



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

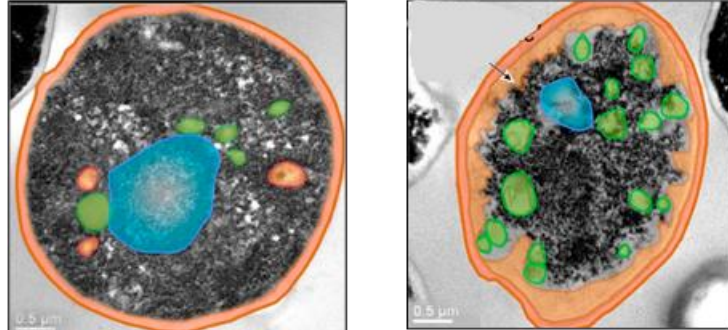
“Μικροενθυλάκωση Βιοδραστικών και Συστατικών Τροφίμων σε Κύτταρα Ζύμης”

MSc Thesis

“Microencapsulation of Bioactive and Food Ingredients in Yeast Cells”

Διευθυντής

Καθηγητής Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α.) Ιωάννης Τσάκνης



ΦΟΙΤΗΤΗΣ/ STUDENT

Αναστασία – Ειρήνη Καβαλάρη

fiqs19006

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ/ SUPERVISOR

Σπύρος Ι. Κοντελής

ΑΙΓΑΛΕΩ / AIGALEO 2021



Faculty of Food Sciences
Department of Food Science and Technology

Master of Science
FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc Thesis

“Microencapsulation of Bioactive and Food Ingredients in Yeast Cells”

STUDENT

Anastasia-Eirini Kavalari

kavalari.anastasia@gmail.com

SUPERVISOR

Spyros J. Konteles

AIGALEO 2021

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Μικροενθυλάκωση Βιοδραστικών και Συστατικών Τροφίμων σε Κύτταρα Ζύμης**» που παρουσιάσθηκε από τον κα. **Αναστασία-Ειρήνη Καβαλάρη** υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Κοντελής Σπυρίδων, PhD,
Ακαδημαϊκός Υπότροφος,
Τμήμα Επιστήμης και
Τεχνολογίας Τροφίμων
(ΠΑ.Δ.Α.)

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής
Τσάκνης Ιωάννης
Καθηγητής
Τμήμα Επιστήμης και
Τεχνολογίας Τροφίμων
ΠΑ.Δ.Α

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής
Λάζου Ανδριάννα
Επίκουρη Καθηγήτρια
Τμήμα Επιστήμης και
Τεχνολογίας Τροφίμων
ΠΑ.Δ.Α

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Αναστασία – Ειρήνη Καβαλάρη του Δημητρίου με αριθμό μητρώου 19006 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι: *«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου»*. Επιθυμώ την άμεση διάθεση στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου, έπειτα από αίτησή μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Ο Δηλούσα



Αναστασία – Ειρήνη Καβαλάρη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, που έκανε δεκτή την αίτησή μου να ενταχθώ στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Καινοτομίας, Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων» και να εμπλουτίσω τις ακαδημαϊκές μου γνώσεις στο κλάδο των τροφίμων. Επίσης, πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να αποδώσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κο. Σπυρίδωνα Κοντελέ, για την άριστη συνεργασία που είχαμε καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας παρά τις όποιες σκόπελους που έπρεπε να ξεπεραστούν τη δύσκολη αυτή περίοδο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου που είναι πάντα αρωγός σε κάθε στόχο που έχω θέσει να φέρω εις πέρας.

Στη μικρή Μαρκέλλα

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Διαδικασίες μικροενθυλάκωσης βασισμένες σε φυσικά φαινόμενα που εμφανίζονται σε διάλυμα και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή συστατικών τροφίμων με μικροενθυλάκωση

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* – φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Εικόνα 2. Παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης

Εικόνα 3. Αρχή της μικροενθυλάκωσης με διεπιφανειακό πολυμερισμό, όπου το (A) ολιγομερές είναι διαλυτό στο σταγονίδιο και το (B) ολιγομερές είναι αδιάλυτο στο σταγονίδιο.

Εικόνα 4. Αντίδραση σχηματισμού μεμβράνης πολυαμιδίου

Εικόνα 5. Διαδικασία κατασκευής μικροκαψουλών που περιέχουν αιθέριο έλαιο μέσω in situ πολυμερισμού

Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής ενθυλάκωσης «φυγοκέντρηση πολλαπλών στομίων»

Εικόνα 7. Σχηματικό διάγραμμα της «Επίστρωσης με εναιώρημα σε αέρα» (air suspension coating)

Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση βιομηχανικού συστήματος «ξήρανσης με ψεκασμό»

Εικόνα 9. Δομή μικροενθυλακωμένου ελαίου που παράγεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές διαδικασίες μικροενθυλάκωσης.

Περίληψη

Οι σύγχρονες ανάγκες στο κλάδο των τροφίμων απαιτούν καινοτόμες και εφαρμόσιμες τεχνολογίες για την κάλυψη των καταναλωτικών και βιομηχανικών αναγκών. Οι τεχνολογίες μικροενθυλάκωσης βιοδραστικών συστατικών έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον του κλάδου. Μία από τις εν λόγω τεχνολογίες αφορά τη χρήση κυττάρων ζύμης ως βάση για τη δημιουργία κάψουλας που θα «φιλοξενήσει» τα επιθυμητά, προς ενθυλάκωση, συστατικά. Η επιλογή των κυττάρων ζυμών ως βάση ενθυλάκωσης φαίνεται να υπερέρχει έναντι άλλων συστατικών, ως προς την εκτεταμένη σταθερότητα, στις διάφορες καταπονήσεις που απαιτούν οι τεχνικές κατά την μικροενθυλάκωση, την σχετικά ακριβή και ελεγχόμενη παράδοση των επιθυμητών συστατικών και την απόλυτη συμβατότητα στα τρόφιμα ως συστατικό. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανασκόπηση της τρέχουσας επιστημονικής γνώσης αναφορικά με τη χρήση και τα πλεονεκτήματα των κυττάρων ζύμης στην μικροενθυλάκωση.

Λέξεις-Κλειδιά: Μικροενθυλάκωση, Ζύμες, Βιοδραστικά Συστατικά

Abstract

Recent needs in the food industry require innovative and applicable technologies to meet consumer demands and industrial needs. Microencapsulation technologies for bioactive ingredients have raised the interest of the industry. One of these technologies involves the use of yeast cells as a basis for creating a capsule that will "accommodate" the desired ingredients to be encapsulated. The choice of yeast cells as the encapsulation base seems to be superior to other ingredients, in terms of extensive stability, in the various stressing situations required by microencapsulation techniques, the relatively precise and controlled delivery of the desired ingredients, and absolute food compatibility as an ingredient. The aim of the present study is to review current scientific knowledge regarding the use and benefits of yeast cells in microencapsulation.

Key words: Microencapsulation, Yeasts, Bioactive Ingredients

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΖΥΜΕΣ	14
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	14
1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ	14
1.3 ΔΟΜΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ	16
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
1.5 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μικροενθυλάκωση	20
2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	20
2.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ	21
2.2.1 Χημικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης.....	21
2.2.2 Φυσικοχημικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης.....	24
2.2.3 Ηλεκτροστατικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης.....	24
2.2.4 Μηχανικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών	33
3.1 Μηχανισμοί και μοντέλα απελευθέρωσης των συστατικών του πυρήνα	33
3.2. Ελεγχόμενη απελευθέρωση συστατικών.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συστατικά Ενθυλάκωσης	36
4.1. Μικροκάψουλες με βάση πολυσακχαρίτες	36
4.1.1 Άλας Αλγινικού οξέος.....	36
4.1.2 Κόμμεα γελάνης και Ξανθάνης	37
4.1.3 Άμυλο	37
4.2 Πρωτεΐνες.....	37
4.3 Λιπίδια.....	38
4.4 Ζύμες και Κυτταρικά τοιχώματα Ζυμών	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ενθυλάκωση σε κύτταρα ζύμης	40
5.1. Τεχνολογία χρήσης ζυμών για μικροενθυλάκωση	40
5.2. Πλεονεκτήματα από τη χρήση κυττάρων ζύμης ως μέσο μικροεθυλάκωσης.....	41
5.2.1 Μηχανικά οφέλη.....	41
5.2.2 Προστασία από υψηλές θερμοκρασίες	42
5.3 Παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση ενθυλάκωσης σε ζύμες	42

5.3.1	Βιωσιμότητα κυττάρων ζύμης.....	42
5.3.2	Διαλυτότητα βιοδραστικής ουσίας.....	43
5.3.3	Φάση ανάπτυξης της ζύμης	43
5.3.4	Θερμοκρασία ενθυλάκωσης	44
5.4.	Εφαρμογές βιοδραστικών συστατικών μικροενθυλακωμένων σε κύτταρα ζύμης.....	45
	Βιβλιογραφία	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΖΥΜΕΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που συμπεριλαμβάνονται σε μια ομάδα οργανισμών που ονομάζονται «μύκητες», η οποία περιλαμβάνει επίσης τις κοινά ονομαζόμενες μούχλες και τα μανιτάρια. Οι ζύμες έχουν και θετικά όσο και αρνητικά αποτελέσματα σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε τυριά, ψωμί, κρασί, μύρα καθώς και σε άλλα αλκοολούχα προϊόντα ζύμωσης. Από την άλλη πλευρά μπορούν επίσης να προκαλέσουν αλλοίωση σε τρόφιμα, όπως γιαούρτι, χυμοί φρούτων, σαλάτες και μαγιονέζα. Η ικανότητα ορισμένων ζυμών να επιβιώσουν σε αντίξοες συνθήκες τους καθιστά ισχυρούς οργανισμούς αλλοίωσης τροφίμων υπεύθυνους για μεγάλες οικονομικές απώλειες ορισμένων προϊόντων διατροφής (Perricone et al., 2017).

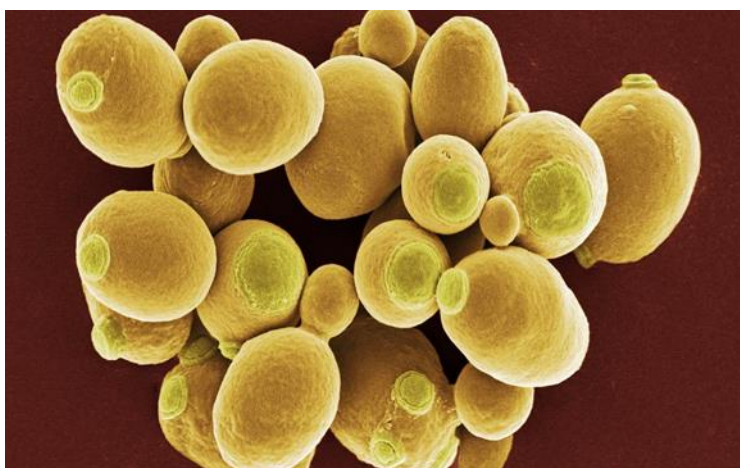
Το είδος της ζύμης που χρησιμοποιείται περισσότερο και έχει μελετηθεί εκτενέστερα είναι το *Saccharomyces cerevisiae*, που συνήθως αναφέρεται ως «ζύμη αρτοποιίας». Αυτό το είδος αναπαράγεται ασεξουαλικά με σχάση και σεξουαλικά (φυλετικά) με τη σύζευξη κυττάρων αντίθετων τύπων. Άλλοι ζυμομύκητες αναπαράγονται με σχάση (π.χ. *Schizosaccharomyces pombe*) και με σχηματισμό ψευδοϋφών, όπως οι διμορφικές ζύμες, όπως για παράδειγμα το ευκαιριακό ανθρώπινο παθογόνο *Candida albicans*. Εκτός από την ευρεία εκμετάλλευσή τους στην παραγωγή τροφίμων, ποτών και φαρμακευτικών προϊόντων, οι ζύμες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως μοντέλο ευκαρυωτικών κυττάρων στην προώθηση των γνώσεών μας στις βιολογικές και βιοϊατρικές επιστήμες. Η μελέτη των ζυμών όχι μόνο παρέχει πληροφορίες για το πώς λειτουργεί ένα απλό ευκαρυωτικό κύτταρο, αλλά επίσης οδηγεί στην κατανόηση αρκετών ανθρώπινων ασθενειών και κληρονομικών διαταραχών (Walker et al., 2009).

1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

Τα κύτταρα ζύμης είναι θεμελιώδη στη ζυθοποιία και την αρτοποιία και υπάρχουν στην ανθρώπινη διατροφή για χιλιάδες χρόνια. Επίσης, η προσθήκη σε ερυθρούς οίνους εμπορικών ανενεργών ξηρών ζυμών είναι μια ευρέως διαδεδομένη πρακτική στην οινοποίηση διότι οδηγεί σε πιο ισορροπημένα κρασιά με καλύτερη αίσθηση στο στόμα και απαλής στυπτικότητας (González-Royo et al., 2016).

Ωστόσο, εδώ και αρκετά χρόνια, σε μία πιο καινοτόμα προσέγγιση, οι ζύμες και για την ακρίβεια τα κύτταρά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως μήτρα ενθυλάκωσης μιας ποικιλίας δραστικών συστατικών (Ciamponi et al., 2012).

Η ενθυλάκωση σε κύτταρα ζύμης περιλαμβάνει κυρίως ολόκληρα κύτταρα καθώς και κυτταρικά τοιχώματα (*cell walls*) *Saccharomyces cerevisiae*, αν και έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για ενθυλάκωση *Candida utilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulopsis lipofera*, *Endomyces vernalis* και ελαιώδης ζύμες (*Cryptococcus curvatus*).



Εικόνα 1: Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* – φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου - Adapted by Harris, 2018

Η διαδικασία ενθυλάκωσης είναι αρκετά απλή και οικονομικά αποδοτική και οι κάψουλες ζύμης που παρασκευάζονται παρέχουν ισχυρή θερμική προστασία κατά τη διάρκεια θερμικών διεργασιών, γεγονός που είναι εξαιρετικά ευεργετικό για πτητικές ενώσεις. Η ενθυλάκωση σε ζύμες είναι επίσης ωφέλιμη για τη σταθεροποίηση/ προστασία βιοδραστικών ενώσεων έναντι ανεπιθύμητων επιπτώσεων από το φως ή το οξυγόνο, για μακροχρόνια απελευθέρωση γεύσης και για στοχευμένη στοματική απελευθέρωση (Paramera et al., 2014). Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την αδρανοποίηση και την μετέπειτα διαδικασία μικροενθυλάκωσης των επιθυμητών συστατικών με την κάθε μία να αποδίδει διαφορετικά κάτω από διαφορετικές συνθήκες και παραμέτρους (π.χ. θερμοκρασία ή πλασμόλυση των ζυμών η οποία δεν είναι πάντοτε απαραίτητη). Για παράδειγμα, ο Bishop (1998), αναφέρει ότι η διαδικασία ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η απευθείας ανάμειξη ενός υδατικού εναιωρήματος ζυμών με

αιθέριο έλαιο. Η διαδικασία αυτή επέτρεψε την ελεύθερη είσοδο του συστατικού από τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες των ζυμών και την παθητική παραμονή του εντός των κυττάρων.

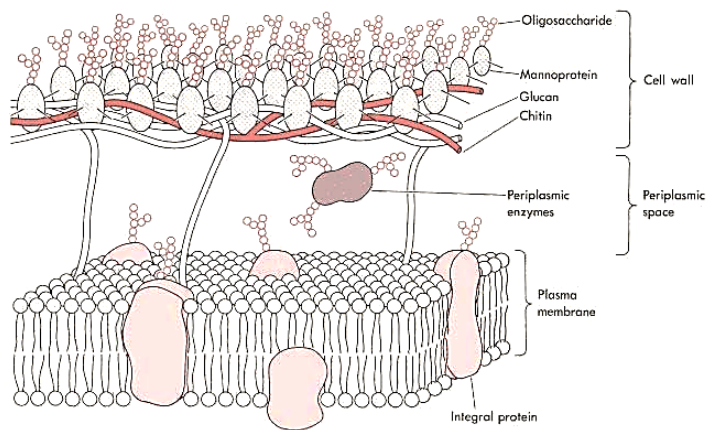
1.3 ΔΟΜΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ

Οι μύκητες είναι κοινοκυτταρικοί οργανισμοί ενώ η ζύμη είναι ένας μονοκύτταρος οργανισμός. Ένα απλό κύτταρο ζύμης με διάμετρο περίπου 5-10μm και συνήθως έχει σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα (Εικόνα 1).

Η δομή των κυττάρων ζύμης, περιλαμβάνει ένα παχύ και μηχανικά ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα και τη μεμβράνη πλάσματος λιπιδίων, η οποία επιτρέπει την ενθουλάκωση τόσο υδρόφοβων όσο και υδρόφιλων δραστικών συστατικών και παρέχει υψηλή ικανότητα απορρόφησης-αποθήκευσης των υλικών του πυρήνα.

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένα φράγμα που αποτελείται κυρίως από υδατάνθρακες που περιβάλλουν το κύτταρο και έχει άκαμπτη δομή πάχους 250 nm που αποτελεί περίπου το 25% του ξηρού βάρους του κυττάρου. Δομείται από τρία αλληπάλληλα στρώματα: (α) το εσωτερικό στρώμα που είναι ένα στρώμα χιτίνης (πολυμερές μακράς αλυσίδας μιας N-ακετυλογλυκοζαμίνης), αποτελούμενο κυρίως από γλυκάνες, (β) το εξωτερικό στρώμα που αποτελείται κυρίως από μαννοπρωτεΐνες, και (γ) ενδιάμεσο στρώμα είναι ένα μείγμα των δομικών συστατικών του εσωτερικού και του εξωτερικού στρώματος.

Η μεμβράνη πλάσματος είναι μια ημιπερατή λιπιδική διπλή στιβάδα μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και του εσωτερικού του κυττάρου. Υπάρχουν διάφοροι ξεχωριστοί ρόλοι που εκτελεί η μεμβράνη πλάσματος, όπως να αποτελεί εμπόδιο στην ελεύθερη διάχυση των διαλυμένων ουσιών, να καταλύει συγκεκριμένες αντιδράσεις, να αποθηκεύει ενέργεια, να παρέχει θέσεις για τη σύνδεση συγκεκριμένων μορίων που εμπλέκονται σε μεταβολικές οδούς σηματοδότησης και να παρέχει οργανωμένη μήτρα υποστήριξης ενζυμικών οδών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση άλλων κυτταρικών συστατικών. Η μεμβράνη του πλάσματος είναι αρκετά ρευστή και εύκαμπτη λόγω των συστατικών της σε λιπίδια, στερόλες και πρωτεΐνες. Η ρευστότητα της μεμβράνης είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία της.



Εικόνα 2: Παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης - *Adapted by Paciello, 2021*

Τα διπλά στρώματα λιπιδίων είναι από τη φύση τους ρευστά και η ρευστότητα καθορίζεται από το βαθμό στον οποίο τα λιπίδια συνδέονται μεταξύ τους. Με τον έλεγχο του επιπέδου κορεσμού στις λιπιδικές μεμβράνες τους, τα κύτταρα ζυμομυκήτων είναι σε θέση να διατηρούν την κατάλληλη ρευστότητα της μεμβράνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες, κάτι που βρίσκει εφαρμογή στην χρήση τους ως μέσα ενθυλάκωσης. Το κυτταρόπλασμα είναι εκείνο το τμήμα του κυττάρου που περικλείεται από τη μεμβράνη του πλάσματος. Είναι ένα υδατικό κολλοειδές υγρό που περιέχει πλήθος μεταβολιτών. Τα κενοτόπια (*vacuoles*) είναι μια δομή συνδεδεμένη με τη μεμβράνη που αποθηκεύει θρεπτικά συστατικά και είναι επίσης εκεί όπου το κύτταρο διασπά πρωτεΐνες. Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα δίκτυο μεμβρανών και αποτελεί συνήθως το σημείο όπου το κύτταρο παράγει πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες για μεμβράνες και έκκριση. Άλλα μικροσωμάτια αποτελούνται κυρίως από σώματα γλυκογόνου και κόκκους λιπιδίων (*Speers et al., 2015*).

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση της τρέχουσας επιστημονικής γνώσης αναφορικά με τη χρήση και τα πλεονεκτήματα των κυττάρων ζύμης στην μικροενθυλάκωση.

1.5 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Για την επίτευξη του σκοπού αλλά και των επιμέρους στόχων της παρούσας εργασίας ακολουθήθηκε μια επιστημονική δομή μελέτης και έρευνας η οποία περιλαμβάνει τα παρακάτω κεφάλαια.

- Στο **Κεφάλαιο 1** γίνεται μία εισαγωγική ανασκόπηση ως προς τη βασική βιολογία των κυττάρων των ζυμών, για την αποτελεσματικότερη μετέπειτα κατανόηση στη χρήση τους για μικροενθυλάκωση.
- Στο **Κεφάλαιο 2** ορίζεται βάσει βιβλιογραφίας η μικροενθυλάκωση και αναλύονται οι μέθοδοι-τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων ή σε πιλοτικά προγράμματα.
- Στο **Κεφάλαιο 3** εξηγούνται και συγκρίνονται οι μηχανισμοί με οποίους γίνεται η ελεγχόμενη απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών σε συγκεκριμένες συνθήκες παράδοσης.
- Στο **Κεφάλαιο 4** παρουσιάζονται τα έως τώρα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστατικά ενθυλάκωσης, εκτός από τις ζύμες, και αναλύεται η αποτελεσματικότητα και η σταθερότητά τους από την τρέχουσα επιστημονική γνώση.
- Στο **Κεφάλαιο 5** γίνεται μία αναλυτική ανασκόπηση των πλεονεκτημάτων της χρήσης των ζυμών ως συστατικά ενθυλάκωσης, ως προς τη σταθερότητα, τη βιοσιμότητα και τα μηχανικά τους οφέλη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μικροενθυλάκωση

2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ως «μικροενθυλάκωση» ορίζεται ένα μέσο «συσκευασίας», διαχωρισμού και αποθήκευσης συστατικών σε μικροσκοπικές κάψουλες για μετέπειτα απελευθέρωσή τους υπό ελεγχόμενες συνθήκες (ελεγχόμενος ρυθμός, παρατεταμένη διάρκεια, κατάλληλη χρονική στιγμή έναρξης απελευθέρωσης). Οι διάφορες μέθοδοι ενθυλάκωσης έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία παραγωγής α' υλών για τρόφιμα, καθώς και για την καλύτερη και ελεγχόμενη απελευθέρωση των συστατικών τροφίμων, συχνά ευαίσθητων σε εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως θερμοκρασία, φως κ.α. Επίσης, η μικροενθυλάκωση με βάση το μέγεθος του τελικού παρασκευάσματος εμπίπτει σε δύο κατηγορίες: μικροκάψουλες (*microcapsules*) και μικροσφαίρες (*microspheres*). Οι εφαρμογές της μικροενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων είναι κοινές και στις δύο κατηγορίες. Ασφαλώς δε, οι τεχνικές και οι τύποι μικροενθυλάκωσης που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων πρέπει να πληρούν διάφορες κρατικές και βιομηχανικές ρυθμιστικές αρχές. Η επιλογή και ανάπτυξη συστατικών μικροενθυλακωμένων τροφίμων για ελεγχόμενη παράδοση (*controlled delivery*) απαιτεί προσεκτική ισορροπία φυσικών και χημικών ιδιοτήτων και επεξεργασία συστατικών, διαθέσιμες τεχνικές και κανονιστικές οδηγίες (Sobel et al., 2014).

Η μικροενθυλάκωση έχει εφαρμοσθεί σε πλήθος βιοδραστικών συστατικών, όπως ενισχυτικά γεύσης, αρωματικές ύλες, ωμέγα λιπαρά οξέα και ενζύμων, κ.α. Η επιλογή των κατάλληλων υλικών ενθυλάκωσης και οι τεχνικές ενθυλάκωσης είναι ζωτικής σημασίας, καθώς καθορίζουν την επιτυχία της ενθυλάκωσης μέσω της αποτελεσματικότητας της παγίδευσης, τη σταθερότητα των καψουλών και τη προστασία του υλικού στον πυρήνα. Οι αποτελεσματικές και στοχευμένες ιδιότητες απελευθέρωσης αλλά και παράδοσης των συστατικών γίνονται κινητήρια δύναμη για τη χρήση της μικροενθυλάκωσης. Ως εκ τούτου νέες καινοτομίες στην ενθυλάκωση καθώς και η χρήση μικροενθυλακωμένων συστατικών στη βιομηχανία τροφίμων συνεχίζει να αυξάνεται (Chang Chang et al., 2019).

2.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ

Η μέθοδος παρασκευής και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μικροενθυλάκωση αλληλεπικαλύπτονται συχνά. Οι διάφορες διαδικασίες μικροενθυλάκωσης μπορούν να χωριστούν σε:

- (α) χημικές,
- (β) φυσικοχημικές,
- (γ) ηλεκτροστατικές και
- (δ) μηχανικές.

Μικροκάψουλες πολυμερούς παρατεταμένης απελευθέρωσης που περιέχουν φαρμακευτικές ουσίες με διάφορα χαρακτηριστικά διαλυτότητας, παρασκευάζονται με κολλοειδή διασποράς πολυμερούς σε ένα εντελώς υδατικό περιβάλλον ως εναλλακτική των συμβατικών τεχνικών μικροενθυλάκωσης (Singh et al., 2010).

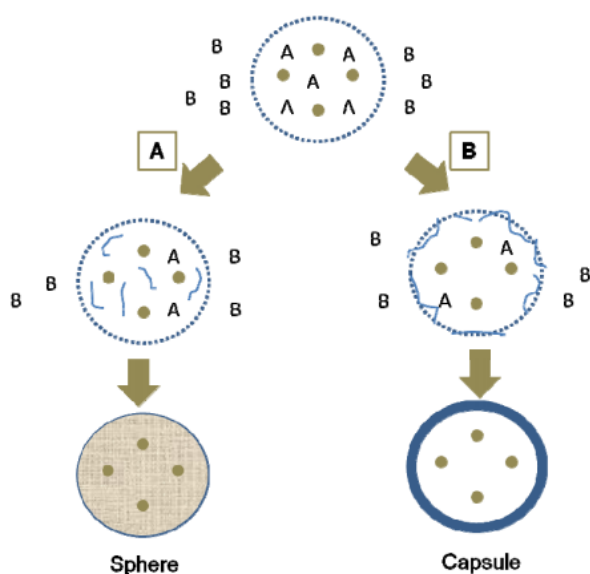
2.2.1 Χημικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης

Οι χημικές διεργασίες ενθυλάκωσης περιλαμβάνουν οπωσδήποτε μια τουλάχιστον χημική αντίδραση και διακρίνονται σε:

- «Διεπιφανειακό πολυμερισμό» (interfacial) και
- «*in situ* πολυμερισμό» (Singh et al., 2010).

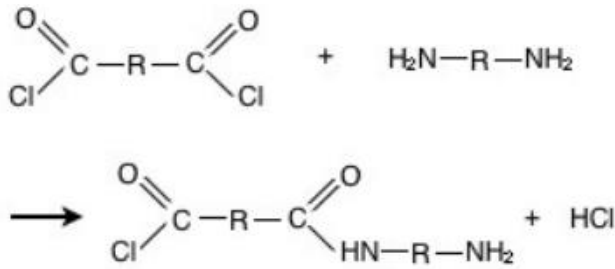
(α) «Διεπιφανειακός Πολυμερισμός»: Ο «διεπιφανειακός πολυμερισμός» είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή ενθυλακωμένων φυτοφαρμάκων, υλικών αλλαγής φάσης, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων, κυρίως λόγω του υψηλού φορτίου των μικροκαψουλών σε δραστικά συστατικά. Είναι μία μέθοδος γρήγορη, υψηλής απόδοσης (χωρίς σημαντικές απώλειες συστατικών), με ελεγχόμενα χαρακτηριστικά απελευθέρωσης και εύκολα βήματα επεξεργασίας (Ricardo et al., 2021). Η διαδικασία συνίσταται στη διασπορά μιας φάσης που περιέχει το βιοδραστικό μονομερές, σε μια δεύτερη αναμίξιμη φάση στην οποία προστίθεται ένα δεύτερο μονομερές. Και τα δύο μονομερή αντιδρούν στην επιφάνεια σταγονιδίων, σχηματίζοντας μια πολυμερή μεμβράνη. Η αντίδραση ξεκινά από την υγρή ακόμα κατάσταση και καθώς η μεμβράνη αρχίζει να σχηματίζεται, η θέση της αντίδρασης εξελίσσεται προς την επιφάνεια των σταγονιδίων. Όταν τα ολιγομερή είναι σε μεγάλο

βαθμό αδιάλυτα στη διεσπαρμένη φάση των σταγόνων, το πολυμερές καθιζάνει γρήγορα κοντά στη διεπαφή και λαμβάνονται μικροκάψουλες συνδεδεμένες με μεμβράνη. Σε συνάρτηση με τη διαλυτότητα των ολιγομερών, σχηματίζεται μια περισσότερο ή λιγότερο παχιά μεμβράνη (Perignon et al., 2014). Με άλλα λόγια, στην τεχνική «διεπιφανειακού πολυμερισμού» το τοίχωμα σχηματίζεται από μονομερή που διαλύονται στις δύο ξεχωριστές φάσεις (φάση λαδιού και νερού) και πολυμερίζονται στη διεπαφή των σταγονιδίων γαλακτώματος. Για παράδειγμα, μονομερή όπως η διαμίνη μπορούν να διαλυθούν στο νερό και η υδατική φάση διασπείρεται στην ελαιώδη φάση.



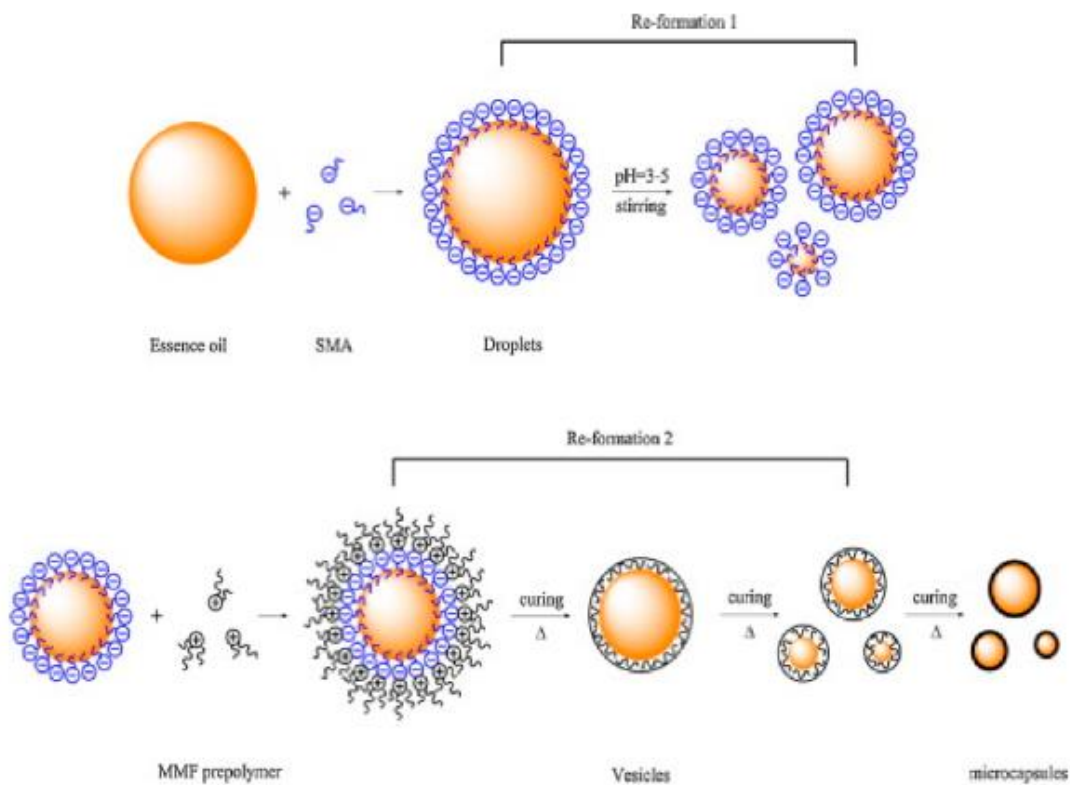
Εικόνα 3 . Αρχή της μικροενθλάκωσης με διεπιφανειακό πολυμερισμό, όπου το (A) ολιγομερές είναι διαλυτό στο σταγονίδιο και το (B) ολιγομερές είναι αδιάλυτο στο σταγονίδιο - *Adapted by Munin and Edwards-Levy 2011*

Το δεύτερο μονομερές που είναι διαλυτό στο λάδι, για παράδειγμα χλωριούχο διοξύ, προστίθεται και αντιδρά με το πρώτο μονομερές στη διεπαφή σχηματίζοντας το υλικό τοιχώματος. Μπορούν να παραχθούν διαφορετικοί τύποι πολυμερών επιλέγοντας διαφορετικά μονομερή, αλλά οι περισσότερες δημοσιεύσεις αναφέρονται σε μεμβράνη πολυαμιδίου (Veršič 2013).



Εικόνα 4 Αντίδραση σχηματισμού μεμβράνης πολυαμιδίου - Adapted by Veršič 2013

(β) «in situ πολυμερισμός»: Ο «in situ πολυμερισμός» λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, ένα υδατικό πολυμερές προστίθεται στον αντιδραστήρα μαζί με απεσταγμένο νερό σε μια ορισμένη θερμοκρασία, ακολουθούμενο από την προσθήκη ενός παράγοντα διασταύρωσης (*cross-linking agent*) στον αντιδραστήρα. Το μείγμα αναδεύεται σε υψηλή ένταση στα 600 rpm για 10 λεπτά ακολουθούμενο από την προσθήκη παραγόντων σχηματισμού πυρήνων, με αποτέλεσμα την κολλοειδή διασπορά του μίγματος. Το pH αυτού του μίγματος ρυθμίζεται στο 3,5-4,0 με συνεχή ανάδευση, ακολουθούμενο από την προσθήκη μιας υπολογισμένης ποσότητας επίστρωσης στη διασπορά. Η αντίδραση διεξάγεται μαζί με ανάδευση, ενώ θερμαίνεται σταδιακά η διασπορά στους 50°C για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Το εναιώρημα των σχηματισμένων καψουλών ψύχεται, πλένεται επανειλημμένα και τελικά ξηραίνεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την προσαρμογή του μεγέθους των καψουλών, την αναλογία κατανομής μεγέθους και ενθυλάκωσης. Μέσω αυτής της μεθοδολογίας έχουν ενθυλακωθεί επιτυχώς, κερι παραφίνης, ως υλικό πυρήνα με φορμαλδεΐδη ουρίας ως υλικό κελύφους, παλμιτικό οξύ, ως πυρήνας με οξυϋδροξείδιο αργιλίου (AlOOH) ως υλικό κελύφους, εξαδεκανίου ή οκταδεκανίου, ως πυρήνας με μελαμίνη-ρητίνη ως υλικό κελύφους, υψηλότεροι υδρογονάνθρακες, ως πυρήνας με ρητίνες αμινο-αλδεΐδης ως υλικό κελύφους και το N-εξαδεκανίου ως πυρήνας με μελαμίνη-φορμαλδεΐδη ως υλικό κελύφους. Μέσω αυτής της διαδικασίας, μπορούν να παραχθούν κάψουλες μεγέθους 0,05-100μm και είναι σε θέση να ενθυλακώσουν πολλές οργανικές ενώσεις ελαιώδους φάσης. Η **Εικόνα 5** παριστά τη μικροενθυλάκωση του αιθέριου ελαίου με τη διαδικασία του in-situ πολυμερισμού.



Εικόνα 5. Διαδικασία κατασκευής μικροκαψουλών που περιέχουν αιθέριο έλαιο μέσω in situ πολυμερισμό – Adapted by Hassan et al., 2016

2.2.2 Φυσικοχημικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης

Πολλές τεχνολογίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μικροκαψουλών για τα τρόφιμα βιομηχανία. Ο Πίνακας 1 παραθέτει πολλά που βασίζονται σε φυσικά φαινόμενα όπως η θερμική ζελατινοποίηση, η ιοντική ζελατινοποίηση και διάφοροι τύποι διαχωρισμού φάσης πολυμερών. Συχνά ονομάζονται χημικές μέθοδοι ακόμη και αν βασίζονται αποκλειστικά σε φυσικά φαινόμενα.

2.2.3 Ηλεκτροστατικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης

Οι πρωτεΐνες και πολλοί πολυσακχαρίτες περιέχουν φορτισμένες πλευρικές ομάδες, οπότε η ηλεκτροστατική έλξη χρησιμοποιείται συνήθως ως κινητήρια δύναμη για τη συγκέντρωσή τους και την δημιουργία γέλης. Ένας άλλος τύπος ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης που χρησιμοποιείται συνήθως είναι ηλεκτροστατική σύνδεση (binding), όπου ένα φορτισμένο στοιχείο εισάγεται για τη σύνδεση δύο ή περισσότερων αντίθετα φορτισμένων στοιχείων. Η γέλη αλγινικού είναι ένα τυπικό δίκτυο που σχηματίζεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ο μηχανισμός σχηματισμού αλγινικού πηγματος που

προκαλείται από ασβέστιο, συμβαίνει λόγω της ομαλής ευθυγράμμισης των αλγινικών πολυμερών τα οποία αλληλεπιδρούν με δισθενή κατιόντα, όπως το ασβέστιο, όπου τα ιόντα ασβεστίου καταλαμβάνουν το χώρο μεταξύ δύο αλγινικών πολυμερών.

Πίνακας 1. Διαδικασίες μικροενθυλάκωσης βασισμένες σε φυσικά φαινόμενα που εμφανίζονται σε διάλυμα και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή συστατικών τροφίμων με μικροενθυλάκωση

Διαδικασία ενθυλάκωσης	Βασικός Μηχανισμός
Πολύπλοκη συσσωμάτωση (συγκεντρωτικός διαχωρισμός φάσης)	Δημιουργεί συσσωμάτωση μεταξύ αντιθετικά φορτισμένων πολυηλεκτρολυτών για να σχηματίσει δύο φάσεις. Το ένα είναι ένα πιο συμπυκνωμένο διάλυμα πολυμερούς από το άλλο και απορροφά διασκορπισμένο υλικό πυρήνα για να σχηματίσει το κέλυφος της κάψουλας όταν ζελατινοποιηθεί.
πολυμερές/ ασυμβατότητα πολυμερούς (διαχωρισμός φάσης)	Διαλύματα ασυμβίβαστων πολυμερών διαχωρίζονται σε δύο υγρές φάσεις η μία εκ των οποίων απορροφά διασκορπισμένο υλικό πυρήνα και στη συνέχεια πηκτώνεται για σχηματισμό κελύφους κάψουλας.
<i>In situ</i> ζελατινοποίηση	Μετατρέπει τα διασπαρμένα σταγονίδια ενός γαλακτώματος σε σωματίδια με θερμική ή ιοντική ζελατινοποίηση.
Layer-by-layer (LbL)	Δημιουργεί κέλυφος κάψουλας σε σταγονίδια ή σωματίδια με εναπόθεση εναλλασσόμενων λεπτών στρωμάτων από αντίθετα φορτισμένα υλικά

Adapted by [Garti and McClements, 2012](#)

Η αλγινική γέλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε συστήματα παράδοσης συστατικών, τόσο σε φαρμακευτικές ουσίες, όσο και σε εφαρμογές τροφίμων. Επίσης, οι υδρογέλες χιτοζάνης έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή τις τελευταίες δεκαετίες. Η κατιονική φύση της χιτοζάνης δίνει την ενδιαφέρουσα ικανότητα να ζελατινοποιείται κατά την επαφή με ορισμένα πολυανιόνια, μια διαδικασία που αναφέρεται ως «ιονοτροπική ζελατινοποίηση» (ionotropic gelation) ([Garti and McClements, 2012](#)).

2.2.4 Μηχανικές Διεργασίες Ενθυλάκωσης

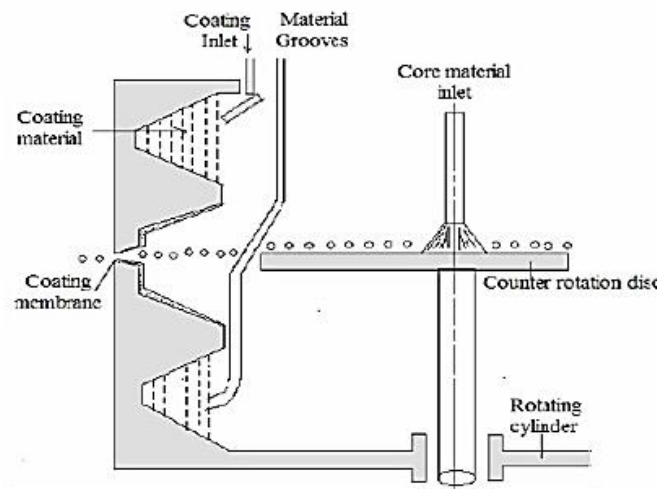
Οι μηχανικές διεργασίες περιλαμβάνουν:

- τη μέθοδο αναστολής αέρα (air-suspension method),
- επικάλυψη με ψεκασμό (pan coating),
- ξήρανση με ψεκασμό (spray drying),
- πήξη ψεκασμού (spray congealing),
- σύστημα μικρο-στομίου (micro-orifice system) και
- κοκκοποίηση περιστροφικής ρευστοποίησης (rotary fluidization bed granulator method).
- σφαιροποίηση περιλαμβάνεται μερικές φορές στο πλαίσιο της μηχανικής διαδικασίας μικροενθυλάκωσης (Singh et al., 2010)

Οι μηχανικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μικροενθυλάκωση απαιτούν ειδικούς εξοπλισμούς. Οι μικροκάψουλες που παράγονται προκύπτουν από μηχανικές διαδικασίες και όχι από ένα καλά καθορισμένο φυσικό ή χημικό φαινόμενο. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μηχανικές μέθοδοι για την παρασκευή μικροκαψουλών και μικροσφαιρίων είναι:

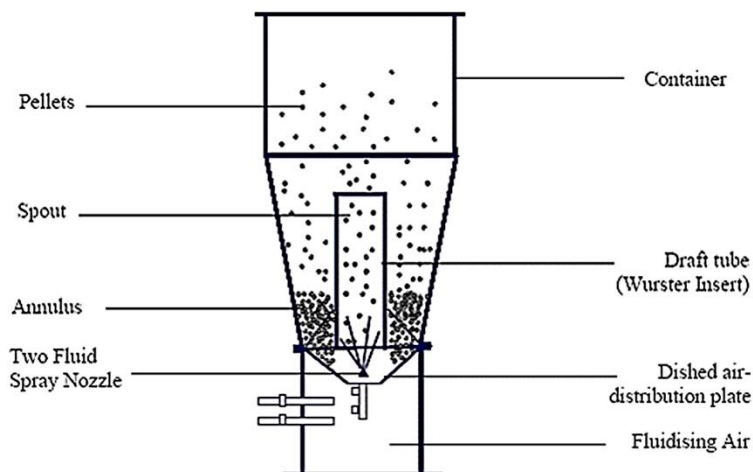
(α) Διεργασία «φυγοκέντρωσης πολλαπλών στομιών» (multiorifice centrifugal process), που αναπτύχθηκε από το Southwest Research Institute ως μηχανική διαδικασία για την παραγωγή μικροκαψουλών που χρησιμοποιούν φυγοκεντρικές δυνάμεις για να εκτοξεύσουν ένα σωματίδιο συστατικού του πυρήνα μέσω μιας μεμβράνης μικροενθυλάκωσης. Η συγκεκριμένη διεργασία είναι ικανή για μικροενθυλάκωση υγρών και στερεών ποικίλων μεγεθών, με διαφορετικά υλικά επικάλυψης (Εικόνα 6).

3. MULTIORIFICE CENTRIFUGATION:



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής ενθυλάκωσης «φυγοκέντρησης πολλαπλών στομιών» - *Adapted by Begum et al., 2018*

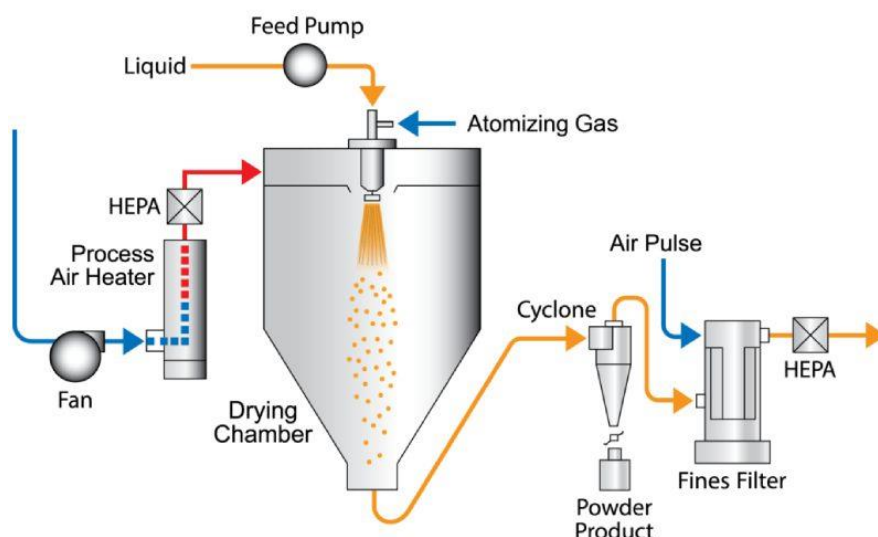
(β) «Επίστρωση με εναιώρημα σε αέρα» (*air suspension coating*) με wurster, η οποία αποτελείται από τη διασπορά στερεών σε μορφή σωματιδίων σωματιδιακών υλικών του πυρήνα σε ένα υποστηρικτικό ρεύμα αέρα και την επικάλυψη ψεκασμού στα αιωρούμενα στον αέρα σωματίδια.



Εικόνα 7. Σχηματικό διάγραμμα της επίστρωσης με «Εναιώρημα σε αέρα» - *Adapted by Hassan et al., 2016*

(γ) «Ξήρανση με ψεκασμό» (*spray drying*) και **«πήξη με ψεκασμό»** (*spray congealing*), όπου και οι δύο μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια ως τεχνικές μικροενθυλάκωσης. Λόγω ορισμένων ομοιοτήτων των δύο διαδικασιών, συζητούνται μαζί. Οι διεργασίες ξήρανσης με ψεκασμό και πήξης με ψεκασμό είναι παρόμοιες στο γεγονός ότι και οι δύο περιλαμβάνουν τη διασπορά του υλικού του πυρήνα σε μια υγροποιημένη ουσία επικάλυψης και τον ψεκασμό ή την εισαγωγή του μείγματος επικάλυψης πυρήνα σε κάποια περιβαλλοντική κατάσταση, όπου επηρεάζεται σχετικά ταχέως η στερεοποίηση της επικάλυψης. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων είναι η στερεοποίηση της επικάλυψης. Η στερεοποίηση επίστρωσης στην περίπτωση ξήρανσης με ψεκασμό επηρεάζεται από την ταχεία εξάτμιση ενός διαλύτη στον οποίο το υλικό επικάλυψης διαλύεται. Αντίθετα, στην πήξη με ψεκασμό επιτυγχάνεται με θερμική πήξη ενός λιωμένου υλικού επικάλυψης ή με στερεοποίηση μιας διαλυμένης επικάλυψης με εισαγωγή του μίγματος υλικού του πυρήνα επικάλυψης σε μη διαλύτη.

(δ) Η «επικάλυψη με ψεκάσμο» (pan coating) για τη μικροενθυλάκωση σχετικά μεγάλων σωματιδίων, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία. Όσον αφορά τη μικροενθυλάκωση, στερεά σωματίδια μεγέθους άνω των 600microns θεωρούνται γενικά απαραίτητα για αποτελεσματική επικάλυψη και η διαδικασία έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την παρασκευή σφαιριδίων ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Στην πράξη, η επικάλυψη εφαρμόζεται ως διάλυμα ή ως ακροφύσιο ψεκαστήρα στο επιθυμητό στερεό υλικό του πυρήνα στην επίστρωση. Συνήθως, για την απομάκρυνση του διαλύτη επικάλυσης, θερμός αέρας περνά πάνω από τα επικαλυμμένα υλικά καθώς οι επικαλύψεις εφαρμόζονται στην επίστρωση (Singh et al., 2010).



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση βιομηχανικού συστήματος «ξήρανσης με ψεκάσμο» - <https://www.hawachdryer.com/>

(ε) Η «τεχνική εξώθησης» περιλαμβάνει την παρασκευή ενός υδατικού διαλύματος υδροκολλοειδών, την μετέπειτα προσθήκη συστατικών μικροενθυλάκωσης (π.χ. συμπυκνωμένων μικροοργανισμών) σε αυτό και την εξώθηση του προκύπτοντος μίγματος μέσω ενός ακροφυσίου. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι ο σχηματισμός σταγονιδίων που πέφτουν σε ένα διάλυμα σκλήρυνσης. Στην περίπτωση του πιο συχνά χρησιμοποιούμενου αλγινικού νατρίου, η ζελατινοποίηση μπορεί να επιτευχθεί ρίχνοντας τα σταγονίδια σε διάλυμα CaCl₂. Το μέγεθος των καψουλών που προκύπτουν εξαρτάται από τη διάμετρο του στομίου, την απόσταση μεταξύ της εξόδου και του διαλύματος σκλήρυνσης, και το ιξώδες του προκύπτοντος μείγματος. Δεδομένου ότι η μέθοδος

εξώθησης ήταν εύκολα διαθέσιμη, χρησιμοποιήθηκε από πολλούς ερευνητές για την μικροενθυλάκωση των προβιοτικών κυττάρων, παρά τις μεγάλες διακυμάνσεις των σφαιριδίων 0,5-3 mm (Heidebach et al., 2012).

(ζ) Η «τεχνική γαλακτώματος». Τα γαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία φαρμακευτικών προϊόντων και τροφίμων για τη βελτίωση της διαλυτότητας, της δραστηριότητας και της σταθερότητας των ενώσεων ενδιαφέροντος. Ένα γαλάκτωμα είναι η διασπορά δύο μη αναμίξιμων υγρών με ένα σταθεροποιητικό παράγοντα, το οποίο συνήθως παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τη συνεχή φάση από ό, τι με τη διεσπαρμένη φάση. Επιπλέον, ένας παράγοντας στερεοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των σταγονιδίων διεσπαρμένης φάσης από τη συνεχή φάση. Εάν η διεσπαρμένη φάση είναι υδατική, το γαλάκτωμα ονομάζεται γαλάκτωμα νερό σε λάδι (W / O), ενώ το αντίθετο είναι γνωστό ως γαλάκτωμα ελαίου σε νερό (O / W) ή αντίστροφη φάση. Και οι δύο περιπτώσεις, που σχηματίζονται μόνο από δύο φάσεις, ονομάζονται απλά γαλακτώματα. Με την προσθήκη μίας ακόμη φάσης, λαμβάνονται διπλά γαλακτώματα, όπως γαλακτώματα νερό-σε-λάδι-σε-νερό (W / O / W) ή λάδια-σε-νερό-σε-λάδι (O / W / O) (Rodrigues et al., 2020). Στη μέθοδο αυτή, ένας μικρός όγκος του υδατικού μίγματος υδροκολλοειδών και συστατικών πυρήνα (ασυνεχής φάση) γαλακτωματοποιείται σε ένα μεγάλο όγκο φυτικού ελαίου (συνεχής φάση). Μόλις σχηματιστεί ένα γαλάκτωμα νερού σε λάδι, το διασκορπισμένο μείγμα πρέπει να αδιαλυτοποιηθεί για να σχηματίσει μικρά σφαιρίδια εντός της φάσης του λαδιού. Όταν παράγονται κάψουλες αλγινικού άλατος, οι μικροκάψουλες σκληραίνονται με αργή προσθήκη διαλύματος CaCl_2 στο γαλάκτωμα υπό ανάδευση. Όταν το διάλυμα ασβεστίου έρχεται σε επαφή με τη διεσπαρμένη φάση αλγινίου, εμφανίζεται στιγμιαίο πήκτωμα. Έτσι, η κινητική γέλη είναι ανομοιογενής, η οποία μερικές φορές οδηγεί σε κάψουλες με ακανόνιστο σχήμα (Heidebach et al., 2012).

(η) Η «ξήρανση με ψεκασμό» αποτελεί μια ταχεία και οικονομική μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή βιο-λιπασμάτων (Campos et al., 2014) Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μια κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος ενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων. Η ξήρανση με ψεκασμό περιλαμβάνει ψεκασμό γαλακτώματος ή εναιώρηματος του υλικού φορέα σε αέριο ξήρανσης, με αποτέλεσμα ταχεία εξάτμιση νερού όπου οι κάψουλες λαμβάνονται ως ξηρή σκόνη. Η διαδικασία ξήρανσης με

ψεκασμό ελέγχεται μέσω της τροφοδοσίας του προϊόντος, της ροής αερίου και της θερμοκρασίας. Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα της μεθόδου ξήρανσης με ψεκασμό, απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες για τη διευκόλυνση της εξάτμισης του νερού. Κατά την ξήρανση με ψεκασμό, παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιέχει τα προς ενθυλάκωση υλικά και τη διαλυμένη μήτρα ενθυλάκωσης. Τα πλεονεκτήματα της ξήρανσης με ψεκασμό είναι η ταχύτητα και το σχετικά χαμηλό κόστος της διαδικασίας. Η τεχνική είναι πολύ αναπαραγωγική και το πιο σημαντικό είναι ότι είναι κατάλληλη για βιομηχανικές εφαρμογές. Ένα μειονέκτημα της ξήρανσης με ψεκασμό είναι το γεγονός ότι αυτή η τεχνική έχει μικρό πεδίο εφαρμογής, αλλά το κύριο πρόβλημα είναι η χρήση υψηλής θερμοκρασίας η οποία δεν είναι συμβατή σε αρκετές περιπτώσεις μικροενθυλάκωσης, όπως για την επιβίωση ενθυλακωμένων προβιοτικών μικροοργανισμών (Amin et al., 2013).

Η ξήρανση με ψεκασμό βασίζεται στη διάλυση του πυρήνα με διασπορά ενός επιλεγμένου υλικού μήτρας. Η διασπορά στη συνέχεια ψεκάζεται σε θερμαινόμενο αέρα που προάγει τη γρήγορη απομάκρυνση του διαλύτη (νερό). Τα κονιοποιημένα σωματίδια στη συνέχεια διαχωρίζονται από τον αέρα ξήρανσης στην έξοδο σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Η σχετική ευκολία και επίσης το χαμηλό κόστος είναι οι κύριοι λόγοι για την ευρεία εφαρμογή της ξήρανσης με ψεκασμό σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνολογιών για βιοενεργά συστατικά τροφίμων όπως βιταμίνες, μέταλλα, γεύσεις, ακόρεστα έλαια και ένζυμα. Είναι μια σχετικά ήπια μεθοδολογία όσον αφορά την εφαρμογή διαλυτών και των μορίων μήτρας. Τόσο τα υδρόφιλα όσο και τα υδρόφοβα βιοδραστικά μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βασικά υλικά. Ωστόσο, τα υδρόφοβα μόρια συνήθως διαλύονται πρώτα σε μια ελαιώδη φάση στην οποία σχηματίζεται ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό πριν από την ξήρανση (Vos et al., 2010).

(θ) Η «**τεχνική λυοφιλίωσης ή ξήρανσης με κατάψυξη**», είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την αφυδάτωση σχεδόν όλων των ευαίσθητων στη θερμότητα υλικών και αρωμάτων. Η κατάψυξη είναι μια λειτουργία πολλαπλών σταδίων σταθεροποιητικών υλικών στα τέσσερα κύρια στάδια: κατάψυξη, εξάχνωση (πρωτογενής ξήρανση), στάδιο εκρόφησης (δευτεροβάθμια ξήρανση) και, τέλος, αποθήκευση. Η ξήρανση με κατάψυξη οδηγεί σε προϊόντα ανώτερης ποιότητας τα οποία έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής. Ωστόσο,

η ενεργειακές απαιτήσεις, ο χρόνος επεξεργασίας (πάνω από 20 ώρες) και η ανοιχτή πορώδης δομή είναι τα σημαντικά μειονεκτήματα της ξήρανσης με ψύξη. Παρ'όλα αυτά, η ξήρανση με κατάψυξη χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό των νανοσωματιδίων (δηλαδή, την απομάκρυνση του νερού από τις ουσίες) που παράγεται από άλλες τεχνικές ενθυλάκωσης. Κατά τη διάρκεια της ξήρανσης με κατάψυξη, οι πόροι σχηματίζονται λόγω της διαδικασίας υποκατάστασης πάγου. Ως εκ τούτου, αυτή η διαδικασία δεν είναι καθαρά εγκλεισμός καθώς τα ενεργά συστατικά τροφίμων εκτίθενται στην ατμόσφαιρα από τους πόρους στην επιφάνεια. Επί του παρόντος, η τεχνική ξήρανσης με κατάψυξη είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την απομάκρυνση του νερού από τις νανοκάψουλες χωρίς να αλλάζει η δομή και το σχήμα τους (Ezhilarasi et al., 2013).

Η ξήρανση με κατάψυξη είναι μια κατάλληλη τεχνική μικροενθυλάκωσης για ευαίσθητες βιοδραστικές ενώσεις, επειδή οι ουσίες δεν εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία όπως στην τεχνική ξήρανσης με ψεκασμό. Τα αποξηραμένα με κατάψυξη προϊόντα μπορούν να ανασυσταθούν γρήγορα και εύκολα, κάτι που είναι ιδιαίτερα πολύτιμο σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης. Για παράδειγμα, αντισώματα και εμβόλια, τα οποία πρέπει να χορηγούνται το συντομότερο δυνατό. Επίσης, η τεχνική ξήρανσης με κατάψυξη είναι απλούστερη από άλλες τεχνικές μικροενθυλάκωσης, λόγω του περιορισμένου αριθμού βημάτων. Τα υλικά επικάλυψης ή φορέα έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εγκλεισμού σε κάψουλα, καθώς μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, οι οποίες επηρεάζουν τη σταθερότητα των λυοφιλοποιημένων σκονών. Οι παράγοντες ενθυλάκωσης μπορούν να επιλεγούν από διάφορους τύπους φυσικών ή συνθετικών υλικών, όπως μαλτοδεξτρίνες, τροποποιημένα άμυλα, πρωτεΐνες, δεξτρίνες και άλλα. Αυτά τα υλικά είναι κατάλληλα για μικροενθυλάκωση, λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν μεμβράνες, της αντίστασης στη γαστρεντερική οδό, του στερεού περιεχομένου, της βιοαποικοδομησιμότητας, της ασφάλειας και των χαμηλών τιμών (Pudziuelyte et al., 2020).

(ι) Η «**τεχνική ψύξης με ψεκασμό**» (spray cooling/ chilling) είναι η διαδικασία στερεοποίησης ενός σε σωματίδια. Η ψύξη με ψεκασμό είναι παρόμοια με την ξήρανση με ψεκασμό με πολλούς τρόπους, αποτελούμενη από πηγή ψεκασμού, θάλαμο

σηματισμού σωματιδίων και ζώνη συλλογής. Η κύρια διαφορά είναι η ζώνη σχηματισμού σωματιδίων, όπου τα σωματίδια σχηματίζονται από την ψύξη και τη σκλήρυνση των σταγονιδίων παρά την εξάτμιση ενός διαλύτη. Για τον σκοπό της ενθυλάκωσης, ένα δραστικό συστατικό διασπείρεται σε ένα υλικό μήτρας υγρού πριν από τον ψεκάσμο. Μετά τον ψεκάσμο και την ψύξη, η μήτρα στερεοποιείται γύρω από το διεσπαρμένο δραστικό συστατικό για να σχηματίσει μια μικροσφαίρα ή μια μικροκάψουλα πολλαπλών πυρήνων. Για συστατικά τροφίμων και διατροφικές φαρμακευτικές εφαρμογές, το δραστικό συστατικό μπορεί να είναι ένα άρωμα, βιταμίνη, θρεπτικό έλαιο ή άλλη βιοδραστική ουσία. Παραδείγματα κοινών υλικών μήτρας περιλαμβάνουν κεριά, λίπη, λιπίδια ή υδροκολλοειδή πηκτωματοποίησης. Η βασική διαδικασία για ψύξη με ψεκάσμο είναι συγκρίσιμη με την ξήρανση με ψεκάσμο. Ένα ομοιογενές μείγμα δραστικού συστατικού και υλικού μήτρας ενθυλάκωσης τροφοδοτείται σε σύστημα ακροφυσίων. Το ακροφύσιο ψεκάζει το μείγμα σε ένα μεγάλο θάλαμο όπου τα σταγονίδια ψύχονται ή πηκτώνονται σε σωματίδια. Τα σωματίδια στη συνέχεια συλλέγονται χρησιμοποιώντας μία ή περισσότερες τεχνικές συλλογής. Οι πιο κοινές τεχνικές συλλογής, ένας σάκος κυκλώνων και φίλτρων. Με οποιαδήποτε από τις πιθανές μεθόδους ή τεχνολογίες ψύξης ψεκάσμου, οι τρεις βασικές και κοινές αρχές είναι η διασπορά του δραστικού συστατικού στο υλικό μήτρας, ο ψεκάσμος του πολτού και η στερεοποίηση του υλικού μήτρας (Oxley 2012).

Οι τεχνικές ψεκάσμου ψύξης χρησιμοποιούνται για πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και διατροφικών φαρμάκων για συστατικά όπως γεύσεις, βιταμίνες, διατροφικά έλαια και προβιοτικά. Διάφοροι λόγοι για την ενθυλάκωση συστατικών με ψύξη ψεκάσμου περιλαμβάνουν κάλυψη γεύσης, ελεγχόμενη απελευθέρωση, ενεργοποιημένη απελευθέρωση, μετατροπή υγρού σε στερεό, προστασία από το περιβάλλον, διαχωρισμός δραστικών συστατικών ή αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας υλικών κελύφους που διατίθενται και σχετίζονται με ψύξη ψεκάσμου, είναι δυνατές πολλές εφαρμογές με ένα ευρύ φάσμα συστατικών. Σε σύγκριση με άλλες διαδικασίες ενθυλάκωσης, η ψύξη ψεκάσμου προσφέρει τα πλεονεκτήματα του φθηνού κόστους και των υψηλών ποσοστών παραγωγής (Oxley 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών

3.1 Μηχανισμοί και μοντέλα απελευθέρωσης των συστατικών του πυρήνα

Η απελευθέρωση των συστατικών του πυρήνα πρέπει να γίνεται με ελεγχόμενο τρόπο. Ως ελεγχόμενη απελευθέρωση μπορεί να οριστεί η διαδικασία όπου ένας ή και περισσότεροι ενεργοί παράγοντες ή συστατικά, αποδεσμεύονται από τη κάψουλα στην επιθυμητή τοποθεσία (π.χ. λεπτό έντερο), την επιθυμητή στιγμή και με τον κατάλληλο ρυθμό. Για συστήματα ενθυλάκωσης που σχετίζονται με πτητικές ουσίες, η απελευθέρωση επηρεάζεται εν πολλοίς από διάφορες ανεξάρτητες διαδικασίες, όπως η διάχυση του συστατικού από τη μήτρα ενθυλάκωσης, τον τύπο των σωματιδίων και τη γεωμετρία τους, τη μεταφορά των συστατικών από τη μήτρα στο επιθυμητό περιβάλλον και τη διάλυση του συστατικών του τοιχώματος. Τα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν το γεγονός ότι σε συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης το ενεργό συστατικό απελευθερώνεται για παρατεταμένες χρονικές περιόδους, μπορεί να μειωθεί η απώλεια συστατικών κατά την επεξεργασία και να αποφευχθεί η αντιδραστικότητα ή η ασυμβατότητα μεταξύ των συστατικών (Sagis 2015). Πιο συγκεκριμένα οι κυριότεροι μηχανισμοί απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων συστατικών είναι:

1. «Μονολιθικό σύστημα ελεγχόμενης αποδόμησης» (*degradation controlled monolithic system*): Στο συγκεκριμένο μηχανισμό, το συστατικό του πυρήνα διασπάται στο δίκτυο του θύλακα και κυκλοφορεί σταθερά στο εσωτερικό του. Η ουσία, επομένως, παραμένει σταθερά συνδεδεμένη στο δίκτυο και στη συνέχεια αποβάλλεται κατά την διάσπαση του πλαισίου του θύλακα. Η ταχύτητα της διασποράς του συστατικού κατά την απελευθέρωσή του είναι μέτρια σε σύγκριση με την διάσπαση του πλαισίου του θύλακα (Ayoub et al., 2019)

2. «Διάχυση» (Diffusion): Η διάχυση ή οποία είναι ο συνηθέστερα εμπλεκόμενος μηχανισμός όπου το ρευστό διάλυσης διεισδύει στο κέλυφος, διαλύει τον πυρήνα και διαρρέει μέσω των διάμεσων καναλιών ή πόρων. Έτσι, η συνολική απελευθέρωση εξαρτάται από:

(α) τον ρυθμό με τον οποίο το υγρό διάλυσης διεισδύει στο τοίχωμα των μικροκαψουλών,

(β) τον ρυθμό με τον οποίο διαλύεται το συστατικό στο υγρό διαλυτοποίησης

(γ) τον ρυθμό με τον οποίο διαρρέει το διαλυμένο συστατικό και διασκορπίζεται από την επιφάνεια (Singh et al., 2010)

3. «Όσμωση» (Osmosis): Στην όσμωση, το στρώμα πολυμερούς της μικροκάψουλας δρα ως ημι-πορώδης μεμβράνη και επιτρέπει την δημιουργία διαφοράς οσμωτικής πίεσης ανάμεσα στο εσωτερικό και το εξωτερικό της μικροκάψουλας. Αυτή η κατάσταση, οδηγεί στη τάση για ρύθμιση της ισορροπίας, η οποία επέρχεται με την απομάκρυνση του ενθυλακωμένο συστατικού μέσω των μικρών πόρων της μεμβράνης (Ayoub et al., 2019).

3.2. Ελεγχόμενη απελευθέρωση συστατικών

Οι προσπάθειες μοντελοποίησης απελευθέρωσης των συστατικών του πυρήνα από μικροκάψουλες είναι ιδιαίτερα περίπλοκες λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας στις φυσικές μορφές των μικροκαψουλών αναφορικά με το μέγεθος, το σχήμα, τη διάταξη του πυρήνα και των υλικών επικάλυψης. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών πυρήνα όπως η διαλυτότητα, η ικανότητα διάχυσης, ο συντελεστής κατανομής και των υλικών επικάλυψης όπως μεταβλητό πάχος και πορώδες, καθιστούν επίσης δύσκολη τη μοντελοποίηση της απελευθέρωσης των συστατικών. Ωστόσο, με βάση διάφορες μελέτες σχετικά με τα χαρακτηριστικά απελευθέρωσης, υπάρχουν κάποιες προσεγγιστικές εκτιμήσεις. Για παράδειγμα αναφέρεται ότι σε μονολιθικές κάψουλες η διαδρομή που διανύεται με το συστατικό του πυρήνα δεν είναι σταθερή. Τα συστατικά στο κέντρο του πυρήνα ταξιδεύουν μεγαλύτερη απόσταση συγκριτικά με τα συστατικά στην επιφάνεια. Επομένως, ο ρυθμός απελευθέρωσης γενικά μειώνεται με το χρόνο. (Singh et al., 2010)

Η ελεγχόμενη απελευθέρωση και η σταθερότητα κατά την αποθήκευση είναι σημαντικά χαρακτηριστικά της μικροενθυλάκωσης. Η ελεγχόμενη απελευθέρωση έχει το ευεργετικό αποτέλεσμα της απελευθέρωσης των δραστικών ενώσεων σε ελεγχόμενους ρυθμούς για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα και μπορεί επίσης να μειώσει τις απώλειες συστατικών κατά το μαγείρεμα και την επεξεργασία των προϊόντων. Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων γευστικών ενώσεων. Ο μηχανισμός απελευθέρωσης εμφανίζεται με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους, δηλαδή διάχυση, διόγκωση, τήξη και αποδόμηση. Ωστόσο, πέρα από τη φύση των φορέων και τις συνθήκες αποθήκευσης, οι ιδιότητες σταθερότητας και απελευθέρωσης των μικροκάψουλων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από

το υλικό του τοιχώματος. Επισημαίνεται ότι η υποβάθμιση της γεύσης διέπεται έντονα από τη σχετική υγρασία, τη θερμοκρασία και την υγρασία κατά την αποθήκευση. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι τα ποσοστά απελευθέρωσης των γευστικών ενώσεων εξαρτώνται από τη θερμοκρασία αποθήκευσης και την προσθήκη νερού στη σκόνη ζύμης. Αναφέρεται ότι, η κατακράτηση των γευστικών ενώσεων παρέμεινε σχεδόν σταθερή έως 1 ώρα θέρμανσης στους 105 °C χωρίς προσθήκη νερού στη σκόνη ζύμης, ενώ με την προσθήκη μιας μικρής ποσότητας νερού, η γεύση απελευθερώθηκε από την ενθυλακωμένη σκόνη ([Sultana et al., 2018](#))

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συστατικά Ενθυλάκωσης

4.1. Μικροκάψουλες με βάση πολυσακχαρίτες

4.1.1 Άλας Αλγινικού οξέος

Τα αλγινικά αναφέρονται γενικά ως οικογένεια πολυανιονικών συμπολυμερών που προέρχονται από θαλάσσια φύκια, κυρίως τα καφέ, ή από βακτήρια. Τα αλγινικά έχουν όλο και μεγαλύτερη σημασία στη βιομηχανία υγειονομικής περίθαλψης και φαρμακευτικών προϊόντων. Από την πρώτη επιτυχημένη ενθυλάκωση κυττάρων από τους Lim και Sun (1980), οι αλγινικές μήτρες χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς για κυτταρική καλλιέργεια και μεταμόσχευση. Τα αλγινικά αποτελούνται από δύο βασικά δομικά στοιχεία, τα υπολείμματα α-1-γλουτουρονικού οξέος (G) και β-d-μαννουρονικού οξέος (M), γραμμικά συνδεδεμένα μεταξύ τους με 1-4 δεσμούς. Τα αλγινικά μπορούν εύκολα να σχηματίσουν σφαιρίδια ή μικροσφαίρες παρουσία κατάλληλων κατιόντων διασύνδεσης και μπορούν να κατασκευαστούν ως συστήματα παροχής. Μπορούν να παρασκευαστούν μικροσφαιρίδια (με διάμετρο μικρότερη από 0,2 mm) χρησιμοποιώντας μεθόδους ψεκασμού, γαλακτωματοποίησης και συσσωμάτωσης. Οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες των αλγινικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία σε διάφορες εφαρμογές. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της αλγινικής μήτρας επηρεάζονται σημαντικά από τη σύνθεση του αλγινικού. Με έλεγχο των συνθηκών παρασκευής, του pH, του τύπου και της συγκέντρωσης των διαθέσιμων ιόντων και της θερμοκρασίας, μπορεί να παραχθεί αλγινική μήτρα επιθυμητών χαρακτηριστικών για εγκλεισμό σε κύτταρα και φάρμακα παράγοντας προϊόντα με βάση το αλγινικό άλας με καλή σταθερότητα, βιοσυμβατότητα, ικανότητα συγκράτησης εξιδρώματος και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Goh et al., 2012).

Τα υλικά του πυρήνα σε θύλακες από άλας αλγινικού νατρίου διατηρούνται σχετικά σταθερά στη μήτρα, η οποία εκτιμάται ότι έχει μέγεθος πόρου μικρότερο από 17 nm. Ωστόσο, το πήκτωμα είναι ευαίσθητο παρουσία ιόντων, χολικών παραγόντων Ca²⁺ + και δυσμενών χημικών περιβαλλόντων (π.χ. περιβάλλον στόμαχου). Ένα σύστημα αλγινικής μήτρας σε πολύ χαμηλό pH αναφέρεται ότι υφίσταται ταχύτερη αποικοδόμηση και απελευθέρωση δραστικών συστατικών (Krasaekoopt et al., 2014)

4.1.2 Κόμμεα γελάνης και Ξανθάνης

Η κόμμι γελάνης (Gellan) είναι ένας μικροβιακός πολυσακχαρίτης, ο οποίος προέρχεται από το *Pseudomonas elodea*. Αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη μονάδα τεσσάρων μονομερών γλυκόζης-γλυκουρονικού οξέος-γλυκόζης-ραμνόζης. Εν αντιθέσει με τη χρήση αλγινικού για ενθυλάκωση, η κόμμι ξανθάνης-γελάνης παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι όξινων συνθηκών (Loveleen Kaur Sarao & M. Arora, 2017).

4.1.3 Άμυλο

Το άμυλο είναι ένας πολύ κοινός πολυσακχαρίτης. Αποτελείται από μεγάλο αριθμό μονάδων γλυκόζης που ενώνονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι κύριες συστατικές μονάδες αμύλου είναι αμυλόζη, ένα γραμμικό πολυμερές d-γλυκοπυρανόζης ενωμένο με α-1-4 γλυκοζιτικό δεσμό και αμυλοπηκτίνη, ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης ενωμένο με α-1-4 γλυκοσιδικό δεσμό και α-1-6 γλυκοζιτικό δεσμό για διακλάδωση. Το άμυλο που δεν χωνεύεται στο λεπτό έντερο από παγκρεατικά ένζυμα, όπως αμυλάσες, είναι γνωστό ως ανθεκτικό άμυλο. Ένα καλό χαρακτηριστικό εντερικής παράδοσης παρέχεται από αυτόν τον τύπο υλικών ενθυλάκωσης. Για παράδειγμα, οι κόκκοι ανθεκτικού αμύλου αποτελούν ιδανική επιλογή για μικροενθυλάκωση προβιοτικών κυττάρων που στοχεύει σε απελευθέρωση στο παχύ έντερο (Loveleen Kaur Sarao & M. Arora, 2017).

4.2 Πρωτεΐνες

Η εφαρμογή μιγμάτων πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών ή υλικών μήτρας που βασίζονται αποκλειστικά σε πρωτεΐνες είναι μια σχετικά νέα στρατηγική και μπορεί να θεωρηθεί ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική προσέγγιση που ωστόσο αναπτύχθηκε άμεσα για προβιοτική ενθυλάκωση. Βέβαια, σε αυτήν την περίπτωση, συχνά απαιτούνται εναλλακτικοί μηχανισμοί πήξης (Heidebach et al., 2012). Για παράδειγμα, η ζελατίνη είναι κόμμι που μπορεί να δημιουργήσει ένα θερμοαντιστρέψιμο τζελ. Αυτό, είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με μερικές άλλες ενώσεις έχει χρησιμοποιηθεί ως υλικό ενθυλάκωσης. Μπορεί να κάνει έναν εξαιρετικό συνδυασμό με ανιονικούς πολυσακχαρίτες, όπως η κόμμι γελάνης, καθώς και οι δύο απωθούν ο ένας τον άλλον λόγω του καθαρού αρνητικού φορτίου, τα υδροκολλοειδή είναι αναμίξιμα σε pH υψηλότερο από το 6. Κατά τη ρύθμιση του pH κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο, η ζελατίνη καταλαμβάνει ένα καθαρό θετικό

φορτίο, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας ισχυρής αλληλεπίδρασης με το κόμμι γελάνης που φέρει αρνητικό φορτίο (Loveleen Kaur Sarao & M. Arora, 2017). Μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η εφαρμογή πρωτεϊνών που υποστηρίζονται ή βασίζονται σε πρωτεΐνες κάψουλες-μήτρες φαίνεται πολλά υποσχόμενη και θα μπορούσε να παρέχει ουσιαστική προστασία κατά τη γαστρική διέλευση εάν εφαρμοστούν ήπιες τεχνικές ενθυλάκωσης (Heidebach et al., 2012).

4.3 Λιπίδια

Εκτός από τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες, χρησιμοποιείται επίσης η ενθυλάκωση με βάση τα λιπίδια, η οποία ωστόσο δεν έχει ακόμη διερευνηθεί καλά. Η ενθυλάκωση μήτρας μπορεί να επιτευχθεί με ανάμιξη με λειωμένο λίπος και μετέπειτα ψύξη. Ωστόσο, η διασπορά συστατικών σε λάδι αναφέρθηκε ότι ήταν μια δύσκολη τεχνολογική εργασία. Πρέπει να ληφθεί υπόψη η πρόωρη τήξη των καψουλών σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτές στο ανθρώπινο σώμα. Επίσης, λόγω πιθανών προβλημάτων διαχωρισμού, είναι πιθανό οι εφαρμογές να περιορίζονται σε στερεά τρόφιμα. Μελέτες αποκάλυψαν ότι η ενθυλάκωση προβιοτικών κυττάρων σε λιπαρές ουσίες δεν έδωσε κανένα προστατευτικό αποτέλεσμα κατά την αποθήκευση σε κατεψυγμένο γιαούρτι. Ο Lahtinen et al. (2007) βρήκε μόνο ένα ελαφρύ προστατευτικό αποτέλεσμα όταν τα προβιοτικά ενθυλακώθηκαν σε βούτυρο κακάο κατά την αποθήκευση σε ροφήματα βρώμης που έχουν υποστεί ζύμωση και δεν έχουν υποστεί ζύμωση. Ως εκ τούτου, οι μικροκάψουλες με βάση το λίπος φαίνονται σήμερα λιγότερο κατάλληλες για ενθυλάκωση σε σύγκριση με μικροκάψουλες με βάση πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες (Heidebach et al., 2012).

4.4 Ζύμες και Κυτταρικά τοιχώματα Ζυμών

Πέραν από τις πιο γνωστές χρήσεις των ζυμών στη βιομηχανία των τροφίμων και των ζυμώσεων, οι ζύμες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για εφαρμογή σε μικροκάψουλες. Κατά τη διαδικασία ενθυλάκωσης, εξωγενείς και συνηθέστερα οι τυπικές υδρόφοβες ενώσεις, διαχέονται και καταλήγουν να παγιδούνται παθητικά στο κυτταρικό σώμα, και μπορούν μετέπειτα να απελευθερωθούν με την εφαρμογή κατάλληλων ερεθισμάτων. Χαρακτηριστικό είναι πως τα κύτταρα ζύμης μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ζωντανά είτε νεκρά, άθικτα (σε πλέον υγιή κατάσταση), διαπερατά ή ακόμη και μετά από άδειασμα όλων των αρχικών κυτταροπλασματικών τους περιεχομένων. Τα κύρια πλεονεκτήματα

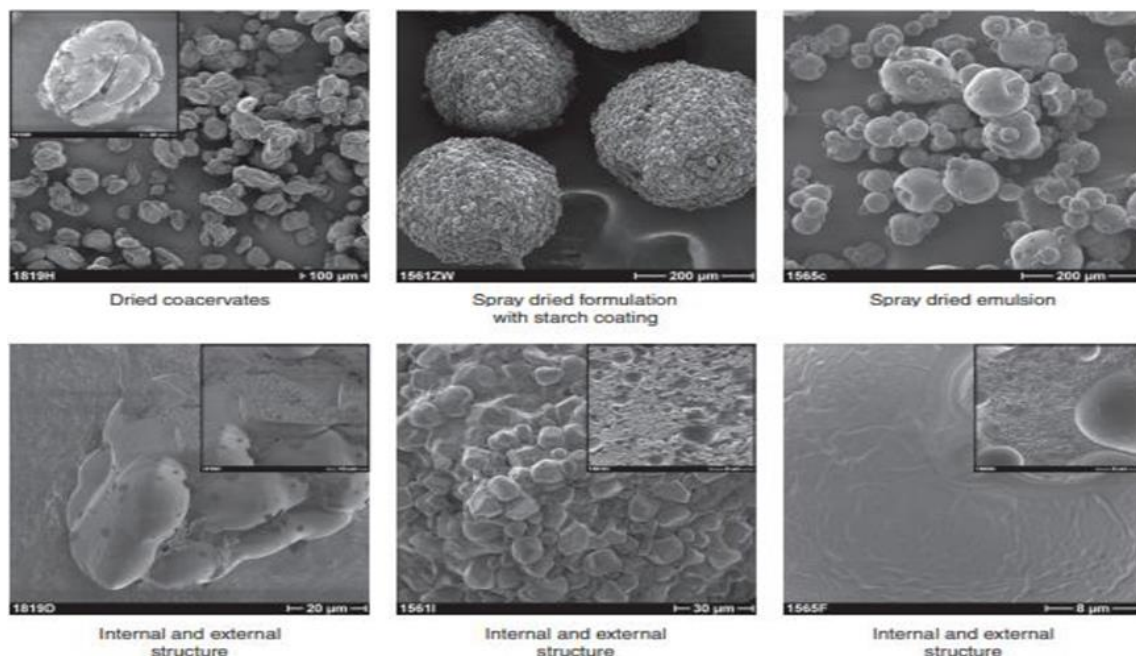
αυτού του συνόλου τεχνολογιών ενθουλάκωσης, που μέχρι σήμερα έχει στοχεύσει κυρίως τρόφιμα και - σε μικρότερο βαθμό - φαρμακευτικές εφαρμογές, είναι το χαμηλό κόστος, η βιοαποικοδομησιμότητα και η βιοσυμβατότητα των καψουλών, σε συνδυασμό με τη βιώσιμη προέλευσή τους (π.χ. αναλωμένη μαγιά προερχόμενη από ζυθοποίηση) (Coradello et al., 2021).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στις ζύμες, το κυτταρικό τοίχωμα αντιπροσωπεύει περίπου το 15-20% της ξηρής μάζας των κυττάρων. Το πάχος του είναι πολύ μεταβλητό (70–200 nm), καθώς μπορεί να αυξάνεται σε απόκριση στη συμπίεση ή στις οσμωτικές δυνάμεις. Δομικά, ωστόσο, είναι πάντοτε μια πολύ πολική διπλής στρώσης στοιβάδα (ένα είδος υδρογέλης). Το εσωτερικό του μέρος αποτελείται κυρίως από διακλαδισμένες β- (1,3) και β- (1,6) γλυκάνες (περίπου 50% του συνολικού τοιχώματος) που συνδέονται με υδρογόνο στο 3–4% της κυρίως κρυσταλλικής χιτίνης. Αυτό το εσωτερικό στρώμα είναι πιθανό να είναι ο κύριος συντελεστής στη συνολική μηχανική αντίσταση ολόκληρου του κυτταρικού τοιχώματος. Το εξωτερικό στρώμα αποτελείται κυρίως από μαννοπρωτεΐνες, οι οποίες είναι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες. Οι μαννοπρωτεΐνες είναι οι κύριοι συντελεστές των ιδιοτήτων της επιφάνειας του κυτταρικού τοιχώματος, για παράδειγμα, τα ανιονικά υπολείμματα φωσφορικού μαννοσυλίου καθορίζουν το φορτίο επιφάνειας του κυττάρου ζύμης και η μείωση του αριθμού τους καθορίζει μια αύξηση στην υδροφοβικότητά του. Επιπλέον, μέσω της ομοιοπολικής τους σύνδεσης με το στρώμα β-γλυκάνης, οι μαννοπρωτεΐνες συμβάλλουν στο εξωτερικό πορώδες του τοιχώματος, και πάνω απ' όλα στην προσκόληση της ζύμης, για παράδειγμα, οι προσκολλητές του *C. albicans* που επιτρέπουν τη δέσμευσή του με τα στοματικά επιθηλιακά κύτταρα είναι όλες οι μαννοπρωτεΐνες (Coradello et al., 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ενθυλάκωση σε κύτταρα ζύμης

5.1. Τεχνολογία χρήσης ζυμών για μικροενθυλάκωση

Οι κατασκευασμένες μικροκάψουλες μπορούν να έχουν διαφορετικές μορφολογίες, μέγεθος και αναλογία μεταξύ πυρήνα και υλικών επικάλυψης. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή μιας τεχνολογικής διαδικασίας για την επιτυχή παραγωγή των μικροκαψουλών και να επηρεάσουν τη σταθερότητα και τη συμπεριφορά απελευθέρωσης των συστημάτων παράδοσης. Υπάρχουν διάφοροι τύποι μικροκαψουλών: μορφή μήτρας, μορφή δεξαμενής, πολλαπλών πυρήνων και μερικά περίτεχνα όπως κάψουλες πολλαπλών τοιχωμάτων, οι οποίες κατασκευάζονται από μια ακολουθία διαδικασιών μικροενθυλάκωσης. (Ciamponi 2011)



Εικόνα 9: Δομή μικροενθυλακωμένου ελαίου που παράγεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές διαδικασίες μικροενθυλάκωσης - Adapted by Luz Sanguansri and Mary Ann Augustin 2010

Γενικά, υπάρχει ένα συγκεκριμένο μοτίβο που ακολουθείται από τους ερευνητές. Αρχικά, τα κύτταρα ζύμης καλλιεργούνται σε μέσο ζυμού για ένα εύλογο χρονικό διάστημα (π.χ. 10 ώρες), αναλόγως τις συνθήκες επώασης, τις αρχικές συγκεντρώσεις των κυττάρων κ.α. και αφήνονται για επώαση. Στην συνέχεια, τυπικά το μέσο φυγοκεντρείται και τα κύτταρα ζύμης απομονώνονται από ξένα σώματα (π.χ. μέσω εκπλύσεων). Έπειτα, τα τελικά κύτταρα μπορούν είτε να υποστούν πλασμόλυση (π.χ. μέσω προσθήκης 10-30% β/β NaCl), είτε όχι και μελετώνται για την ικανότητά τους ως φορείς μικροενθυλάκωσης.

Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε διάλυμα με την επιθυμητή ουσία και ακολουθεί η επιλεγμένη μέθοδος ως τεχνική δημιουργίας μικροκαψουλών, όπως μέσω φυγοκέντρησης για συγκεκριμένη ένταση και χρόνο (π.χ. 6000 rpm για 20 λεπτά). Τέλος, λαμβάνονται οι ζύμες που περιέχουν την επιθυμητή ουσία και έτσι αποκτάται η τελική μορφή της μικροκάψουλας (Salari et al., 2013).

5.2. Πλεονεκτήματα από τη χρήση κυττάρων ζύμης ως μέσο μικροενθυλάκωσης

5.2.1 Μηχανικά οφέλη

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερα μεγάλη προσοχή και ενδιαφέρον στη χρήση κυττάρων ζύμης ως φορέων διαφορετικών ενώσεων με διάφορες επιθυμητές ιδιότητες. Αυτό το ενδιαφέρον οφείλεται στο ευρύ φάσμα των προσφερόμενων πλεονεκτημάτων στη μικροενθυλάκωση, όπως η διαδικασία μικροενθυλάκωσης με χαμηλό κόστος σε μεγάλο όγκο παραγωγής, η ασφάλεια των κυττάρων ζύμης στην ανθρώπινη διατροφή και η γρήγορη και σχετικά εύκολη διάθεση στο εμπόριο από τους προμηθευτές. Επιπροσθέτως, τα μηχανικά χαρακτηριστικά της δομής των κυττάρων της ζύμης τα καθιστούν ιδανικά για τη συμπλήρωσή τους με διαφορετικά μόρια. Το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών χαρακτηρίζεται από αυξημένη αντοχή στις μηχανικές καταπονήσεις, γεγονός που οδηγεί στην πρόληψη της ρήξης των κυττάρων, όταν αυτά χρησιμοποιηθούν για υψηλά φορτία συμπλήρωσης των προς ενθυλάκωση συστατικών. Επιπλέον, η απλότητα των διαδικασιών είναι ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της ενθυλάκωσης σε κύτταρα ζύμης, ενώ την ίδια στιγμή οι διεργασίες δεν είναι δαπανηρές κι ούτε απαιτούν τοξικούς διαλύτες. Τέλος, τα μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά των εν λόγω κυττάρων ενισχύουν τη παρατεταμένη και ελεγχόμενη απελευθέρωση του δραστικού υλικού. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι τα νεκρά κύτταρα του *S.cerevisiae* εμφανίζουν διάφορες θετικές επιδράσεις χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες. Οι πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος ζύμης, ειδικά οι υδατοδιαλυτές β-1,3 και β-1,6 D-γλυκάνες, παρέχουν σημαντικές αντιβακτηριακές, θεραπευτικές, αντιοξειδωτικές, μη μεταλλαξιογόνες και μη τοξικές δράσεις (Moghadam et al., 2019)

Επίσης, οι Salari et al., (2013) μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της χρήσης του *S. cerevisiae* για την μικροενθυλάκωση μίας φαρμακευτικής ουσίας (Βερβερίνη). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι το *S. cerevisiae* θα μπορούσε να είναι ένας

αποτελεσματικός και ασφαλής φορέας για δραστικά υλικά όπως η βερβερίνη, με τα πλασμολυμένα και μη πλασμολυμένα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως μικροκάψουλες να συμπληρώνονται με βερβερίνη έως περίπου $40,2 \pm 0,2\%$ β / β (Salari et al., 2013).

5.2.2 Προστασία από υψηλές θερμοκρασίες

Η θερμική σταθερότητα των κυττάρων ζύμης είναι ένα πλεονέκτημα στη χρήση τους ως μικροκάψουλες. Αναφέρεται ότι τα κύτταρα παραμένουν σταθερά έπειτα από έκθεσή τους στους περίπου 265 °C, μετά από αυτό το σημείο το κυτταρικό τοίχωμα αρχίζει να αποσυντίθεται. Η θερμική σταθερότητα της ζύμης καθορίστηκε από τους Normand et al. (2005) οι οποίοι έδειξαν ότι στους μεταξύ 25 και 110 °C εμφανίζεται μια μικρή απώλεια μάζας. Στους 110–263 °C η μάζα παραμένει περίπου σταθερή ενώ η αύξηση των θερμοκρασιών γύρω στους 263–293 °C προκαλεί ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος. Τέλος, σε υψηλότερη θερμοκρασία (293–400 °C) τα ξηρά συστατικά των κυττάρων είναι ασταθή και στο τέλος (400 °C), τα δείγματα ουσιαστικά θα ανθρακωθούν (Moghadam et al., 2019). Έχει αναφερθεί ότι με εγκλεισμό αρωματικών ουσιών (flavors) σε κύτταρα ζυμομύκητα η κατακράτηση των ουσιών βελτιώθηκε σημαντικά, ενώ με προσθήκη νερού στις ξηρές μικροκάψουλες, η θερμική σταθερότητα αυτών μειώθηκε δραματικά. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να σχετίζεται με τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Υπό υγρές συνθήκες, οι β-γλυκάνες γίνονται μαλακές και διαλυτές δομές, από σκληρές υαλώδεις β-γλυκάνες και επομένως χάνουν την ικανότητά τους να ενεργούν ως υλικό τοιχώματος (Sultana et al., 2018).

5.3 Παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση ενθυλάκωσης σε ζύμες

5.3.1 Βιωσιμότητα κυττάρων ζύμης

Η βιωσιμότητα των κυττάρων ζύμης είναι ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας στην αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης. Τα μη βιώσιμα κύτταρα είναι πιο επιθυμητά για διεργασίες εγκλεισμού σε σχέση με τα βιώσιμα, λόγω της αποφυγής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά την εφαρμογή της μικροενθυλάκωσης. Επιπλέον, εφόσον η διαδικασία ενθυλάκωσης οφείλεται κυρίως στην παθητική διάχυση, και τελευταία σχετίζεται με την ενεργή μεταφορά, μέχρι στιγμής, η απώλεια της βιωσιμότητας δεν επηρεάζει την ικανότητα εγκλεισμού των κυττάρων ζύμης. Επίσης, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μικροενθυλάκωσης, η βιωσιμότητα των κυττάρων χάνεται, ενώ το

κυτταρικό τοίχωμα και η μεμβράνη παραμένουν ανέπαφα. Συνολικά, τα νεκρά κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά για εγκλεισμό βιοδραστικών ενώσεων. Αποδείχθηκε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή ενθυλάκωση, καθώς αναφέρεται ότι η χρήση νεκρών κυττάρων *C. curvatus* για ενθυλάκωση λαδιού για προστασία από την οξείδωση, δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από τη χρήση ζωντανών κυττάρων (Moghadam et al., 2019).

5.3.2 Διαλυτότητα βιοδραστικής ουσίας

Πέραν της βιωσιμότητας των κυττάρων για μία αποτελεσματική ενθυλάκωση, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και η διαλυτότητα της βιοδραστικής ουσίας που προρίζεται για ενθυλάκωση. Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι η διαλυτότητα, φάνηκε να επηρεάζει εντονότερα τη διέλευση της ουσίας εντός των κυττάρων ακόμα και από το ίδιο το μέγεθος των πόρων στις μεμβράνες των κυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και όταν οι πόροι του κυττάρου επεκτείνονται, η μοριακή ροή που διέρχεται από το κυτταρικό τοίχωμα δεν ενισχύεται σημαντικά. Επομένως, διαπιστώνεται ότι ο πιο σημαντικός λόγος για τη μοριακή διέλευση μέσω του κυτταρικού τοιχώματος είναι η διαλυτότητα του ενεργού συστατικού στους πόρους του κυτταρικού τοιχώματος και αυτό θα μπορούσε να είναι ανεξάρτητο από το μέγεθος των πόρων. Το κυτταρικό τοίχωμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι κατασκευασμένο από ένα πολύ πολικό δίκτυο γλυκανών, μαννοπρωτεϊνών και χιτίνης που αποτελούν μια υδρόφιλη πορώδης δομή. Καθώς το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένα εξαιρετικά υδρόφιλο δίκτυο, τα υδρόφιλα μόρια έχουν περισσότερες πιθανότητες να το περάσουν από τις υδρόφοβες ενώσεις. Υπάρχει μια υπόθεση ότι εάν το κυτταρικό τοίχωμα γίνει πιο υδρόφοβο, είναι καλύτερο για την ενθυλάκωση υδρόφοβων ενώσεων επειδή αυτά τα μόρια μπορούν να κολλήσουν στις λιποδιαλυτές περιοχές του κυτταρικού τοιχώματος για να μπουν μέσα λόγω της συγγένειάς τους με αυτές τις περιοχές (Pham-hoang et al., 2016).

5.3.3 Φάση ανάπτυξης της ζύμης

Έως τώρα, καθίσταται σαφές ότι η αποτελεσματικότητα και η απόδοση της μικροενθυλάκωσης είναι πολύπλευρη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Ένας εκ των σημαντικών παραγόντων φαίνεται να είναι η φάση ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης. Έχει αναφερθεί ότι η δομή των κυττάρων *S. cerevisiae* ποικίλλει σημαντικά κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Συγκεκριμένα, η αρχιτεκτονική, η σύνθεση και η διαπερατότητα

των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι γνωστό ότι εξαρτώνται από εξωτερικά ερεθίσματα και από την φάση ανάπτυξης του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, τα τοιχώματα κατά την λογαριθμική (εκθετική) φάση ανάπτυξης, είναι γνωστό ότι είναι πιο πορώδη και λιγότερο ανθεκτικά στην ενζυματική αποδόμηση από αυτά των κυττάρων στη στάσιμη φάση. Παρ'όλα αυτά, φαίνεται ότι οι μορφολογικές διαφορές στα κύτταρα ανάλογα με την φάση ανάπτυξής τους, εμφάνισαν αμελητέα διαφορετική φόρτιση. (Ciamponi et al., 2012)

5.3.4 Θερμοκρασία ενθυλάκωσης

Ομοίως, η διαπερατότητα των κυττάρων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της μικροενθυλάκωσης. Μελέτες αναφέρουν, ότι θερμοκρασίες μεταξύ 35 °C και 45 °C ήταν κρίσιμες για την επιτυχή "παγίδευση". Πάνω από τους 35 °C τα φωσφολιπίδια της εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης είναι περισσότερο ρευστά, συνεπώς η διείσδυση των μορίων στο πλάσμα αυξάνεται, ενώ κάτω από τους 35°C τα λιπίδια βρίσκονται κυρίως σε πιο πηκτή κατάσταση, η οποία περιορίζει την είσοδο των συστατικών. Άλλες μελέτες έχουν επίσης επισημάνει την επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση ενθυλάκωσης υδρόφοβων μορίων, υποδεικνύοντας ότι η απόδοση της ενθυλάκωσης ελαίου φλούδας πορτοκαλιού σε κύτταρο ζύμης αυξήθηκε όταν η θερμοκρασία ήταν μεταξύ 40°C και 50°C. Αξιοσημείωτο επίσης, αφορά έρευνα η οποία αναφέρει ότι ο ρυθμός εγκλεισμού λιμονένιου σε θερμοκρασία επώασης 40°C, ήταν σχεδόν διπλάσιος από ότι στους 20°C και 30°C. Ωστόσο, η θέρμανση περισσότερο από τις βέλτιστες θερμοκρασίες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης. Για παράδειγμα, οι Sangwai και Vania παρατήρησαν τη μείωση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης σε υψηλότερες από τις βέλτιστες θερμοκρασίες και πρότειναν ότι η εξάτμιση του διαλύτη λειτούργησε ως αιτία αυτού του αποτελέσματος. Ο άλλος πιθανός λόγος για τη μείωση της αποτελεσματικότητας σε υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να έγκειται στη θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες) και των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης. Οι Sultana et al. (2018) έδειξε επίσης ότι για τη σκόνη ζύμης, ο ρυθμός απελευθέρωσης, ο οποίος εξετάζεται στην επόμενη ενότητα, ήταν ταχύτερος σε υψηλότερη θερμοκρασία σε σύγκριση με χαμηλότερη θερμοκρασία. Το προφίλ απελευθέρωσης για τη μαγιά εξαρτάται πλήρως από τη θερμοκρασία (υγρή θέρμανση). Οι γεύσεις απελευθερώθηκαν σε δύο βήματα. Το πρώτο βήμα ήταν μια πολύ

γρήγορη απελευθέρωση, ενώ το δεύτερο βήμα ήταν μια πολύ αργή απελευθέρωση γεύσης (Moghadam et al., 2019).

5.4. Εφαρμογές βιοδραστικών συστατικών μικροενθυλακωμένων σε κύτταρα ζύμης
Το ευρωπαϊκό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας 0242 135 στην AD2 Ltd είναι πιθανώς η πρώτη τεκμηριωμένη εφαρμογή της ζύμης αρτοποιίας ως ενιαίου οργανισμού για μικροενθυλάκωση σε υδρόφοβες δραστικές ουσίες χωρίς αλλοιώσεις κυττάρων. Οι εφαρμογές αυτής της καινοτομίας περιλάμβαναν μεταξύ άλλων αρωματικές ενώσεις και προϊόντα για κτηνιατρικές χρήσεις. Στη συνέχεια, το 1993 οι Procter and Gamble υπέβαλαν δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για εφαρμογές μικροεγκλεισμού ζύμης σχετικά με ενεργοποιητές λευκαντικών για καθαριστικά υλικά. Ενώ το 1998 το έργο των Bishop και των συνεργατών του έδειξε τότε τη χρησιμότητα της ζύμης αρτοποιίας ως βιολογικών μικροκαψουλών για την ενσωμάτωση υψηλών συγκεντρώσεων διαφορετικών αιθέριων ελαίων, τα οποία φαίνεται να συσσωρεύονται σε μεγάλα λιπαρά οργανίδια εντός των κυττάρων ζύμης. Στη συνέχεια, οι Nelson et al. (2006) περιέγραψαν την εφαρμογή μικροενθυλάκωσης σε κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα για μια ποικιλία δραστικών ουσιών, όπως ανθεκτικά αρώματα, μαλακτικά δέρματος, βιταμίνες, αντιμικροβιακά, αντιβιοτικά, ορμόνες και φάρμακα. Επιπλέον, έχει αναφερθεί μια μικροενθυλάκωση βασισμένη σε κύτταρα ζυμομυκήτων του χλωρογενικού οξέως ως υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Πιο πρόσφατα, έχει περιγραφεί η ενθυλάκωση της κουρκουμίνης μέσα στα κύτταρα ζύμης. (Ciamponi 2011)

Μέχρι σήμερα έχει πραγματοποιηθεί διαδικασία ενθυλάκωσης εντός κυττάρων ζύμης για διάφορες ενώσεις με διαφορετικές ιδιότητες. Στην πραγματικότητα, αυτή η διαδικασία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για εγκλεισμό φυσικών ενώσεων. Επιπλέον, η ζύμη αρτοποιίας (*Saccharomyces cerevisiae*) έχει αναδειχθεί ως ένας βολικός ξενιστής για την ανάπτυξη ενός νέου είδους συστήματος παράδοσης φαρμακευτικών ουσιών. Αιθέρια έλαια, όπως της φλούδας πορτοκαλιού και το έλαιο μέντας, ένζυμα, αρώματα και τερπένια (λιμονένιο, καρβόνη κα), φαινολικές ενώσεις που περιλαμβάνουν χλωρογενικό οξύ, ρεσβερατρόλη, κουρκουμίνη, φεσετίνη και καρβακρόλη, μόρια φαρμάκων (φαινοφιμπράτη, νιτρική εκναζόλη κα), νανοσωματίδια, λιπαρά οξέα, συμπεριλαμβανομένων πολυακόρεστων τριακυλογλυκερολών, ιχθυέλαιο όπως ιχθυέλαιο menhaden, προβιοτικά (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) και βιταμίνες

όπως η χοληκαλσιφερόλη έχουν παγιδευτεί με επιτυχία σε κύτταρα ζύμης. Όλες αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η ενθυλάκωση αυτών των ουσιών σε κύτταρα ζύμης πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ενθυλάκωση ζωντανών μικροοργανισμών σε κύτταρα ζυμομύκητα προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως καλύτερη προστασία και ενίσχυση της σταθερότητάς τους. Τα τοιχώματα των κυττάρων ζύμης ενεργούν ως προστατευτικό στρώμα και οδηγούν στην ελαχιστοποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των προβιοτικών και του γαστρικού υγρού, και ως εκ τούτου αυξάνουν την επιβίωση των βακτηρίων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συνθήκες pH. Σε άλλες μελέτες αποδείχθηκε η θετική επίδραση των κυτταρικών τοιχωμάτων *S. cerevisiae* ως προστατευτικό στρώμα όπου κύτταρα *Lactobacillus acidophilus* διατηρήθηκαν καλύτερα έναντι του γαστρικού υγρού σε σύγκριση με ελεύθερα βακτήρια. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε εύκολα να εξηγηθεί λόγω της καθυστέρησης της διείσδυσης υγρού από το γαστρικό υγρό μέσα στις κάψουλες. Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ότι κύτταρα *Bacillus bifidum*, επικαλυμμένα και μη επικαλυμμένα με ένωση κυτταρικού τοιχώματος *S. cerevisiae*, δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στη λογαριθμική μείωση του βακτηριακού τους αριθμού, καθώς το επιπλέον στρώμα επικάλυψης της ένωσης κυτταρικού τοιχώματος *S. cerevisiae* δεν μπόρεσε να μειώσει τον ρυθμό μείωσης του πληθυσμού του ενθυλακωμένου *B. bifidum* σε pH 1,55. Αν και αυτό μπορεί να οφείλεται σε χαμηλή αντίσταση αυτού του βακτηριακού στελέχους σε χαμηλές τιμές pH ([Moghadam et al., 2019](#)).

Βιβλιογραφία

Amin T., Thakur M., Jain S. (2013). *MICROENCAPSULATION-THE FUTURE OF PROBIOTIC CULTURES*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, International peer-reviewed scientific online journal..

Ayoub A., Sood M., Singh J., Bandral J. (n.d.). *Microencapsulation and its applications in food industry*.

Begum Y. , Chandra Deka S. (2017). *Stability of Spray Dried Microencapsulated Anthocyanins Extracted from Culinary Banana Bract*. International Journal of Food Properties 20(12).

Bishop, J.R.P., Nelson, G. and Lamb, J. (1998). Microencapsulation in yeast cells. *Journal of Microencapsulation*, 15(6), pp.761–773.

Campos D., Acevedo F., Morales E., Aravena J., Amiard V., Jorquera M., Inostroza N., Rubilar M., D.C. (2014). Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, [online] 30(9), pp.2371–2378. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24806812/> [Accessed 28 Aug. 2021].

Chang Chang, K.Stone and Nickerson M. (2019). Microencapsulated Food Ingredients. *www.sciencedirect.com*, [online] pp.446–450. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965217757> [Accessed 28 Aug. 2021]. Encyclopedia of Food Chemistry.

Ciamponi, F. (2011). *Characterisation of microencapsulation process in Saccharomyces cerevisiae*. [online] [Thesis]. Manchester, UK: The University of Manchester; 2011. Available at: <https://www.escholar.manchester.ac.uk/uk-ac-man-scw:130902> [Accessed 28 Aug. 2021].

Ciamponi, F., Duckham, C. and Tirelli, N. (2012). Yeast cells as microcapsules. Analytical tools and process variables in the encapsulation of hydrophobes in *S. cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [online] 95(6), pp.1445–1456. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22581037/>.

Coradello, G. and Tirelli, N. (2021). Yeast Cells in Microencapsulation. General Features and Controlling Factors of the Encapsulation Process. *Molecules (Basel, Switzerland)*,

[online] 26(11). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34073703/> [Accessed 28 Aug. 2021].

de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. and Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), pp.292–302.

Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., Jena, B.S. and Anandharamakrishnan, C. (2013). Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.513–520.

Garti and McClements (2012). *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals* / ScienceDirect. [online] . Available at: A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.

Goh, C.H., Heng, P.W.S. and Chan, L.W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), pp.1–12.

González-Royo, E., Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Fort, F., Canals, J.M. and Zamora, F. (2016). The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the colour, phenolic compounds, polysaccharides and astringency of a model wine solution and red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), pp.172–181.

Harris, K. (2018). *The Rise of Yeast*. [online] . Available at: <https://insanitek.net/the-rise-of-yeast/> [Accessed 28 Aug. 2021].

Hassan, M.M., Milla, J., Rupnow, T., Al-Ansari, M. and Daly, W.H. (2016). Microencapsulation of Calcium Nitrate for Concrete Applications. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, 2577(1), pp.8–16.

Heidebach T., Forst P., Kulozik U., T. (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), pp.291–311.

Krasaekoopt W., Watcharapoka S., (2014). *Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice*. *LWT- Food Science and Technology* 57(2):761–766 DOI:10.1016/j.lwt.2014.01.037.

Munin, A. and Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, [online] 3(4), pp.793–829. Available at: <https://www.mdpi.com/1999-4923/3/4/793> [Accessed 23 Apr. 2021].

Nakhaee Moghadam, M., Khameneh, B. and Fazly Bazzaz, B.S. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* as an Efficient Carrier for Delivery of Bioactives: a Review. *Food Biophysics*, 14(3), pp.346–353.

Nelson G., Duckham C., Crothers M (2006). *Microencapsulation in Yeast Cells and Applications in Drug Delivery*. ACS Symposium Series 923:268-281 DOI:10.1021/bk-2006-0923.ch019 In book: *Polymeric Drug Delivery I* (pp.268-281).

Normand V., Dardelle G., Steenhoudt M., Bouquerand P. (2007). *Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system*. *Food Hydrocolloids* 21(5):953-960 DOI:10.1016/j.foodhyd.2006.12.013.

Oxley J. (2014). *Overview of Microencapsulation Process Technologies*. *Microencapsulation in the Food Industry* (pp.35-46).

Paciello Lucia (2021). *Production of heterologous proteins by engineered yeast cells*.

Paramera E. (2014). *Yeast Cells and Yeast-Based Materials for Microencapsulation*. *Microencapsulation in the Food Industry* (pp.267-281).

Perignon, C., Ongmayeb, G., Neufeld, R., Frere, Y. and Poncelet, D. (2015). Microencapsulation by interfacial polymerisation: membrane formation and structure. *Journal of Microencapsulation*, [online] 32(1), pp.1–15. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25265057/> [Accessed 28 Aug. 2021].

Perricone M. (2017). *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*.

Pham-hoang B., Voilley A., Waché Y. (2016). Molecule structural factors influencing the loading of flavoring compounds in a natural-preformed capsule: Yeast cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, [online] 148, pp.220–228. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776516306221> [Accessed 28 Aug. 2021].

Pudziuelyte, L., Marksa, M., Sosnowska, K., Winnicka, K., Morkuniene, R. and Bernatoniene, J. (2020). Freeze-Drying Technique for Microencapsulation of *Elsholtzia ciliata* Ethanolic Extract Using Different Coating Materials. *Molecules*, [online] 25(9), p.2237. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/9/2237> [Accessed 28 Aug. 2021].

Ricardo, F., Pradilla, D., Luiz, R. and Alvarez Solano, O.A. (2021). A Multi-Scale Approach to Microencapsulation by Interfacial Polymerization. *Polymers*, [online] 13(4). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33671501/> [Accessed 28 Aug. 2021].

Rodrigues B., Olivo P., Osmari M., Vasconcellos R., Ribeiro L., Bankuti F., Pozza M., B.M. (2020). Microencapsulation of Probiotic Strains by Lyophilization Is Efficient in Maintaining the Viability of Microorganisms and Modulation of Fecal Microbiota in Cats. *International Journal of Microbiology*, [online] 2020, p.1293481. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32802066/> [Accessed 28 Aug. 2021].

Sagis L. (2015). *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* / *ScienceDirect*. [online] www.sciencedirect.com. Available at: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128003503/microencapsulation-and-microspheres-for-food-applications> [Accessed 28 Aug. 2021].

Salari, R., Bazzaz, B.S.F., Rajabi, O. and Khashyarmanesh, Z. (2013). New aspects of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel carrier for berberine. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1).

Sarao, L.K. and Arora, M. (2015). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), pp.344–371.

Singh, M.N., Hemant, K.S.Y., Ram, M. and Shivakumar, H.G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, [online] 5(2), pp.65–77. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21589795/> [Accessed 28 Aug. 2021].

Sobel R. (2014). *Microencapsulation in the Food Industry* / *ScienceDirect*. [online] www.sciencedirect.com. Available at: [Accessed 28 Aug. 2021].

Speers, R.A. and Forbes, J. (2015). Brewing microbiology: design and technology applications for spoilage management, sensory quality and waste valorization. Annie Hill, Ed. Woodhead Pub. Ltd. Cambridge, UK, 10 pp.: Yeast: an overview. *Brewing microbiology: design and technology applications for spoilage management, sensory quality and waste valorization.*, [online] pp.1–10. Available at: <https://researchportal.hw.ac.uk/en/publications/brewing-microbiology-design-and-technology-applications-for-spoil> [Accessed 28 Aug. 2021].

Sultana A., Tanaka Y., Fushimi Y., Yoshii H. (2018). *Stability and release behavior of encapsulated flavor from spray-dried Saccharomyces cerevisiae and maltodextrin powder*. Food Research International 106 DOI:10.1016/j.foodres.2018.01.059.

Versic R., Sobel R. and Gaonkar A. (2013). *Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods*. Microencapsulation in the Food Industry (pp.3-12).

Walker, G.M. (2009). *Yeasts*. [online] . Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739445003357>.

Ying, D.Y., Phoon, M.C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I. and Augustin, M.A. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, [online] 75(9), pp.E588-595. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21535593/>