθμό 1643 cm^{-1} για το αμίδιο τύπου I ή για τη δόνηση τάσης του δεσμού C=O (C=O stretching) και στον κυματαριθμό 1528 cm^{-1} για το αμίδιο τύπου II ή για τη δόνηση τάσης και κάμψης του δεσμού N-H (N-H stretching and bending) εμφανίστηκαν στις δομές εγκλεισμού που προέκυψαν μέσω της ηλεκτροστατικής ισοποίησης και της ξήρανσης με ψεκασμό. Αντίστοιχα, οι χαρακτηριστικές κορυφές της PUL στους κυματαριθμούς ανάμεσα στα 1200 και 1030 cm^{-1} για το δεσμό C-O, στον κυματαριθμό 1147 cm^{-1} για τη δόνηση τάσης του (1→4) γλυκοσιδικού δεσμού και στους κυματαριθμούς 844 cm^{-1} και 930 cm^{-1} που προέρχονται από τις μονάδες α-γλυκοπυρανοσίδης και τους α-(1→6) γλυκοσιδικούς δεσμούς, αντίστοιχα, παρουσιάστηκαν στις δομές εγκλεισμού [42]. Οι δομές WPI:PUL με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων παρουσίασαν αυξημένη απορρόφηση

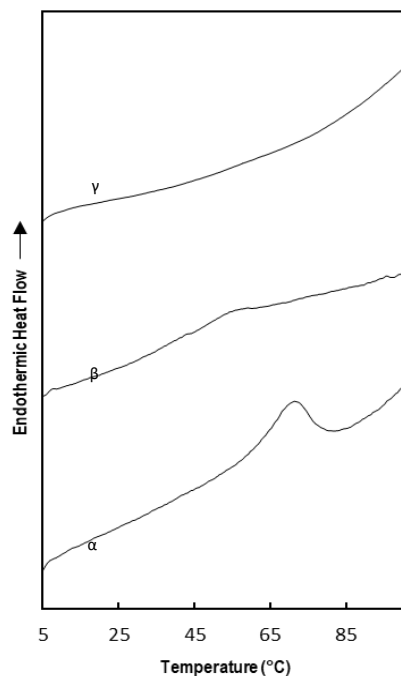
στους κυματαριθμούς μεταξύ των 3000 cm^{-1} και 2800 cm^{-1} συγκριτικά με τις δομές WPI-PUL εξαιτίας της παρουσίας του μίγματος αιθέριων ελαίων στις δομές. Συμπερασματικά, η εμφάνιση των παραπάνω χαρακτηριστικών κορυφών στα φάσματα ATR-FTIR των προϊόντων εγκλεισμού επιβεβαιώνει την επιτυχή/αποτελεσματική συγκράτηση της προς εγκλεισμό ουσίας στους φορείς εγκλεισμού.

4.2.3 Προσδιορισμός θερμικών χαρακτηριστικών μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC)

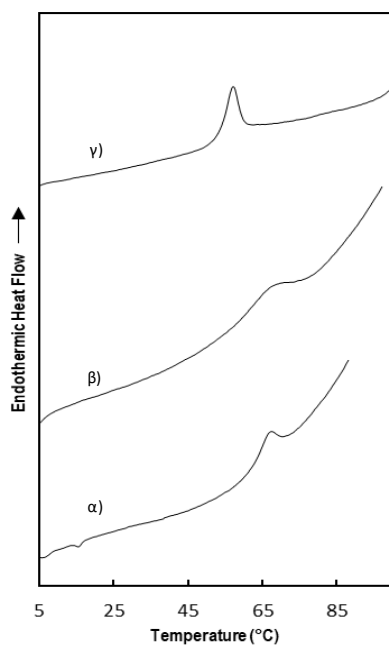
Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται οι σαρώσεις DSC για τις δομές εγκλεισμού WPI:PUL με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων που αναπτύχθηκαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και της ξήρανσης με ψεκασμό κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C , 45°C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33$, $0,64$, $0,75$).



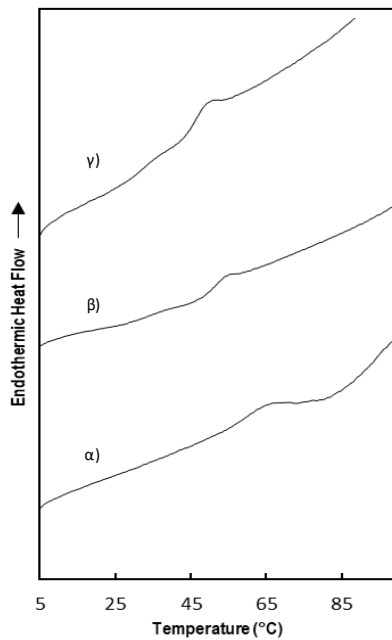
Σχήμα 4-11: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 7 days.



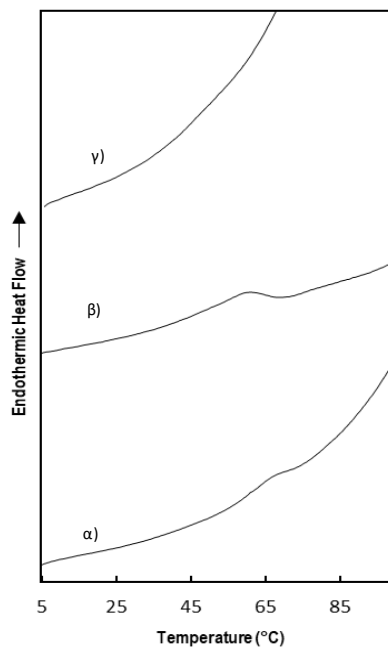
Σχήμα 4-12: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 45°C για 7 days.



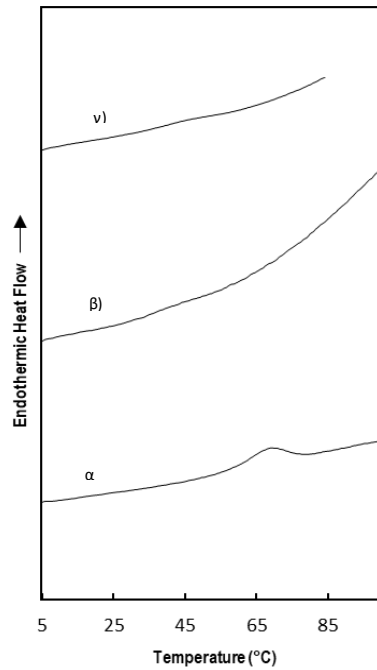
Σχήμα 4-13: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 30 days.



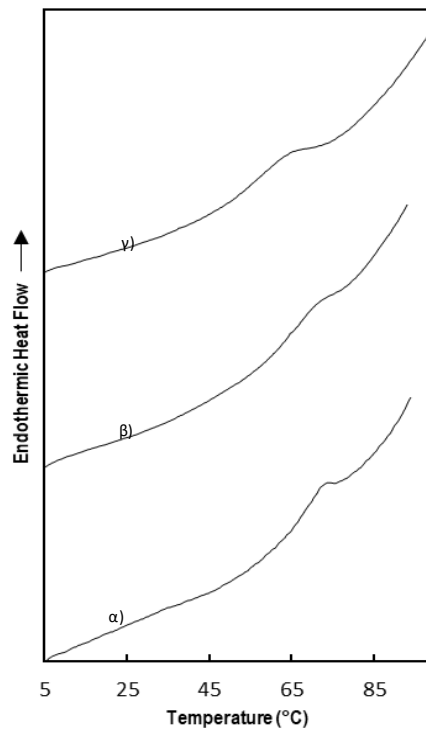
Σχήμα 4-14: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού EL-WPI:PUL (30:70) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 45°C για 30 days.



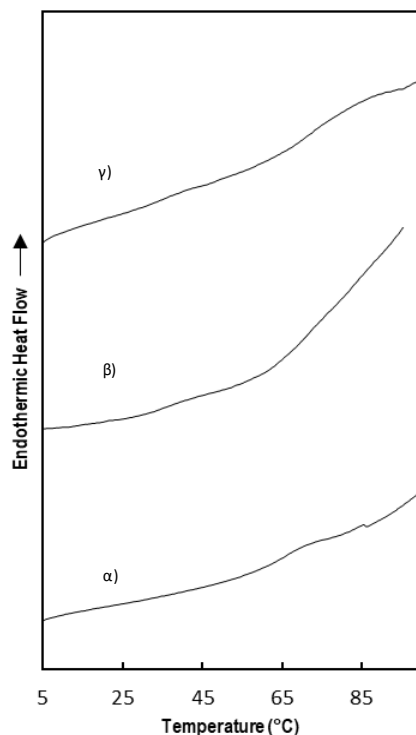
Σχήμα 4-15: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 7 days.



Σχήμα 4-16: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 45°C για 7 days.



Σχήμα 4-17: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 25°C για 30 days.



Σχήμα 4-18: Διαγράμματα DSC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης των προϊόντων εγκλεισμού SP-WPI:PUL (80:20) με εγκλεισμένο μίγμα εκχυλίσματος κατά την αποθήκευσή τους σε διάφορες ενεργότητες νερού: 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ) στους 45°C για 30 days.

Κατά τη σάρωση των δειγμάτων καταγράφηκε η ροή θερμότητας ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ενώ τα δείγματα θερμάνθηκαν με σταθερό ρυθμό. Οι αρχικές σαρώσεις, παρουσίασαν ενδόθερμες μεταβάσεις οι οποίες οφείλονται στην παρουσία της πουλουλάνης στους εγκλεισμούς. Με βάση τα παραπάνω σχήματα παρατηρείται η μετατόπιση των ενδόθερμων κορυφών προς χαμηλότερες θερμοκρασίες, τυπικές της υαλώδους μετάπτωσης, η οποία υποδεικνύει την προοδευτική μείωση της T_g με την αύξηση της περιεκτικότητας των δομών εγκλεισμού σε νερό λόγω της πλαστικοποίησης των άμορφων πλεγμάτων των δομών με το νερό. Επίσης, παρατηρείται ότι η παρουσία μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε πουλλουλάνη στις δομές της ηλεκτροστατικής ινοποίησης οδήγησε στην εμφάνιση μεγαλύτερης έντασης ενδόθερμων κορυφών συγκριτικά με τις δομές της ξήρανσης με ψεκασμό. Στον Πίνακα 4-1 και 4-2 παρουσιάζονται οι T_g των δομών εγκλεισμού WPI:PUL που αναπτύχθηκαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και της ξήρανσης με ψεκασμό, αντίστοιχα κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C, 45°C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$).

Πίνακας 4-3: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) για τις δομές εγκλεισμού WPI:PUL με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων που αναπτύχθηκαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C, 45°C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$).

Χρόνος/Θερμοκρασία αποθήκευσης	Σχετική υγρασία	T_g
7days		
25°C	0.33	57.06
	0.64	55.66
	0.75	53.31
45°C	0.33	75.24
	0.64	59.54
	0.75	44.66
30days		
25°C	0.33	68.29
	0.64	60.75
	0.75	58.13
45°C	0.33	71.97
	0.64	52.16
	0.75	48.45

Πίνακας 4-4: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) για τις δομές εγκλεισμού WPI:PUL με εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων που αναπτύχθηκαν μέσω της ξήρανσης με ψεκάσμο κατά την αποθήκευσή τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C, 45°C) και σχετικής υγρασίας ($a_w=0,33, 0,64, 0,75$).

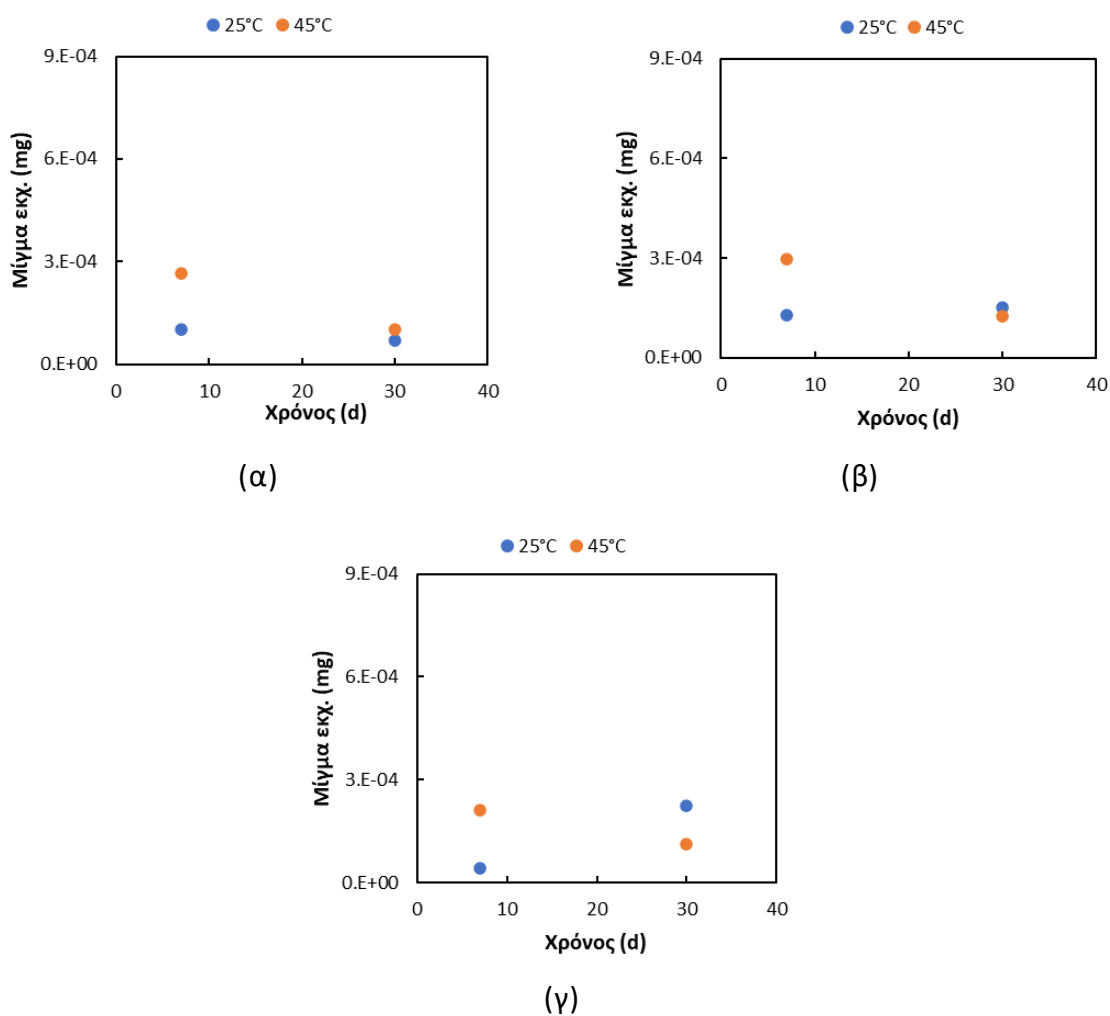
Χρόνος/Θερμοκρασία αποθήκευσης	Σχετική υγρασία	T_g
7days		
25°C	0.33	70.09
	0.64	64.72
	0.75	48.25
45°C	0.33	71.14
	0.64	57.70
	0.75	49.32
30days		
25°C	0.33	75.02
	0.64	70.22
	0.75	65.88
45°C	0.33	77.98
	0.64	50.89
	0.75	46.73

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 4-1 και 4-2, η T_g κυμάνθηκε από 53,31°C έως 68,29°C και από 44,66°C έως 75,24°C για τις δομές εγκλεισμού που προέκυψαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και από 48,25°C έως 75,02°C και από 46,73°C έως 77,98°C για τις δομές εγκλεισμού που προέκυψαν μέσω της ξήρανσης με ψεκάσμο στις δυο θερμοκρασίες αποθήκευσης που εξετάστηκαν (25, 45°C), αντίστοιχα. Με βάση τα αποτελέσματα, όπως αναμενόταν, παρατηρείται ότι η αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας στα δείγματα οδήγησε σε μείωση της T_g καθώς το νερό δρα ως πλαστικοποιητής της άμορφης μήτρας του φορέα εγκλεισμού. Επιπλέον, οι δομές που προέκυψαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές T_g εξαιτίας της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε πουλλουάνη συγκριτικά με τις δομές μέσω της ξήρανσης με ψεκάσμο.

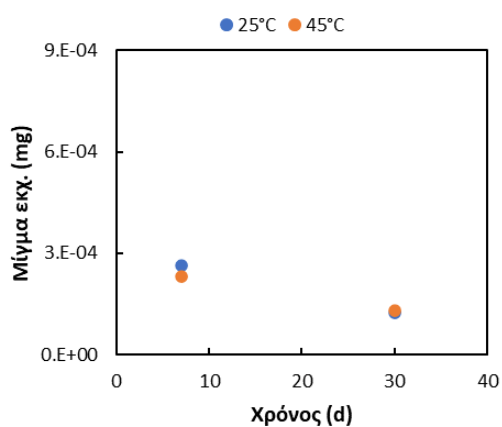
4.2.4 Προσδιορισμός ελεγχόμενης αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών

4.2.4.1 Επίδραση θερμοκρασίας αποθήκευσης στην αποδέσμευση των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών

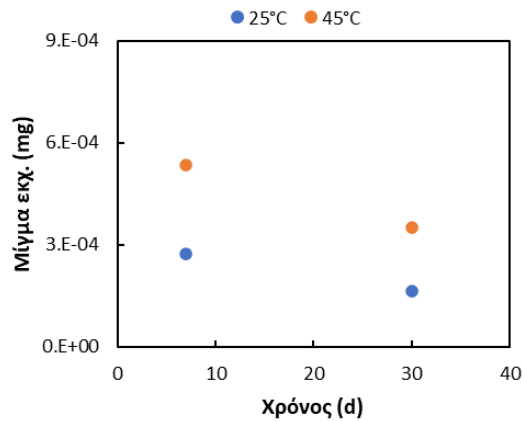
Στα Σχήματα 4-19 και 4-20 παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην αποδέσμευση του μίγματος αιθέριων ελαίων στις δομές εγκλεισμού που προέκυψαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και της ξήρανης με ψεκασμό, αντίστοιχα, κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασίες 25°C και 45°C σε ενεργότητες νερού 0,33, 0,64 και 0,75.



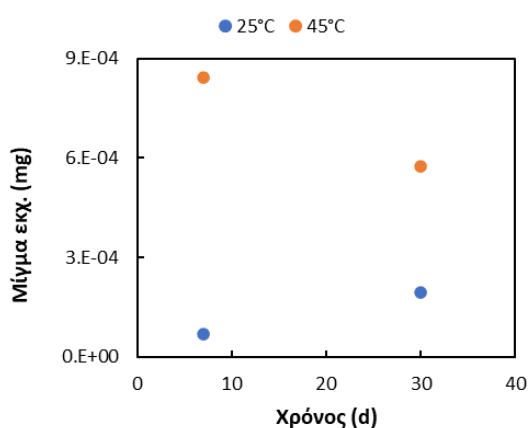
Σχήμα 4-19: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού ΧΕ-WPI:PUL (30:70) κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασίες 25°C και 45°C σε ενεργότητες νερού 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ).



(α)



(β)



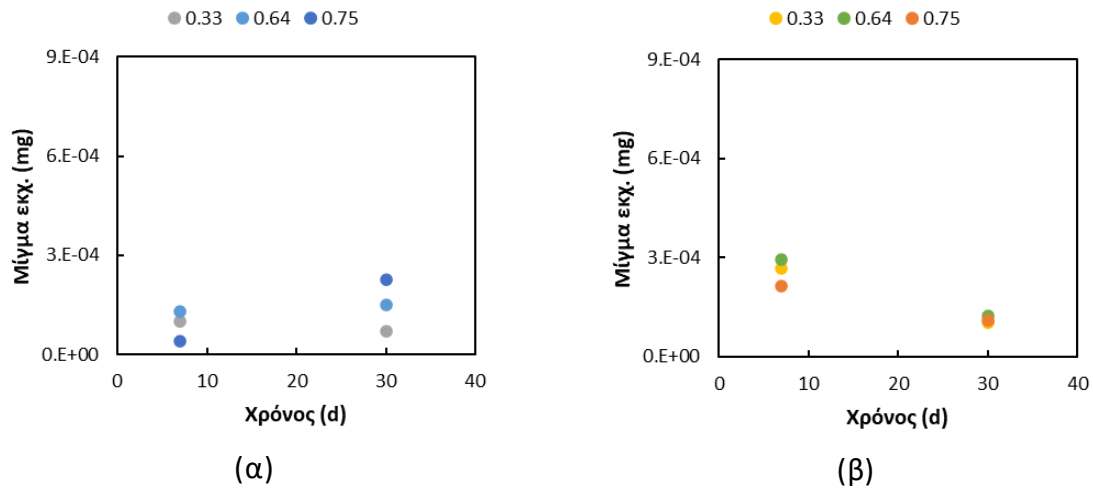
(γ)

Σχήμα 4-20: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού XS-WPI:PUL (80:20) κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασίες 25°C και 45°C σε ενεργότητες νερού 0,33 (α), 0,64 (β), 0,75 (γ).

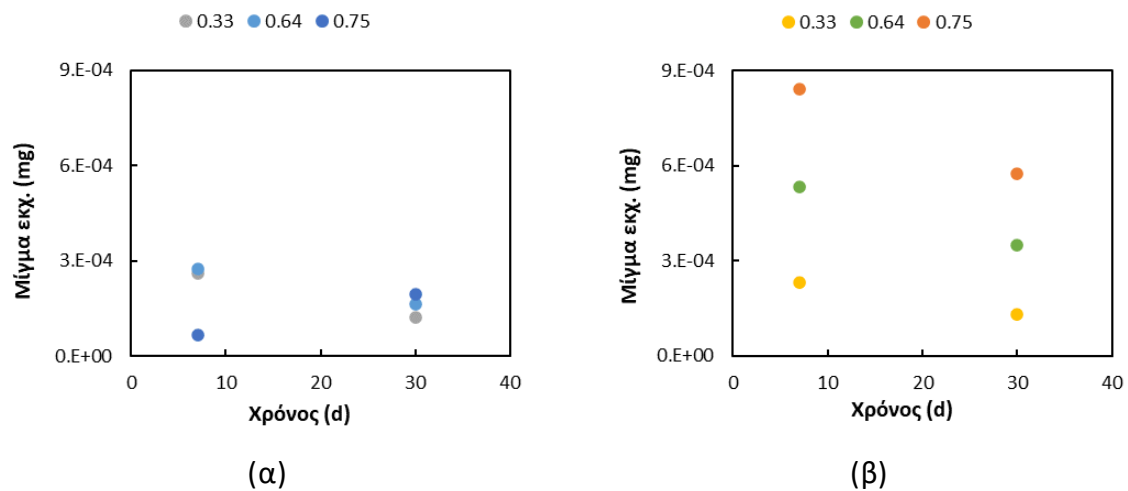
Με βάση τα παραπάνω σχήματα, παρατηρείται, όπως είναι αναμενόμενο, ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης από τους 25°C στους 45°C είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποδέσμευσης του μίγματος αιθέριων ελαίων για όλες τις υγρασίες αποθήκευσης. Ωστόσο, η ενσωμάτωση του μίγματος αιθέριων ελαίων στις δομές εγκλεισμού και με τις δυο τεχνικές είχε ως αποτέλεσμα την προστασία των ενεργών συστατικών από τη θερμική υποβάθμιση. Συγκρίνοντας τις δυο τεχνολογίες εγκλεισμού, συμπεραίνεται ότι η ηλεκτροστατική ινοποίηση οδήγησε στην ανάπτυξη δομών με μεγαλύτερη συγκράτηση των ενεργών συστατικών σε σχέση με την ξήρανση με ψεκασμό. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη διαφορά στη σύσταση των φορέων εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις δυο τεχνικές εγκλεισμού (XS-WPI:PUL (30:70), XS-WPI:PUL (80:20)) συμπεραίνοντας ότι η παρουσία της πουλλουλάνης σε μεγαλύτερη αναλογία στην μήτρα οδήγησε σε αύξηση της συγκράτησης των ενεργών συστατικών. Επιπλέον, η ηλεκτροστατική ινοποίηση αποτελεί μια μέθοδο εγκλεισμού η οποία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη προϊόντων υψηλότερης ποιότητας.

4.2.4.2 Επίδραση σχετικής υγρασίας στην αποδέσμευση των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών

Στα Σχήματα 4-19 και 4-20 παρουσιάζεται η επίδραση της σχετικής υγρασίας αποθήκευσης στην αποδέσμευση του μίγματος αιθέριων ελαίων στις δομές εγκλεισμού που προέκυψαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και της ξήρανης με ψεκασμό, αντίστοιχα, κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασίες 25°C και 45°C σε ενεργότητες νερού 0,33, 0,64 και 0,75.



Σχήμα 4-21: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού ΧΕ-WPI:PUL (30:70) κατά την αποθήκευσή τους σε ενεργότητες νερού 0,33, 0,64, 0,75 σε θερμοκρασίες 25°C (α) και 45°C (β).



Σχήμα 4-22: Αποδέσμευση μίγματος αιθέριων ελαίων των προϊόντων εγκλεισμού ΧS-WPI:PUL (80:20) κατά την αποθήκευσή τους σε ενεργότητες νερού 0,33, 0,64, 0,75 σε θερμοκρασίες 25°C (α) και 45°C (β).

Με βάση τα παραπάνω σχήματα, συμπεραίνεται ότι η αύξηση της σχετικής υγρασίας αποθήκευσης των δειγμάτων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποδέσμευσης του μίγματος αιθέριων ελαίων για όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης που εξετάστηκαν. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην υδρόφιλη φύση του φορέα εγκλεισμού με αποτέλεσμα η αύξηση της υγρασίας να οδηγεί σε κατάρρευση της δομής και απελευθέρωση των ενεργών συστατικών στην επιφάνεια των προϊόντων εγκλεισμού. Ωστόσο, η αποθήκευση των δειγμάτων σε χαμηλή σχετική υγρασία οδήγησε στην παραμονή των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών στο εσωτερικό του φορέα εγκλεισμού και για τα δυο προϊόντα εγκλεισμού για τις δυο θερμοκρασίες αποθήκευσης που εξετάστηκαν.

4.3 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΥ OIL-MIX ΣΕ ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΓΙΑ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ (ΕΚΒΟΛΗ)

4.3.1 Απόδοση Ενσωμάτωσης (ΧΕ%)

Όλα τα δείγματα (ΧC, ΧΡ, ΧS) οδηγήθηκαν στη συσκευή του εκβολέα για παραγωγή των πέλλετ, που αποτελούν και το τελικό στάδιο της συνολικής διεργασίας παραγωγής της ζωοτροφής. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του περιεχόμενου oil mix πριν και μετά τη διεργασία της εκβολής, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3-1. Η απόδοση ενσωμάτωσης (ΧΕ%) των προϊόντων εκβολής παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4-5: Απόδοση ενσωμάτωσης (ΧΕ%) των καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών

No	Δείγμα	Κωδ/ση - πρόμιγμα	ΧΕ%
1	Προϊόν εκβολής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μη εγκλεισμένη μορφή	ΧΡ	36,65
2	Προϊόν εκβολής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή με την μέθοδο spray drying	ΧS	73,41
3	Προϊόν εκβολής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή με την μέθοδο electrospinning/electrospraying	ΧΕ	64,33

Από τα αποτελέσματα της απόδοσης ενσωμάτωσης, διαπιστώθηκε πως το δείγμα εγκλεισμένης σκόνης oil-mix με τη μέθοδο της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας (electrospinning) εμφάνισε μικρότερο ποσοστό βιοδραστικού περιεχομένου oil-mix μετά την ενσωμάτωση, παρά το γεγονός ότι η μορφολογία του ήταν ικανοποιητική. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε ως βέλτιστο το προϊόν εκβολής με ενσωματωμένο εγκλεισμένο oil mix μέσω ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying) και μελετήθηκε περαιτέρω. Το βέλτιστο δείγμα, δηλαδή το προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή με την μέθοδο spray drying (Προϊόν 1), χαρακτηρίστηκε ως προς τη διατηρησιμότητά του, και συγκρίθηκε με το προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μη εγκλεισμένη μορφή (Προϊόν 2), καθώς και με τη συμβατική ζωοτροφή. Το Προϊόν 1, το Προϊόν 2, και η συμβατική ζωοτροφή, προέκυψαν από τα προμίγματα ΧS, ΧΡ και ΧC αντίστοιχα μετά τη διεργασία της εκβολής.

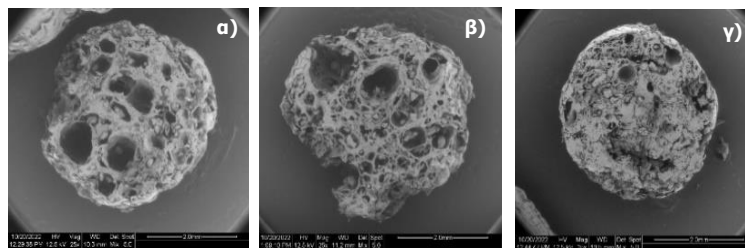
Πίνακας 4-6: Κωδικοποίηση των τελικών προϊόντων ζωοτροφών

Προϊόν	Κωδ/ση
Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή με την μέθοδο spray drying	Προϊόν 1
Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μη εγκλεισμένη μορφή	Προϊόν 2

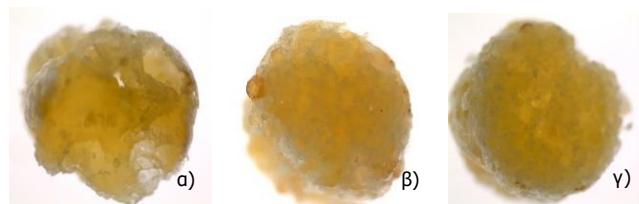
4.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ

4.4.1 Μορφολογία

Οι απεικονίσεις που προέκυψαν από την χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), για τα καινοτόμα προϊόντα εκβολής με ενσωματωμένα φυσικά βιοδραστικά συστατικά σε εγκλεισμένη και μη εγκλεισμένη μορφή, παρατίθενται παρακάτω.



Σχήμα 4-23: Εικόνες SEM της συμβατικής ζωοτροφής (control) (α), του προϊόντος 1 (β), και του προϊόντος 2 (γ).



Σχήμα 4-24: Στερεοσκοπική απεικόνιση της διατομής της συμβατικής ζωοτροφής (α), του προϊόντος 1 (β), και του προϊόντος 2 (γ).

4.4.2 Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο

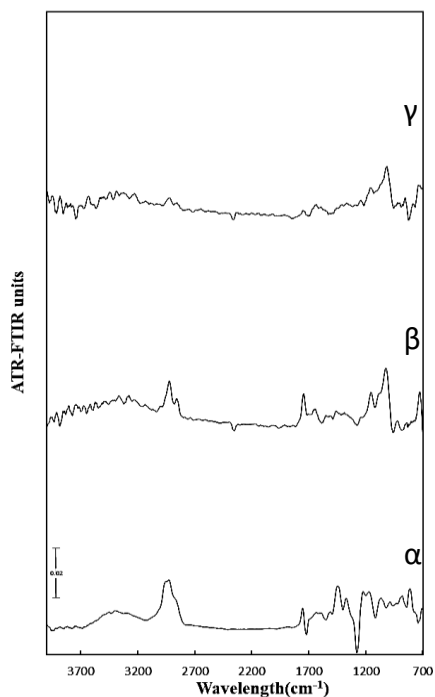
Για να προσδιοριστεί η βιοδραστητικότητα των νέων καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών που αναπτύχθηκαν, μετρήθηκε το συνολικό φαινολικό τους περιεχόμενο πριν και μετά τη διεργασία της ενσωμάτωσης με στόχο να αξιολογηθεί η επίδραση του εγκλεισμού στην τελική ποιότητα του προϊόντος.

Πίνακας 4-7: Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών

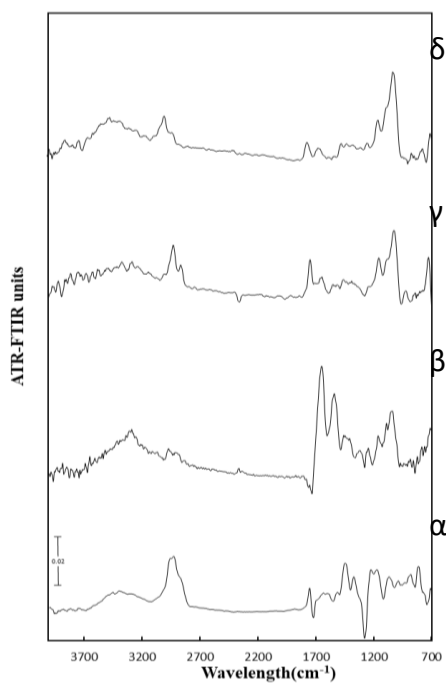
Προϊόν	Κωδ/ση	mg GAE/g δείγμα τος αρχικό	mg GAE/g δείγμα τος τελικό	Απώλεια βιοδραστητικότητας
Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή μέσω spray drying	Προϊόν 1	2,35	2,33	0,60%
Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μη εγκλεισμένη μορφή	Προϊόν 2	2,20	2,13	3,16%

4.4.3 Εφαρμογή της τεχνικής ATR-FTIR

Η εφαρμογή της τεχνικής ATR-FTIR, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τους χημικούς δεσμούς, επιτρέπει τον έλεγχο της παρουσίας της βιοδραστητικής ουσίας στο τελικό προϊόν, συνεπώς και την επιβεβαίωση της σταθερότητας αυτού. Επομένως, μέσω αυτής της τεχνικής, ήταν η δυνατή η αξιολόγηση της ύπαρξης των εγκλεισμένων και μη εγκλεισμένων ενεργών συστατικών oil mix στα τελικά προϊόντα, κατά την αποθήκευσή τους σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C) και υγρασίας ($a_w=0.54$) για ενενήντα (90) ημέρες. Η φασματοσκοπία ATR-FTIR εφαρμόστηκε στα τελικά προϊόντα καινοτόμων ζωοτροφών (προϊόν 1 και 2), στις εγκλεισμένες δομές XS-WPI:ru1 που περιείχαν εγκλεισμένο oil mix, στο μίγμα αιθέριων ελαίων oil mix (υλικό πυρήνα) καθώς και στη συμβατική ζωοτροφή (XC) για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα φάσματα που ελήφθησαν για τα νέα τελικά προϊόντα.



Σχήμα 4-25: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) (α), της συμβατικής ζωτροφής (β), και του τελικού προϊόντος ζωτροφής με ενσωματωμένο το μη εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (προϊόν 2) κατά την αποθήκευσή του στους 25°C και aw=0.54 για 90 ημέρες.



Σχήμα 4-26: Φάσματα ATR-FTIR του μίγματος μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (α), των εγκλεισμένων δομών SP-WPI:pu1 με το εγκλεισμένο μίγμα μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (β), της συμβατικής ζωτροφής (γ), και του τελικού προϊόντος ζωτροφής με ενσωματωμένο το εγκλεισμένο μίγμα μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) (δ) (προϊόν 1) κατά την αποθήκευσή του στους 25°C και aw=0.54, για 90 ημέρες.

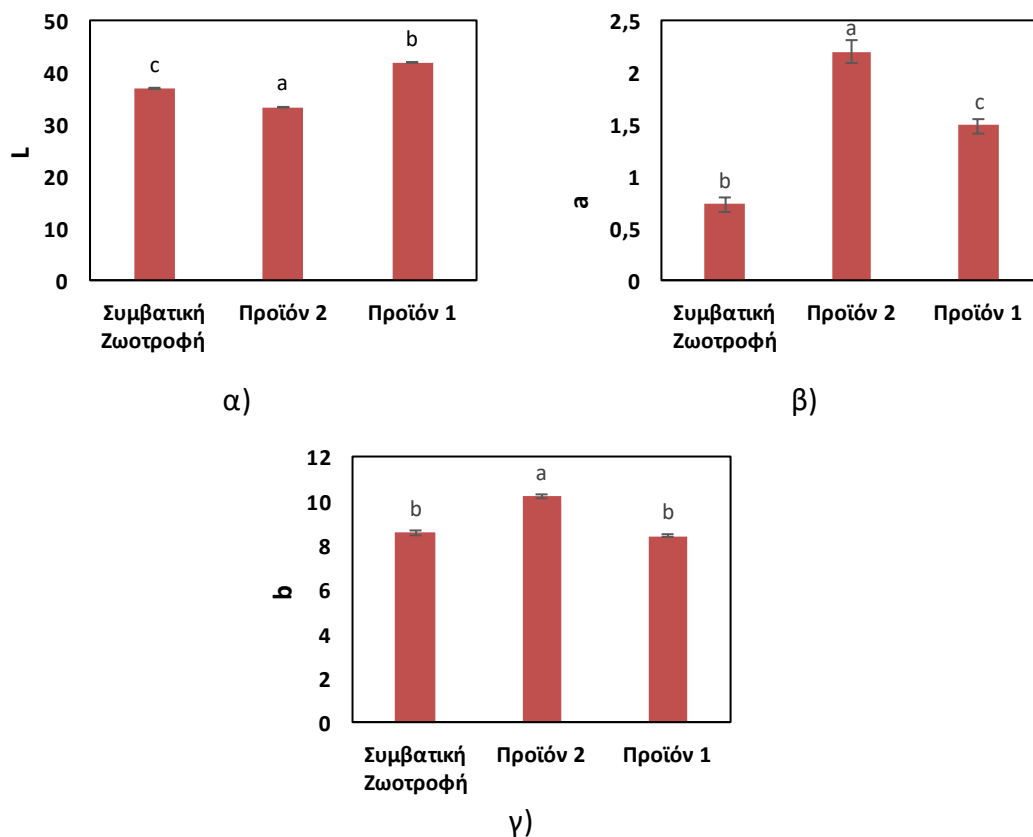
4.4.4 Προσδιορισμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών

4.4.4.1 Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης

Πίνακας 4-8: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης των καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών

Προϊόν	Κωδ/ση	aw	Tg (°C)
Συμβατική ζωοτροφή	ΣΖ	0,54	49,57
Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή	Προϊόν 1	0,54	57,38
Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μη εγκλεισμένη μορφή	Προϊόν 2	0,54	55,62

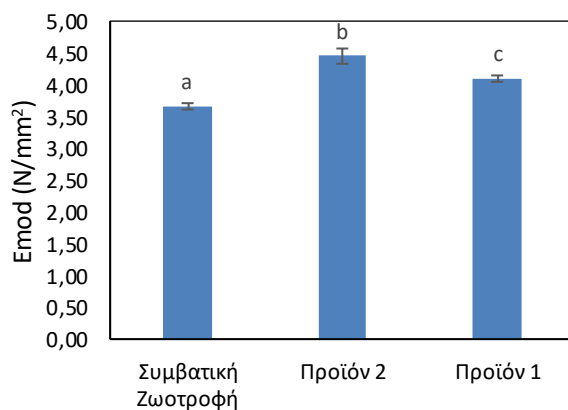
4.4.4.2 Μέτρηση χρώματος



Σχήμα 4-27: Παράμετροι χρώματος L (α), a (β), και b (γ) για τα τελικά προϊόντα ζωοτροφής 1 και 2, καθώς και για τη συμβατική ζωοτροφή.

4.4.4.3 Μέτρηση σκληρότητας

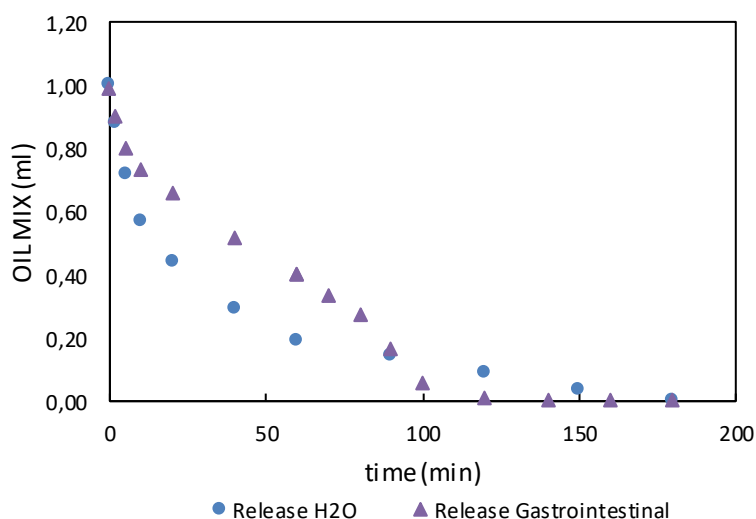
Τα καινοτόμα προϊόντα ζωοτροφών 1 και 2, χαρακτηρίστηκαν ως προς τη σκληρότητά τους και συγκρίθηκαν με τη συμβατική ζωοτροφή. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



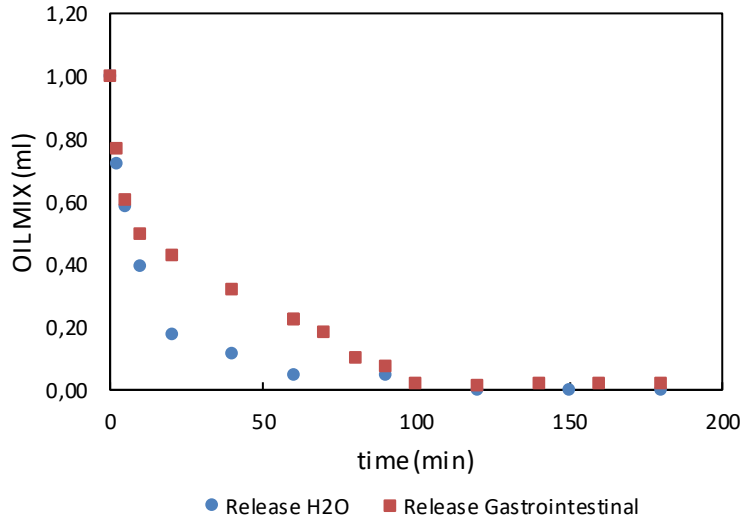
Σχήμα 4-28: Προσδιορισμός σκληρότητας (N/mm²) των καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφής σε σύγκριση με τη συμβατική ζωοτροφή.

4.5 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΒΟΛΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΣΟΜΙΩΣΗΣ

Μελετήθηκε η απελευθέρωση του μίγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) των τελικών προϊόντων εκβολής (προϊόν 1, προϊόν 2), σε συνθήκες γαστρεντερικής προσομοίωσης, για 180 λεπτά. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της απελευθέρωσης, μετρήθηκε και η απελευθέρωση του oil mix για τα τελικά προϊόντα εκβολής και σε υδάτινο περιβάλλον (νερό). Η γραφική απεικόνιση της μελέτης απελευθέρωσης των τελικών προϊόντων σε περιβάλλον νερού και γαστρεντερικών υγρών παρουσιάζεται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 4-29: Σύγκριση απελευθέρωσης μίγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) στο νερό και σε συνθήκες γαστρεντερικής προσομοίωσης για το Προϊόν 1

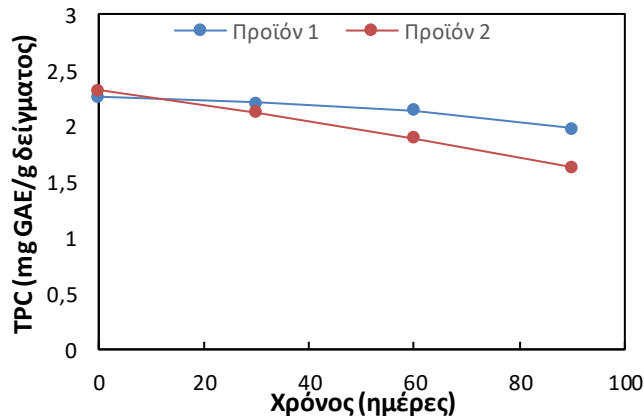


Σχήμα 4-30: Σύγκριση απελευθέρωσης μίγματος αιθέριων ελαίων (oil mix) στο νερό και σε συνθήκες γαστρεντερικής προσομοίωσης για το Προϊόν 2

4.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΖΩΗΣ

4.6.1 Μέτρηση Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου

Η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στη βιοδραστικότητα των τελικών προϊόντων ζωοτροφών (προϊόν 1, προϊόν 2) ως προς το συνολικό φαινολικό τους περιεχόμενο απεικονίζεται γραφικά στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 4-31: Μεταβολή βιοδραστικότητας σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης (90 ημέρες) για τα νέα τελικά προϊόντα ζωοτροφών

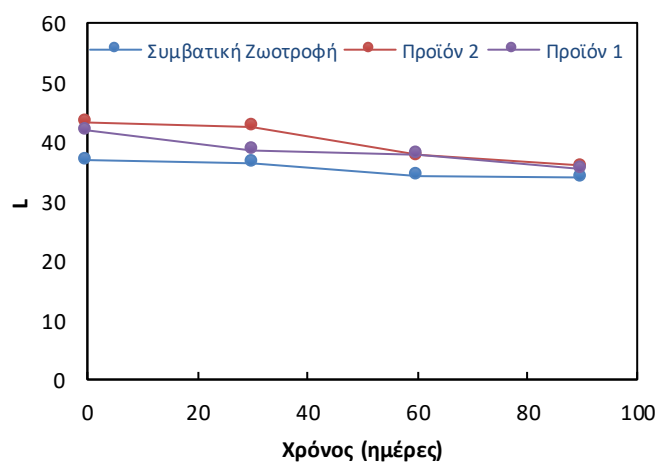
Τα συγκριτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στους χρόνους μηδέν (0) και ενενήντα (90) ημερών, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4-6, στον οποίο δίνονται οι τιμές του συνολικού φαινολικού φορτίου για κάθε τελικό προϊόν καινοτόμου ζωοτροφής, στην αρχή της μελέτης διατηρησιμότητας (χρόνος παραγωγής, t=0 ημέρες) και στο τέλος αυτής (t=90 ημέρες), καθώς και το ποσοστό της απώλειας των βιοδραστικών συστατικών στο τελικό προϊόν μετά το πέρας της μελέτης.

Πίνακας 4-9: Βιοδραστικό περιεχόμενο καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφής σε χρόνους t=0 και t=90 ημερών

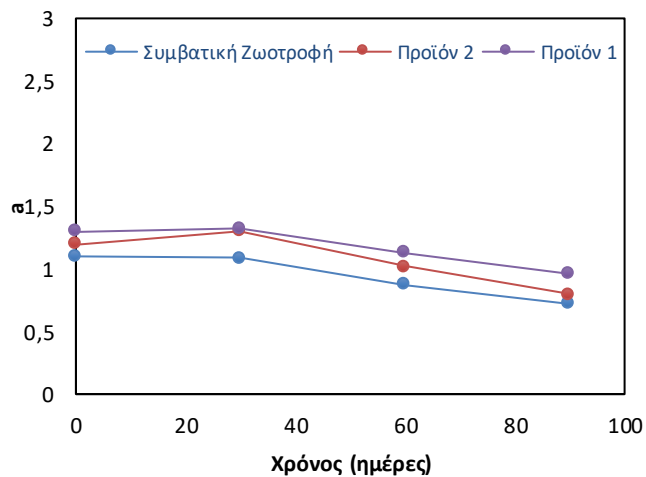
No	Περιγραφή	Κωδ/ση	mg GAE/g δείγμα τος t=0 ημέρες	mg GAE/g δείγμα τος t=90 ημέρες	Απώλεια βιοδραστι- κότητας
1	Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) με spray drying	Προϊόν 1	1,66	1,45	12,65 %
2	Καινοτόμο προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μη εγκλεισμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix)	Προϊόν 2	0,92	0,64	30,43 %

4.6.2 Μεταβολή χρώματος

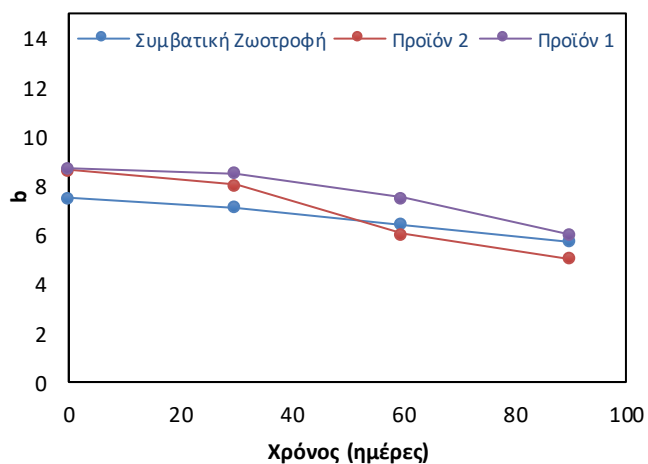
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του χρώματος ως προς τις τρεις συντεταγμένες L^* , a^* και b^* στους διάφορους χρόνους αποθήκευσης (0, 30, 60 και 90 ημέρες) για τα νέα προϊόντα ζωοτροφών με ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά σε εγκλεισμένη και μη εγκλεισμένη μορφή (προϊόν 1, προϊόν 2), καθώς και για τη συμβατική ζωοτροφή, παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα.



Σχήμα 4-32: Μεταβολή της παραμέτρου L^* στα τελικά προϊόντα ζωοτροφής 1 και 2, καθώς και στη συμβατική ζωοτροφή κατά την κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες.



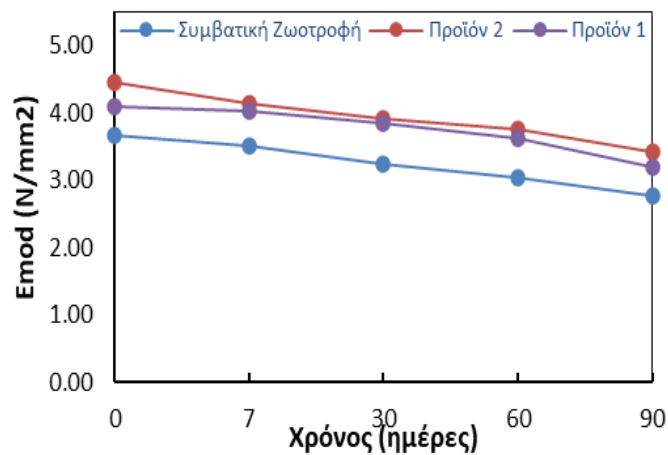
Σχήμα 4-33: Μεταβολή της παραμέτρου a^* στα τελικά προϊόντα ζωοτροφής 1 και 2, καθώς και στη συμβατική ζωοτροφή κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες.



Σχήμα 4-34: Μεταβολή της παραμέτρου b^* στα τελικά προϊόντα ζωοτροφής 1 και 2, καθώς και στη συμβατική ζωοτροφή κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες.

4.6.3 Μεταβολή σκληρότητας

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της σκληρότητας (E_{mod}) στους διάφορους χρόνους αποθήκευσης (0, 30, 60 και 90 ημέρες) για τα νέα προϊόντα ζωοτροφών με ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά σε εγκλεισμένη και μη εγκλεισμένη μορφή (προϊόν 1, προϊόν 2), καθώς και για τη συμβατική ζωοτροφή, παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Σχήμα 4-35: Μεταβολή της σκληρότητας στα τελικά προϊόντα ζωοτροφής 1 και 2, καθώς και στη συμβατική ζωοτροφή κατά την κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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

Συνεπώς, στην παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης των ωφελειών της βιολογικής δράσης του oil-mix, από επιλεγμένα βότανα με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μετέπειτα στην ανάπτυξη καινοτόμων λειτουργικών ζωοτροφών με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Από την εφαρμογή και τη μελέτη των 3 τεχνικών εγκλεισμού (ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία, ξήρανση με εκνέφωση, ξήρανση με κατάψυξη) προέκυψαν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η απόδοση εγκλεισμού των παραγόμενων δομών ως προς την περιεκτικότητά τους στο μίγμα αιθέριων ελαίων ήταν 86,88% και 73,34% μέσω της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας και της ξήρανσης με ψεκασμό, αντίστοιχα. Με βάση τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι και οι δυο μέθοδοι οδήγησαν στην ανάπτυξη δομών με υψηλή απόδοση εγκλεισμού ενώ η ηλεκτροστατική ινοποίηση σημείωσε υψηλότερα ποσοστά εγκλεισμού συγκριτικά με την ξήρανση με ψεκασμό.
- Τα τελικά προϊόντα εγκλεισμού που προέκυψαν είναι δύο, και αντιστοιχούν στην τεχνική της Ηλεκτροστατικής Ινοποίησης (Electrospinning/Electrospraying) και της ξήρανσης με εκνέφωση (spray drying). Και τα δύο δείγματα περιέχουν εγκλεισμένο το μίγμα αιθερίων ελαίων (oil mix), διότι εμφάνισε την καλύτερη συμπεριφορά κατά τον εγκλεισμό, ανέπτυξε την επιθυμητή μικρο και νανο-δομή, ενώ παράλληλα διατήρησε το βιοδραστικό του περιεχόμενο υψηλό. Τα τελικά προϊόντα εγκλεισμού έχουν μορφή λευκού φιλμ νανοϊνών (Electrospinning/Electrospraying), και λευκής σκόνης (Spray Drying).
- Όσον αφορά την μελέτη εγκλεισμού με την μέθοδο freeze drying, η συγκεκριμένη τεχνική εμφάνισε την χειρότερη συμπεριφορά κατά τον εγκλεισμό, δεν ανέπτυξε την επιθυμητή δομή, ενώ παράλληλα διατήρησε το βιοδραστικό του περιεχόμενο ιδιαίτερα χαμηλό γι' αυτό και δεν συμπερίληφθηκε στην περαιτέρω μελέτη.
- Όσον αφορά την μελέτη της μορφολογίας των 2 ενθυλακωμένων δομών, αρχικά, τα αποτελέσματα του εγκλεισμού του μίγματος αιθέριων ελαίων στην υδατική μήτρα WPI:pul (30:70)% w/w, μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning/electrospraying) είναι πολύ ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, οι νανοΐνες που παρήχθησαν χαρακτηρίζονται από τυχαίο προσανατολισμό, ομοιομορφία, καλή διασπορά των συστατικών, και απαλλαγμένες από συσσωματώματα και σφαιρικούς σχηματισμούς-αστοχίες (beads). Το ίδιο ισχύει και για τα αποτελέσματα στα προϊόντα εγκλεισμού που λήφθηκαν από την ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) του μίγματος

αιθέριων ελαίων στην υδατική μήτρα WPI:pul (80:20)% w/w, καθώς αποτελούνται από δομές που προσομοιάζουν το σχήμα των κόκκων, με αρκετά 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.

- Από την εφαρμογή της τεχνικής ATR-FTIR επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματική συγκράτηση του oil-mix στους φορείς εγκλεισμού. Με βάση τις κορυφές των φασμάτων επιβεβαιώνεται η παρουσία των εκχυλισμάτων στις δομές εγκλεισμού για χρόνο αποθήκευσης έως και 30 ημέρες σε όλες τις θερμοκρασίες και σχετικές υγρασίες αποθήκευσης των δειγμάτων. Επίσης παρατηρείται ότι η ένταση των κορυφών είναι μειωμένη για θερμοκρασία αποθήκευσης 45°C συγκριτικά με τους 25°C όπως αναμένεται εξαιτίας της θερμικής υποβάθμισης των δειγμάτων. Ωστόσο, ο εγκλεισμός των εκχυλισμάτων στην μήτρα WPI:PUL οδήγησε σε αυξημένη σταθερότητά τους και για τις δυο μεθόδους εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκαν.
- Με βάση τα αποτελέσματα της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC), όπως αναμενόταν, παρατηρείται ότι η αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας στα δείγματα οδήγησε σε μείωση της T_g καθώς το νερό δρα ως πλαστικοποιητής της άμορφης μήτρας του φορέα εγκλεισμού. Οι δομές που προέκυψαν μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές T_g εξαιτίας της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε πουλλουλάνη συγκριτικά με τις δομές μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό.
- Η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης από τους 25°C στους 45°C είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποδέσμευσης του μίγματος αιθέριων ελαίων για όλες τις υγρασίες αποθήκευσης. Ωστόσο, η ενσωμάτωση του μίγματος αιθέριων ελαίων στις δομές εγκλεισμού και με τις δυο τεχνικές είχε ως αποτέλεσμα την προστασία των ενεργών συστατικών από τη θερμική υποβάθμιση. Συγκρίνοντας τις δυο τεχνολογίες εγκλεισμού, συμπεραίνεται ότι η ηλεκτροστατική ινοποίηση οδήγησε στην ανάπτυξη δομών με μεγαλύτερη συγκράτηση των ενεργών συστατικών σε σχέση με την ξήρανση με ψεκασμό. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη διαφορά στη σύσταση των φορέων εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις δυο τεχνικές εγκλεισμού (XS-WPI:PUL (30:70), XS-WPI:PUL (80:20)) συμπεραίνοντας ότι η παρουσία της πουλλουλάνης σε μεγαλύτερη αναλογία στην μήτρα οδήγησε σε αύξηση της συγκράτησης των ενεργών συστατικών.
- Η αύξηση της σχετικής υγρασίας αποθήκευσης των δειγμάτων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποδέσμευσης του μίγματος αιθέριων ελαίων για όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης που εξετάστηκαν. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην υδρόφιλη φύση του φορέα εγκλεισμού με αποτέλεσμα η αύξηση της υγρασίας να οδηγεί σε κατάρρευση της δομής και απελευθέρωση των ενεργών συστατικών στην επιφάνεια των προϊόντων εγκλεισμού. Ωστόσο, η αποθήκευση των δειγμάτων σε χαμηλή σχετική υγρασία οδήγησε στην παραμονή των εγκλεισμένων ενεργών συστατικών στο εσωτερικό του φορέα εγκλεισμού και για τα δυο προϊόντα εγκλεισμού για τις δυο θερμοκρασίες αποθήκευσης που εξετάστηκαν [42], [43].

Από την τεχνική φυγοκεντρικής εκβολής (extrusion) για την ενσωμάτωση του oil mix σε εγκλεισμένη ή μη εγκλεισμένη μορφή, σε πρόμιγμα κατάλληλων προδιαγραφών, και στη συνέχεια παραγωγή των τελικών πέλλετ ζωοτροφής, προέκυψαν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Από τα αποτελέσματα της απόδοσης ενσωμάτωσης, διαπιστώθηκε πως το δείγμα εγκλεισμένης σκόνης oil-mix με τη μέθοδο της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας (electrospinning) εμφάνισε μικρότερη βιοδραστικότητα μετά την ενσωμάτωση, παρά το γεγονός ότι η μορφολογία του ήταν ικανοποιητική.
- Επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη το βέλτιστο δείγμα που προέκυψε από την εκβολή, δηλαδή το προϊόν εκβολής με ενσωματωμένο εγκλεισμένο oil mix μέσω ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying). Το προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή με την μέθοδο spray drying (Προϊόν 1), χαρακτηρίστηκε ως προς τη διατηρησιμότητά του, και συγκρίθηκε με το προϊόν ζωοτροφής με ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μη εγκλεισμένη μορφή (Προϊόν 2), καθώς και με τη συμβατική ζωοτροφή.
- Το τελικό προϊόν ζωοτροφής που διατήρησε περισσότερο τη δραστηριότητά του μετά το πέρας της διεργασίας, αντιστοιχούσε στο Προϊόν 1, το οποίο περιείχε την εγκλεισμένη σκόνη oil mix. Τα τελικά προϊόντα ζωοτροφής που αναπτύχθηκαν εμφανίζουν ικανή αντιοξειδωτική δράση και πρόκειται να συμβάλλουν στην προσπάθεια υποκατάστασης των συνθετικών προσθέτων στις ζωοτροφές, προσφέροντας μια πιο πράσινη και οικολογική αγροδιατροφική προσέγγιση.
- Το τελικό προϊόν ζωοτροφής που διατήρησε περισσότερο τη δραστηριότητά του μετά το πέρας της ενσωμάτωσης, αντιστοιχεί στο Προϊόν 1, το οποίο περιείχε τα φυσικά βιοδραστικά συστατικά σε εγκλεισμένη μορφή, επιβεβαιώνοντας τα οφέλη που προσφέρει ο εγκλεισμός στην ποιότητα, στην σταθερότητα και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.
- Ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των τελικών προϊόντων ζωοτροφών με ενσωματωμένα φυσικά βιοδραστικά συστατικά, τα ανέδειξε ως προς τη σύσταση, τη μορφολογία, τη βιοδραστικότητα, την υφή (σκληρότητα) και το χρώμα, σε σχέση με τα χαρακτηριστικά της συμβατικής ζωοτροφής με την οποία και συγκρίθηκαν. Επιπλέον, από τα φάσματα ATR-FTIR που ελήφθησαν, επιβεβαιώνεται η παρουσία του μίγματος αιθέριων ελαίων (oil mix), τόσο για το προϊόν 1 όσο και για το προϊόν 2. Ωστόσο, η κορυφή που αντιστοιχεί στο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) του προϊόντος 1 (εγκλεισμένο μίγμα) σε σχέση με του προϊόντος 2 (μη εγκλεισμένο μίγμα) είναι πολύ υψηλότερη, επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι **ο εγκλεισμός προσέδωσε σταθερότητα στο τελικό προϊόν και συνέβαλλε στην καλύτερη διατήρηση των βιοδραστικών του συστατικών.**
- Η μελέτη απελευθέρωσης των τελικών προϊόντων εκβολής σε υδατικό περιβάλλον και σε περιβάλλον γαστρεντερικής προσομοίωσης, έδειξε ότι το προϊόν 1 με το ενσωματωμένο μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε εγκλεισμένη μορφή μέσω

ξήρασης με ψακασμό, εμφάνισε μεγαλύτερη σταθερότητα και σταδιακή απελευθέρωση και για τις δύο συνθήκες για τις οποίες μελετήθηκε. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη διεργασία του εγκλεισμού η οποία προηγήθηκε της εκβολής.

- Όσον αφορά τις μετρήσεις διατηρησιμότητας των τελικών καινοτόμων προϊόντων ζωοτροφών που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο του παρόντος προγράμματος, και πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα ενενήντα (90) ημερών, διεξήχθησαν πολύ ικανοποιητικά συμπεράσματα ως προς τη σταθερότητα του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων, με μέγιστη απώλεια φαινολικού περιεχομένου να καταγράφεται στις 90 ημέρες για το προϊόν που περιείχε το μίγμα αιθέριων ελαίων (oil mix) σε μη εγκλεισμένη μορφή, και να αντιστοιχεί σε 30,43%. Το προϊόν 1 με ενσωματωμένο το εγκλεισμένο oil mix, διατήρησε το συνολικό φαινολικό του περιεχόμενο κατά 87,35% στις 90 ημέρες αποθήκευσης, ενώ το προϊόν 2 κατά 69,57% στο ίδιο χρονικό διάστημα. Αυτό συμβαίνει διότι τα βιοδραστικά συστατικά του προϊόντος 2, δεν ενσωματώθηκαν στο προϊόν σε εγκλεισμένη μορφή αλλά ελεύθερη, με αποτέλεσμα να είναι εκτεθειμένα και να απελευθερώνονται με πιο γρήγορο και μη ελεγχόμενο ρυθμό στο περιβάλλον [42].
- Ως προς τα αποτελέσματα της μελέτης της μεταβολής των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων συγκριτικά με τη συμβατική ζωοτροφή, οι μετρήσεις του χρώματος, αναφορικά με τον παράγοντα L^* που εκφράζει τη φωτεινότητα, έδειξαν ότι η συμβατική ζωοτροφή και το προϊόν 2, εμφάνισαν μια σταθερότητα μέχρι τις 30 ημέρες αποθήκευσης, ακολουθούμενη από μια σταδιακή αλλά μικρή μείωση μέχρι το τέλος της μελέτης (90 ημέρες) [44]. Το προϊόν ζωοτροφής 1 με ενσωματωμένο το μη εγκλεισμένο oil mix, εμφανίζει μια πιο καθοδική τάση στις πρώτες 30 ημέρες, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται παρόμοια τάση με τα υπόλοιπα δείγματα. Συνολικά η τιμή του παράγοντα L^* μειώθηκε σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν, με μεγαλύτερη μείωση αυτή που αντιστοιχεί στο προϊόν 2. Όσον αφορά τον παράγοντα a^* , σε όλα τα δείγματα οι τιμές που καταγράφονται είναι θετικές, γεγονός που αντιπροσωπεύει αποχρώσεις του κόκκινου. Τέλος όσον αφορά στον παράγοντα b^* που σχετίζεται με τη μεταβολή του μπλε-κίτρινου χρώματος είναι ξεκάθαρη η κυριαρχία του κίτρινου χρώματος στα νέα προϊόντα των ζωοτροφών, καθώς και στη συμβατική ζωοτροφή. Η χαμηλότερη τιμή του b^* αντιστοιχεί στο προϊόν 2, στο οποίο μειώνεται περισσότερο μετά τις 30 πρώτες ημέρες. Το προϊόν 1 και η συμβατική ζωοτροφή, εμφανίζουν κοινή συμπεριφορά, με την τιμή του b^* να παρουσιάζει μια αργή και σταδιακή μείωση. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η ενσωμάτωση των βιοδραστικών συστατικών σε εγκλεισμένη μορφή αύξησε τη σταθερότητα του τελικού προϊόντος ως προς τις φυσικοχημικές μεταβολές που συνδέονται με το χρώμα.
- Από τα διαγράμματα της μέτρησης του χρώματος σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης, παρατηρείται ότι οι συνολικές διαφορές χρώματος μεταξύ της συμβατικής ζωοτροφής και του προϊόντος 1 με τα εγκλεισμένα βιοδραστικά συστατικά δεν είναι πολύ μεγάλες, και παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά. Μεγαλύτερες μεταβολές στις τιμές των δεικτών παρουσίασε το προϊόν 2, γεγονός που οφείλεται στα ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά που εμπεριέχει σε

ελεύθερη μορφή, τα οποία είναι εκτεθειμένα στο περιβάλλον και αλλοιώνονται με την πάροδο του χρόνου κατά την αποθήκευση [42].

- Παρόμοια συμπεριφορά ακολούθησαν τα δείγματα και στις μετρήσεις της μεταβολής της σκληρότητας κατά την αποθήκευση σε συνθήκες θερμοκρασίας 25°C και $a_w=0.54$, για 90 ημέρες, με βέλτιστη διατηρησιμότητα της σκληρότητας να αντιστοιχεί στο Προϊόν 1.

Συμπερασματικά, το τελικό προϊόν ζωοτροφής που διατήρησε περισσότερο τη δραστικότητα και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μετά το πέρας της της μελέτης διατηρησιμότητας, είναι το προϊόν 1, το οποίο περιείχε την εγκλεισμένη σκόνη του μίγματος αιθέριων ελαίων (oil mix). Συνολικά, και τα δύο τελικά προϊόντα ζωοτροφής που αναπτύχθηκαν εμφάνισαν ικανοποιητική σταθερότητα κατά την αποθήκευση, διατηρώντας το βιοδραστικό τους περιεχόμενο τουλάχιστον στο 70% και μετά το πέρας των 90 ημερών. Συνεπώς, η προσθήκη φυσικών βιοενεργών συστατικών σε εγκλεισμένη αλλά και ελεύθερη μορφή στη συμβατική ζωοτροφή, αποτελεί μια ρεαλιστική προσέγγιση για την ανάπτυξη νέων προϊόντων ζωοτροφών, με βελτιωμένες ιδιότητες και θρεπτικά χαρακτηριστικά. Τα τελικά προϊόντα ζωοτροφής που αναπτύχθηκαν εμφανίζουν ικανή αντιοξειδωτική δράση και πρόκειται να συμβάλλουν στην προσπάθεια υποκατάστασης των συνθετικών προσθέτων στις ζωοτροφές, προσφέροντας μια πιο πράσινη και οικολογική αγροδιατροφική προσέγγιση. Εν κατακλείδι, οι μεθοδολογίες και τα επιστημονικά πειράματα και ευρήματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ενδείκνυται να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για αντίστοιχα πειράματα από άλλους ερευνητές, έτσι ώστε η παραγωγή των προϊόντων που μελετήθηκαν σε καθαρά πειραματικό πλαίσιο, να εδραιωθεί και σε βιομηχανική κλίμακα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. F. B. van der Poel *et al.*, 'Future directions of animal feed technology research to meet the challenges of a changing world', *Anim Feed Sci Technol*, vol. 270, p. 114692, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2020.114692.
- [2] H. Ahmad Ganaie, 'Review of the active principles of medicinal and aromatic plants and their disease fighting properties', *Medicinal and Aromatic Plants: Expanding their Horizons through Omics*, pp. 1–36, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-819590-1.00001-X.
- [3] G. Sacchetti *et al.*, 'Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods', *Food Chem*, vol. 91, no. 4, pp. 621–632, Aug. 2005, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2004.06.031.
- [4] N. Modupalli, L. Devraj, and V. Natarajan, 'Plant extracts as flavoring agents', *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, pp. 165–186, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-822475-5.00006-5.
- [5] A. Michalak, 'Heavy Metals Toxicity Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress', 2006.
- [6] N. Leyva-López, E. P. Gutiérrez-Grijalva, G. Vazquez-Olivo, and J. B. Heredia, 'Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties', *Molecules*, vol. 22, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2017. doi: 10.3390/molecules22060989.
- [7] E. P. Gutiérrez-Grijalva, M. A. Picos-Salas, N. Leyva-López, M. S. Criollo-Mendoza, G. Vazquez-Olivo, and J. B. Heredia, 'Flavonoids and phenolic acids from Oregano: Occurrence, biological activity and health benefits', *Plants*, vol. 7, no. 1. MDPI AG, Mar. 01, 2018. doi: 10.3390/plants7010002.
- [8] S. Z. Nobakht, M. Akaberi, A. H. Mohammadpour, A. T. Moghadam, and S. A. Emami, 'Hypericum perforatum: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions', *Iran J Basic Med Sci*, vol. 26, no. 9, pp. 1045–1058, Sep. 2022, doi: 10.22038/IJBMS.2022.65112.14338.
- [9] A. Agapouda, A. Booker, T. Kiss, J. Hohmann, M. Heinrich, and D. Csupor, 'Quality control of Hypericum perforatum L. analytical challenges and recent progress', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 71, no. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 15–37, Jan. 01, 2019. doi: 10.1111/jphp.12711.
- [10] O. Singh, Z. Khanam, N. Misra, and M. K. Srivastava, 'Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview', *Pharmacognosy Reviews*, vol. 5, no. 9. pp. 82–95, Jan. 2011. doi: 10.4103/0973-7847.79103.
- [11] A. del P. Sánchez-Camargo and M. Herrero, 'Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient: recent scientific evidence', *Current Opinion in Food Science*, vol. 14. 2017. doi: 10.1016/j.cofs.2016.12.003.
- [12] M. Miroddi, G. Calapai, S. Isola, P. L. Minciullo, and S. Gangemi, 'Rosmarinus officinalis L. as cause of contact dermatitis', *Allergologia et Immunopathologia*, vol. 42, no. 6. 2014. doi: 10.1016/j.aller.2013.04.006.
- [13] S. S. Fernandes, M. S. Coelho, and M. de las M. Salas-Mellado, 'Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods: Polyphenols, Carotenoids, Peptides From Animal and Plant Sources New', in *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*, 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-814774-0.00007-4.

- [14] A. Durazzo *et al.*, 'Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health', *Phytotherapy Research*, vol. 33, no. 9. 2019. doi: 10.1002/ptr.6419.
- [15] D. Lin *et al.*, 'An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes', *Molecules*, vol. 21, no. 10. 2016. doi: 10.3390/molecules21101374.
- [16] S. A. Álvarez, N. E. Rocha-Guzmán, R. F. González-Laredo, J. A. Gallegos-Infante, M. R. Moreno-Jiménez, and M. Bravo-Muñoz, 'Ancestral Food Sources Rich in Polyphenols, Their Metabolism, and the Potential Influence of Gut Microbiota in the Management of Depression and Anxiety', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 70, no. 4. 2022. doi: 10.1021/acs.jafc.1c06151.
- [17] P. Courvalin, 'Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance', *Journal of Internal Medicine*, vol. 264, no. 1. 2008. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01940.x.
- [18] A. Molina-Cortés, M. Quimbaya, A. Toro-Gomez, and F. Tobar-Tosse, 'Bioactive compounds as an alternative for the sugarcane industry: Towards an integrative approach', *Heliyon*, vol. 9, no. 2. 2023. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13276.
- [19] P. de Vos, M. M. Faas, M. Spasojevic, and J. Sikkema, 'Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components', *International Dairy Journal*, vol. 20, no. 4. 2010. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008.
- [20] F. Paulo and L. Santos, 'Design of experiments for microencapsulation applications: A review', *Materials Science and Engineering C*, vol. 77. 2017. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.219.
- [21] N. Eghbal, W. Liao, E. Dumas, S. Azabou, P. Dantigny, and A. Gharsallaoui, 'Microencapsulation of Natural Food Antimicrobials: Methods and Applications', *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 12, no. 8. 2022. doi: 10.3390/app12083837.
- [22] A. M. Khanvilkar, R. C. Ranveer, and A. K. Sahoo, 'Carrier materials for encapsulation of bio-active components of food', *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 40, no. 1. 2016.
- [23] Y. Liu *et al.*, 'Whey protein concentrate/pullulan gel as a novel microencapsulated wall material for astaxanthin with improving stability and bioaccessibility', *Food Hydrocoll*, vol. 138, 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.108467.
- [24] V. Trinetta, 'The Application of Edible and Active Pullulan Coatings on Foods', *Reference Module in Food Science*, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21129-3.
- [25] B. Sun *et al.*, 'Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning', *Progress in Polymer Science*, vol. 39, no. 5. 2014. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002.
- [26] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, 'Electrospinning of nanofibers', *J Appl Polym Sci*, vol. 96, no. 2, 2005, doi: 10.1002/app.21481.
- [27] C. Anandharamakrishnan and S. Padma Ishwarya, *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*. 2015. doi: 10.1002/9781118863985.
- [28] D. Nowak and E. Jakubczyk, 'The freeze-drying of foods ⇔ the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials', *Foods*, vol. 9, no. 10. 2020. doi: 10.3390/foods9101488.

- [29] F. Makki, 'Extrusion Cooking: Technologies and Applications', *Food Research International*, vol. 35, no. 9, 2002, doi: 10.1016/s0963-9969(02)00091-1.
- [30] E. Uitterhaegen and P. Evon, 'Twin-screw extrusion technology for vegetable oil extraction: A review', *Journal of Food Engineering*, vol. 212, 2017. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.06.006.
- [31] M. Relucenti *et al.*, 'Microscopy methods for biofilm imaging: Focus on sem and VP-SEM pros and cons', *Biology*, vol. 10, no. 1, 2021. doi: 10.3390/biology10010051.
- [32] N. Babbar, H. S. Oberoi, D. S. Uppal, and R. T. Patil, 'Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues', *Food Research International*, vol. 44, no. 1, 2011, doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.001.
- [33] J.-F. Gonnet, 'CIELab measurement, a precise communication in flower colour: An example with carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivars', *Journal of Horticultural Science*, vol. 68, no. 4, 1993, doi: 10.1080/00221589.1993.11516378.
- [34] J. M. Aguilera, 'Microstructure and Food Product Engineering', *Food Technol*, vol. 54, no. 11, 2000.
- [35] C. Mella, M. Quilaqueo, R. N. Zúñiga, and E. Troncoso, 'Impact of the simulated gastric digestion methodology on the in vitro intestinal proteolysis and lipolysis of emulsion gels', *Foods*, vol. 10, no. 2, 2021, doi: 10.3390/foods10020321.
- [36] L. Jakobek, I. Strelec, D. Kenjeric, L. Šoher, I. Tomac, and P. Matic, 'Simulated Gastric and Intestinal Fluid Electrolyte Solutions as an Environment for the Adsorption of Apple Polyphenols onto β -Glucan', *Molecules*, vol. 27, no. 19, Oct. 2022, doi: 10.3390/molecules27196683.
- [37] K. Akhtar, S. A. Khan, S. B. Khan, and A. M. Asiri, 'Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization', in *Handbook of Materials Characterization*, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-92955-2_4.
- [38] K. L. A. Chan, F. H. Tay, G. Poulter, and S. G. Kazarian, 'Chemical imaging with variable angles of incidence using a diamond attenuated total reflection accessory', *Appl Spectrosc*, vol. 62, no. 10, 2008, doi: 10.1366/000370208786049222.
- [39] AOAC, 'Official Methods of Analysis, 16th Edn. Washington, DC: Association Of Official Analytical Chemists', *Sci Educ (Dordr)*, vol. 18, no. 5, 2003.
- [40] G. I. Bisharat, P. N. Eleni, N. M. Panagiotou, M. K. Krokida, and Z. B. Maroulis, 'Thermal, textural, and physicochemical analysis of corn extrudates enriched with broccoli or olive paste', *Int J Food Prop*, vol. 17, no. 9, pp. 2100–2116, Oct. 2014, doi: 10.1080/10942912.2013.785560.
- [41] A. Fontes-Zepeda *et al.*, 'The Addition of Mango and Papaya Peels to Corn Extrudates Enriches Their Phenolic Compound Profile and Maintains Their Sensory Characteristics', *Waste Biomass Valorization*, vol. 14, no. 3, pp. 751–764, Mar. 2023, doi: 10.1007/s12649-022-01898-4.
- [42] C. Drosou, 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 Hydrocoll*, vol. 77, pp. 726–735, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2017.11.014.

- [43] H. D. Özeren, R. T. Olsson, F. Nilsson, and M. S. Hedenqvist, 'Prediction of plasticization in a real biopolymer system (starch) using molecular dynamics simulations', *Mater Des*, vol. 187, 2020, doi: 10.1016/j.matdes.2019.108387.
- [44] J. Kour, S. Singh, and D. Chandra Saxena, 'Retention of bioactive compounds during extrusion processing and storage', *Food Chem X*, vol. 13, 2022, doi: 10.1016/j.fochx.2021.100191.