

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

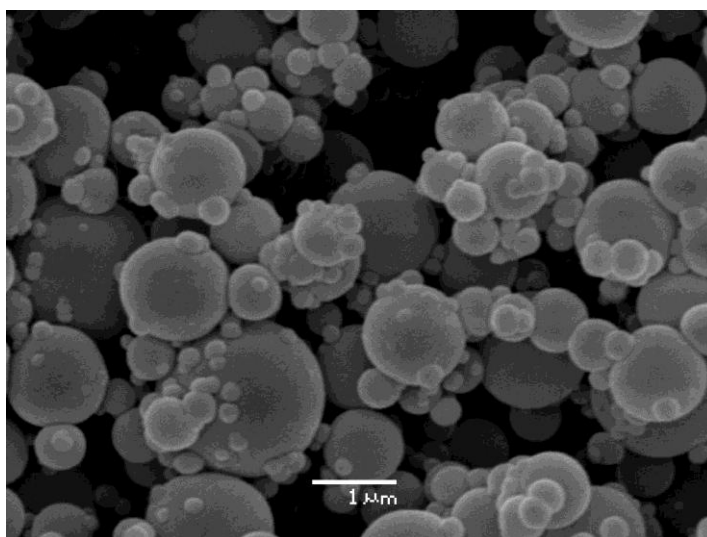


ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ &
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Κατεύθυνση: Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων



Νανοσωματίδια με την τεχνολογία ηλεκτροψεκασμού ως φορείς
για την ενθυλάκωση κατεχινών

Ευγενία Α. Καναβού

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαντάλα Ι

Αθήνα, 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

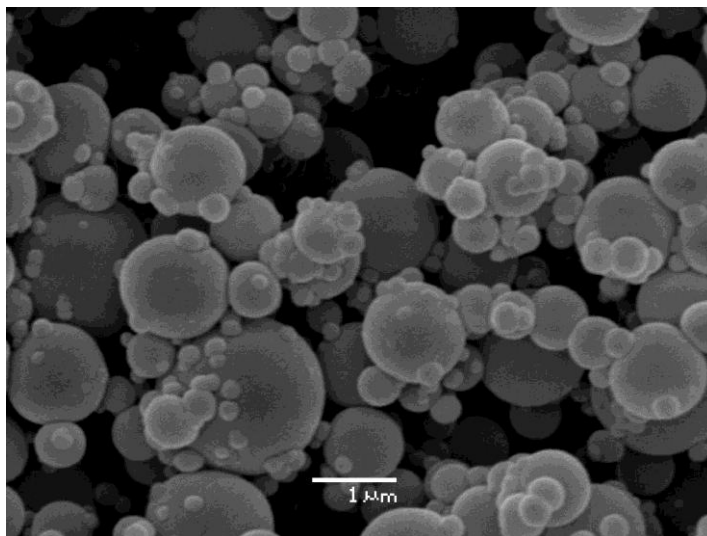


ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ &
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Κατεύθυνση: Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων



«Νανοδομάτια με την τεχνολογία ηλεκτροψεκασμού ως φορείς
για την ενθυλάκωση κατεχινών»

Ευγενία Α. Καναβού

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαντάλα Ι

Αθήνα, 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Νανοδοματίδια με την τεχνολογία ηλεκτροψεκασμού ως φορείς
για την ενθυλάκωση κατεχινών»**

Ευγενία.Α.Καναβού

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μαντάλα Ιωάννα

Τριμελής Επιτροπή

Μαντάλα Ιωάννα

Ευαγγελίου Βασιλική

Κουτίνας Απόστολος

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παρασκευή νανοσωματιδίων από μείγματα πρωτεϊνών και πολυσακχαρίτη με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού και η ενθυλάκωση βιοενεργών συστατικών σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα για να παρασκευαστούν τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε υπερσυμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού σε συγκέντρωση 97% σε πρωτεΐνες (WPI) και ο πολυσακχαρίτης βακτηριακή κυτταρίνη (BC). Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν με τα βιοπολυμερή σε συγκεντρώσεις (1-16% κβ) BC (10-30% κβ) WPI και 5%κβ Tween 20 για όλα τα δείγματα. Η επιφανειακή τάση των διαλυμάτων αυξανόταν όσο αυξανόταν και η συγκέντρωση της BC χωρίς η συγκέντρωση της WPI να επηρεάζει το αποτέλεσμα. Αντίθετα, η προσθήκη της BC επηρέασε το ζ-δυναμικό των διαλυμάτων, το οποίο όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της, μειωνόταν.

Το ιζώδες και το επιφανειακό ιζώδες των διαλυμάτων αυξανόταν επίσης με την αύξηση της BC. Η μελέτη των επιφανειακών ιδιοτήτων των διαλυμάτων βοήθησε στην πρόβλεψη του σχηματισμού ομοιογενών σωματιδίων. Τα σωματίδια που παρασκευάστηκαν μελετήθηκαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) και είχαν σφαιρική δομή με τη διάμετρό τους να είναι σε κλίμακα νανομέτρων από 120 έως 380 nm.

Επιλέχθηκε το βέλτιστο δείγμα για την ενθυλάκωση της κατεχίνης μέσω της μελέτης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, της επιφανειακής τάσης και του ζ-δυναμικού των διαλυμάτων αλλά και της μικροδομής των νανοσωματιδίων. Έτσι με την ίδια μέθοδο παρασκευάστηκε το δείγμα με τα βιοπολυμερή σε συγκεντρώσεις 8%κβ BC, 20%κβ WPI και 5%κβ Tween 20 και προστέθηκε σε αυτό η EGCG. Δημιουργήθηκαν δείγματα με 0,1 και 0,2 mg EGCG/ml διαλύματος.

Στη συνέχεια η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού έλαβε ξανά χώρα με την προσθήκη της EGCG όπου ο ρυθμός ροής του διαλύματος στο σύστημα του ηλεκτροψεκασμού ήταν 42 ± 3 $\mu\text{L/h}$ και το ηλεκτρικό πεδίο ήταν ρυθμισμένο στα $19,4 \pm 2$ kV.

Η απόσταση του ακροφύσιου από τον συλλέκτη ήταν στα 13 cm και η διαδικασία έγινε σε συνθήκες περιβάλλοντος. Στα δείγματα που παράχθηκαν έγιναν μελέτες ως προς το μέγεθος των σωματιδίων με το ζ-sizer και ως προς το ποσοστό ενσωμάτωσης της EGCG σε αυτά με το φωτόμετρο. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές συνθήκες pH, υγρασίας και θερμοκρασίας και έγιναν μετρήσεις στο μέγεθος των νανοσωματιδίων και στην απελευθέρωση της EGCG σε διάφορους χρόνους αποθήκευσης μέχρι το πέρας της 45^{ης} ημέρας.

Την πρώτη μέρα της παρασκευής των νανοσωματιδίων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μέγεθος τους αυξήθηκε λόγω της παρουσίας της EGCG σε αυτά. Το ποσοστό ενσωμάτωσης της EGCG ήταν στο 51% για το δείγμα 0,01% κβ EGCG και στο 30% για το δείγμα 0,02 % κβ EGCG.

Στις μετρήσεις που έγιναν για τα νανοσωματίδια τα οποία είχαν αποθηκευτεί σε ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικά pH αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η αύξηση του μεγέθους τους στο όξινο pH με τιμή 3 σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα νανοσωματίδια που αποθηκεύτηκαν στα διαλύματα με pH 6 και 9. Τα ποσοστά της εναπομένουσας EGCG ήταν μικρότερα στο όξινο pH. Το φαινόμενο αυτό ίσως να οφείλεται στη συμπεριφορά του μείγματος της WPI με τη BC στις διάφορες τιμές pH. Οι μετρήσεις που έγιναν στην περίπτωση που τα νανοσωματίδια παρέμειναν αποθηκευμένα σε διάφορες τιμές υγρασίας (20%, 40%, 60% και 80%) έδειξαν να υπήρχαν αλλαγές στο μέγεθος τους αλλά και στα ποσοστά απελευθέρωσης του βιοενεργού συστατικού. Η αύξηση της διαλυτότητας της BC κατά την παραμονή της σε υδατικά διαλύματα προκάλεσε και την αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων όσο αυξανόταν και το ποσοστό της υγρασίας του περιβάλλοντος όπου ήταν αποθηκευμένα τα νανοσωματίδια. Όσο αυξανόταν επίσης η υγρασία μειωνόταν και το ποσοστό παραμονής της ενθυλακωμένης EGCG επιβεβαιώνοντας έτσι και την αύξηση διαλυτότητας του συστήματος σε αυξημένα ποσοστά υγρασίας. Στις αντίστοιχες μετρήσεις που έγιναν για τις αλλαγές στο μέγεθος των νανοσωματιδίων κατά την παραμονή τους σε διάφορες θερμοκρασίες παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες αλλαγές.

Η διάμετρος των νανοσωματιδίων αυξανόταν όσο αυξανόταν και η θερμοκρασία του νερού στο οποίο διαλύθηκαν. Επίσης τα ποσοστά της απομένουσας EGCG στα νανοσωματίδια ήταν πολύ μικρά και η EGCG απελευθερώθηκε γρήγορα σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Τα αποτελέσματα αυτά αποδίδονται στο γεγονός ότι η EGCG αλλά και η WPI είναι θερμικά ευαίσθητες και κατά την έκθεσή τους σε μεγάλες θερμοκρασίες κατακρημνίζονται.

Λέξεις κλειδιά: Πρωτεΐνες, Κατεχίνες, Ενθυλάκωση, Ηλεκτροψεκασμός

Abstract

The main purpose of this research was the production of nanoparticles from protein and polysaccharide solutions, through the electro spinning process as well as the encapsulation of the bioactive ingredients stored in them. More specifically, in order to produce these samples, Whey Protein Isolate (WPI) was used as well as Bacterial Cellulose Polysaccharide (BC). The produced solutions with the biopolymers were in concentrations as (1-16% wt) BC, (10-30% wt) WPI and 5% wt Tween20 for all these samples. The surface tension of the solutions increased when the BC concentration increased too, without the WPI concentration affecting the result. BC addition affected the z-force of the solutions, which was increasing when the BC concentration was decreasing.

At first, several samples were produced containing different concentrations of the two biopolymers, WPI and BC. The characteristics that were examined were the viscosity, the interfacial viscosity, electrical conductivity, surface tension and the ζ -potential. The BC addition affected the ζ -potential of the solutions, which decreased when the BC concentration increased. The viscosity and the interfacial viscosity of the solutions also increased with the BC addition. It took an extended research on the surface characteristics of these solutions that helped to predict the homogeneous particle shaping. The produced particles were deliberated with the Scanning Electron Microscope (SEM), and in all cases seemed to have a spherical shape and their diameter being up to 120-380nm of the nanometer scale. After being successfully produced the optimum sample was chosen for the encapsulation of the catechine. The same procedure was followed to produce the biopolymer sample, having concentrations up to 8%wt BC, 20%wt WPI and 5%wt Tween20 in which Epigallocatechin Gallate (EGCG) was added. Samples were created with 0.1 and 0.2 mg EGCG/ml of solutions. Moreover, the electrospinning process was verified with the addition of EGCG, and the flow rate of the solution in the electro spinning process was 42 ± 3 mL/h and the electric field was regulated at 19.4 ± 2 KV. The nozzle's distance from the collector was 13cm and the process took place in ambient conditions.

The produced samples were checked for their particles' size, using the z-sizer, and the EGCG concentrate percentage using the spectrophotometer. All of the samples were afterwards stored in different pH conditions, humidity and temperature, and then measurements done for checking the size of the nanoparticles as well as the EGCG release, in different storage time till 45 days. After the first day of producing nanoparticles, results showed that their size had increased due to the EGCG presence. The concentration percentage of the EGCG in these samples was up to 51% in the sample 0.01 wt EGCG, and up to 30% in the sample 0.02 wt EGCG.

According to the measurements performed in the nanoparticles which were stored in buffer solutions with different pH, an increase in their size as observed in the acid pH in a higher percentage than the nanoparticles stored in solutions with a higher pH 6 and 9. The remaining percentage of the EGCG concentration was smaller in the acid pH and as these values increased the percentage increased as well. This phenomenon might be a result of the WPI mixture's conduction with the BC through the different pH values. The performed calculations that took place in case the nanoparticles remained stored in different values of humidity (20%, 40%, 60% and 80%) showed that they were different according to their size and also in the release percentage of the bioactive component. The increase of the BC solubility during its storage in aqueous solutions caused the increase of the nanoparticles' size as the moisture increased as well. Furthermore, as relative humidity increased, the percentage of the encapsulated EGCG's residence decreased, proving the increase of the system's solubility in high humidity percentages. In relevant measurements performed for the nanoparticles' size change, during their storage in different temperature conditions bigger differences were spotted.

The diameter of the nanoparticles increased as the water temperature they dissolved in, increased as well. Also the remaining of the EGCG percentage in the nanoparticles, was really low and EGCG was released fast in a very high percentage. These results are due to the fact that EGCG and WPI are heat-sensitive and by exposing them in high temperatures they collapse.

Key Words: Proteins, Catechins, Encapsulation, Electrospraying

*Κι αν πτωχική τη βρείς,
η Ιθάκη δε σε γέλασε.
Έτσι σοφός που έγινες,
με τόση πείρα,
ήδη θα το κατάλαβες η Ιθάκης τι σημαίνουν
Κ.Καβάφης
«Ιθάκη»*

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης έγινε στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της κυρίας Ιωάννας Μαντάλα.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Ιωάννα Μαντάλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να εκπονηθεί η έρευνα αυτή και για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση που μου έδωσε.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Ευη Παξιμάδά, η οποία με τις γνώσεις της και την επιμονή της με βοήθησε πάρα πολύ στη διεκπεραίωση της μελέτης και στην επίλυση των προβλημάτων που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια αυτής. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας καθώς και την κυρία Βασιλική Ευαγγελίου και τον κύριο Απόστολο Κουτίνα για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος θέλω να δώσω ένα μεγάλο ευχαριστώ τους γονείς μου και την αδερφή μου, όπου με την υποστήριξη, την κατανόηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, κατάφερα να πραγματοποιήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές αλλά και τα όνειρά μου. Επίσης οφείλω ένα ευχαριστώ στους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την αγάπη που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια.

Ευγενία Α. Καναβαί, Ιούλιος 2016

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract.....	5
1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Αντιοξειδωτικά.....	12
1.1.1 Κατεχίνες	14
1.1.2 EGCG.....	15
1.1.3 Πρωτεΐνες και αντιοξειδωτικά	16
1.2 Ενθυλάκωση βιοενεργών συστατικών.....	18
1.3 Ηλεκτρονηματοποίηση	19
1.3.1 Αρχές λειτουργίας.....	20
1.4 Βακτηριακή Κυτταρίνη	23
1.5 Πρωτεΐνες γάλακτος.....	25
1.5.1 Πρωτεΐνες ορού.....	25
1.5.2 Συμπυκνώματα και υπερσυμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού	26
1.6 Αρχές λειτουργίας.....	28
1.6.1 Επιφανειακή τάση.....	28
1.6.2 Ηλεκτρική αγωγιμότητα	29
1.6.3 Ρεολογία.....	30
1.6.4 Ρευστά ανάλογα με την ιξώδη συμπεριφορά.....	31
1.6.5 Περιστροφική ιξωδομετρία.....	32
1.6.5 Επιφανειακή ρεολογία	33
1.6.5 ζ-δυναμικό.....	34
1.6.6 SEM.....	35
1.7 Σκοπός της μελέτης.....	39
2.Υλικά και μέθοδοι.....	40
2.1 Υλικά	40
2.2 Όργανα	40
2.3 Μέθοδοι.....	41
2.3.1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	41
<i>Επεξεργασία βακτηριακής κυτταρίνης.....</i>	<i>41</i>
<i>Όξινη υδρόλυση.....</i>	<i>42</i>
2.3.2 Παρασκευή διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης	42
2.4 1^ο Πειραματικό στάδιο.....	43

2.4.1 Παρασκευή διαλυμάτων πρωτεΐνης με βακτηριακή κυτταρίνη	43
2.4.2 Μέτρηση Ηλεκτρικής αγωγιμότητας	44
2.4.3 Μέτρηση Επιφανειακής τάσης	44
2.4.4 Ρεολογικές μετρήσεις.....	45
2.4.5 Ηλεκτρονηματοποίηση	46
2.4.6 Μέτρηση ζ-δυναμικού.....	47
2.4.7 Μικροδομή και μέγεθος σωματιδίων.....	48
2.4.8 Στατιστική ανάλυση.....	48
2.5 2^ο Πειραματικό στάδιο.....	49
2.5.1 Ενσωμάτωση EGCG	49
2.5.2 Φωτόμετρο	51
3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	52
3.1 Διαδικασία ηλεκτροψεκασμού.....	52
3.2 Ιδιότητες παραγόμενων σωματιδίων.....	53
3.2.1 Μικροδομή σωματιδίων.....	53
3.3 Ιδιότητες διαλυμάτων	57
3.3.1 Ηλεκτρική αγωγιμότητα	57
3.3.2 Επιφανειακή τάση.....	58
3.3.3 ζ-δυναμικό.....	60
3.3.4 Ρεολογικές ιδιότητες διαλυμάτων.....	61
<i>Ιζώδες διαλύματος.....</i>	<i>62</i>
<i>Επιφανειακό ιζώδες διαλυμάτων.....</i>	<i>64</i>
3.4 Επιλογή κατάλληλου δείγματος.....	70
3.5 Ενσωμάτωση EGCG.....	70
3.6 Μικροδομή σωματιδίων με EGCG	71
3.7 Απόδοση ενσωμάτωσης της EGCG στα διαλύματα WPI-BC	72
3.9.1 pH.....	75
3.9.2 Σχετική Υγρασία περιβάλλοντος	79
3.9.3 Θερμοκρασία	81
3.10 Συμπεράσματα.....	84
3.11 Μελλοντική έρευνα	87
4 Βιβλιογραφικές αναφορές.....	88

5. Παράρτημα	97
5.Ευρετήριο γραφημάτων	109
6.Ευρετήριο εικόνων και πινάκων.....	110

1. Εισαγωγή

1.1 Αντιοξειδωτικά

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι ένα σοβαρό πρόβλημα στα τρόφιμα λόγω του ότι μπορεί να παράγει ταγγείς οσμές και γεύσεις, μειώνει το χρόνο ζωής, αλλάζει την υφή και το χρώμα καθώς και μειώνει τη διατροφική αξία τους (Alamed et al, 2009). Για παράδειγμα η οξείδωση των λιπιδίων έχει βρεθεί πως παίζει μεγάλο ρόλο στην αλλοίωση της ποιότητας στα επεξεργασμένα τρόφιμα που περιέχουν κρέας. Διαδικασίες όπως η άλεση διαταράσσουν την ακεραιότητα των κυττάρων των μυϊκών ιστών και έτσι τα λιπίδια εκτίθενται στο οξυγόνο και σε διάφορους άλλους παράγοντες οξείδωσης (Erikson et al, 2002). Η θερμική επεξεργασία προκαλεί ακόμα πιο γρήγορα την οξείδωση των λιπιδίων αυτών των τροφίμων μέσω της χήλωσης του σιδήρου από την αίμη που υπάρχει στις πρωτεΐνες, διαταράσσουν την κυτταρική ακεραιότητα, απενεργοποιούν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά και καταρρίπτουν τα ενδογενή υπεροξειδία (Erikson et al, 2002). Τα γαλακτώματα είναι ένα άλλο παράδειγμα τροφίμου που μπορεί γρήγορα να υποβιβαστεί από τις αντιδράσεις οξείδωσης.

Η χημεία της οξείδωσης σε γαλακτώματα τύπου νερό σε έλαιο, εξαρτάται κατά πολύ από τη μεμβράνη διεπιφάνειας των σωματιδίων του γαλακτώματος, αφού εκεί τα προοξειδωτικά όπως ο σίδηρος μπορούν να αντιδράσουν με τα επιφανειενεργά υπεροξειδία των λιπιδίων (McClements, 2000).

Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι ώστε να ελεγχθεί ο ρυθμός και να η έκταση της οξείδωσης στα τρόφιμα, με την πιο αποτελεσματική να είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών (Alamed et al, 2009).

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες οι οποίες εμφανίζονται στα τρόφιμα ή στο σώμα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν σαν μέσο για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα. Οι λειτουργίες τους βασίζονται σε διάφορες μεθόδους, όπως ο έλεγχος των υποστρωμάτων μεταξύ οξυγόνου και λιπιδίων, ο έλεγχος των προοξειδωτικών (αντιδραστικά στελέχη των οξειδωτικών μετάλλων) και η αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών (Frankel, 1994).

Τα αντιοξειδωτικά είναι δυνατόν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες όπου σχετίζονται με το μηχανισμό δράσης τους. Έτσι υπάρχουν τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά και τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά.

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες, οπότε και να καθυστερήσουν την διαδικασία της έναρξης ή να διακόψουν τη διαδικασία διάδοσης της αυτοοξειδωσης (McClements, 2000).

Τα αντιοξειδωτικά αυτά διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητά τους κατά την αναστολή της οξείδωσης, λόγω των διαφορετικών χημικών ιδιοτήτων τους, αλλά και της φυσικής τους θέσης μέσα στο σύστημα (Frankel 1994). Διάφορα συνθετικά τροφίμων όπως τα BHA, BHT ή το TBHQ ανήκουν στα κοινά πρωτογενή αντιοξειδωτικά. Άλλα πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι η α-τοκοφερόλη, ο παλμιτικός ασκορβυλεστέρας, η καρνοσόλη.

Αυτά τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, αν και είναι πολύ αποτελεσματικά στον έλεγχο της οξείδωσης των λιπιδίων, το καταναλωτικό κοινό αναζητά φυσικά συστατικά τροφίμων, και γι' αυτόν το λόγο η βιομηχανία τροφίμων σπεύδει σε εναλλακτικά συστατικά. Έτσι έχουν γίνουνται πολλές έρευνες πάνω στην αποτελεσματικότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών σε γαλακτώματα, όπως είναι οι τοκοφερόλες, τα εκχυλίσματα φρούτων (μούρα, κεράσια, σταφύλια, φράουλες κ.α) καθώς και εκχυλίσματα φυτών (ρίγανη, χρυσάνθεμο, ανθό λεμονιού, τσάι, δεντρολίβανο κ.α).

Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να επιβραδύνουν την οξείδωση των λιπιδίων μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων των χηλικών ενώσεων που σχηματίζονται με τα μέταλλα μετάπτωσης, την αντικατάσταση του υδρογόνου στα πρωτογενή αντιοξειδωτικά, την απομάκρυνση του οξυγόνου και την απενεργοποίηση των αντιδραστικών ειδών (Reische et al, 1998). Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένας από αυτούς τους μηχανισμούς δεν περιλαμβάνει τη μετατροπή των ελεύθερων ριζών σε πιο σταθερά προϊόντα. Στα δευτερογενή αντιοξειδωτικά ανήκουν το φωσφορικό οξύ, το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και τα πολυφωσφορικά. Ωστόσο στην αναζήτηση φυσικών αντιοξειδωτικών έχει γίνει η αντικατάστασή τους με κιτρικό οξύ του οποίου όμως η δράση δεν είναι τόσο αποτελεσματική (Mc Clements, 2000).

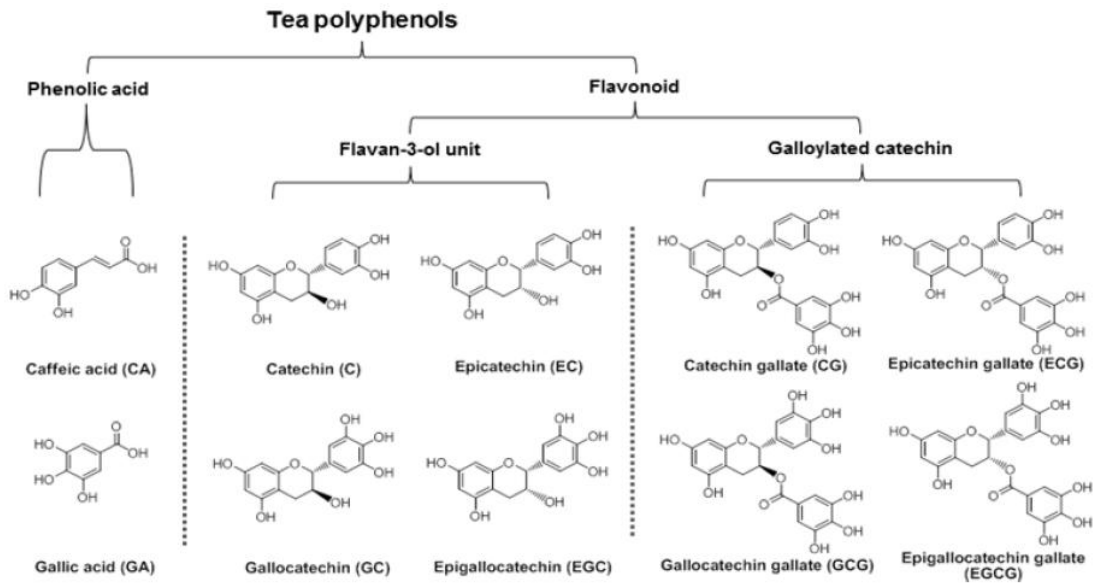
1.1.1 Κατεχίνες

Την τελευταία δεκαετία έχει δοθεί παγκοσμίως, μεγάλη προσοχή στα φυσικά φαινορικά αντιοξειδωτικά, τα οποία περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή που βρίσκονται σε πολλά φρούτα και λαχανικά, στο κόκκινο κρασί και στο τσάι, για τα προστατευτικά τους αποτελέσματα ενάντια στην καταστροφή από βιολογικά οξειδωτικά (Frankel and German, 2006). Το τσάι περιέχει έναν μεγάλο αριθμό βιοενεργών χημικών ουσιών, ωστόσο είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή, στα οποία περιέχονται και οι κατεχίνες με τα παράγωγα τους. Τα φλαβονοειδή επίσης περιέχουν την κερκετινη, την καμπερόλη την μυρικετίνη και τους γλυκοζίτες τους (Khan & Mukhtar, 2007).

Οι κατεχίνες που προέρχονται από το πράσινο τσάι σε σχέση με αυτές του μαύρου είναι πολύ περισσότερες, λόγω του ότι η διαδικασία παραγωγής τους διαφέρει. Στο μαύρο τσάι, κατά την παραγωγή του, υπάρχει η διαδικασία της ζύμωσης όπου κατά τη διάρκεια της η οξειδάση της πολυφαινόλης καταλύει την οξείδωση οδηγώντας έτσι στον πολυμερισμό των κατεχινών (Khan, & Mukhtar, 2007). Κατά την παραγωγή του πράσινου τσαγιού τα φρέσκα φύλλα μπαίνουν στον ατμό, ώστε να αποτραπεί η ζύμωση, και έτσι παράγεται ένα ξηρό και σταθερό προϊόν. Οι πολυφαινόλες γνωστές σαν κατεχίνες, συνήθως κατέχουν το 30-42% των ξηρών στερεών στο έτοιμο πράσινο τσάι (Khan, & Mukhtar, 2007). Σε μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα οι κατεχίνες που βρίσκονται στο πράσινο τσάι, αναστέλλουν την καρκινογένεση του δέρματος, του πνεύμονα, του οισοφάγου, του στομάχου, του κόλον, του ήπατος, του λεπτού εντέρου, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη και του μαστού (Chung et al 2000). Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι το πράσινο τσάι σε συνδυασμό με μια ισορροπημένη διατροφή αναπτύσσει μια ολοκληρωμένη αντιοξειδωτική ιδιότητα και προστατεύει ενάντια στην βλάβη στους ανθρώπους μέσω της οξείδωσης (Erba et al., 2005).

Οι τέσσερις κύριες κατεχίνες που βρίσκονται στο πράσινο τσάι είναι οι: επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού εστέρα ((-)-epigallocatechin gallate - EGCG), επικατεχίνη γαλλικού εστέρα, ((-)-epigallocatechin-EGC) (-), γαλλική επικατεχίνη ((-)-epicatechin gallate (ECG) (επικατεχίνη), και η επικατεχίνη ((-)-epicatechin (EC). Η κυριότερη κατεχίνη είναι η EGCG η οποία κατέχει περίπου το 50-80% των κατεχινών στο πράσινο τσάι (N. Khan, H. Mukhtar, 2007).

Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού δρύν ως αντιοξειδωτικά καθώς δεσμεύουν και εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα που είναι πιθανό να οδηγήσουν σε καρκινογενέσεις και τις μετατρέπουν σε μη τοξικές (Dreosti 2000).



Εικόνα [1]. Χημικές δομές και ταξινόμηση των πολυφαινολών στο τσάι

1.1.2 EGCG

Μεταξύ των κατεχινών στο τσάι, η EGCG είναι η πιο αποτελεσματική στις αντιδράσεις με τα πιο ενεργά οξυγονούχα είδη. Οι διάφορες χημικές δομές της EGCG συμβάλλουν στην αποτελεσματική αντιοξειδωτική ενέργεια των κατεχινών και βοηθούν στην χύλωση των μετάλλων αλλά και στην απενεργοποίηση των ελεύθερων ριζών. Αυτή η δομή επίσης, επιτρέπει τη μετατόπιση των ηλεκτρονίων προσδίδοντας μεγάλη δραστηριότητα στην απόσβεση των ελεύθερων ριζών (Kondo et al., 1999).

Η EGCG δείχνει να έχει και μεγάλη σημασία στην ιατρική καθώς έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τη δράση της. Έχει αποδειχθεί ότι είναι δραστική κατά των ιών και μπορεί να παρέχει νευροπροστατευτική δράση (Zhong et al 2012).

Σε έρευνες που έγιναν πάνω σε κάποια ήδη πολυφαινολών από πράσινο τσάι, ως προς τα αντιπολλαπλασιαστικά τους αποτελέσματα σε καρκινικά κύτταρα, αποδείχθηκε ότι η EGCG ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις υπόλοιπες (Guang-Jian Du, Zhiyu Zhang, Xiao-Dong Wen, Chunhao Yu, Tyler Calway, Chun-Su Yuan and Chong-Zhi Wang, 2012). Επίσης η EGCG μπορεί να έχει αντιφλεγμονώδη δράση καθώς και να μειώσει τον κίνδυνο της καρδιαγγειακής νόσου (Zhong et al 2012, Lim 2012).

Οι κατεχίνες αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους και διάφορες ομάδες υδροξυλίου. Βάσει των ομάδων υδροξυλίου που βρίσκονται στο μόριο τους οι κατεχίνες κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες τις κανονικές και τις εστεροποιημένες. Η κατεχίνη, η γαλλοκετεχίνη, η επικατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη EGCG είναι μη-εστεροποιημένες. Η δομή των κατεχινών είναι εξαιρετικά ασταθής όταν συναντώνται στη φύση. Η EGCG οξειδώνεται εύκολα από τα ένζυμα, τα οξέα και την θερμότητα (Graham, 1992). Οι κατεχίνες είναι μη σταθερές σε $pH > 6,5$ και ότι η EGCG αποδομείται τελείως.

Η EGCG είναι διαλυτή στο νερό και σε πολικούς διαλύτες και ελάχιστα διαλυτή στα περισσότερα λιπόφιλα μέσα. Έτσι η εφαρμογή της είναι δύσκολη σε διάφορα γαλακτώματα και έλαια. Σε αυτό αποδίδεται η χαμηλή κυτταρική απορρόφηση της EGCG *in vivo*. Η EGCG είναι δυνατόν να μετατραπεί δομικά μέσω της εστεροποίησης με διαφορετικά λιπαρά οξέα, ώστε να παράγει λιπόφιλα εστερικά παράγωγα, με αυξημένη την κυτταρική απορρόφηση και βιοαποδοτικότητα *in vivo* (Zhong et al, 2012).

1.1.3 Πρωτεΐνες και αντιοξειδωτικά

Στα διάφορα τρόφιμα οι φαινόλες που υπάρχουν σε αυτά αλληλοεπιδρούν με τις πρωτεΐνες, κατά τη διάρκεια παρασκευής τους ή κατά την αποθήκευσή τους. τα αποτελέσματα που μπορεί να δώσουν οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι πιθανό να επηρεάσουν το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση των τροφίμων αλλάζοντας αρνητικά ή θετικά τις ιδιότητες τους. Μέσα από έρευνες αποδεικνύεται ότι οι φαινολικές ενώσεις δημιουργούν δυνατή αλληλεπίδραση με τις σφαιρικές πρωτεΐνες και μπορούν να προκαλέσουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Στα διαλύματα οι πολυφαινόλες όπως οι κατεχίνες μπορούν να σχηματίσουν αδιάλυτα συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες του γάλακτος (Liang & Xu, 2003).

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει είναι πάνω στους μη ομοιοπολικούς δεσμούς των κατεχινών με τις πρωτεΐνες (Nagy et al, 2012).

Ο Charlton και η ομάδα του το 2002 δήλωσε ότι χρειάζεται μια επαρκής επικάλυψη των επιφανειών των πρωτεϊνών με μόρια πολυφαινολών, ώστε να γίνει η συσσωμάτωση των μορίων των πρωτεϊνών που θα οδηγήσει στην κατακρήμνιση των συμπλεγμάτων πολυφαινολών-πρωτεϊνών. Όταν οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, η κατακρήμνιση οφείλεται στον σχηματισμό ενός υδροφοβικού στρώματος πολυφαινολών στην επιφάνεια των πρωτεϊνών. Από την άλλη μεριά, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, η κατακρήμνιση οφείλεται στον συνδυασμό της συμπλοκοποίησης των φαινολών στην επιφάνεια των πρωτεϊνών και στη δημιουργία σταυροδεσμών μεταξύ διάφορων πρωτεϊνικών μορίων με τις φαινόλες.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και πολυφαινολών εξαρτώνται από το μέγεθος, τη διαμόρφωση και το φορτίο των μορίων των πρωτεϊνών. Η συνένωση των πολυφαινολών με τις πρωτεΐνες με δομή σφαιρική και πιο συμπαγή είναι χαμηλότερη σε σχέση με αυτές που είναι πλούσιες σε προλίνη και έχουν μια πιο ανοικτή και χαλαρή δομή (Naczka et al, 2006). Σε μελέτες για την αλληλεπίδραση της α-καζεΐνης με ένα είδος κατεχίνης αποδείχτηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του διαλύματος της α-καζεΐνης αυξήθηκε αλλά και πάλι ήταν μικρότερη από αυτή της κατεχίνης μόνο. (Arts et al 2001). Επίσης έχει βρεθεί ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μίγματος από πρωτεΐνες με φλαβονοειδή είναι χαμηλότερη από τη συνολική και των δύο ξεχωριστά. Το αποτέλεσμα αυτής της συγκάλυψης αρχικά είναι ότι τα αντιοξειδωτικά δε μπορούν να φτάσουν στη βέλτιστη ικανότητα σάρωσης στην μήτρα. Για παράδειγμα η προσθήκη γάλακτος σε τσάι ενδέχεται να μειώσει την αντιοξειδωτική ικανότητα των αντιοξειδωτικών στο τσάι.

Αυτό μπορεί να έχει και ως αποτέλεσμα την παραγωγή παραπροϊόντων που περιέχονται στα αντιοξειδωτικά και στις πρωτεΐνες. Η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να οδηγήσει σε πιο γρήγορη οξείδωση του προϊόντος (Arts et al, 2002).

Μια άλλη συνέπεια των αλληλεπιδράσεων των αντιοξειδωτικών με τις πρωτεΐνες μπορεί να είναι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μη- αντιστρεπτή αναλόγως το pH, τη θερμοκρασία και τις συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών και των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά τη σχέση της EGCG με την β-λακτογλοβουλίνη, μελέτες έδειξαν πως σχηματίζονται μεταξύ τους δεσμοί υδρογόνου, γεγονός που μειώνει την αντιοξειδωτική δράση της EGCG (Zorilla et al 2011). Υπάρχει επίσης η αντίληψη ότι μπορεί να εμπλέκονται και άλλου είδους δεσμοί όπως υδρόφοβες αντιδράσεις (Papadopoulou et al, 2005)

Στα γαλακτώματα ελαίου/νερού όπου υπήρχαν ομοιοπολικά σύμπλοκα EGCG με πρωτεΐνη παρουσιάστηκε αυξημένη διεπιφανειακή συγκέντρωση της EGCG σε σχέση με τα μη ομοιοπολικά σύμπλοκα (Wei et al, 2015).

1.2 Ενθυλάκωση βιοενεργών συστατικών

Η μικροενθυλάκωση ή η νάνοενθυλάκωση ορίζεται σαν μια τεχνολογία προστασίας των στερεών των υγρών ή των αέριων υλικών σε μικρές κάψουλες οι οποίες μπορούν να απελευθερώσουν τα συστατικά τους σε ελεγχόμενο ρυθμό κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Αυτές οι κάψουλες προστατεύουν το ενθυλακωμένο προϊόν από το φως και το οξυγόνο και συνεπώς προλαμβάνουν την αποδόμηση του (Ferreira, Rocha, Coelho, 2008).

Ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα που δημιουργούνται κατά την ανάπτυξη ενός λειτουργικού τροφίμου είναι η διατήρηση της δράσης και η βιοδιαθεσιμότητα των βιοενεργών συστατικών του καθ'όλη τη διάρκεια των κατεργασιών που αφορούν την παραγωγή, την αποθήκευση αλλά και την μεταφορά του τροφίμου στο γαστρικό μας σύστημα (Gomez and Mascaraque, 2015). Για την EGCG και γενικά για τις κατεχίνες οι πιο επιβλαβείς παράγοντες είναι το φως και το οξυγόνο. Η ανάπτυξη εδώδιμων μητρών ενθυλάκωσης τέτοιων συστατικών σε κλίμακα νανομέτρων ή μικρομέτρων, θεωρείται αποτελεσματικός τρόπος ώστε να προστατευθούν αυτές οι ενεργές ενώσεις από τις δυσμενείς συνθήκες (Dube, Ng, Nicolazzo, & Larson, 2010).

Η ενθυλάκωση μπορεί να γίνει με διάφορα βιοπολυμερή, όπως υδροπηκτώματα πρωτεϊνών ή πολυσακχαρίτες. Σε σύγκριση με τη μη ενθυλακωμένη EGCG, η ενθυλακωμένη σε νανοσωματίδια πολυλακτικού οξέος-πολυεθυλενογλυκόλης διατηρεί καλύτερα την βιολογική της αποτελεσματικότητα (Gomez and Mascaraque, 2015).

Μία από τις βασικές προκλήσεις στην ανάπτυξη των λειτουργικών τροφίμων είναι η διατήρηση της δράσης αλλά και η βιοδιαθεσιμότητά των βιοενεργών συστατικών κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τροφίμου, της αποθήκευσης και της διόδου στο γαστροεντερικό σύστημα. Η ανάπτυξη μητρών νάνο-ή μικρο-ενθυλάκωσης θεωρείται μια σωστή επιλογή ώστε να προστατευθούν αυτές οι βιολογικά ενεργές ενώσεις από τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Dube, Ng, Nicolazzo, & Larson, 2010).

Υπάρχει μεγάλος αριθμός από τεχνικές ενθυλάκωσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή συστημάτων νανο- ή μικροσωματιδίων.

Κάποιες από αυτές τις μεθόδους είναι η γαλακτωματοποίηση, η εξάτμιση, οι μέθοδοι εκβολής, η επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης με ψεκασμό ψυκτικού υγρού, η ξήρανση με ψεκασμό και η συσσωμάτωση (Coaggregation) (Lopez-Rubio, Sanchez, Wilkanowicz, Sanz, & Lagaron, 2012).

Ωστόσο κάποιες από αυτές τις μεθόδους περιλαμβάνουν την έκθεση των βιοενεργών συστατικών σε υψηλές θερμοκρασίες ή /και στη χρήση οργανικών διαλυτών, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την σταθερότητα των ευαίσθητων θρεπτικών συστατικών και να αποκλείσουν την χρήση τους σε εφαρμογές στα τρόφιμα (Lopez-Rubio, Sanchez, Wilkanowicz, Sanz, & Lagaron, 2012).

1.3 Ηλεκτρονηματοποίηση

Ο ψεκασμός μέσω ηλεκτρικού ρεύματος χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα ως μια εναλλακτική μέθοδος για την παραγωγή πολυμερικών σωματιδίων ενσωματώνοντας βιοενεργούς παράγοντες, στην βιομηχανία των καλλυντικών, των θεραπευτικών ειδών και των τροφίμων. (Bock, Dargaville, & Woodruff, 2012, Jaworek & Sobczyk, 2008). Ο ηλεκτροδυναμικός ψεκασμός και η ηλεκτρονηματοποίηση είναι πολύπλευρες ηλεκτροδυναμικές μέθοδοι, οι οποίες μπορούν να παράγουν δομές ενθυλάκωσης χωρίς την επιβολή υψηλών θερμοκρασιών ή τη χρήση τοξικών διαλυτών (Chakraborty, Liao, Adler, & Leong, 2009). Οι ηλεκτροδυναμικές αυτές διαδικασίες που ονομάζονται *electrospinning* και *electrospraying* είναι εύκολες, αποδοτικές και ευέλικτες μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούν ηλεκτρικά φορτισμένους πίδακες πολυμερικών διαλυμάτων για την παραγωγή ινών ή σωματιδίων σε κλίμακα μικρομέτρων ή νανομέτρων. Οι ηλεκτρονηματοποιημένες ίνες ή τα ηλεκτροψεκασμένα σωματίδια έχουν πολλά δομικά και λειτουργικά πλεονεκτήματα.

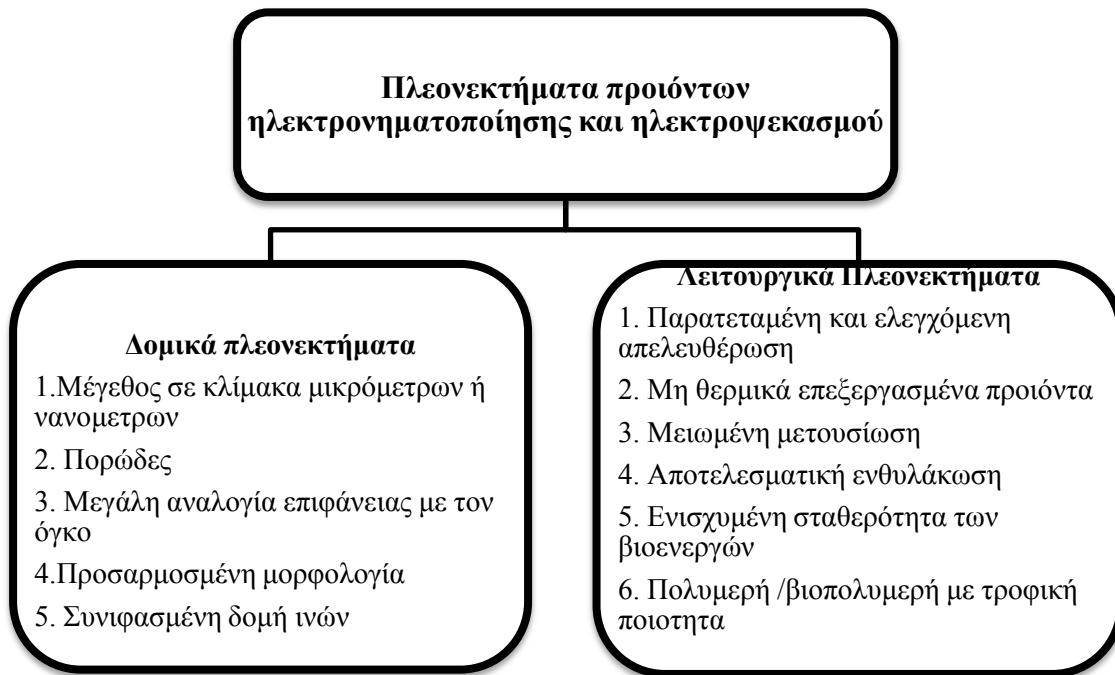
Παρ'όλα αυτά η χρήση τους στο πεδίο των τροφίμων είναι ακόμα περιορισμένη και δεν έχει μελετηθεί αρκετά (Bhushani A & Anandharamakrishnan, 2014).

Κάποιες από τις μελέτες που έχουν γίνει αφορούν την ενθυλάκωση βιοενεργών παραγόντων αλλά και στελεχών βακτηρίων για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Για παράδειγμα ο Amparo López-Rubio με την ομάδα του το 2012 χρησιμοποίησε τη μέθοδο του *electrospinning* για την ενθυλάκωση του στελέχους *Bifidobacterium* σε μήτρα WPC με πουλλουράνη, ώστε να ελέγξει τη βιωσιμότητα του στελέχους.

Σε άλλη μελέτη οι Gomez-Mascaraque το 2015 χρησιμοποίησε την τεχνική του *electrospraying* για να εξετάσει την αντιοξειδωτική δράση της EGCG όταν είναι ενθυλακωμένη σε ζελατίνη.

Εκτός από τον τομέα των τροφίμων οι τεχνικές του *electrospinning* και του *electrospraying* εφαρμόζονται και στον τομέα της ιστοτεχνολογίας.

Σε μια έρευνα εξετάζεται η πρόοδος των νηματοποιημένων μητρώων από πολυσακχαρίτες και οι εφαρμογές τους στην βιοϊατρική, συμπεριλαμβανομένων των ικριωμάτων στην ιστοτεχνολογία, των επικαλύψεων των τραυμάτων, των συστημάτων της ελεγχόμενης απελευθέρωσης των φαρμάκων και της ακινητοποίησης των υποστρωμάτων των καταλυτών και των ενζύμων (Kuen Yong Lee, Lim Jeong , Yun Ok Kang , Seung Jin Lee, Won Ho Park, 2009).



Εικόνα [2]: Πλεονεκτήματα προϊόντων που έχουν δημιουργηθεί με electrospinning και electrospraying

1.3.1 Αρχές λειτουργίας

Το electrospinning είναι η διαδικασία που χρησιμοποιεί ηλεκτροστατικές δυνάμεις ώστε να μετατρέψει μια αιωρούμενη σταγόνα ενός πολυμερούς σε μια λεπτή ίνα όπου εναποτίθεται σε έναν γειωμένο συλλέκτη (Frenot & Chronakis, 2003). Το πολυμερικό διάλυμα εξωθείται από το άκρο μιας βελόνας με μια συνεχή ροή από μια σύριγγα που λειτουργεί σαν αντλία, σχηματίζοντας μια σταγόνα στο άκρο.

Όταν μία μικρή ποσότητα του διαλύματος του πολυμερούς εκτεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο, η σταγόνα εκτείνεται προς πιο κοντινό σημείο με το χαμηλότερο δυναμικό, μετατρέπεται σε μία δομή που είναι γνωστή ως κώνος Taylor (Reneker, Yarin, Fong, & Koombhongse, 2000; Yarin, Koombhongse, & Reneker, 2001).

Όταν το ηλεκτρικό πεδίο φτάσει σε μία κρίσιμη τιμή στην οποία οι ηλεκτρικές δυνάμεις θα ξεπεράσουν την επιφανειακή τάση της σταγόνας από τον κώνο Taylor, εκβάλλεται ένα φορτισμένο υγρό ρεύμα ή ένας πίδακας του πολυμερούς (Doshi Jayesh & Reneker, 1995). Ο πίδακας αργότερα, επιμηκύνεται μερικώς περιγραφόμενος ως εκτεταμένη έλικα, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του από το άκρο της σύριγγας στον συλλέκτη.

Η ηλεκτροστατική δύναμη συμβάλλει, στη δύναμη ώθησης, στη βαρύτητα, στη δύναμη απόκρουσης, στην επιφανειακή τάση και στις ιξωδοελαστικές δυνάμεις που δρουν στον φορτισμένο πίδακα (Ding, Li, Miyauchi¹, Kuwaki, & Shiratori, 2006). Η αραίωση του πίδακα του πολυμερούς συνεχίζεται όσο ο διαλύτης εξατμίζεται και οι συνεχείς ίνες που δημιουργούνται εναποτίθενται στον γειωμένο συλλέκτη. Όταν το φορτισμένο πήγμα εκβάλλεται μέσω της ηλεκτροστατικής δύναμης από το ακροφύσιο προς τον συλλέκτη, εφαρμόζεται μία δύναμη αντίστασης ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του με τον περιβαλλόμενο αέρα και μειώνει την υψηλή ταχύτητα του πίδακα. Η επέκταση της σταγόνας αποδίδεται στην δύναμη Coulomb ενώ η συναίρεσή της αποδίδεται στην επιφανειακή τάση και στις ιξωδοελαστικές δυνάμεις. Η παρουσία του ηλεκτρικού πεδίου επηρεάζει την άπωση των ηλεκτροστατικών και των δυνάμεων Coulomb όπου παρατηρούνται στην διαδικασία. Το ηλεκτρικό πεδίο οδηγεί στην παραμόρφωση της φορτισμένης σταγόνας από σφαιρική σε μια ατρακτοειδή δομή και επηρεάζει τη μετάβαση από τον ηλεκτροψεκασμό στην διαδικασία της ηλεκτρονηματοποίησης (Almería, Deng, Fahmy, & Gomez, 2010; Grimm & Beauchamp, 2005).

Η διαδικασία του electrospraying (ψεκασμός) είναι μια διαδικασία διάσπασης των ατόμων από τις ηλεκτρικές δυνάμεις. Η διαφορά μεταξύ της ηλεκτρονηματοποίησης και του ηλεκτροψεκασμού (ηλεκτροδυναμικός ψεκασμός), όπου μπορούν να θεωρηθούν συγγενείς τεχνολογίες, βασίζεται στον βαθμό της μοριακής συνένωσης στο υλικό, μία ιδιότητα η οποία ελέγχεται από τη διαφορά στη συγκέντρωση του πολυμερικού διαλύματος (Chakraborty, Liao, Adler, & Leong, 2009; Enayati, Chang, Bragman, Edirisinghe, & Stride, 2011). Όταν η συγκέντρωση του πολυμερούς είναι υψηλή, ο πίδακας από τον κώνο Taylor σταθεροποιείται και η επιμήκυνση λαμβάνει χώρα μέσω του μηχανισμού της περιδίνησης του διαλύματος (wheeping instability mechanism).

Αν η συγκέντρωση του πολυμερούς είναι χαμηλή τότε ο πίδακας αποσταθεροποιείται και ως εκ τούτου σχηματίζονται σταγόνες. Αυτές οι υψηλά φορτισμένες σταγόνες διασκορπίζονται μόνες τους στο κενό, εμποδίζοντας έτσι τη συσσώρευση και τη δημιουργία θρόμβων (Jaworek, & Sobczyk, 2008).

Περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη οδηγεί στην κατασκευή και την στερεοποίηση των σταγόνων αυτών με αποτέλεσμα την συλλογή στερεών πολυμερικών σωματιδίων στον γειωμένο συλλέκτη (Bock, Dargaville, & Woodruff, 2012).

Υπάρχει γενικά πρόοδος στη χρήση του ομοαξονικού electrospinning και electrospraying για την παραγωγή προϊόντων με δύο αναμίξιμα ή μη αναμίξιμα υλικά στον πυρήνα ή στα τοιχώματα.

Σε αυτήν τη μέθοδο δύο ομόκεντρα ή ένα διπλό ακροφύσιο προάγουν την παραγωγή ινών (με) ή σωματιδίων με πυρήνα και κέλυφος περιέχοντας το βιοενεργό συστατικό στο εσωτερικό του τριχοειδούς και το υλικό προστασίας στο εξωτερικό του τριχοειδούς (Zheng, Zhang, Zhao, & Han, 2012).

Τα προϊόντα που προέρχονται από τις διαδικασίες του electrospinning ή του electrospraying κατέχουν διάφορα δομικά και λειτουργικά πλεονεκτήματα. Το μέγεθος του τελικού προϊόντος μπορεί να ελεγχθεί περαιτέρω μεταβάλλοντας τους παράγοντες που διέπουν το σύστημα, το διάλυμα, το όργανο και τις παραμέτρους του περιβάλλοντος που γίνεται η διαδικασία.

Ο τύπος και η συγκέντρωση του πολυμερούς και του διαλύτη που χρησιμοποιείται, καθορίζουν τις ιδιότητες του διαλύματος, όπως το pH, την ηλεκτρική αγωγιμότητα και την επιφανειακή τάση.

Οι παράμετροι του οργάνου, περιλαμβάνουν το ηλεκτρικό δυναμικό που εφαρμόζεται, το ρυθμό ροής του διαλύματος, την απόσταση του ακροφύσιου από τον συλλέκτη και σε κάποιες περιπτώσεις τη φύση του υλικού του συλλέκτη. Επιπροσθέτως οι συνθήκες περιβάλλοντος στις οποίες γίνεται η διαδικασία, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η ταχύτητα του αέρα, μπορούν να καθορίσουν τον ρυθμό της εξάτμισης του διαλύτη από το προϊόν (Raghavan et al., 2012). Έτσι μπορούν να παραχθούν προϊόντα σε κλίμακα μικρόμετρων ($>1\mu\text{m}$) υπομικρόμετρων ή νανομέτρων (10-1000 nm) (Klaessig, Marrapese, & Abe, 2011).

Για την παρασκευή ινών και σωματιδίων με τη μέθοδο της ηλεκτρονηματοποίησης και του ηλεκτροψεκασμού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πολυμερή που δεν είναι τοξικά και να είναι εγκεκριμένα συστατικά. Έτσι γίνονται πολλές έρευνες ώστε να αναπτυχθούν συστήματα πολυμερών τα οποία να είναι φυσικά και να μπορούν να αφομοιωθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό χωρίς να προκαλέσουν προβλήματα.

1.4 Βακτηριακή Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ο πιο οικονομικός, σε αφθονία και πιο άμεσα διαθέσιμος πολυσακχαρίτης στον κόσμο όπου παραδοσιακά εξάγεται από τα φυτά ή τα παράγωγά τους (Faezah Esa, Siti Masrinda Tasirin, Norliza Abd Rahman, 2014). Είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές μορίων β(1-4)-D-γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Είναι υδροφοβική βιοδιασπώμενη, έχει ευρεία χημική τροποποιητική δυνατότητα και μπορεί να σχηματίσει ημικρυσταλλικές ινώδεις μορφές. Επίσης χρησιμοποιούνταν εδώ και εκατοντάδες χρόνια για την κατασκευή οικοδομικών υλικών και υφασμάτων (Klemm, 2005).

Τα πιο κοινά παράγωγα κυτταρίνης που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων είναι η καρβομέθυλο κυτταρίνη (Carbomethyl Cellulose-CMC) και η υδροπροπυλο-μέθυλο-κυτταρίνη (Hydropropyl Methylcellulose-HPMC) (McClements, 2005).

Παρότι τα φυτά μπορούν είναι πηγή κυτταρίνης τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι διάφορα βακτήρια μπορούν ως εναλλακτική πηγή, να παράγουν κυτταρίνη.

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι το πολυμερές το οποίο είναι φιλικό προς το περιβάλλον και τυγχάνει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος κόσμο (McClements, 2011).

Το βακτήριο *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 παράγει βακτηριακή κυτταρίνη (Bacterial Cellulose-BC).

Αυτά τα βακτηριακά είδη όταν τοποθετηθούν σε ένα μέσο καλλιέργειας πλούσιο σε πολυσακχαρίτες έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πυκνά υμένα κυτταρίνης. Η μεμβράνη που σχηματίζεται αποτελείται από δέσμες ινιδίων με πλάτος 4μm, οι οποίες αποτελούνται από νανοϊνίδια με πλάτος μικρότερο των 100 nm (Yamanaka et al 1989).

Παρ' ότι η κυτταρίνη που προέρχεται από τα φυτά (Plant Cellulose-PC) έχει την ίδια χημική δομή με τη βακτηριακή κυτταρίνη (BC) η δομή τους και οι μηχανικές ιδιότητές τους διαφέρουν.

Η βακτηριακή κυτταρίνη (BC) παρουσιάζει μια τρισδιάστατη δικτυωμένη δομή, έχει υψηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και υψηλότερη κρυσταλλικότητα (Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000). Επιπλέον ενώ η PC σχετίζεται φυσικά με άλλα ήδη βιοπολυμερών όπως η ημικυτταρίνες και η λιγνίνη, η BC είναι καθαρή κυτταρίνη.

Λόγω των ξεχωριστών ιδιοτήτων, όπως για παράδειγμα η υψηλή καθαρότητα, η υψηλή μηχανική αντοχή, η χαμηλή πυκνότητα και η βιοσυμβατότητα, η BC παρουσιάζεται ως ένα υλικό που έχει εφαρμογές στην βιοϊατρική (Klemm, Schumann, Udhardt, & Marsch, 2001) στη βιομηχανία χαρτιού (Chawla, Bajaj, Survase, & Singhal, 2009) και πιο πρόσφατα σαν παράγοντας ενίσχυσης σε πολυμερικές μήτρες.

Συγκρινόμενη με τις άλλες διαιτητικές ίνες η BC έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως, ότι είναι μια καθαρή μορφή κυτταρίνης η οποία δεν απαιτεί δριμείς χημικές τεχνικές για να απομονωθεί ή να καθαριστεί όπως είναι απαραίτητο για τις κυτταρίνες που προέρχονται από τα φυτά. Τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν ένα μέσο όπως χυμούς φρούτων και να επαναπαράγουν *in situ* τη γεύση και το χρώμα του μέσου καλλιέργειας.

Μπορεί να παράγει μια σειρά από σχήματα και υφές, όπως φιλμ, πολτούς, νήματα, σφαιρίδια, σωματίδια, ινίδια κ.ά, και έτσι να χρησιμοποιηθεί σε πολλών ειδών εφαρμογές στα τρόφιμα και τέλος οι ίνες της βακτηριακής κυτταρίνης σε κλίμακα νανομέτρων, έχοντας καλή τρισδιάστατη δομή μπορούν να εφαρμοστούν σε καινοτόμες διαδικασίες παρασκευής τροφίμων (Shi et al, 2013)

Η BC μπορεί να σχηματίσει υδροπυκτώματα και οι ρεολογικές της ιδιότητες οδήγησαν στην χρήση της στη βιομηχανία τροφίμων σε μια μορφή γέλης, με την ονομασία Nata, το οποίο είναι ένα είδος επιδορπίου (Zhiyun Shi, Yue Zhang, Glyn O. Phillips, Guang Yang, 2013).

Το nata-de-coco είναι ένα γλύκισμα που προέρχεται από τις Φιλιππίνες, όπου λεπτά φύλλα γέλης πάχους ενός εκατοστού, ζυμώνονται με νερό καρύδας, τεμαχίζονται σε κύβους και εμβαπτίζονται σε σιρόπι ζάχαρης. Παρόμοια τρόφιμα μπορούν να παρασκευαστούν από άλλους χυμούς όπως για παράδειγμα το Nata de pina από ανανά. (Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000).



Εικόνα [3]: Απεικόνιση της BC

Οι ιδιότητες και η δομή των συστατικών της BC ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να ενισχύσουν τη σταθερότητα του τροφίμου σε ένα μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών και καταστάσεις ψύξης-απόψυξης.

Για εφαρμογές που έχουν να κάνουν με την πύκνωση, την ζελατινοποίηση, τη σταθεροποίηση και τη δέσμευση νερού έγιναν έρευνες πάνω στη λειτουργία της BC στην τροποποίηση της ρεολογίας του τροφίμου (Okiyama, Motoki and Yamanaka, 1992; Okiyama et al., 1993).

Μπορεί να προστεθεί σε κολλώδες άρτυμα ώστε να βελτιώσει την κολλώδη υφή του, ενώ σαν σταθεροποιητικός παράγοντας μπορεί να διατηρήσει την υγρασία του προϊόντος. Σε παγωτό που περιέχει BC, το σχήμα του μπορεί να διατηρηθεί ακόμα και 60 λεπτά μετά την παραμονή του εκτός ψυγείου. Σαν παράγοντας ζελατινοποίησης, όταν προστέθηκε σε τοφου ποσότητα 0,2-0,3 %, η ισχύς ζελατινοποίησης αυξήθηκε σημαντικά.

Ως ανασταλτικός παράγοντας, η BC που προστέθηκε σε ρόφημα σοκολάτας απέτρεψε την κατακρήμνιση του κακάου λόγω του ότι το πλέγμα της BC μπορεί να διατηρήσει τα σωματίδια του κακάου. Επιπροσθέτως, φαίνεται να έχει μεγάλη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, αφού μετά από τη διαδικασία της αποστείρωσης το ιξώδες παρέμεινε αναλλοίωτο. Επίσης με τη προσθήκη βακτηριακής κυτταρίνης είναι δυνατόν να παραχθούν προϊόντα με λίγες θερμίδες καθώς και με χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης (Shi et al, 2013).

Ενώ σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμογής των βιοπολυμερών στα τρόφιμα απαιτείται η ξήρανση τους, η βακτηριακή κυτταρίνη δε μπορεί να ανακτήσει τις αρχικές ρεολογικές ιδιότητες του διαλύματος όπως επίσης και την αρχική ικανότητα απορρόφησης νερού (Agoda-Tanjawa et al, 2010).

1.5 Πρωτεΐνες γάλακτος

Το γάλα που προέρχεται από βοοειδή περιέχει περίπου 30-35g πρωτεΐνες ανά λίτρο. Οι δύο κύριες κατηγορίες πρωτεϊνών είναι οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες ορού. Οι καζεΐνες κατέχουν το 76-86% των πρωτεϊνών του γάλακτος και οι πρωτεΐνες ορού γύρω στο 14-24%.

1.5.1 Πρωτεΐνες ορού

Οι πρωτεΐνες ορού παρουσιάζονται ως διάλυμα στον ορό του γάλακτος συνήθως σε μονομερή ή διμερή σχηματισμό. Αυτό το κλάσμα περιέχει τέσσερις κύριες πρωτεΐνες, τη β-λακτογλοβουλίνη (β-Lg), την α-λακταλβουμίνη (α-La), την αλβουμίνη (BSA) και την ανοσοσφαιρίνη (Ig) (Robin et al, 1992). Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν δευτεροταγή και τριτοταγή και σε πολλές περιπτώσεις τεταρτοταγή δομή (Jovanović et al, 2005).

Οι πρωτεΐνες ορού είναι κυρίως σφαιρικές με μια ομοιογενή κατανομή υδροφοβικών/υδροφιλικών αμινοξέων κατά μήκος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και τη παρουσία δισουλφιδικών δεσμών και δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το pH και τα άλατα (Robin et al, 1992). Η συμπαγής δομή τους δίνει τη δυνατότητα να σχηματίσουν λεπτά και κολλώδη υμένα (ειδικά σε PI 5,2 για την β-lg) (Leman J and Kinsella, 1989). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών ορού είναι η υψηλή διαλυτότητά τους στο νερό σε διάφορες τιμές pH. Μπορούν να παραμείνουν διαλυτές ακόμα και σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο (γύρω σε pH 4,9) εφόσον δεν έχουν μετουσιωθεί (Teo et al 2016).

Τα συστατικά των πρωτεϊνών ορού χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο φάσμα λειτουργικών εφαρμογών στην βιομηχανία των τροφίμων. Κάθε εφαρμογή απαιτεί μία ή περισσότερες λειτουργικές ιδιότητες όπως η ζελατινοποίηση, η θερμική σταθερότητα, ο σχηματισμός αφρού ή η γαλακτοματοποίηση.

Τα συστατικά των πρωτεϊνών ορού παρασκευάζονται ώστε να ενισχύσουν κάποιες λειτουργικές ιδιότητες εναλλάσσοντας τη σύσταση της πρωτεΐνης ή κάποιου μη πρωτεϊνικού συστατικού ή και τροποποιώντας την πρωτεΐνη. Οι τροποποιήσεις των πρωτεϊνών του ορού, που βασίζονται στην ενζυματική υδρόλυση ή στον πολυμερισμό που προκαλείται από την θερμότητα έχουν μεγάλο δυναμικό στη σχεδίαση λειτουργικών τροφίμων (Foegeding et al, 2002).

Η παραγωγή των συμπυκνωμάτων (25-80% πρωτεΐνη) και των υπερσυμπυκνωμάτων (>90% πρωτεΐνη) πρωτεϊνών ορού απαιτεί την αφαίρεση μεγάλου ποσοστού μη πρωτεϊνικών ενώσεων. (Goldsmith, Amundson, Horton, & Tannenbaum, 1970).

1.5.2 Συμπυκνώματα και υπερσυμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού

Τα συστατικά που παρασκευάζονται από πρωτεΐνες ορού έκαναν την πρώτη τους εμφάνιση στον χώρο των τροφίμων τις τελευταίες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα. Η χρήση τους έγινε ευρεία λόγω των θρεπτικών και των λειτουργικών τους ιδιοτήτων. Στο τέλος της πρώτης δεκαετίας του 21^{ου} αιώνα εξελίχθηκαν σε μια σειρά από εκλεπτυσμένα και στοχευμένα συστατικά τροφίμων με πολλές θρεπτικές και λειτουργικές ιδιότητες (Bolland, 2011).

Έτσι για να γίνει πιο εύκολη η διαχείριση αυτής ξεκίνησαν πολλές πρακτικές ώστε να κλασματοποιηθεί από το μείγμα πρωτεϊνών του ορού.

Έπειτα από πολλά χρόνια και πολλών ειδών επεξεργασίες το WPC (Whey protein concentrate) και το WPI (Whey protein isolate) είναι τα συμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού που χρησιμοποιούνται ευρέως.

Τα συμπυκνώματα αυτά παρασκευάζονται μέσω της υπερδιήθησης του ορού. Για να επιτευχθεί το ζητούμενο ποσοστό στερεών στα συμπυκνώματα αυτά λαμβάνουν χώρα και άλλες διεργασίες όπως η όσμωση ή και η εξάτμιση σε κενό.

Η WPC μπορεί να περιέχει πρωτεΐνη έως και 89%, ενώ η WPI περιέχει το ελάχιστο 90% με σχεδόν όλη την λακτόζη να έχει αφαιρεθεί.

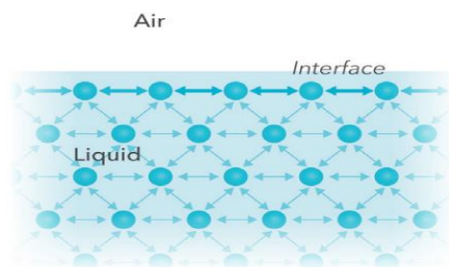
Η παρασκευή των υπεσυμπυκνωμάτων πρωτεΐνης ορού εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες ορού είναι αμφίφιλα μόρια, τα οποία μπορούν να θεωρηθούν φορτισμένα ιόντα. Σε διάφορες τιμές pH κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο οι πρωτεΐνες ορού έχουν ένα θετικό φορτίο και συμπεριφέρονται ως κατιόντα, ενώ σε τιμές pH πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο έχουν αρνητικό φορτίο και έχουν συμπεριφορά ανιόντων. Σε κάθε περίπτωση οι πρωτεΐνες μπορούν να αφομοιωθούν από τον αντίστοιχο ιοντοανταλλάκτη, έτσι αναπτύχθηκαν διάφορα μέσα με το κατάλληλο μέγεθος πόρων και τα κατάλληλα επιφανειακά χαρακτηριστικά ώστε να ανακτηθούν οι πρωτεΐνες από τα διφασικά διαλύματα (Varnam and Sutherland, 1994).

Στα πλεονεκτήματα των WPC και WPI στις διάφορες εφαρμογές τους στα τρόφιμα, περιλαμβάνονται εκτός από το μεγάλο ποσοστό πρωτεϊνών και αμινοξέων, οι χαμηλές θερμίδες, η περιεκτικότητα σε νάτριο, και η έλλειψη παθογόνων και τοξικών συστατικών και μη διατροφικών παραγόντων. Επίσης τα συμπυκνώματα των πρωτεϊνών ορού έχουν υψηλή ικανότητα γαλακτοματοποίησης, συμβατότητα με άλλα συστατικά, άμεση διαθεσιμότητα καθώς και την αντίληψη ότι είναι φυσικό προϊόν (Renner and Abd El Salam, 1991) Οι WPC και WPI είναι λευκά προϊόντα με την τυπική γεύση των γαλακτοκομικών, όπως γλυκιά και αρωματική, παρόλα αυτά πολλές διεργασίες όπως η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα μη γαλακτώδεις γεύσεις. Πλέον έχουν κερδίσει την αποδοχή ως συστατικά λειτουργικών τροφίμων.

1.6 Αρχές λειτουργίας

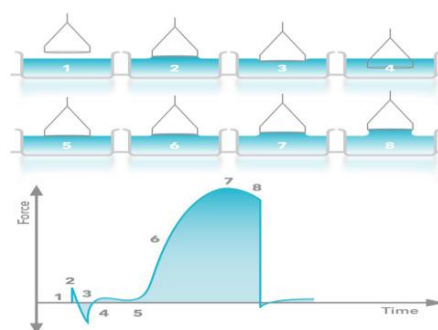
1.6.1 Επιφανειακή τάση

Οι συνεκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων ενός υγρού είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο της επιφανειακής τάσης (Surface Tension –ST). Τα μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια του ρευστού, δεν έχουν τα ίδια γειτονικά άτομα σε όλες τις πλευρές και έτσι συνδέονται πιο ισχυρά με αυτά που δρουν. Έτσι σχηματίζεται ένα υμένιο το οποίο κάνει πιο δύσκολη την κίνηση δια μέσου της επιφάνειας από την κίνηση όταν είναι τελείως βυθισμένο στο ρευστό.



Εικόνα [4]: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων στο εσωτερικό και στοίχιση στη επιφάνεια του ρευστού.

Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης μπορεί να γίνει με το τενσιόμετρο (Sigma force tensiometer). Η λειτουργία του βασίζεται στη μέτρηση της δύναμης της αλληλεπίδρασης ενός καθετήρα στην διεπιφάνεια υγρού-αερίου ή υγρού -υγρού. Ένας καθετήρας σε ισορροπία αιωρείται και έρχεται σε ισορροπία με την διεπιφάνεια του υγρού που μελετάται. Οι δυνάμεις που εφαρμόζονται από την ισορροπία όσο ο καθετήρας αλληλεπιδρά με την επιφάνεια του υγρού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να υπολογιστεί η επιφανειακή τάση. Οι δυνάμεις που εμφανίζονται σε αυτήν την κατάσταση εξαρτώνται από το μέγεθος και το σχήμα του καθετήρα, από τη γωνία επαφής μεταξύ του καθετήρα και της επιφάνειας του ρευστού και την επιφανειακή τάση του υγρού. Ο καθετήρας αυτός είναι κατασκευασμένος από λευκόχρυσο, όπου μπορεί να διασφαλίσει τη μηδενική γωνία επαφής του με το υγρό.



Εικόνα [5]: Μέτρηση επιφανειακής τάσης με τη μέθοδο Du Noüy ring

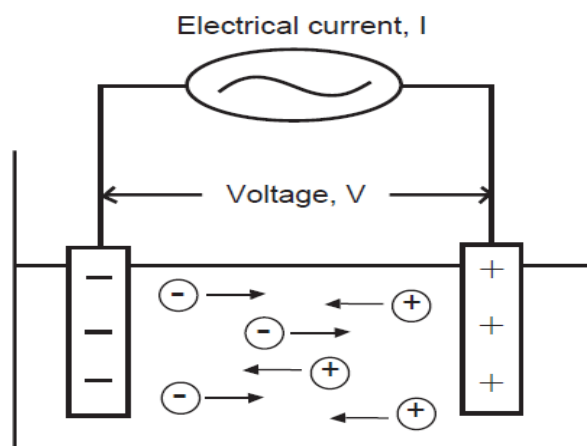
Ο τύπος καθετήρα που χρησιμοποιείται κυρίως είναι ο Du Noüy ring. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί την αλληλεπίδραση ενός δακτυλίου από λευκόχρυσο με την επιφάνεια του ρευστού. Ο δακτύλιος βυθίζεται πιο κάτω από την διεπιφάνεια του ρευστού. Μετά από τη βύθιση του, ο δακτύλιος ανασηκώνεται δημιουργώντας ένα μηνίσκο από το ρευστό. Τελικά ο μηνίσκος θα αποσπαστεί από το δακτύλιο. Πριν από αυτό όμως, η ένταση (συνεπώς και η δύναμη που ασκείται) του μηνίσκου θα διέλθει από την μέγιστη τιμή και θα αρχίσει να πέφτει πριν την απόσπαση του μηνίσκου.

Ο υπολογισμός της επιφανειακής τάσης μέσω αυτής της μεθόδου βασίζεται στην μέτρηση της μέγιστης δύναμης. Το βάθος της βύθισης του δακτυλίου και το επίπεδο στο οποίο ο δακτύλιος θα ανασηκωθεί όταν θα φτάσει στη μέγιστη έλξη σχετίζονται άμεσα με την τεχνική.

1.6.2 Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Αγωγιμότητα είναι η ικανότητα ενός διαλύματος να διαπεράσει ένα ηλεκτρικό ρεύμα. στα διαλύματα το ρεύμα διεξάγεται από τα ανιόντα και τα κατιόντα που φέρονται από τα ηλεκτρόνια. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός διαλύματος εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως τη συγκέντρωση, την κινητικότητα και το σθένος των ιόντων καθώς και τη θερμοκρασία. Όλες οι ουσίες κατέχουν ένα βαθμό αγωγιμότητας. Στα υδατικά διαλύματα το επίπεδο της ιοντικής δύναμης, διαφέρει από την χαμηλή αγωγιμότητα του καθαρού νερού στην υψηλή των συμπυκνωμένων χημικών ουσιών.

Η αγωγιμότητα μπορεί να μετρηθεί με την εφαρμογή ενός εναλλασσόμενου ρεύματος σε δύο ηλεκτρόδια τα οποία έχουν βυθιστεί σε ένα διάλυμα και να μετρήσει το δυναμικό (V). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τα κατιόντα μεταφέρονται στο αρνητικό ηλεκτρόδιο, ενώ τα ανιόντα στο θετικό ηλεκτρόδιο, και έτσι το διάλυμα λειτουργεί σαν ηλεκτρικός αγωγός.



Εικόνα [6]: Μεταφορά των ιόντων στο διάλυμα

1.6.3 Ρεολογία

Στην βιομηχανία των τροφίμων χρειάζεται να γίνονται μετρήσεις για τις φυσικές ιδιότητες που σχετίζονται με την υφή τους. Το ιξώδες (viscosity) είναι ίσως η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα ρεολογικής συμπεριφοράς ενός ρευστού ή ημίρρευστου προϊόντος. Η φυσική του έννοια είναι η αντίσταση των ρευστών στη ροή, αποτελεί, δηλαδή, το μέγεθος της εσωτερικής τριβής των μορίων των ρευστών. Το ιξώδες (μ) συνήθως χαρακτηρίζεται ως μέγεθος αντίστροφο του ποιοτικού μεγέθους της *ρευστότητας* ($\mu=1/\rho$)

Οι ρεολογικές ιδιότητες πρέπει να θεωρούνται ένα υποσύνολο των ιδιοτήτων της υφής των τροφίμων, για το λόγο του ότι η έννοια της υφής περιλαμβάνει παράγοντες πέρα από τις ρεολογικές ιδιότητες. (Daubert, & Foegeding, 2010).

Η επιστήμη της ρεολογίας αφορά τη ροή και την παραμόρφωση της ύλης και προσπαθεί να προσδιορίσει τη σχέση μεταξύ της τάσης που εφαρμόζεται σε ένα υλικό και της παραμόρφωσης ή της ροής που αυτή δημιουργεί. Η τάση (stress) και η παραμόρφωση (strain) είναι οι βασικές έννοιες της ρεολογίας. Τάση είναι η μέτρηση της δύναμης ανά μονάδα επιφάνειας και μετρείται σε Pascal (Pa). Η κατεύθυνση της δύναμης σε σχέση με την επιφάνεια στην οποία ασκείται καθορίζει τον τύπο της τάσης. Όταν οι δυνάμεις δρουν εφαπτομενικά προς την επιφάνεια η τάση ονομάζεται διατμητική. Ο τύπος τη παραμόρφωσης που ασκείται, καθορίζεται από την κατεύθυνση της εφαρμοζόμενης τάσης, σε σχέση με την επιφάνεια του υλικού (Munizaga, Barbosa-Canovas, 2005). Για τα ιδανικά στερεά, τα υλικά υπακούν στο νόμο του Hook, ενώ τα ιδανικά ρευστά υπακούν τις αρχές του Newton και η συνεχής αναλογικότητα συνήθως αναφέρεται ως ιξωδομετρία, ορισμένη σαν εσωτερική αντίσταση στη ροή.

Οι ρεολογικές μετρήσεις, στη βιομηχανία τροφίμων, χρησιμοποιούνται ως εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των ακατέργαστων υλικών πριν την επεξεργασία, στα ενδιάμεσα προϊόντα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας αλλά και για τα τελειοποιημένα τρόφιμα. Υπάρχουν πολλές προσεγγίσεις ως προς τη διεξαγωγή του χαρακτηρισμού των ρεολογικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, και η τεχνική που θα επιλεγεί εξαρτάται κατά πολύ από το προϊόν και τα λειτουργικά του χαρακτηριστικά που πρέπει να αναλυθούν (Daubert, & Foegeding, 2010).

1.6.4 Ρευστά ανάλογα με την ιξώδη συμπεριφορά

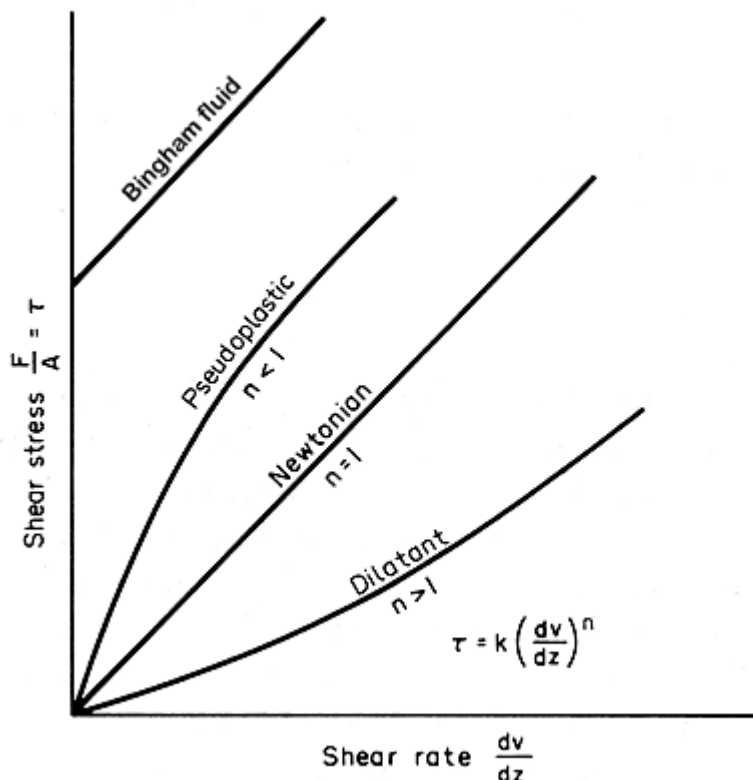
Νευτώνεια ρευστά

Είναι τα ρευστά όπου το ιξώδες τους εξαρτάται από το ρυθμό παραμόρφωσης του γραμμικά. Το ιξώδες είναι ανεξάρτητο από το ρυθμό διάτμησης του ρευστού (Rao et al, 2005). Νευτώνεια συμπεριφορά παρουσιάζουν τα αέρια, τα περισσότερα υγρά και τα διαλύματα ουσιών με μικρό μοριακό βάρος (Παπαϊωάννου Θ.Α, 2002)

Μη Νευτώνεια ρευστά

Τα ρευστά όπου η εξάρτηση της ιξώδους συμπεριφοράς από το ρυθμό παραμόρφωσης τους είναι μη γραμμική ονομάζονται μη νευτώνεια. Έτσι η καμπύλη ροής τους δεν είναι ευθεία γραμμή και η κλίση της δηλαδή το ιξώδες τους, εξαρτάται από την πίεση και τη θερμοκρασία, αλλά και από τον ρυθμό παραμόρφωσής τους.

Ανεξάρτητα από τον χρόνο τα μη νευτώνεια ρευστά διακρίνονται σε ψευδοπλαστικά (shear-thinning) όπου το ιξώδες μειώνεται με και σε διασταλτικά (shear thickening) όπου το ιξώδες αυξάνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης.



Εικόνα[7]: Ρεολογικά διαγράμματα ρευστών

Όταν τα μη νευτώνεια ρευστά εξαρτώνται από τον χρόνο διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Τα θιξοτροπικά όπου για ένα συγκεκριμένο ρυθμό διάτμησης, όπου το ιξώδες μειώνεται με το χρόνο και τα ρεοπηκτικά των οποίων το ιξώδες αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου.

1.6.5 Περιτροφική ιξωδομετρία

Για τα ρευστά η βασική λειτουργία για τις ρεολογικές μετρήσεις στην βιομηχανία τροφίμων είναι η περιστροφική ιξωδομετρία η οποία μπορεί να προσφέρει βασικές πληροφορίες. Η περιστροφική ιξωδομετρία περιέχει ένα αναπόσπαστο κομμάτι (σε γεωμετρικό σχήμα) το οποίο έρχεται σε επαφή με το δείγμα και μέσω κάποιων μηχανικών περιστροφικών μέσων το ρευστό θα υποστεί διάτμηση. Οι βασικές αρχές που δημιουργήθηκαν για την ανάπτυξη των καταστατικών εξισώσεων (σχέσεις μεταξύ ρυθμού και τιμής διάτμησης) είναι οι εξής:

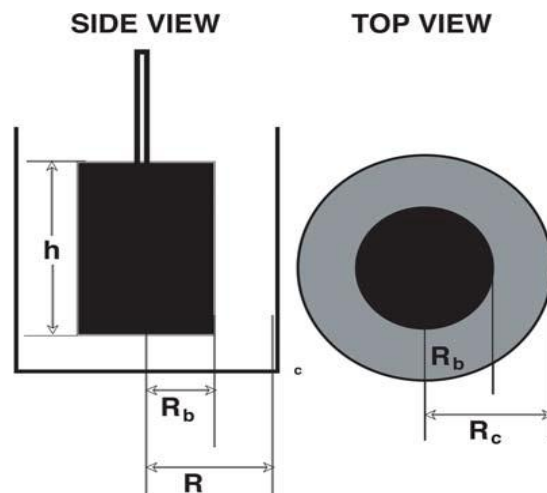
- Η στρωτή ροή του ρευστού, όπου έχει να κάνει με τον εξορθολογισμό του ρευστού.
- Η σταθερή κατάσταση, όπου είναι συνώνυμο με τις επιδράσεις που είναι ανεξάρτητες του χρόνου
- Η μη ολίσθηση (no slip) στις διεπιφάνειες στερεού υγρού. Δηλαδή όταν το αναπόσπαστο κομμάτι ελέγχου καταβυθιστεί στο ρευστό θα πρέπει μαζί με τα τοιχία του δοχείου που περιέχει το δείγμα να λειτουργούν σαν όρια για το ρευστό.

Ομόκεντροι κύλινδροι

Αυτή η ρεολογική σύνδεση αποτελείται από ένα κυλινδρικού σχήματος αναπόσπαστο κομμάτι, που συνήθως ονομάζεται bob με συγκεκριμένο μέγεθος R_b , το οποίο αναρτάται από μια συσκευή μέτρησης ροπής, η οποία καταβυθίζεται σε ένα ρευστό δείγμα το οποίο περιέχεται σε έναν ελαφρώς μεγαλύτερο κύλινδρο ο οποίος αναφέρεται ως cup με ακτίνα R_c . Για να υπολογιστεί η παραμόρφωση θα πρέπει να είναι γνωστή η γεωμετρία του οργάνου που καταβυθίζεται στο ρευστό δηλαδή το ύψος και η ακτίνα καθώς και η απόκριση ροπής του ρευστού στον αισθητήρα μέτρησης (Daubert, & Foegeding, 2003).

Οι ομόκεντροι κύλινδροι χρησιμοποιούνται συνήθως για τον έλεγχο ρευστών χαμηλού ιξώδους.

Υλικά που είναι κατάλληλα για μέτρηση με ομόκεντρους κυλίνδρους, είναι τα πολυμερή χαμηλής συγκέντρωσης, τα διαλύματα, τα έλαια, διάφορα φαρμακευτικά παρασκευάσματα, αφροί, και προϊόντα τροφίμων όπως χυμοί, γαλακτοκομικά προϊόντα όπως γάλα και κρέμα, σάλτσες ζυμαρικών και διάφορα ντρέσινγκς (DHR Series Getting Started Guide)



Εικόνα [8]: Γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων

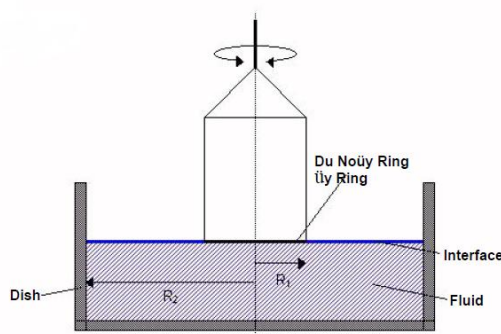
1.6.5 Επιφανειακή ρεολογία

Η ρεολογική συμπεριφορά ενός υλικού μπορεί να είναι διαφορετική στην επιφάνεια σε σχέση με όλο τον όγκο του. Η επιφανειακή ρεολογία είναι ένα πεδίο το οποίο μελετά τους μετασχηματισμούς που εμφανίζονται στις διεπιφάνειες των ρευστών (Steffe , 1996). Έτσι είναι ένα δυναμικό εργαλείο παρατήρησης των ενεργειών σε μια διεπιφάνεια. Σε ένα κολλοειδές διαφασικό σύστημα για παράδειγμα, η σταθερότητά του έχει να κάνει με τον σχηματισμό ενός σταθερού διεπιφανειακού στρώματος. Τα επιφανειακά χαρακτηριστικά δεν έχουν να κάνουν μόνο με τη σταθερότητα του ρευστού, του αφρού ή κάποιου γαλακτώματος, αλλά μπορούν να επηρεάσουν και τις τεχνολογικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κάθε φορά, όπως την γαλακτοματοποίηση, την ηλεκτρονηματοποίηση, τη μεταφορά μάζας κ.α.

Η επιφανειακή ρεολογία μελετά την απόκριση της επιφάνειας του ρευστού στην διάτμηση.

Τεχνολογία επιφανειακής ρεολογίας

Η μέτρηση της επιφανειακής ρεολογίας γίνεται με το σύστημα Double Wall Ring (DWR) και το Double Wall Douy Ring (DDR) όπου το σύστημα δίνει πληροφορίες για το ποσοτικό ιξώδες και την ιξωδοελαστική συμπεριφορά των ρευστών. Το DDR έχει κατασκευαστεί από λευκόχρυσο και ιρίδιο και χρησιμοποιείται κυρίως για να ορίσει τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες της διεπιφάνειας μεταξύ του ρευστού και του αέρα. Το σύστημα μέτρησης περιέχει ένα λεπτό συρμάτινο δακτύλιο και μια πλατφόρμα κατασκευασμένη από Duran.



Εικόνα [9]: Σύστημα μέτρησης με Du Nouy Ring

Το κυκλικό τμήμα του δακτυλίου επιτρέπει τον σχηματισμό μηνίσκου ανάμεσα στην επιφάνεια και τη γεωμετρία, δημιουργώντας έτσι ένα μικρό σφάλμα ανάμεσα στα δεδομένα.

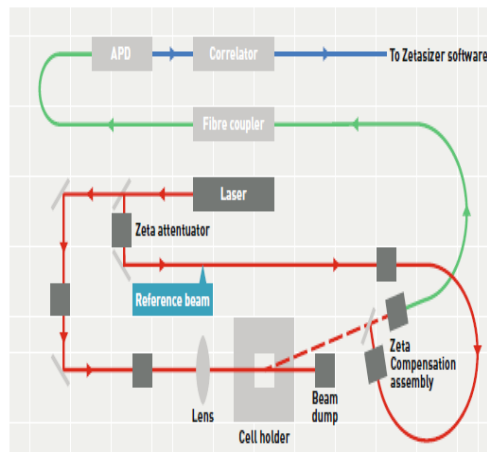
1.6.5 ζ-δυναμικό

Στα κολλοειδή συστήματα, το ζ δυναμικό είναι η διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού κατά μήκος του στρώματος των ιόντων γύρω από ένα φορτισμένο ιόν. Το φορτίο που αποκτάται από ένα σωματίδιο ή ένα μόριο μέσα σε ένα μέσο είναι το ζ δυναμικό του και προκύπτει από το φορτίο της επιφάνειας καθώς και από τη συγκέντρωση και τον τύπο των ιόντων στο διάλυμα. Αφού τα σωματίδια με παρόμοια φορτία θα απωθήσουν το ένα το άλλο, αυτά με τα μεγαλύτερα φορτία θα αντισταθούν στην κροκίδωση και στη συσσωμάτωση για μεγαλύτερη περίοδο κάνοντας έτσι τα δείγματα πιο σταθερά. Αυτό σημαίνει ότι η σταθερότητα μπορεί να μετατραπεί αλλάζοντας το pH την συγκέντρωση και τον τύπο των ιόντων. Το ζ δυναμικό είναι μια ηλεκτρική ιδιότητα που διαθέτει κάθε σωματίδιο που βρίσκεται σε διασπορά.

Αποτυπώνει την ηλεκτροστατική συνεισφορά στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων και είναι μία από τις παραμέτρους που ελέγχονται για τη σταθερότητα ενός διαλύματος. Το ζ δυναμικό των σωματιδίων ενός διαλύματος, είναι μια ενδεικτική παράμετρος για πολλές ιδιότητες του, όπως το ιξώδες, ο διαχωρισμός φάσεων κλπ.

Το φορτίο του ζ δυναμικού των σωματιδίων και των μορίων καθορίζεται από τη μέτρηση της ταχύτητας τους όσο κινούνται προς την ηλεκτροφόρηση. Τα σωματίδια και τα μόρια που έχουν κάποιο ζ δυναμικό, μετακινούνται προς ένα ηλεκτρόδιο εφόσον εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται είναι ανάλογη με τη δύναμη του πεδίου και με την τιμή του ζ δυναμικού τους.

Σε περίπτωση που είναι γνωστή η δύναμη του πεδίου, μπορεί να μετρηθεί η ταχύτητα της μετακίνησης τους, με τη χρήση της μεθόδου laser Doppler ηλεκτροφόρησης, και στη συνέχεια με την εφαρμογή των καθιερωμένων θεωριών να υπολογιστεί το ζ δυναμικό. Για να βελτιωθεί η ακρίβεια των μετρήσεων χρησιμοποιείται μια τεχνική όπου ονομάζεται PALS (phase analysis light scattering). Ωστόσο η τεχνική αυτή μπορεί να παρέχει μόνο μέσες τιμές ζ δυναμικού, έτσι αναπτύχθηκε η τεχνική M3-PALS όπου καθορίζει τη μέση τιμή αλλά και την κατανομή κατά τη διάρκεια της ίδιας μέτρησης.



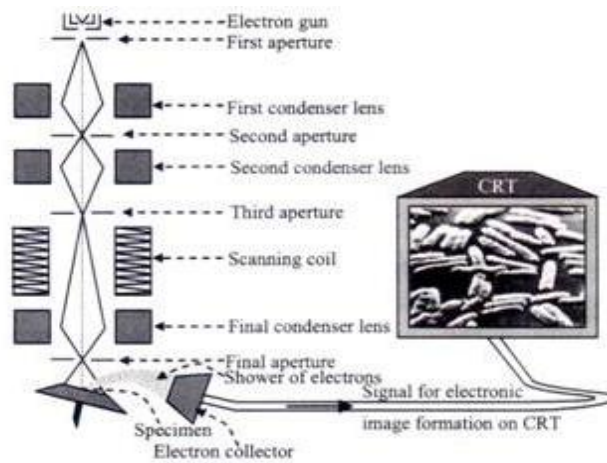
Εικόνα [10]: Διάγραμμα τρόπου λειτουργίας Zeta Sizer

1.6.6 SEM

Η μικροσκοπία ηλεκτρονικής σάρωσης (Scanning electron microscope-SEM) χρησιμοποιεί μια λεπτή δέσμη ηλεκτρονίων ώστε να παράγει μια υψηλά αναλυτική εικόνα του δείγματος.

Οι εικόνες SEM έχουν τρισδιάστατη εμφάνιση, πράγμα πολύ χρήσιμο όταν πρόκειται να εξεταστεί η επιφανειακή δομή ενός δείγματος. (Adam de Gree, 2015).

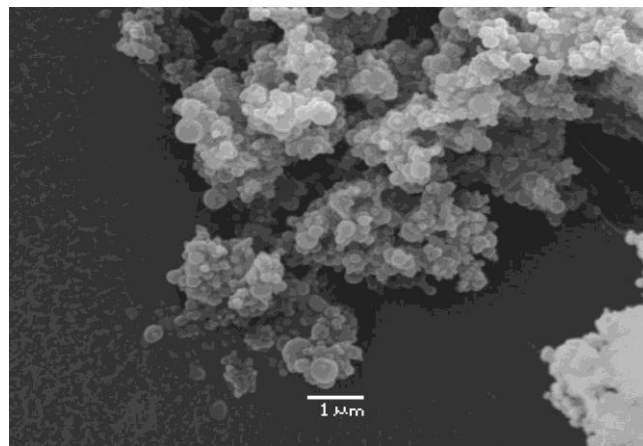
Το δείγμα εκτίθεται στη δέσμη ηλεκτρονίων που προέρχονται από ένα ηλεκτρονιοβόλο, η οποία σαρώνει όλη την επιφάνεια του δείγματος. Αυτό προκαλεί την απελευθέρωση και τον καταιγισμό δευτερευόντων ηλεκτρονίων και άλλων τύπων ακτινοβολιών από την επιφάνεια του δείγματος. Η ένταση των δευτερευόντων ηλεκτρονίων εξαρτάται από το σχήμα και την χημική σύσταση του αντικειμένου που ακτινοβολείται. Αυτά τα ηλεκτρόνια συλλέγονται από έναν ανιχνευτή, ο οποίος παράγει ηλεκτρονικά σήματα.



Εικόνα [11]:Μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης

Αυτά τα σήματα σαρώνονται με τον τρόπο που λειτουργεί ένα σύστημα τηλεόρασης για να παράγουν μια εικόνα στο σωλήνα καθόδου ακτίνων (cathode ray tube-CRT). Η εικόνα καταγράφεται μέσω της σύλληψής της από το CRT.

Η SEM συνήθως απαιτεί ένα θάλαμο κενού για να λειτουργήσει, καθώς η δέσμη ηλεκτρονίων δεν πρέπει να παρεμποδίζεται ενώ περνάει μέσα από το μικροσκόπιο. Μικρά σωματίδια μπορεί να παρεκκλίνουν τα ηλεκτρόνια πάνω στο δείγμα και να δημιουργήσουν σκοτεινά σημεία στα αποτελέσματα.



Εικόνα [12]: Απεικόνιση δείγματος σκόνης WPI από το SEM

Η διαδικασία θα λειτουργήσει μόνο αν το δείγμα είναι σωστά προετοιμασμένο. Τα μέταλλα είναι τα μόνα υλικά τα οποία δεν απαιτούν προετοιμασία, αφού είναι ήδη ηλεκτρικοί αγωγοί και ανταποκρίνονται όταν βομβαρδίζονται από τα ηλεκτρόνια. Ωστόσο, τα αμέταλλα υλικά, χρειάζεται να καλυφθούν με ένα επιχριστικό υλικό.

Τα επιχρίσματα παρέχουν στο δείγμα μια λεπτή στρώση ενός αγωγίμου υλικού, συνήθως χρυσού. Ο χρυσός αποκτείνεται μέσω της χρήσης ενός ηλεκτρικού πεδίου και αργό σε μορφή αερίου. Το ηλεκτρικό πεδίο εκτοπίζει ένα ηλεκτρόνιο από το αργό, με αποτέλεσμα την ιοντοανταλλαγή. Αυτά τα θετικά ιόντα έλκονται από το λεπτό φύλλο του χρυσού, το οποίο είναι φορτισμένο αρνητικά. Ενώ εγκαθίστανται στο χρυσό, τα ιόντα του αργού αποβάλλουν τα ιόντα του χρυσού, τα οποία πέφτουν πάνω στο δείγμα, καλύπτοντας το έτσι με μια λεπτή αγωγήμη επίστρωση.



α



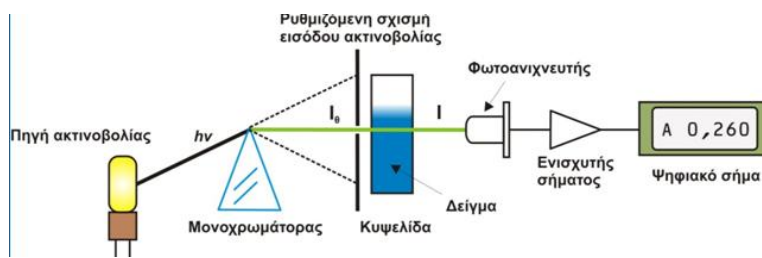
β

Εικόνα [13] : Διαδικασία επιχρύσωσης δειγμάτων (α), επιχρυσωμένα δείγματα (β)

1.6.7 Φασματοσκοπία

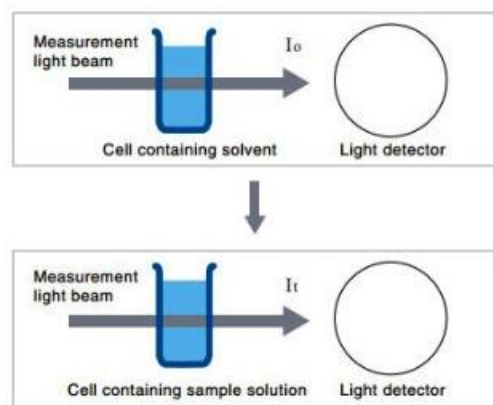
Το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ποσότητας φωτός όπου ένα δείγμα απορροφά. Η διαδικασία της μέτρησης με φασματοσκοπία στα διαλύματα, ξεκινάει με την τοποθέτηση του διαλύματος στο μονοπάτι μιας ακτίνας φωτός. Αφού η ακτίνα διαπεράσει την κυψελίδα, μετριέται η αρχική ένταση. Αργότερα παράγεται ένα διάλυμα το οποίο έχει διαλυθεί με το δείγμα και αυτό τοποθετείται ξανά στο μονοπάτι της ακτίνας φωτός. Έτσι μετριέται η τελική ένταση. Μέσω συγκεκριμένων εξισώσεων μπορεί να βρεθεί η διαπερατότητα ή η απορρόφηση που είναι και το ζητούμενο στα διαλύματα.

Αυτός ο τρόπος μέτρησης μειώνει την επιρροή της αντανάκλασης από την επιφάνεια της κυψελίδας και την απορρόφηση από το διάλυμα και διασφαλίζει ότι μετριέται μόνο η απορρόφηση λόγω του δείγματος.



Εικόνα [14]: Αρχή λειτουργίας φασματομέτρου

Τα κύρια μέρη ενός φασματοφωτόμετρου είναι, μια πηγή φωτός, ένα φασματόμετρο, ο θάλαμος που μπαίνει η κυψελίδα με το δείγμα και ένας ανιχνευτής.



Εικόνα[15]: Κύρια μέρη φασματοφωτόμετρου

1.7 Σκοπός της μελέτης

Έχουν γίνει πολλές μελέτες για να ελεγχθεί η σημασία των βιοενεργών συστατικών στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι κατεχίνες είναι μια ομάδα αντιοξειδωτικών πάνω στις οποίες έχουν γίνει πολλές έρευνες, βάσει των οποίων μελετάται ο μηχανισμός δράσης τους, οι αντιοξειδωτικές τους ικανότητες αλλά και οι αλληλεπιδράσεις τους με άλλες ενώσεις, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή λιπίδια.

Γενικά έχει αποδειχθεί πως τα βιοενεργά συστατικά όταν είναι ενσωματωμένα σε διάφορα μείγματα βιοπολυμερών μπορούν να έχουν καλύτερο ρυθμό απελευθέρωσης σε ένα μέσο, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Πολλές μελέτες έχουν αναπτυχθεί, παρουσιάζοντας διαφορετικούς τρόπους ενθυλάκωσης βιοενεργών συστατικών οι οποίες όμως πολλές φορές δεν φέρνουν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Η διαδικασία της ηλεκτρονηματοποίησης και του ηλεκτροψεκασμού είναι ιδανική για την παραγωγή ινών ή σωματιδίων για την ενθυλάκωση βιοενεργών συστατικών, εφόσον υπάρχουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις, αφού είναι μια διαδικασία που δε χρειάζεται τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών ή διαλυτών οι οποίοι είναι τοξικοί για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Οι πρωτεΐνες ορού και τα συμπυκνώματα τους παρουσιάζονται συχνά ως συστατικά ενσωμάτωσης βιοενεργών συστατικών λόγω των ιδιοτήτων τους. Επίσης έχει γίνει συνδυασμός πρωτεϊνών με φυτικούς πολυσακχαρίτες και τα αποτελέσματα ενθυλάκωσης αλλά και ελεγχόμενης απελευθέρωσης των βιοενεργών είναι αρκετά ενδιαφέροντα.

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος μελετάται τα τελευταία χρόνια ως προς τις ιδιότητές του, παρόλα αυτά δεν έχει μελετηθεί η ικανότητά της ως μέσο ενθυλάκωσης κατεχινών με τη μέθοδο της ηλεκτρονηματοποίησης ή του ηλεκτροψεκασμού.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να παρασκευαστούν συστήματα από πρωτεΐνες και βακτηριακή κυτταρίνη ώστε να ενθυλακωθεί η ECGG με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού.

Έγιναν ερευνητικές μελέτες πάνω:

- Στην αλληλεπίδραση των βιοπολυμερών μέσω μετρήσεων των ιδιοτήτων των μιγμάτων αλλά και
- Στην ικανότητά τους να ενσωματώσουν την ECGG και στη συνέχεια να την απελευθερώσουν με ελεγχόμενο ρυθμό σε διάφορες συνθήκες.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

- Πρωτεΐνη ορρού γάλακτος (WPI), Lacordan DI-9224 (Arla Foods Ingredients, Ambs-Denmark)
- Βακτηριακή κυτταρίνη
- Απιονισμένο νερό
- Επιγαλοκατεχίνη του γαλικού εστέρα (Epigallocatehin gallate (-)EGCG), TCI,Japan
- Οσμωτικές μεμβράνες, Spectra Por (Spectrum Labs, Netherlands)
- Tween 20, Πολυσορβικό,. (Fisher Scientific, St. Louis, USA)
- Θευκό οξύ (H_2SO_4)
- Ιωδιούχο νάτριο (NaI)
- Βρωμιούχο κάλλιο (KBr)
- Βρωμιούχο νάτριο (NaBr)
- Οξικό κάλλιο (KCH_3COO)
- Κιτρικό οξύ
- Νιτραζίδιο
- Κιτρικό Νάτριο
- Κιτρικό άλας
- Φωσφορικό νάτριο
- Πιπέττες Pasteur
- Σύριγγες των 5mL

2.2 Όργανα

- Υδατόλουτρο, Memmert, Germany
- Όργανο μέτρησης pH, Hanna HI 98150. GLP pH/ORP Meter, Portugal
- Όργανο μέτρησης ηλεκτρικής αγωγιμότητας, Lovibond Water Testing Tintometer Group (Sensodirect Con110),
- Φυγόκεντρος, (Ecospin, Sorvall Instruments)
- Όργανο μέτρησης επιφανειακής τάσης, KSV Sigma 701 tensiometer (KSV Instruments Ltd., Finland)
- Αναλυτής σκέδασης φωτός, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK
- Φασματοφωτόμετρο, Spectrometer UV-1800, Shimadzu, North America
- Μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης, JEOL JSM 6360, USA

- Ρεόμετρο, Discovery HR-3, TA Instruments, New Castle, DE, USA
 - Όργανο electrospinning-electrospraying, Fluidnatek LE-10 (BioInicia S.L., Valencia, Spain)
- Όλα τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη Sigma-Aldrich

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Komagataibacter sucrofermentans* (DSM 15973). Οι καλλιέργειες έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα όπως περιγράφεται από τους Hestrin & Schramm (1954). Το θρεπτικό υπόστρωμα περιέχει μια πηγή άνθρακα (20 g/L), εκχύλισμα ζύμης (5 g/l), πεπτόνη (5 g/L), κιτρικό οξύ (1.15 g/L), και Na₂HPO₄ (2.7 g/L). Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται στους 30°C ενώ ταυτόχρονα είναι υπό ανάδευση (100-120 rpm) για δύο ημέρες μέσα στο θρεπτικό μέσο που περιγράφηκε. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού έγινε σε κωνικές φιάλες όγκου 250 ml, οι οποίες περιείχαν 50 ml θρεπτικού μέσου και εμβολιάστηκαν με 10% v/v μικροοργανισμού. Οι φιάλες επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30°C χωρίς να αναδεύονται, για διάστημα 15 ημερών.

Με το πέρας των 15 ημερών η βακτηριακή κυτταρίνη που εμφανίστηκε σαν στρώμα στο επάνω μέρος της φιάλης, αφαιρέθηκε και ξεπλύθηκε για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα από το θρεπτικό μέσο. Για να απομακρυνθούν τα βακτηριακά κύτταρα προστέθηκε NaOH με συγκέντρωση 2 M και στη συνέχεια ξεπλύθηκε με άφθονο νερό για να αποκτήσει ουδέτερο pH.

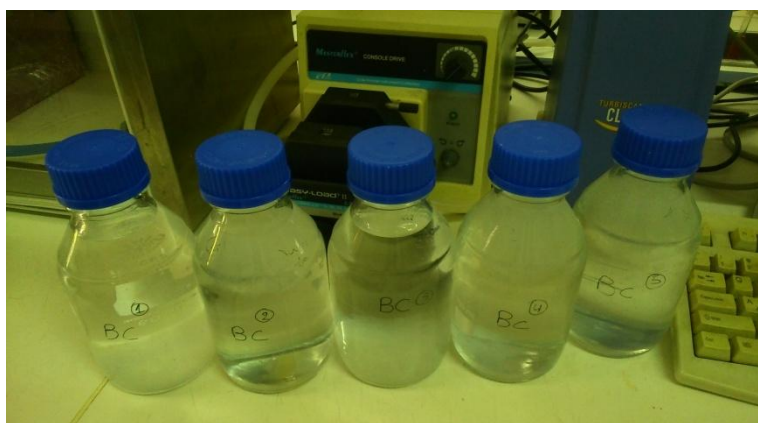
Επεξεργασία βακτηριακής κυτταρίνης

Μετά τον καθαρισμό τους, οι μεμβράνες της βακτηριακής κυτταρίνης κόπηκαν σε μικρά κομμάτια και αναμείχθηκαν με απιονισμένο νερό, ώστε να παραχθούν διαλύματα με συγκέντρωση 5% κ.β. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση των διαλυμάτων της βακτηριακής κυτταρίνης με αναδευτήρα υψηλής διατημητικής τάσης (13500 rpm, Ultra Turrax T25, IKA, Germany) για 20 λεπτά, μέχρι να ομογενοποιηθούν.

Όξινη υδρόλυση

Λόγω του μεγάλου της ιξώδους, η βακτηριακή κυτταρίνη έπρεπε να υδρολυθεί. Η όξινη υδρόλυση των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης έγινε με θειικό οξύ 60% κ.β. και νερό (50 g/L). Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε φιάλες οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, όπου παρέμειναν εκεί υπό ανάδευση σε οριζόντια συνεχόμενη κίνηση για 72 ώρες στους 60°C.

Λόγω της προσθήκης του θειικού οξέος, οι τιμές του pH του διαλύματος της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν πολύ χαμηλές. Έτσι, τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο υγρό αντικαταστάθηκε με ίση ακριβώς ποσότητα νερού. Στη συνέχεια τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε οσμωτικές μεμβράνες οι οποίες επίσης τοποθετήθηκαν σε απιονισμένο. Λόγω της οσμωτικής πίεσης η όξινη φάση του διαλύματος περνάει έξω από τη μεμβράνη ενώ το νερό διαπερνά τη μεμβράνη και εισέρχεται στο εσωτερικό της με συνέπεια να αυξάνει το pH του διαλύματος. Το τελικό pH των διαλυμάτων ύστερα από όλες αυτές τις διαδικασίες έφτασε στο 2,6.



Εικόνα[16]: Φιαλίδια με BC κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης

2.3.2 Παρασκευή διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης

Για να παρασκευαστούν τα διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης που προορίζονταν για μελέτη έγιναν συγκεκριμένες αραιώσεις και συμπυκνώσεις των αρχικών διαλυμάτων. Η συγκέντρωση του διαλύματος της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν αρχικά 5% και τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν συγκεντρώσεις 1%, 2%, 4 %, 8% και 16 %.

2.4 1^ο Πειραματικό στάδιο

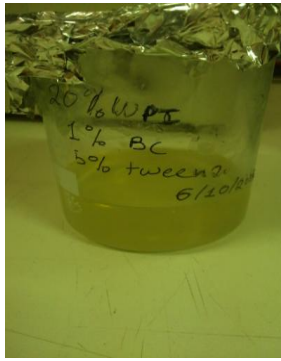
2.4.1 Παρασκευή διαλυμάτων πρωτεΐνης με βακτηριακή κυτταρίνη

Για τα διαλύματα πρωτεΐνης με βακτηριακή κυτταρίνη (Bacterial Cellulose –BC) χρησιμοποιήθηκε το υπερσυμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού με 97% ποσοστό πρωτεΐνης (Whey Protein Isolate-WPI). Επίσης σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε ποσότητα του επιφανειοενεργού Tween 20 ώστε να μειωθεί η επιφανειακή τάση του τελικού διαλύματος. Για να παρασκευαστούν αυτά τα διαλύματα οι ποσότητες της WPI και του Tween διαλύθηκαν σε ακριβείς ποσότητες ώστε να είναι αντίστοιχες με αυτές της BC. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν ήταν διάφοροι συνδυασμοί των ποσοτήτων της WPI, της BC και του tween. Οι ποσότητες της WPI κυμαίνονταν από 10-30 % κβ WPI ενώ της BC 1-16% κβ BC ενώ η ποσότητα του tween ήταν σταθερή σε όλα τα διαλύματα στο 5%. Έτσι παρασκευάστηκαν 15 δείγματα προς μέτρηση με όλες τις πιθανές ποσότητες των WPI και BC.

Ουσιαστικά όταν αναφερόμαστε στην ποσότητα της BC στα διαλύματα εννοείται πως είναι το αραιωμένο ή το συμπυκνωμένο διάλυμα της BC (stock BC) το οποίο είναι διαφορετικό από τις αρχικές ποσότητες που έχουν αναφερθεί. Τα τελικά διαλύματα ήταν 100 ml. Η ποσότητα του Tween ήταν 5 g σε όλα τα δείγματα.

Πίνακας [1]: Συνδυασμοί ποσοτήτων stock BC και WPI.

BC/WPI	10%	20%	40%
1%	85ml/10g	75ml/20g	55ml/40g
2%	85ml/10g	75ml/20g	55ml/40g
4%	85ml/10g	75ml/20g	55ml/40g
8%	85ml/10g	75ml/20g	55ml/40g
16%	85ml/10g	75ml/20g	55ml/40g



Εικόνα[17]: Δείγμα διαλύματος που προορίζεται για τον ηλεκτροψεκασμό.

Για κάθε δείγμα, η ζύγιση έγινε σε ζυγό ακριβείας όπου σε ποτήρι ζέσεως αρχικά ζυγίστηκε η σκόνη της WPI και στη συνέχεια προστέθηκαν οι ανάλογες ποσότητες του stock BC και του Tween που είναι σε υγρή μορφή. Το κάθε διάλυμα παρέμεινε σε ανάδευση για 30 λεπτά. Ένα μέρος από τα διαλύματα προορίζονταν για τις διάφορες μετρήσεις όπως την ηλεκτρική αγωγιμότητα, την επιφανειακή τάση, το pH και τη ρεολογική συμπεριφορά και ένα μέρος για την διαδικασία του Electrospraying.

2.4.2 Μέτρηση Ηλεκτρικής αγωγιμότητας

Η μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των διαλυμάτων έγινε με αγωγιμόμετρο Lovibond Water Testing Tintometer Group (Sensodirect Con110). Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκαν 35 mL διαλύματος και καταβυθίστηκε σε αυτό η ράβδος του αγωγιμόμετρου. Για κάθε διάλυμα έγιναν τρεις μετρήσεις. Οι τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των διαλυμάτων κυμαίνονταν από 1-3.17 mS. Επίσης έγιναν μετρήσεις της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του stock BC αλλά και του διαλύματος stock BC με το Tween 20. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία 25°C.

2.4.3 Μέτρηση Επιφανειακής τάσης

Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης έγινε με τη χρήση της μεθόδου Du Nouy χρησιμοποιώντας το τενσιόμετρο KSV Sigma 701 tensiometer (KSV Instruments Ltd., Finland). Σε ειδικό ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκαν περίπου 30ml διαλύματος και αυτό τοποθετήθηκε στο όργανο ώστε να ξεκινήσει η μέτρηση της επιφανειακής τάσης. Οι μετρήσεις έγιναν στους 25°C. Λόγω της ιδιαίτερης ευαισθησίας του οργάνου και της μέτρησης βασική προϋπόθεση είναι το διάλυμα να βρίσκεται σε απόλυτη ακινησία. Έτσι θα πρέπει να μείνει σταθερό για τουλάχιστον 10 λεπτά πριν την έναρξη της διαδικασίας της μέτρησης της επιφανειακής τάσης.

Ακόμα μια προϋπόθεση για να είναι σωστή η μέτρηση της επιφανειακής τάσης είναι η απουσία φυσαλίδων από το διάλυμα και αυτό γιατί ο σχηματισμός του μηνίσκου μεταξύ του Du Nouy ring και της επιφάνειας του διαλύματος δε θα γίνει σωστά και θα παραποιηθούν τα αποτελέσματα.

2.4.4 Ρεολογικές μετρήσεις

Οι ρεολογικές μετρήσεις των διαλυμάτων έγιναν με ρεόμετρο (Discovery HR-3, TA Instruments, New Castle, DE, USA) εξοπλισμένο με τη γεωμετρία των ομόκεντρων κυλίνδρων (κάτω γεωμετρία 30 mm διάμετρος, άνω γεωμετρία 28 mm διάμετρος). Η θερμοκρασία που έγιναν οι μετρήσεις του ιξώδους ήταν στους 25°C η οποία έμενε σταθερή μέσω ενός υδατόλουτρου που ήταν συνδεδεμένο με το ρεόμετρο. Το φαινόμενο ιξώδες καθορίστηκε σε σχέση με το επιβαλλόμενο ρυθμό διάτμησης με τιμές από 0,01 έως 100 s⁻¹.

Ο χρόνος της μέτρησης ήταν 10 λεπτά και μέσα σε αυτόν τον χρόνο σημειώθηκαν 10 σημεία που εμφανίζονται στο τελικό διάγραμμα της ρεολογικής συμπεριφοράς των διαλυμάτων. Το κενό μεταξύ των δύο κυλίνδρων ήταν καθορισμένο στα 0,1 cm. Το δείγμα προς μέτρηση μέσα στον κύλινδρο ήταν 15 g και για κάθε διάλυμα γίνονταν δύο μετρήσεις. Για την επαναληπτική μέτρηση το δείγμα αντικαθιστούνταν λόγω του ότι οι ιδιότητες του δείγματος τροποποιούνταν μετά την διατμητική τάση που του επιβαλλόταν από τους κυλίνδρους.



Εικόνα[18]: Γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων

Το ίδιο ρεόμετρο χρησιμοποιήθηκε και για να γίνουν οι μετρήσεις του επιφανειακού ιξώδους των διαλυμάτων. Η γεωμετρία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Du Nouy ring (διάμετρος εσωτερικού κάτω γεωμετρίας 12,7 mm, εξωτερική διάμετρος κάτω γεωμετρίας 25,6 mm, εσωτερική διάμετρος δακτυλίου 19 mm, εξωτερική διάμετρος δακτυλίου 25,4, όγκος 4 ml). Ο ρυθμός διάτμησης ρυθμίστηκε μεταξύ 0,1 και 100 s⁻¹.

Το σύστημα τοποθετήθηκε έτσι ώστε ο δακτύλιος να είναι στην επιφάνεια του διαλύματος και το δείγμα ήταν εκτεθειμένο στην περιβάλλουσα ατμόσφαιρα.

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της μέτρησης του επιφανειακού ιξώδους το δείγμα ήταν σε ηρεμία μέσα στο σύστημα για 3 λεπτά. Για κάθε διάλυμα γίνονταν επίσης δυο μετρήσεις και για κάθε μέτρηση σημειώθηκαν 10 σημεία.



Εικόνα[19]: Γεωμετρία Du Nouy ring

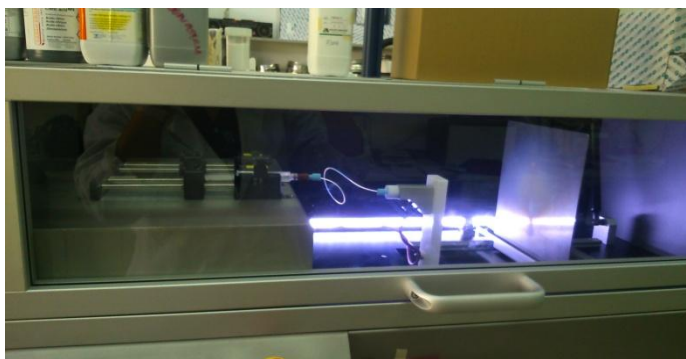
2.4.5 Ηλεκτρονηματοποίηση

Η συσκευή για τη διαδικασία της ηλεκτρονηματοποίησης (electrospinning) που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Fluidnatek LE-10 (BioInicia S.L., Valencia, Spain). Η συσκευή μπορεί να παράγει ένα εύρος ηλεκτρικού πεδίου από 0 έως 30 kV. Οι συνθήκες αυτές έχουν να κάνουν με τον ρυθμό ροής του διαλύματος στο ακροφύσιο του συστήματος και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου.

Οι τιμές του ρυθμού ροής αλλά και του ηλεκτρικού πεδίου γίνεται η διαδικασία του electrospinning εξαρτώνται από τις ιδιότητες του πολυμερούς όπως το ιξώδες, η επιφανειακή τάση ή το μοριακό βάρος κ.α αλλά και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος που γίνεται η διαδικασία. Η διαδικασία του electrospinning έγινε με σταθερό ρυθμό ροής μέσω μιας χαλύβδινης βελόνας με εσωτερική διάμετρο 0,7 mm. Η σύριγγα τοποθετήθηκε οριζοντίως σε μία ψηφιακά ελεγχόμενη αντλία, ενώ η βελόνα ήταν σε οριζόντια θέση έναντι ενός μεταλλικού συλλέκτη.

Τα διαλύματα εισήχθησαν σε πλαστική σύριγγα των 5 ml και ρυθμίστηκαν οι συνθήκες του ψεκασμού. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Οι συνθήκες του electrospinning βελτιστοποιήθηκαν και σταθεροποιήθηκαν στα 20-80 $\mu\text{l/h}$ για το ρυθμό ροής και 10-20 kV για το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται στο σύστημα. Μια άλλη παράμετρος που ρυθμίστηκε ήταν η απόσταση του ακροφύσιου με τον συλλέκτη του δείγματος που ήταν στα 13 cm.



Εικόνα [20]: Συσκευή Electrospinning

Για να θεωρηθεί η διαδικασία επιτυχής θα πρέπει κατά τη διάρκεια του Electrospinning να εμφανιστεί μια λεία λευκή σκιά στον συλλέκτη του συστήματος, όπου και αυτό θα είναι το τελικό ηλεκτρονηματοποιημένο δείγμα. Αυτό σημαίνει πως οι συνθήκες έχουν ρυθμιστεί σωστά και σχηματίζεται σωστά ο κώνος Taylor. Στις περιπτώσεις όμως που δε σχηματίζεται ο κώνος Taylor το δείγμα που ψεκάζεται στον συλλέκτη είναι ανομοιόμορφο και έχουν δημιουργηθεί φυσαλίδες ή ανομοιόμορφες περιοχές. Έτσι επαναπροσδιορίζονται οι τιμές του ρυθμού ροής και του ηλεκτρικού πεδίου μέχρι να δημιουργηθεί το βέλτιστο δείγμα.

Στο τέλος της διαδικασίας της ηλεκτρονηματοποίησης το δείγμα το οποίο ήταν σε μορφή σκόνης, συλλέχθηκε με προσοχή από τον συλλέκτη και μεταφέρθηκε σε τρυβλία τα οποία τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα. Βασική προϋπόθεση για να συλλεχθεί το δείγμα ήταν η επιφάνεια του στο συλλέκτη να είναι λεία και χωρίς ατέλειες.

Στα αποτελέσματα μετά από τον χαρακτηρισμό τους, τα δείγματα φάνηκαν να έχουν σφαιρική δομή και όχι ινώδη μορφή όπως αναμενόταν, έτσι η διαδικασία δεν ήταν η ηλεκτρονηματοποίηση (electrospinning) αλλά ο ηλεκτροψεκασμός (electrospraying). Οι δύο αυτές διαδικασίες είναι ίδιες, αλλά διαφέρουν ως προς το αποτέλεσμα στο συλλέκτη. Έτσι στο εξής η διαδικασία θα αναφέρεται ως ηλεκτροψεκασμός (electrospraying).

2.4.6 Μέτρηση ζ-δυναμικού

Οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού πραγματοποιήθηκαν με την συσκευή Dynamic Laser Light Scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK), στους 25°C. Το ζ-δυναμικό, αφού σχετίζεται με την ταχύτητα ηλεκτροφόρησης των σωματιδίων υπολογίστηκε από την ταχύτητα που μετρήθηκε μέσω της εξίσωσης Smoluchowski. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:100 έτσι ώστε να αποφευχθούν τα φαινόμενα της πολλαπλής σκέδασης. Οι μετρήσεις αναφέρθηκαν σαν το μέσο όρο των δύο διαφορετικών εγχύσεων, με πέντε διαφορετικές αναγνώσεις ανά έγχυση.

2.4.7 Μικροδομή και μέγεθος σωματιδίων

Η μικροδομή των σωματιδίων μετά των ηλεκτροψεκασμό ορίστηκε από το οπτικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL JSM 6360 σε μία επιταχυνόμενη τάση στα 20 kV και σε απόσταση σάρωσης στα 9-12 mm, το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ένα σύστημα εκπομπής εικόνας. Αρχικά τα δείγματα τα οποία ήταν σε μορφή σκόνης χρειάστηκε να επιμεταλλωθούν με ένα μείγμα χρυσού με παλλάδιο κάτω από συνθήκες κενού και μετά να εξεταστεί η δομή τους σε θερμοκρασία 25°C. Οι εικόνες που λήφθηκαν προέρχονταν από διάφορες περιοχές των δειγμάτων ώστε να υπάρχει μια πλήρης εικόνα για τη μικροδομή ολόκληρου του δείγματος. Για να μετρηθεί ο μέσος όρος του μεγέθους των σωματιδίων σε κάθε δείγμα έγινε επεξεργασία των εικόνων αυτών με το λογισμικό Image Pro όπου υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η διασπορά των διαμέτρων των σωματιδίων.

Μια άλλη μέθοδος μέτρησης του μεγέθους των σωματιδίων ήταν η ανάλυση μέσω του Dynamic Laser Light Scattering equipment (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Τα δείγματα που είναι σε μορφή σκόνης διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τα αποτελέσματα εμφανίζονταν σαν μέσες τιμές. Επίσης εκτιμήθηκε και ο δείκτης πολυδιασποράς πολυδιασπορά (PDI) μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$PDI = \frac{D_{90}-D_{10}}{D_{50}}$$

2.4.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Statgraphics Centurion XV (Statgraphics, Rockville, MD, USA) και εφαρμόστηκε το F test ώστε να γίνουν οι συγκρίσεις των μέσων τιμών των επιλεγμένων ιδιοτήτων σε επίπεδα εμπιστοσύνης στο 95%.

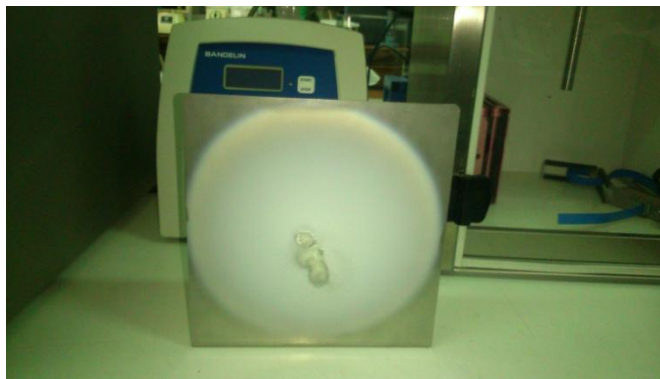
2.5 2^ο Πειραματικό στάδιο

Το δεύτερο πειραματικό στάδιο συμπεριελάμβανε την προσθήκη της EGCG στα πολυμερικά διαλύματα της WPI με την BC. Κατά την εξέταση των αποτελεσμάτων του πρώτου σταδίου, όπως θα αποδειχθεί και στα αποτελέσματα, το πιο κατάλληλο διάλυμα για βάσει των ιδιοτήτων του ήταν αυτό που περιείχε 20%κβ WPI και 8%κβ BC.

2.5.1 Ενσωμάτωση EGCG

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα που περιείχαν 20%κβ WPI, 8%κβ BC και 5% κβ Tween 20, με τον ίδιο τρόπο που παρασκευάστηκαν στο πρώτο πειραματικό στάδιο. Οι ποσότητες της EGCG προστέθηκαν στα διαλύματα ήταν 0,1 mg EGCG/ml διαλύματος και 0,2 mg EGCG/ml διαλύματος.

Αφού παρασκευάστηκαν τα πολυμερικά διαλύματα και έμειναν στην ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 λεπτά στη συνέχεια προστέθηκε και η ποσότητα της EGCG και η ανάδευση συνεχίστηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες για 30 λεπτά ακόμη. Όταν πλέον το διάλυμα ήταν ομοιογενές έγιναν οι ανάλογες προετοιμασίες για τη διαδικασία του Electrospraying. Ο ρυθμός ροής του διαλύματος στο σύστημα του ηλεκτροψεκασμού ήταν 42 ± 3 $\mu\text{L}/\text{h}$ και το ηλεκτρικό πεδίο ήταν ρυθμισμένο στα $19,4 \pm 2$ kV. Η απόσταση του ακροφύσιου από τον συλλέκτη ήταν στα 13 cm και η διαδικασία έγινε σε συνθήκες περιβάλλοντος.



Εικόνα [21]: Δείγμα μετά τη διαδικασία του Electrospraying

Αφού τελείωσε η διαδικασία του electrospray τα δείγματα συλλέχθηκαν σε τρυβλία τα οποία στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε ξηραντήρα μέχρι να γίνουν τα ανάλογα πειράματα.

Σε αυτό το στάδιο τα δείγματα που συγκεντρώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η απελευθέρωση της EGCG σε διάφορες συνθήκες στις οποίες τέθηκαν.

Οι συνθήκες αυτές ήταν η έκθεση των δειγμάτων σε διαφορετικές υγρασίες, σε διάφορα διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH, σε διαφορετικές θερμοκρασίες αλλά και η έκθεσή τους σε συνθήκες περιβάλλοντος. Η απελευθέρωση της EGCG ελέγχθηκε με μετρήσεις των διαλυμάτων σε φωτόμετρο όπου ουσιαστικά γινόταν μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων και μέσω κάποιων εξισώσεων βρέθηκε και το ποσοστό απελευθέρωσης της EGCG. Σε κάθε χρονική στιγμή έγιναν επίσης μετρήσεις στο μέγεθος (particle size) των σωματιδίων.

Για την εκτίμηση της απελευθέρωσης της EGCG στα διαλύματα των WPI και BC σε συνθήκες περιβάλλοντος, σε σχέση με τον χρόνο, γινόντουσαν μετρήσεις της απορρόφησης μέσω του φωτόμετρου UV κάθε 7 ημέρες μέχρι το πέρας της 45^{ης} όπου 1.5 mg σωματιδίων διαλύονταν σε 4ml απιονισμένου νερού. Για το ίδιο χρονικό διάστημα και με τον ίδιο ρυθμό έγιναν επίσης μετρήσεις για τη διάμετρο των σωματιδίων με το ζ-sizer, όπου 1 mg σωματιδίων διαλύθηκε σε 4 ml απιονισμένου νερού για κάθε μέτρηση.

Για τις ανάλογες μετρήσεις σε σχέση με τα διαφορετικά pH, παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων pH σε τιμές 3.6, 6 και 11. Έτσι παρασκευάστηκαν 50ml ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε pH και διαλύθηκαν σε αυτά 25 mg σωματιδίων. Το διάλυμα με pH 3 ήταν κιτρικό άλας (Citrate), αυτό με το pH 6 ήταν απιονισμένο νερό και το βασικό διάλυμα (pH 11) ήταν φωσφορικό νάτριο (Disodium Phosphate). Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος και οι μετρήσεις για την απελευθέρωση της EGCG και το μέγεθος των σωματιδίων έγιναν τη χρονική στιγμή που παρασκευάστηκαν, μετά από δύο ώρες μετά από 4 ώρες και στη συνέχεια κάθε 7 μέρες μέχρι την ολοκλήρωση της 45^{ης} ημέρας της αποθήκευσής τους.

Για να εκτιμηθεί η απελευθέρωση της EGCG και το μέγεθος των σωματιδίων σε σχέση με τη θερμοκρασία παρασκευάστηκαν διαλύματα με 20 ml απιονισμένο νερό και 10 mg δείγματος. Οι θερμοκρασίες στις οποίες εκτέθηκαν τα δείγματα ήταν στους 30°, 60° και 90° C. Κάθε διάλυμα παρέμεινε στην εκάστοτε θερμοκρασία για 20 λεπτά υπό ανάδευση. Κάθε πέντε λεπτά 4 ml διαλύματος τιτλοδοτούνταν για να γίνουν οι μετρήσεις στο φωτόμετρο και το ζ-sizer.

Όλα τα δείγματα των σωματιδίων είχαν αποθηκευτεί για 15 ημέρες σε ξηραντήρα. Κατά την έκθεσή τους σε διαφορετικές υγρασίες τα δείγματα των σωματιδίων αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε βάζα τα οποία περιείχαν άλατα τα οποία διαμόρφωναν την σχετική υγρασία του περιβάλλοντος.

Οι ζητούμενες υγρασίες ήταν 20%, 40%, 60% και 80%, έτσι χρησιμοποιήθηκαν οξικό κάλλιο (KCH_3COO), ιωδιούχο νάτριο (NaI), βρωμιούχο νάτριο ($NaBr$), και βρωμιούχο κάλλιο (KBr) αντίστοιχα. Τα βάζα αποθηκεύτηκαν σε ξηραντήρα και γίνονταν οι ανάλογες μετρήσεις με το φωτόμετρο και το z-sizer σε διαλύματα με 1mg σωματιδίων σε 4 ml απιονισμένο νερό. Οι μετρήσεις γίνονταν κάθε 15 ημέρες μέχρι το πέρας της 45^{ης} ημέρας της αποθήκευσης των βάζων.

Για όλες τις παραπάνω συνθήκες παρασκευάστηκαν δείγματα με τις δύο διαφορετικές ποσότητες της EGCG στα διαλύματα της WPI με την BC (0,1 και 0,2 EGCG), μάρτυρας (blank), δηλαδή δείγματα από το πρώτο πειραματικό στάδιο χωρίς την προσθήκη της EGCG, καθώς και καθαρή EGCG. Για την καθαρή EGCG έγιναν μετρήσεις μόνο με το φωτόμετρο.

2.5.2 Φωτόμετρο

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τις φασματοφωτομετρικές μετρήσεις ήταν η UV Spectrometer UV-1800, Shimadzu. Οι μετρήσεις της απορρόφησης έγιναν σε μήκος κύματος στα 280 nm όπου εκεί εμφανίζεται και η μέγιστη απορρόφηση της EGCG. Η συγκέντρωση της EGCG υπολογίστηκε μέσω των καμπυλών βαθμονόμησης που έχουν εξασφαλισθεί για διαφορές συγκεντρώσεις EGCG καθώς και για διάφορα ρυθμιστικά μέσα.

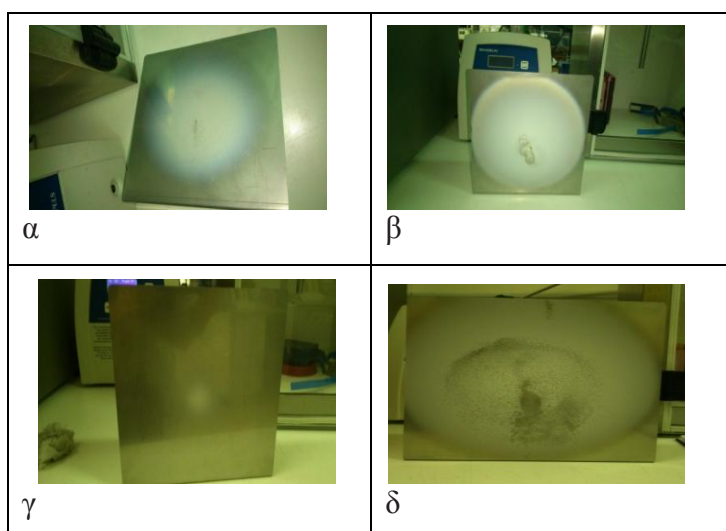
3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Διαδικασία ηλεκτροψεκασμού

Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού διέφεραν ως προς τις συγκεντρώσεις σε BC και WPI. Έτσι δημιουργήθηκαν 12 δείγματα τα οποία περιείχαν από 1-16%κβ BC και 10-30%κβ WPI όπου περιείχαν και Tween20 σε σταθερή συγκέντρωση 5%κβ. Οι μετρήσεις που έγιναν σε αυτά πριν τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού ήταν μετρήσεις που αφορούσαν στο pH, στην ηλεκτρική αγωγιμότητα, στην επιφανειακή τάση αλλά και στο ιξώδες. Οι ιδιότητες αυτές αποτελούν παραμέτρους για τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού. Δηλαδή βάσει αυτών των ιδιοτήτων επιλέχθηκαν οι τιμές του ρυθμού ροής (flow-rate) του διαλύματος προς το ακροφύσιο του συστήματος και οι τιμές του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόστηκε σε αυτό (Voltage). Σκοπός ήταν να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός των παραμέτρων ώστε να δίνουν το καλύτερο αποτέλεσμα, πρώτον στον συλλέκτη και δεύτερον να έχουν παρασκευαστεί τα βέλτιστα σωματίδια ώστε να γίνει επιτυχής η ενσωμάτωση του βιοενεργού συστατικού. Για να θεωρηθεί επιτυχής η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού θα πρέπει αφού έχουν εφαρμοστεί οι σωστές συνθήκες στο σύστημα να σχηματιστεί ο κώνος Taylor και στη συνέχεια να μην υπάρξουν ανομοιομορφίες κατά τη συλλογή του δείγματος στον συλλέκτη.

Ο ρυθμός ροής του διαλύματος στο σύστημα αναλόγως με το δείγμα ήταν στα 20-80μL/h, και το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόστηκε στα 10-20kV. Κάθε διάλυμα διέφερε ως προς το ιξώδες του, την επιφανειακή τάση και την ηλεκτρική αγωγιμότητα του, έτσι ήταν λογικό σε κάθε διαδικασία να ληφθούν διαφορετικές συνθήκες. Παρόλα αυτά για κάποια δείγματα δε βρέθηκε ο βέλτιστος συνδυασμός των συνθηκών ώστε να γίνει επιτυχής ο ηλεκτροψεκασμός. Στην περίπτωση των διαλυμάτων που περιείχαν 30%κβ WPI το αποτέλεσμα στον συλλέκτη δεν ήταν το επιθυμητό, καθώς εμφανίζονταν στο τελικό δείγμα πολλές σταγόνες και περιοχές με ανομοιομορφίες. Επίσης σε κάποιες περιπτώσεις δεν εμφανιζόταν καθόλου δείγμα στον συλλέκτη ή αυτό ήταν ελάχιστο. Αυτό έχει να κάνει με τον σχηματισμό του κώνου Taylor, δηλαδή σε κάποιες περιπτώσεις δεν σχηματιζόταν σωστά, ή και καθόλου. Μελέτες έχουν δείξει πως οι πρωτεΐνες λόγω της δομής τους είναι πιθανό πολλές φορές να δημιουργήσουν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση της και συνεπώς την μη επιτυχή διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού (Nieuwland et al, 2013).

Πειραματικά αυτό επιβεβαιώθηκε όχι μόνο λόγω του ότι δεν ήταν πολλές φορές δυνατόν να σχηματιστεί σωστά ο κώνος Taylor αλλά και επειδή πολλές φορές το διάλυμα συγκεντρωνόταν μέσα στο σύστημα της σύριγγας με το ακροφύσιο και ήταν αδύνατο να γίνει η ώθησή λόγω του μεγάλου ιξώδους του και της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να ξεραίνεται μέσα στο ακροφύσιο. Οι τιμές του pH των διαλυμάτων WPI-BC είναι στο $3,9\pm 0,2$ αναλόγως τη συγκέντρωση της WPI. Στις παρακάτω εικόνες εμφανίζονται κάποια δείγματα που προέρχονται από επιτυχείς και μη επιτυχείς διαδικασίες ηλεκτροψεκασμού. Στην εικόνα α, β τα παραγόμενα δείγματα προέρχονται από διαλύματα που περιείχαν 10%κβ WPI και 8%κβ BC και 20%κβ WPI και 8%κβ BC αντίστοιχα. Τα δείγματα γ και δ είναι δείγματα από τα ηλεκτροψεκασμένα διαλύματα με 30%κβ WPI και 1%BC και 30%κβ WPI και 8%BC αντίστοιχα.

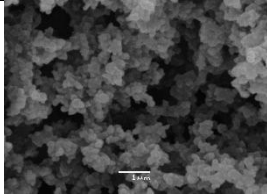
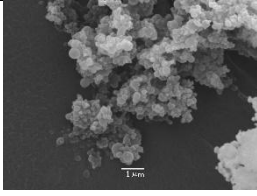
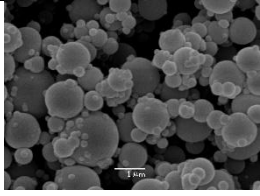
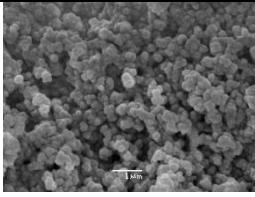
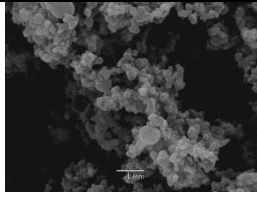
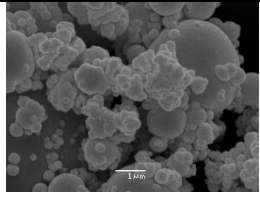
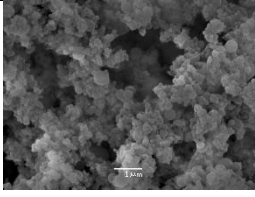
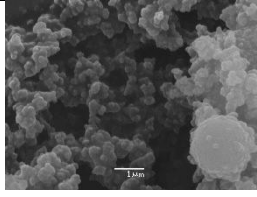
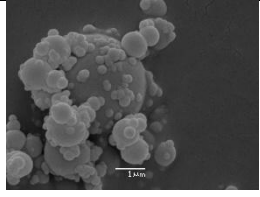


Εικόνα [22]: Εικόνες δειγμάτων μετά τον ηλεκτροψεκασμό [α]:10%κβWPI-8%BC [β] 20%κβ WPI-8%BC [γ] 30%κβ WPI-1%κβ BC [δ] 30%κβ WPI-8% BC.

3.2 Ιδιότητες παραγόμενων σωματιδίων

3.2.1 Μικροδομή σωματιδίων

Η μικροδομή και το μέγεθος των σωματιδίων που παράγονται κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού είναι δύο παράμετροι που παίζουν ρόλο στην επιτυχία της διαδικασίας αυτής. Οι μικροδομή και συγκεκριμένα το σχήμα των σωματιδίων σε όλα τα δείγματα ήταν σφαιρικό όπως φαίνεται και στις ενδεικτικές εικόνες που συλλέχθηκαν από το SEM.

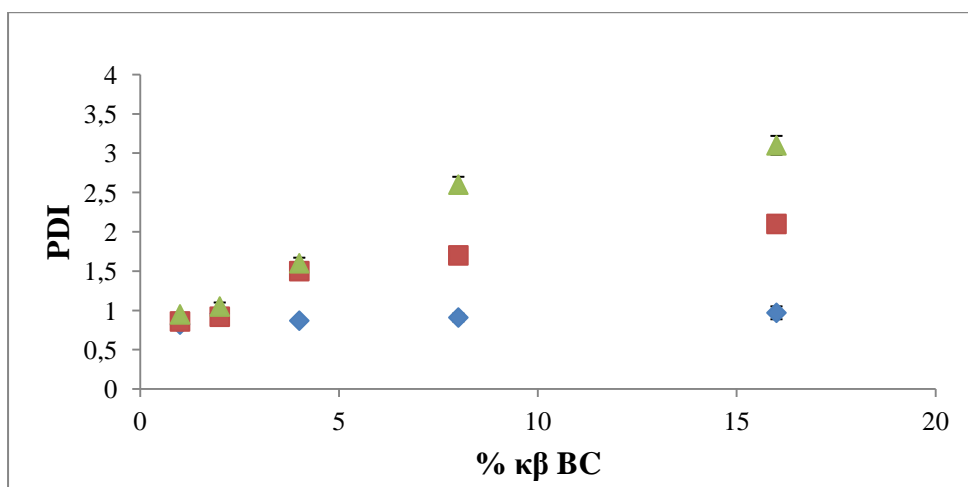
	10%κβ WPI	20% κβ WPI	30% κβ WPI
1 % κβ BC	 α	 β	 γ
8 % κβ BC	 δ	 ε	 ζ
16 % κβ BC	 η	 θ	 ι

Εικόνα [23]: Εικόνες μικροδομής δειγμάτων από το SEM.

Στην παραπάνω εικόνα [23], απεικονίζονται οι μικροδομές των σωματιδίων που παράχθηκαν από τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού, μέσω του SEM. Συμπεραίνεται ότι τα δείγματα με τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε WPI, δηλαδή αυτά με τις συγκεντρώσεις 10%κβ και 20%κβ WPI, εμφανίζουν μια πιο ομοιογενή δομή. Αυτό το φαινόμενο πιθανόν να οφείλεται στην δέσμευση των μονομερών της BC στον σκελετό της WPI. Αυτό γίνεται είτε μέσω των υδροφοβικών ενώσεων είτε μέσω των δεσμών υδρογόνου, όπου σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα του οποίου το φορτίο παραμένει σταθερό, αλλά επηρεάζονται οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και η διαμόρφωση της WPI. Η αλληλεπίδραση της BC με την πρωτεΐνη πιθανόν να προσφέρει μια ανοιχτή μοριακή δομή της πρωτεΐνης, η οποία να μπορεί να μειώσει την κρίσιμη συγκέντρωση συμπλοκοποίησης και να διευκολύνει την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού.

Αυτό το φαινόμενο δεν εμφανίζεται όταν αυξηθεί η πρωτεΐνη, όπως στην περίπτωση της συγκέντρωσης της στο 30% κβ.

Στην εικόνα [23(γ,ζ,ι)], φαίνεται πως δεν υπάρχει η ίδια ομοιογένεια με τις προηγούμενες συγκεντρώσεις της WPI, δηλαδή η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων δεν είναι ομοιόμορφη και υπάρχουν μεγάλες διαφορές σε αυτά. Ο σχηματισμός των σφαιρικών δομών οφείλεται στο πλήθος των σφαιρικών πρωτεϊνών όπως η α-λακτογλοβουλίνη και η β-λακταλβουμίνη που αποτελούν την WPI (Mc Clements, 2005). Οι σφαιρικές αυτές πρωτεΐνες όπως είναι οι αλβουμίνες, καθώς και ο πολυηλεκτρολυτικός τους χαρακτήρας, είναι υπεύθυνα για τις μοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτές οι ενδομοριακές ή εξωμοριακές αλληλεπιδράσεις, καθώς και η διαμόρφωση των πολυμερικών αλυσίδων που δημιουργούνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις WPI διατηρώντας την ακαμψία τους, προάγουν τον σχηματισμό μονοδιασπορικών δομών κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού, παρά την επιβολή πολλών διαφορετικών συνδυασμών ρυθμού ροής και επιβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Συνολικά η διάμετρος των σωματιδίων όλων των δειγμάτων κυμαινόταν σε κλίμακα υπομικρών και νανομέτρων (nm), γεγονός που ενίσχυσε τις πιθανότητες μιας επιτυχούς ενθυλάκωσης της EGCG στα σωματίδια των διαλυμάτων BC-WPI.

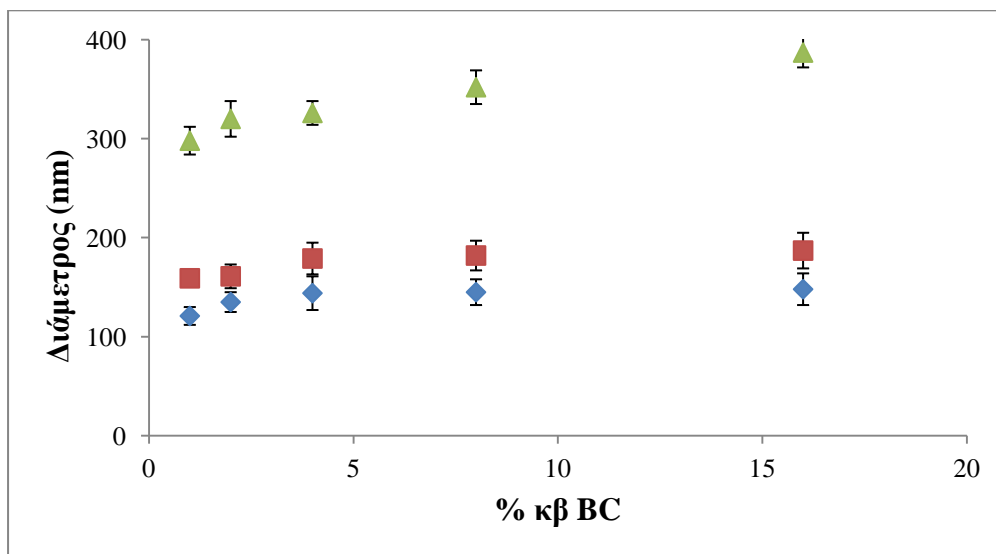


Γράφημα [1]: Απεικόνιση πολυδιασποράς στα διαλύματα BC-WPI ♦10%κβ WPI
■ 20%κβ WPI ▲30% κβ WPI

Ο μέσος όρος της διαμέτρου των σωματιδίων κυμάνθηκε από τα 120 έως τα 390 nm για τα δείγματα των διαφορετικών ποσοτήτων BC και WPI. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση της συγκέντρωσης των δύο βιοπολυμερών, δηλαδή της BC και της WPI είχε σαν αποτέλεσμα και την αύξηση του μέσου όρου της διαμέτρου των σωματιδίων των δειγμάτων, όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα [2]. Για παράδειγμα το δείγμα 8% BC και 10% WPI είχε μέσο όρο διαμέτρου τα 145nm ενώ το δείγμα 8%BC και 20% WPI παρουσίασε μέσο όρο διαμέτρου στα 182nm.

Παρατηρήθηκε σε έρευνες πως το μέγεθος των σωματιδίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυμερούς (Nandana Bhardwaj, Subhas Kundu, 2010), δηλαδή όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυμερούς τόσο μεγαλύτερο μέγεθος θα έχουν και τα σωματίδια του ηλεκτροψεκασμένου δείγματος και τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο δείκτης πολυδιασποσφοράς (PDI), (Marysol Aceituno-Medina et al, 2013).

Ως προς τη στατιστική μελέτη που έγινε για το μέγεθος των σωματιδίων στα παραδείγματα που αναφέρθηκαν παραπάνω έδειξε ότι τα αποτελέσματα δε διαφέρουν στατιστικά.



Γράφημα [2]: Μέσος όρος διαμέτρου σωματιδίων BC-WPI ♦10%κβWPI

■ 20%κβ WPI ▲ 30% κβ WPI

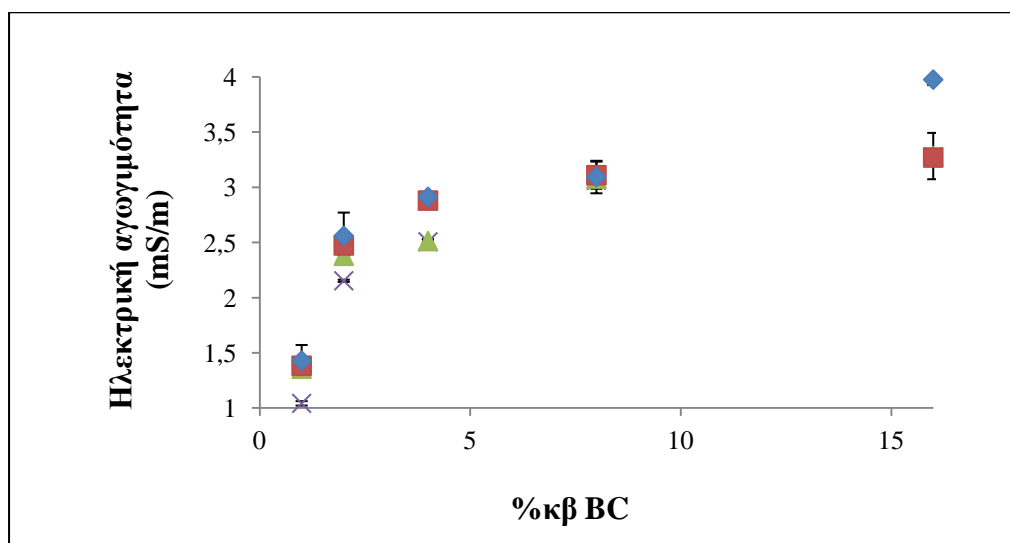
3.3 Ιδιότητες διαλυμάτων

3.3.1 Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Όπως έχει προαναφερθεί η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι μία ακόμα παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και την επιτυχή παραγωγή σωματιδίων. Στο γράφημα [3] απεικονίζεται η ηλεκτρική αγωγιμότητα των διάφορων διαλυμάτων WPI-BC. Οι τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας αυξήθηκαν σταθερά με την αύξηση της συγκέντρωσης της BC στα διαλύματα BC-WPI ανεξάρτητα με τη συγκέντρωση της WPI. Ανεξάρτητα με τις συγκεντρώσεις της WPI η ηλεκτρική αγωγιμότητα των διαλυμάτων κυμάνθηκε με αυξητικό ρυθμό από 1,3 έως 3,98 mS/m όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της BC από 1% έως 16%κβ αντίστοιχα.

Σε έρευνες έχει αποδειχθεί ότι γενικά η προσθήκη ενός πολυσακχαρίτη μπορεί να αυξήσει την ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός διαλύματος όταν προστίθεται σε αυτό (Rocik et al, 2012), όπως συνέβη και στη συγκεκριμένη μελέτη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την προσθήκη του Tween20 στο διάλυμα της BC η ηλεκτρική αγωγιμότητα έδειξε να μειώνεται, παρόλα αυτά αυξήθηκε ξανά με την προσθήκη της WPI.



Γράφημα [3]: Ηλεκτρική αγωγιμότητα διαλυμάτων BC-WPI. x0%κβ WPI ◆10%κβWPI
■20%κβ WPI ▲30% κβ WPI

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα σχετίζεται με τη συγκέντρωση των πολυμερών επειδή παρουσιάζουν ιδιότητες πολυηλεκτρολυτών όταν βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα, δηλαδή η WPI είναι φορτισμένη θετικά όταν βρίσκεται σε διαλύματα με pH μικρότερο του ισοηλεκτρικού σημείου και αρνητικά σε μεγαλύτερο pH και η BC είναι αρνητικά φορτισμένη όταν βρίσκεται σε διάλυμα με οποιαδήποτε τιμή pH.

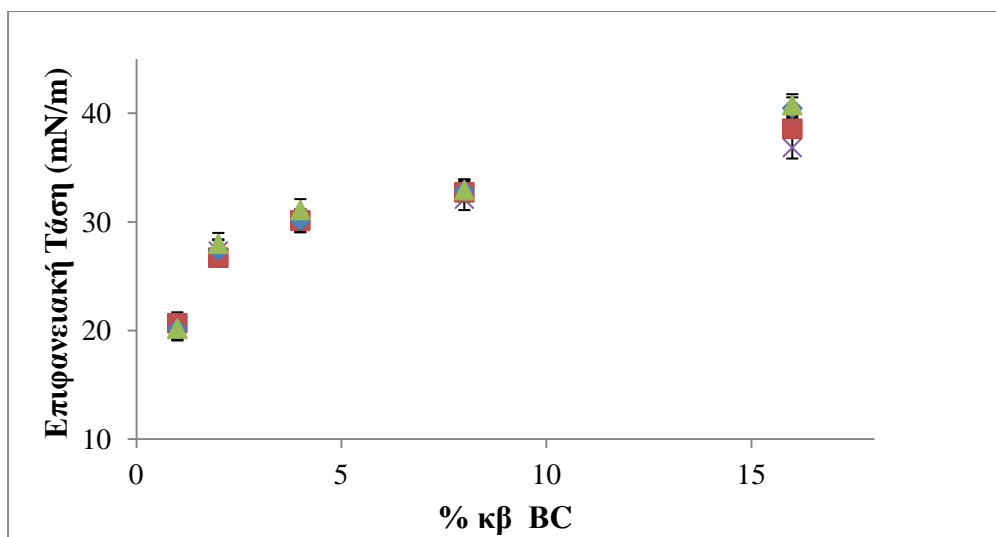
Ο σχηματισμός του πίδακα του διαλύματος που πρόκειται να δημιουργηθεί από τον ηλεκτροψεκασμό εξαρτάται από τις υψηλές πυκνότητες των φορτίων στην επιφάνεια του διαλύματος, οι οποίες επηρεάζονται από το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο αλλά και από την ηλεκτρική αγωγιμότητα του βιοπολυμερούς.

Οι μεγάλες διαφορές που εμφανίζονται στο μέγεθος των σωματιδίων δε μπορούν να συσχετιστούν με τη μικρή διαφορά των τιμών της ηλεκτρικής αγωγιμότητας που βρέθηκε στα διάφορα διαλύματα που εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι όταν οι τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας είναι μεγάλες, το φορτίο που φέρει το διάλυμα προς ηλεκτροψεκασμό είναι πολύ υψηλό με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιείται ο κώνος Taylor και έτσι να μην επιτυγχάνεται, δηλαδή να μην σχηματίζονται τα σωματίδια ή οι ίνες. (Bock et al, 2012). Δηλαδή? Δεν μπορούν να παραχθούν σταγονίδια?

Αυτό είναι πιθανό να συνέβη και στην περίπτωση των διαλυμάτων που περιείχαν WPI με συγκέντρωση 30% κβ, όπου σε αυτά η ηλεκτρική αγωγιμότητα ήταν σε υψηλές τιμές καθώς έφτασε στα 3,93mS/m (16%κβ BC-30%κβ WPI) και η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού ήταν αρκετά περίπλοκη. Παρ'όλα αυτά με βάση την στατιστική ανάλυση που έγινε για την ηλεκτρική αγωγιμότητα των διαλυμάτων φαίνεται πως δεν υπάρχει στατιστική διαφορά των αποτελεσμάτων αυτών.

3.3.2 Επιφανειακή τάση

Στο γράφημα [4] φαίνεται η επίδραση της προσθήκης της BC στην επιφανειακή τάση των διαλυμάτων. Όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της BC αυξανόταν και η τιμή της επιφανειακής τάσης στα διαλύματα, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της WPI. Οι τιμές της επιφανειακής τάσης των διαλυμάτων WPI-BC κυμάνθηκε από τιμές 20Nm/m, όταν η συγκέντρωση της BC ήταν στο 1%κβ, έως 40mN/m, όταν η συγκέντρωση της BC ήταν 16%κβ. Από αυτά τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η συγκέντρωση της BC παίζει ρόλο στην επιφανειακή τάση του διαλύματος WPI-BC.



Γράφημα[4]: Επιφανειακή τάσης στα διαλύματα WPI-BC ×0%κβ WPI ◆10%κβWPI
 ■20%κβ WPI ▲ 30% κβ WPI

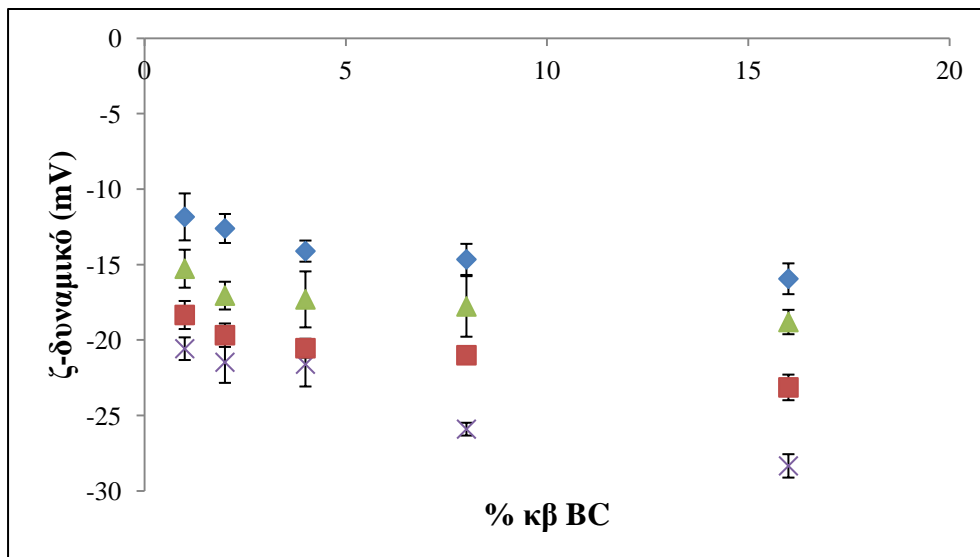
Ωστόσο οι χαμηλές τιμές της επιφανειακής τάσης όπως στην περίπτωση των τιμών ~20 mN/m του διαλύματος δεν μπορούν να αποδοθούν στο διαλυόμενο πολυμερές, εκτός και αν αυτό έχει αμφίφιλες ιδιότητες. Στην περίπτωση της συγκεκριμένης μελέτης η BC δεν ήταν καθαρή αφού ήταν αναμειγμένη με πρωτεΐνες. Η επιφανειακή τάση καθορίζει το μέγιστο και το ελάχιστο όριο της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού όταν οι υπόλοιπες παράμετροι διατηρούνται σταθερές (Bhardwaj, Kundu, 2012). Η επιφανειακή τάση μπορεί να επηρεάσει το τελικό μέγεθος των σωματιδίων, έτσι η διαφοροποίηση στη διάμετρο των σωματιδίων μπορεί να αποδοθεί στην διαφορετική επιφανειακή τάση του εκάστοτε διαλύματος που πρόκειται να γίνει ηλεκτροψεκασμός (Rubio-Lopez, Lagaron, 2012).

Για παράδειγμα στην περίπτωση των διαλυμάτων που περιέχουν WPI σε συγκέντρωση 20%κβ όσο αυξάνεται η ποσότητα της συγκέντρωσης της BC από 1% έως 16%κβ BC αυξάνεται και η επιφανειακή τάση από 20mN/m στα 40mN/m αντίστοιχα, καθώς επίσης και η μέση διάμετρος των ηλεκτροψεκασμένων σωματιδίων όπου αυξάνεται από τα 150nm στα 190nm αντίστοιχα. Το ίδιο συμβαίνει και στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα διαλύματα είναι 10% και 30%κβ, όπου με την αύξηση της συγκέντρωσης της BC αυξάνονται και οι τιμές της επιφανειακής τάσης και το μέγεθος των σωματιδίων.

Αυτό που παρατηρείται ίσως οφείλεται στις μικρές τιμές της επιφανειακής τάσης της σταγόνας που σχηματίζει τον κώνο Taylor στο ακροφύσιο του συστήματος του ηλεκτροψεκασμού. Έχει παρατηρηθεί ότι μεγάλες τιμές στην επιφανειακή τάση των διαλυμάτων μπορεί να υπερνικήσει τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που δημιουργούνται κατά την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου μέσω του συστήματος και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και έτσι να εμποδίσει τον σχηματισμό του κώνου Taylor και συνεπώς την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού (Bock et al, 2012). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την επιφανειακή τάση σε αντίθεση με τη προσθήκη της BC, δεν έδειξαν ότι υπάρχει στατιστική συσχέτιση της αλλαγής των τιμών της με την αύξηση της συγκέντρωσης της WPI. Έτσι είναι σαφές ότι οι ποσότητες της WPI δε μπορεί να επηρεάσει την επιφανειακή τάση του διαλύματος. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι η BC η οποία περιέχει επίσης πρωτεΐνες κινείται πιο γρήγορα από την WPI και έτσι καλύπτει την επιφάνεια του διαλύματος με αποτέλεσμα μια πολύ μικρή ποσότητα της WPI να μπορεί να μεταφερθεί εκεί. Αυτό συμβαίνει σε όλες τις περιπτώσεις των διάφορων συγκεντρώσεων της WPI (20% και 30% κβ WPI) (Wongsasulak et al, 2007). Σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις της BC (1-4% κβ BC) οι τιμές της επιφανειακής τάσης εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της WPI.

3.3.3 ζ-δυναμικό

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η επίδραση του ζ-δυναμικού των διαλυμάτων όσο αυξάνεται η ποσότητα της WPI.



Γράφημα[5]: ζ-δυναμικό διαλυμάτων WPI-BC. × 0%κβ WPI ■ 10%κβ WPI ▲ 20% κβ WPI
◆ 30%κβ WPI

Σε προηγούμενες έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι όταν σε ένα διάλυμα με θετικές τιμές ζ-δυναμικού, προστεθεί BC, η οποία εμφανίζει αρνητικό φορτίο σε όλες τις τιμές pH, οι τιμές του ζ-δυναμικού για αυτό το διάλυμα θα μειωθούν (Paximada et al, 2016). Η WPI έχει θετικό φορτίο και οι τιμές για το ζ-δυναμικό κυμαίνονται στα 12-16 mV αναλόγως της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε pH 3,8. Όπως φαίνεται και στο γράφημα [5] για το διάλυμα που περιέχει 10% κ.β WPI, όσο αυξάνεται η ποσότητα της BC από 1% έως 16% κ.β, η τιμή του ζ-δυναμικού μειώνεται από το -18mV στο -23mV.

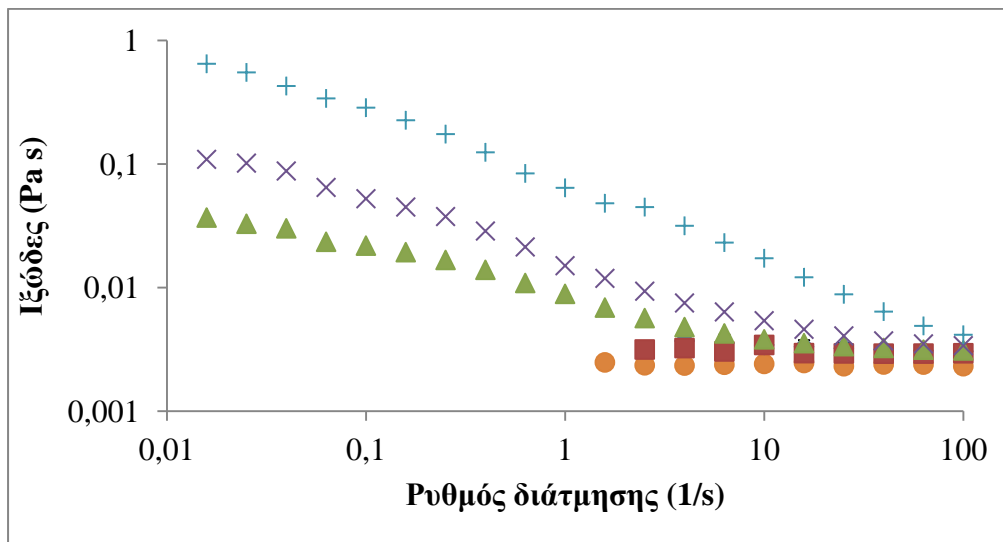
Το ίδιο συμβαίνει και στο διάλυμα που περιέχει 20% WPI όπου όσο αυξάνεται η ποσότητα της BC το ζ-δυναμικό του διαλύματος μειώνεται από τα -15mV (1%BC) στα -18,8 (16%BC). Αντίστοιχα και στην περίπτωση που το διάλυμα περιέχει 30%κ.β WPI το ζ-δυναμικό του είναι -11,83mV (1%κβ BC) και -15,93 (16%κβ BC). Η μείωση της πυκνότητας του φορτίου υποδηλώνει την απορρόφηση της BC στην θετικά φορτισμένη WPI, κυρίως μέσω των ηλεκτροστατικών έλξεων. Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει την ικανότητα των αρνητικά φορτισμένων πολυσακχαριτών, όπως είναι η BC, να απορροφούνται στις θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες. Η αύξηση της συγκέντρωσης της WPI δείχνει να επηρεάζει την τιμή του ζ-δυναμικού στα διάφορα διαλύματα, όπως φαίνεται και στο γράφημα [5]. Στα διαλύματα με 10%κ.β WPI το ζ-δυναμικό φτάνει έως τα -23mV ενώ όταν είναι σε περιεκτικότητα 30%κ.β η τιμή ανεβαίνει στα -15mV, γεγονός που αποδεικνύει την δραστηριότητά της στο συνολικό φορτίο του διαλύματος. Στην στατιστική ανάλυση που έγινε για τα συγκεκριμένα δείγματα δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά.

3.3.4 Ρεολογικές ιδιότητες διαλυμάτων

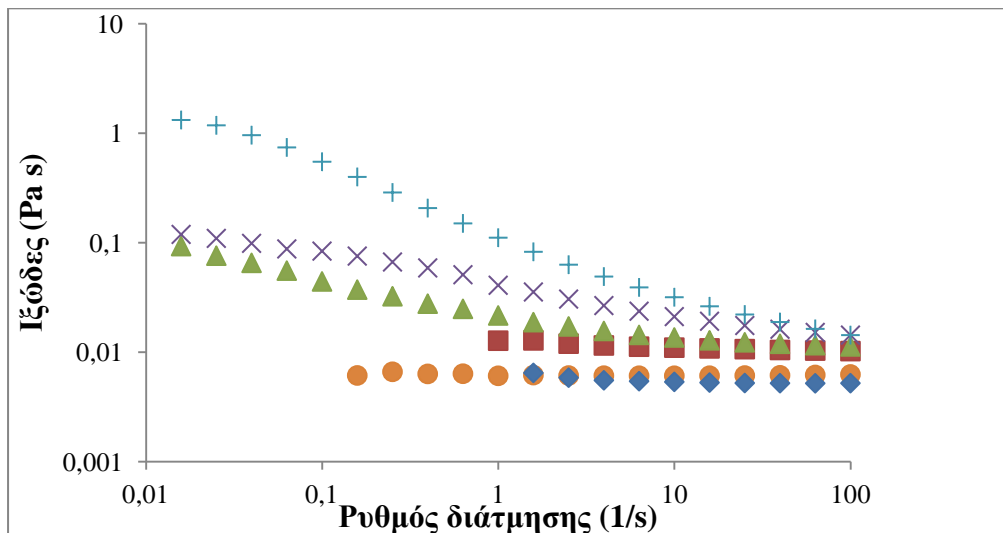
Για να θεωρηθεί επιτυχής η διαδικασία του ηλεκτροπηκασμού θα πρέπει να είναι γνωστές οι ιδιότητες του διαλύματος. Μια ιδιότητα που παίζει βασικό ρόλο στην επιλογή των παραμέτρων του συστήματος του ηλεκτροπηκασμού είναι η ιξωδοελαστικότητα του διαλύματος, η οποία μπορεί να επηρεάσει την διαδικασία του σχηματισμού του κώνου Taylor αλλά και τη σταθερότητά του. Επομένως το διάλυμα θα πρέπει να διατηρεί το κατάλληλο ιξώδες ώστε να μπορεί να ανταπεξέλθει στις συνθήκες οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τον ηλεκτροπηκασμό (Rocik et al, 2012).

Ιξώδες διαλύματος

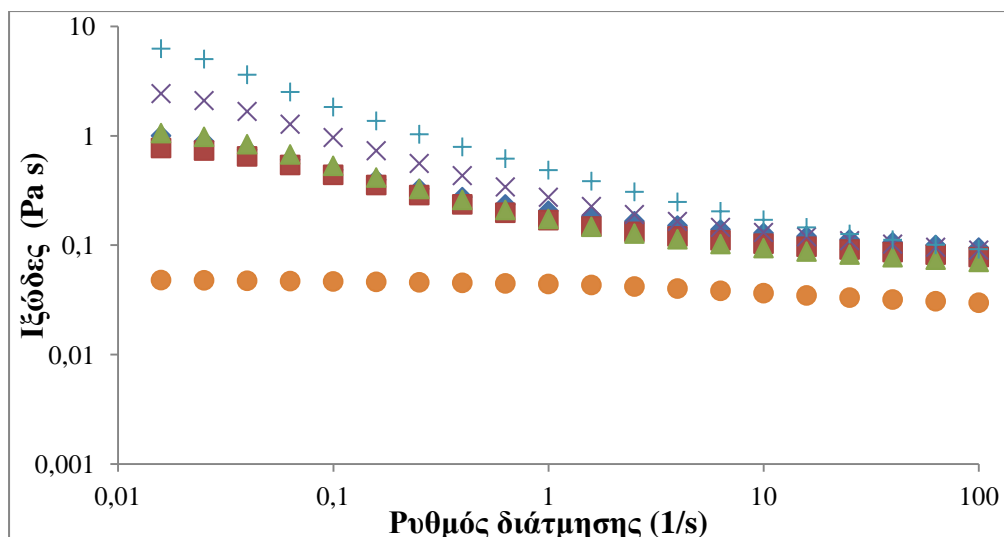
Στα παρακάτω γραφήματα [6],[7],[8], περιγράφεται το η ρεολογική συμπεριφορά των διαλυμάτων σε σχέση με τη προσθήκη της BC.



Γράφημα[6]: Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων 10%κβ WPI σε σχέση με την προσθήκη BC •0%κβ BC♦1%κβBC ■2%κβ BC ▲4% κβ BC
× 8%κβ BC + 16%κβ BC



Γράφημα[7]: Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων με 20%κβ WPI σε σχέση με τη συγκέντρωση της BC •0%κβ BC♦1%κβBC ■2%κβ BC ▲4% κβ BC
× 8%κβ BC + 16%κβ BC



Γράφημα[8]: Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων 30%κβ WPI σε σχέση με την προσθήκη της BC •0%κβ BC♦1%κβBC ■2%κβ BC ▲4% κβ BC × 8%κβ BC + 16%κβ BC

Τα διαλύματα που δεν περιέχουν συγκεντρώσεις BC φαίνεται να παρουσιάζουν συμπεριφορά Νευτώνειου ρευστού, αφού καθ'όλη τη διάρκεια της διάτμησης το $\xi\omega\delta\epsilon\varsigma$ τους παραμένει σταθερό. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες οι οποίες αναφέρουν πως τα διαλύματα με μικρού ποσοστού συγκεντρώσεις WPI έχουν Νευτώνεια συμπεριφορά (Kaltsa et al, 2014, Paximada et al 2016). Η Νευτώνεια συμπεριφορά των διαλυμάτων που περιέχουν WPI συνεχίζει να εμφανίζεται επίσης και σε αυτά τα οποία περιέχουν μικρή ποσότητα BC, δηλαδή τα διαλύματα με 1-4%κβ BC και 10-20%κβ WPI.

Αυτό επίσης μπορεί να τεκμηριωθεί καθώς η ποσότητα της WPI είναι αυτή που ορίζει τη ρεολογική συμπεριφορά του ρευστού, δηλαδή τη Νευτώνεια συμπεριφορά, αφού βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με την BC (Kaltsa et al, 2014).

Όσον αφορά τα υπόλοιπα διαλύματα, παρατηρείται μια αύξηση στο $\xi\omega\delta\epsilon\varsigma$ τους όσο αυξάνεται σε αυτά και η συγκέντρωση της BC. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση των διαλυμάτων που περιέχουν 20%κβ WPI, η τιμή του $\xi\omega\delta\epsilon\upsilon\varsigma$ του διαλύματος κατά την απουσία της BC ξεκινά από τα 0,006 Pa s ενώ όταν προστίθεται 16%κβ BC το $\xi\omega\delta\epsilon\varsigma$ φτάνει σε τιμές έως και τα 1,44 Pa s, δηλαδή η τιμή του $\xi\omega\delta\epsilon\upsilon\varsigma$ αυξάνεται ως και τρεις τάξεις μεγέθους όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση της BC στο διάλυμα. Ως προς την ρεολογική τους συμπεριφορά, με την προσθήκη της BC σε συγκέντρωση 4-16%κβ τα διαλύματα εμφάνισαν συμπεριφορά λεπτόρρευστου, όπως τα περισσότερα διαλύματα που περιέχουν πολυμερή σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Hayati et al, 2009).

Η αύξηση των τιμών του ιξώδους μπορεί να αιτιολογηθεί και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της BC με την WPI λόγω των διαμοριακών δεσμών που φέρονται μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών ή και λόγω της εμφάνισης των άτακτων τμημάτων των αλυσίδων της WPI ή της BC.

Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της BC στα διαλύματα, αυτά εμφανίζουν ψευδοπλαστική συμπεριφορά δηλαδή όταν αυξάνεται ο ρυθμός διάτμησης τα διαλύματα αυτά φαίνεται ότι γίνονται πιο λεπτόρρευστα, όπως ισχύει με όλα τα συστήματα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών, (Rao.1995). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να σχετιστεί με τη δομή των πολυμερικών αλυσίδων στο διάλυμα. Χωρίς την επιβολή κάποιου φορτίου τα μακρομόρια των διαλυμάτων αυτών, έχουν μια τρισδιάστατη δομή επειδή βρίσκονται στην χαμηλότερη ενεργειακή τους κατάσταση. Όταν όμως βρεθούν υπό διάτμηση, τα μακρομόρια χάνουν τον τρισδιάστατο χαρακτήρα τους και προσανατολίζονται παράλληλα με την κατεύθυνση της διάτμησης που εφαρμόζεται, με αποτέλεσμα να επιμηκύνονται και ακολούθως να μειώνεται η αντίστασή τους στη ροή και το ιξώδες σε όλο τον όγκο του διαλύματος (Freeman, 1996).

Συμπεραίνεται λοιπόν πως το ιξώδες και συνεπώς η συγκέντρωση των πολυμερών σε ένα διάλυμα, αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους για τη διαδικασία και το αποτέλεσμα της ηλεκτρονηματοποίησης ή του ηλεκτροψεκασμού. Σε παλαιότερες μελέτες αποδείχθηκε πως για τιμές ιξώδους μεγαλύτερες του 1,5 Pa s κατά τη διαδικασία της ηλεκτρονηματοποίησης παράχθηκαν ίνες και όταν η τιμή του ιξώδους ήταν μικρότερη από 1,5 Pa s στον συλλέκτη του συστήματος εμφανίζονταν σωματίδια (Rocik et al, 2012). Στα δείγματά μας ιξώδες μεγαλύτερο από 1,5 Pa s εμφανίζουν αυτά που περιέχουν 4-16% BC και 30%κβ WPI.

Επιφανειακό ιξώδες διαλυμάτων

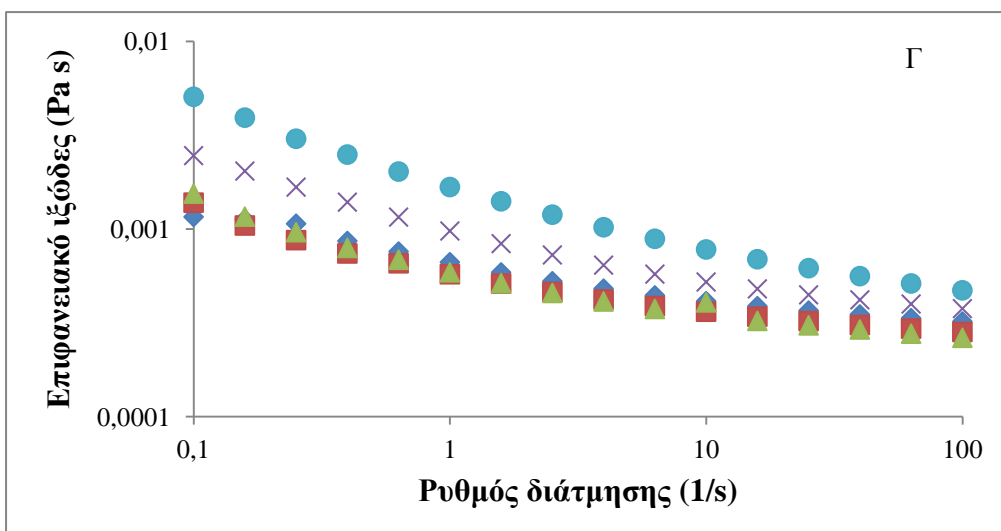
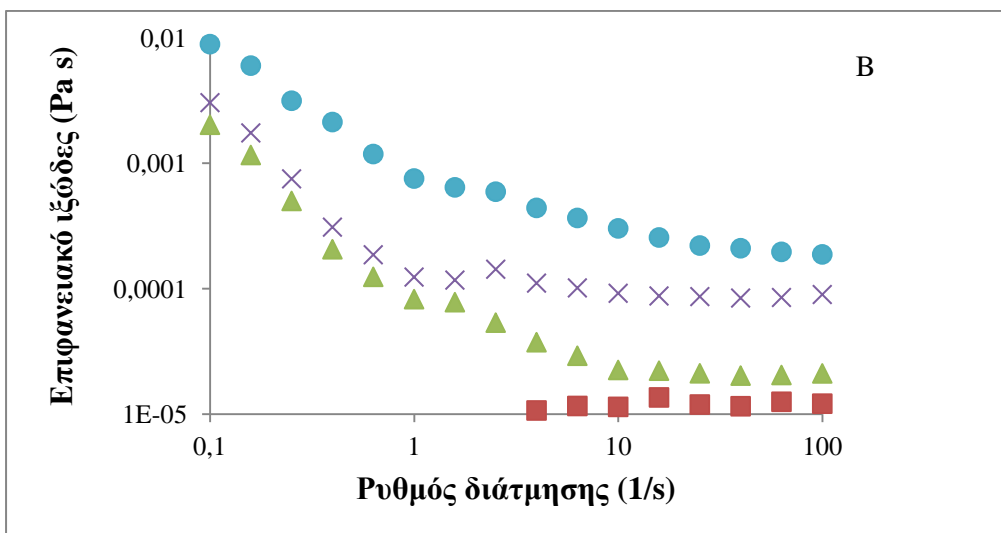
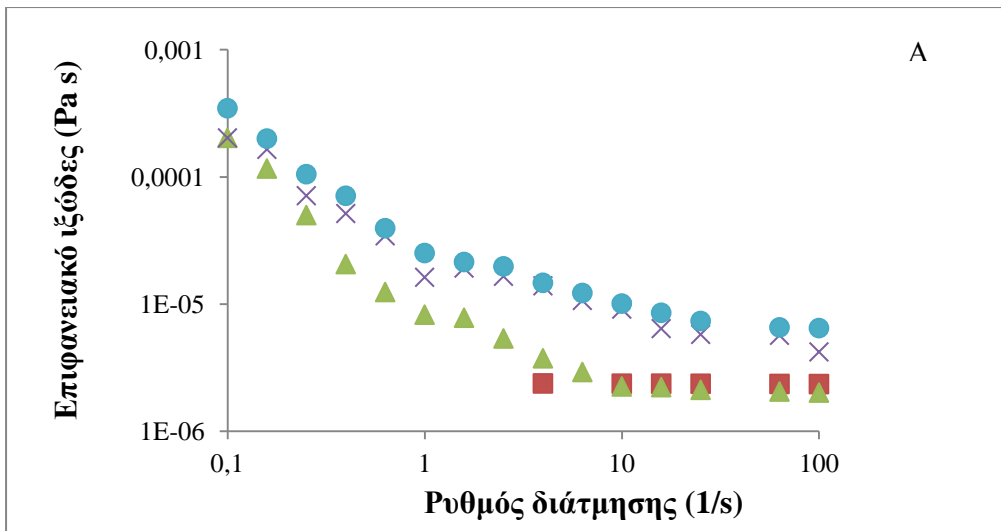
Η επιφανειακή ρεολογία είναι ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρατήρηση της ενδιάμεσης φάσης ενός διαλύματος. Το επιφανειακό ιξώδες διαφέρει από το ιξώδες λόγω της αναδιοργάνωσης των μορίων του πολυμερούς. Δηλαδή απεικονίζει τη σχέση μεταξύ της παραμόρφωσης μίας επιφάνειας και των τάσεων που ασκούνται σε αυτήν και έτσι παρατηρείται αυτή η αναδιοργάνωση των μορίων του πολυμερούς στην επιφάνειά του. Το ιξώδες ενός διαλύματος μπορεί να χαρακτηριστεί και ρεολογία τριών διαστάσεων σε αντίθεση με το επιφανειακό ιξώδες που είναι ρεολογία δύο διαστάσεων αφού έχει να κάνει με τη μελέτη του ιξώδους μόνο του επιφανειακού του στρώματος.

Διάφορες μελέτες κάνουν την υπόθεση πως αφού το επιφανειακό ιζώδες έχει να κάνει με τις ιδιότητες της διεπιφάνειας του διαλύματος, όπου αυτές είναι και το στοιχείο για την σταθερότητα της διασποράς, θα πρέπει να συσχετίζονται με αυτή και όχι με το ιζώδες (Pelipenko et al, 2012).

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει αφορούν το ιζώδες των πολυμερών όπου δηλώνουν πως τα πολυμερή με μεγάλες τιμές ιζώδους ευνοούν τον σχηματισμό λειών ινών ή σωματιδίων. Μέσω του επιφανειακού ιζώδους μπορεί να προβλεφθεί η συνέχεια του πίδακα κατά τον σχηματισμό του κώνου Taylor (Rocik et al, 2012). Οι ελαστικές δυνάμεις αντιστέκονται στην κάμψη του πίδακα και εμποδίζουν τη διάλυσή του. Άρα το επιφανειακό ιζώδες μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του ηλεκτροψεκασμού ή της ηλεκτρονηματοποίησης ενός διαλύματος πολυμερών (Pelipenko et al, 2012).

Επίσης δεδομένης μιας έκτασης για τον κώνο Taylor, τα ρεολογικά χαρακτηριστικά παίζουν σημαντικό ρόλο, λόγω της μεγάλης διαμέτρου του πίδακα. Όσο ο πίδακας λεπταίνει τα επιφανειακά χαρακτηριστικά υπερισχύουν, λόγω της αύξησης της αναλογίας της επιφάνειας (S) με τον όγκο (V) ($S/V = 4D^{-1}$), όπου D είναι η διάμετρος του πίδακα όπου μειώνεται από 1mm όπου είναι και η εσωτερική διάμετρος του ακροφύσιου σε μερικά χιλιάδες νανόμετρα (nm), που είναι και η διάμετρος των τελικών ινών που παράγονται στην περίπτωση της ηλεκτρονηματοποίησης. Επίσης η εξάτμιση του διαλύτη, δημιουργεί μια βαθμωτή συγκέντρωση στα μόρια του πολυμερούς η οποία οδηγεί σε μια πιο σαφή επίδραση του επιφανειακού ιζώδους, (Pelipenko et al, 2012)

Στα παρακάτω γραφήματα (9 [A, B, C]) παρουσιάζεται η αλλαγή του επιφανειακού ιζώδους στα διαλύματα WPI-BC όσο αλλάζουν οι συγκεντρώσεις των WPI και BC. Αυτό που αρχικά παρατηρήθηκε είναι πως σε σχέση με το ιζώδες, το επιφανειακό ιζώδες ήταν χαμηλότερο κατά τρεις με πέντε τάξεις μεγέθους.



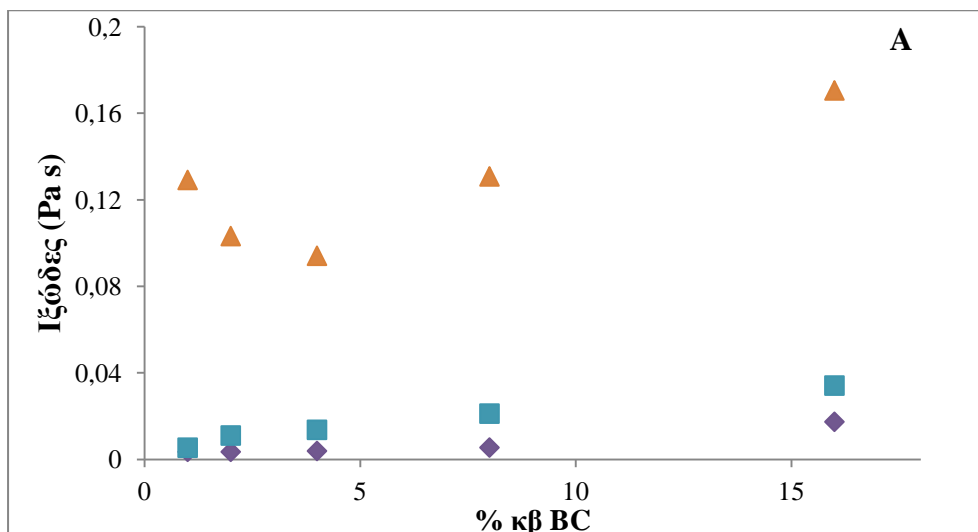
Γράφημα [9]: Επιφανειακό ιξώδες διαλυμάτων WPI-BC (A) 10% WPI, (B) 20% WPI, (Γ) 30% WPI. ♦1%κβBC, ■2%κβ BC, ▲4% κβ BC, × 8%κβ BC, •16%κβ BC

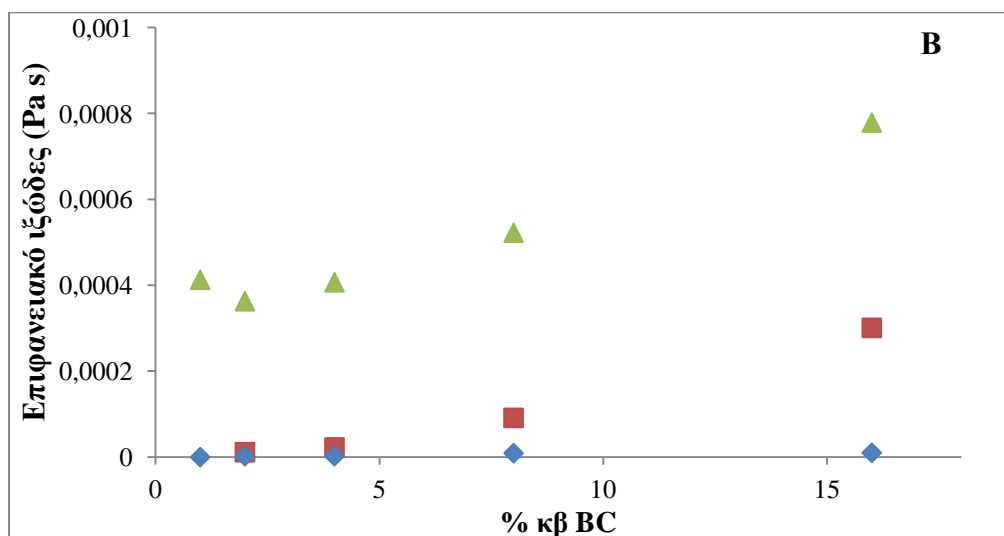
Από τα παραπάνω γραφήματα [9] (Α),(Β), (Γ) στα διαλύματα με χαμηλές συγκεντρώσεις σε WPI, δηλαδή στα 10%κβ και 20%κβ WPI [9] (Α και Β) και χαμηλές συγκεντρώσεις BC δηλαδή στο 2%κβ BC η μέτρηση του επιφανειακού ιξώδους δείχνει να έχουν Νευτώνεια συμπεριφορά ρευστού, όπου υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ του ρυθμού παραμόρφωσης και του ρυθμού διάτμησης όπου στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν $0,1-100 \text{ s}^{-1}$. Όμως με την αύξηση της συγκέντρωσης και των δύο πολυμερών στο διάλυμα, άλλαξε και η ρεολογική του συμπεριφορά. Έτσι σε συγκεντρώσεις της BC μεγαλύτερες από 4% κβ και WPI 10-30% κβ τα διαλύματα είχαν συμπεριφορά ψευδοπλαστικού. Αξιοσημείωτο είναι επίσης πως οι τιμές του επιφανειακού ιξώδους των διαλυμάτων αυξήθηκαν όσο αυξανόταν και η συγκέντρωση της BC σε αυτά, ανεξάρτητα με τη συγκέντρωση της WPI. Σε κάποιες περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση της BC ήταν πολύ μικρή, δηλαδή στο 1%κβ ή δεν υπήρχε καθόλου, το επιφανειακό ιξώδες του διαλύματος ήταν σε τόσο χαμηλές τιμές όπου το ρεόμετρο δεν ήταν δυνατόν να δώσει τιμές.

Έτσι συμπεραίνεται πως η ποσότητα της BC είναι αυτή που επηρεάζει την τιμή του επιφανειακού ιξώδους στα διαλύματα WPI-BC. Αυτό μπορεί και να επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες όπου η BC προστίθεται σε διάφορα συστήματα ως πηκτικό μέσο, αφού είναι δυνατόν να αυξήσει τις τιμές του ιξώδους αλλά και του επιφανειακού ιξώδους (Paximada et al, 2016).

Αυτό που πρέπει επίσης να σημειωθεί είναι οι διαφορές που βρέθηκαν ανάμεσα στο ιξώδες και το επιφανειακό ιξώδες των διαλυμάτων και πως επηρεάζονται αυτά από την προσθήκη της BC.

Στο γραφήμα [10] που ακολουθεί αποτυπώνονται οι τιμές του ιξώδους αλλά και του επιφανειακού ιξώδους των διαλυμάτων σε ρυθμό διάτμησης στα 10 s^{-1} .





Γράφημα [10]: Ιξώδες (A) και επιφανειακό ιξώδες (B) για τα διαλύματα WPI-BC.

◆10%κβ WPI, ■20%κβ WPI, ▲30% κβ WPI.

Όπως αποδεικνύεται και στο γράφημα[10] για μικρές συγκεντρώσεις WPI, το ιξώδες και το επιφανειακό ιξώδες δεν έχουν ιδιαίτερες διαφορές, όταν όμως ή συγκέντρωση αυξηθεί από 10%κβ σε 20-30%κβ οι διαφορές είναι εμφανείς.

Στην περίπτωση όπου η WPI είναι στο 20%κβ για το επιφανειακό ιξώδες (Γράφημα[10] (B)) τα διαλύματα χωρίζονται σε δύο περιοχές όπου η μία αντιπροσωπεύει τις συγκεντρώσεις της BC στα 1-4%κβ και η άλλη τις συγκεντρώσεις 4-16%κβ BC.

Όσον αφορά τα διαλύματα που περιέχουν 30%κβ WPI, σημειώθηκε πως το ιξώδες εμφανίζει δύο περιοχές, όπου η μία είναι για συγκεντρώσεις 1-4%κβ BC και η άλλη για 4-16%κβ BC, ενώ για την ίδια περίπτωση του επιφανειακού ιξώδους η πρώτη περιοχή ήταν χωριζόταν για τις συγκεντρώσεις 1-2%κβ BC και η δεύτερη για 2-16%κβ BC.

Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρθηκε πως το επιφανειακό ιξώδες μπορεί να δώσει καλύτερες προβλέψεις για την δυνατότητα ευκολία της ηλεκτρονηματοποίησης ενός διαλύματος, όπως στην περίπτωση συστημάτων χιτοζάνης με πολυαιθυλενοξείδιο (Chitosan-PEO) (Rocik et al, 2012) γεγονός που αντιτίθεται στα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης. Αυτό είναι πιθανόν να έγινε επειδή σε εκείνη τη μελέτη ο στόχος ήταν η παρασκευή ινών και όχι σωματιδίων.

Παρόλα αυτά εδώ μπορεί να σημειωθεί η συσχέτιση του ιξώδους με τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) της διαμέτρου των σωματιδίων. Για παράδειγμα για την περίπτωση των διαλυμάτων που είχαν συγκέντρωση 10%κβ WPI, όπου στην περίπτωση του ιξώδους και του επιφανειακού ιξώδους εμφανίζεται μόνο μία περιοχή (Γράφημα[10](B)) ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) του μεγέθους των σωματιδίων φαίνεται να είναι κάτω από το 1, γεγονός που αποδεικνύει ότι για συγκεντρώσεις WPI 10%κβ το μέγεθος των σωματιδίων εμφανίζει μονοδιασπορά. Όταν τα διαλύματα περιέχουν 20%κβ WPI, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω στην περίπτωση του επιφανειακού ιξώδους (Γράφημα[10](B)) οι τιμές του χωρίζονται σε δύο περιοχές σε σχέση με την συγκέντρωση της BC, ενώ στην περίπτωση του ιξώδους δεν εμφανίζεται τέτοιος διαχωρισμός. Μελετώντας και την πολυδιασπορά του μεγέθους για τη συγκέντρωση της WPI στο 20% εμφανίζεται διαφορά σε αυτή όσο αλλάζει η συγκέντρωση της BC, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την περίπτωση του επιφανειακού ιξώδους. Πιο συγκεκριμένα για συγκεντρώσεις της BC μεταξύ 1-2%κβ ο PDI του μεγέθους των σωματιδίων είναι κάτω από το 1 δηλαδή εμφανίζει μονοδιασπορά, ενώ για τιμές της BC μεταξύ 4-16%κβ ο PDI είναι μεγαλύτερος του 1 δηλαδή υπάρχει πολυδιασπορά.

Όσον αφορά τα διαλύματα που περιέχουν 30%κβ WPI παρατηρήθηκαν στο ιξώδες αλλά και στο επιφανειακό ιξώδες δυο περιοχές, όπου στην περίπτωση του ιξώδους η μία περιοχή περιείχε τα διαλύματα με BC σε συγκέντρωση 1-4%κβ και η άλλη τα διαλύματα με 4-16%κβ BC, ενώ για το επιφανειακό ιξώδες οι περιοχές διαχωρίστηκαν στις συγκεντρώσεις 1-2%κβ BC και 2-16%κβ BC.

Οι τιμές για το επιφανειακό ιξώδες ταιριάζουν καλύτερα με τον PDI του μεγέθους των σωματιδίων που έχουν παραχθεί, αφού τα διαλύματα που οι τιμές του επιφανειακού τους ιξώδους βρίσκονται στην πρώτη περιοχή έχουν PDI μικρότερο από 1, δηλαδή εμφανίζουν μονοδιασπορά και αυτά που οι τιμές του επιφανειακού τους ιξώδους βρίσκονται στη δεύτερη περιοχή βάσει του PDI εμφανίζουν πολυδιασπορά (PDI>1).

Ο λόγος που στην περίπτωση του επιφανειακού ιξώδους, είναι πιο εύκολο να βρεθούν διαφορετικές περιοχές στις τιμές είναι ότι η μέτρηση αυτή είναι πολύ μεγάλης ευαισθησίας και έτσι μπορεί να δείξει την οποιαδήποτε μικρή διαφορά που μπορεί να έχουν δύο διαλύματα.

3.4 Επιλογή κατάλληλου δείγματος

Η εξέταση των παραπάνω αποτελεσμάτων οδήγησε στην επιλογή του βέλτιστου δείγματος για την ενσωμάτωση της EGCG στο δεύτερο πειραματικό στάδιο. Για να θεωρηθεί η ενθυλάκωση του βιοενεργού συστατικού επιτυχής θα πρέπει τα νανοσωματίδια να έχουν το κατάλληλο μέγεθος ώστε να μπορεί να γίνει η ενσωμάτωση και συγχρόνως να μπορούν να απελευθερώσουν το βιοενεργό συστατικό με το σωστό ρυθμό. Επίσης σημαντική παράμετρος επιλογής δείγματος ήταν και οι ιδιότητες του αρχικού διαλύματος. Η ιξωδοελαστική συμπεριφορά, η ηλεκτρική αγωγιμότητα αλλά και η επιφανειακή τάση είναι παράμετροι που εξετάστηκαν ώστε να επιλεγεί το καλύτερο δείγμα. Το δείγμα με συγκεντρώσεις 20% κβ WPI και 8% κβ BC εμφάνισε τον καλύτερο συνδυασμό ιδιοτήτων σαν διάλυμα πριν και μετά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού. Μετά τον ηλεκτροψεκασμό, το δείγμα που είχε συγκεντρωθεί στον συλλέκτη ήταν αρκετά ομοιογενές και σε μεγάλη ποσότητα. Μετά από τη μελέτη των παραπάνω αλλά και την στατιστική ανάλυση που έγινε στα δείγματα, αυτό με συγκεντρώσεις 20%κβ WPI και 8% κβ BC φάνηκε να είναι το καταλληλότερο για την ενθυλάκωση της EGCG.

3.5 Ενσωμάτωση EGCG

Στο πρώτο πειραματικό στάδιο παρασκευάστηκαν διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις WPI-BC, 10-30%κβ WPI και 1-16%κβ BC. Βάσει των αποτελεσμάτων αλλά και της στατιστικής ανάλυσης που έγινε σε όλα τα δείγματα, το δείγμα που επιλέχθηκε για να χρησιμοποιηθεί στο δεύτερο πειραματικό στάδιο ήταν αυτό που περιείχε 20%κβ WPI και 8%κβ BC.

Κάποια δείγματα δεν είχαν μεταξύ τους διαφορές ως προς το μέσο όρο της διαμέτρου των σωματιδίων αλλά και των υπόλοιπων ιδιοτήτων. Το συγκεκριμένο δείγμα όμως επιλέχθηκε γιατί είχε τις καλύτερες ιδιότητες πριν και μετά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού αλλά ήταν και το διάλυμα με το οποίο δεν προέκυψε κάποιο πρόβλημα κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού καθώς επίσης έβγαλε το καλύτερο αποτέλεσμα στον συλλέκτη του σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Στη συγκεκριμένη μελέτη το ζητούμενο ήταν η δημιουργία σωματιδίων από βιοπολυμερή όπως η WPI και η BC, τα οποία θα έχουν τη δυνατότητα όχι μόνο να ενθυλακώσουν την EGCG και αλλά και να την προστατέψουν από τις διάφορες συνθήκες, όπως οι διάφορες τιμές pH, θερμοκρασίας και υγρασίας.

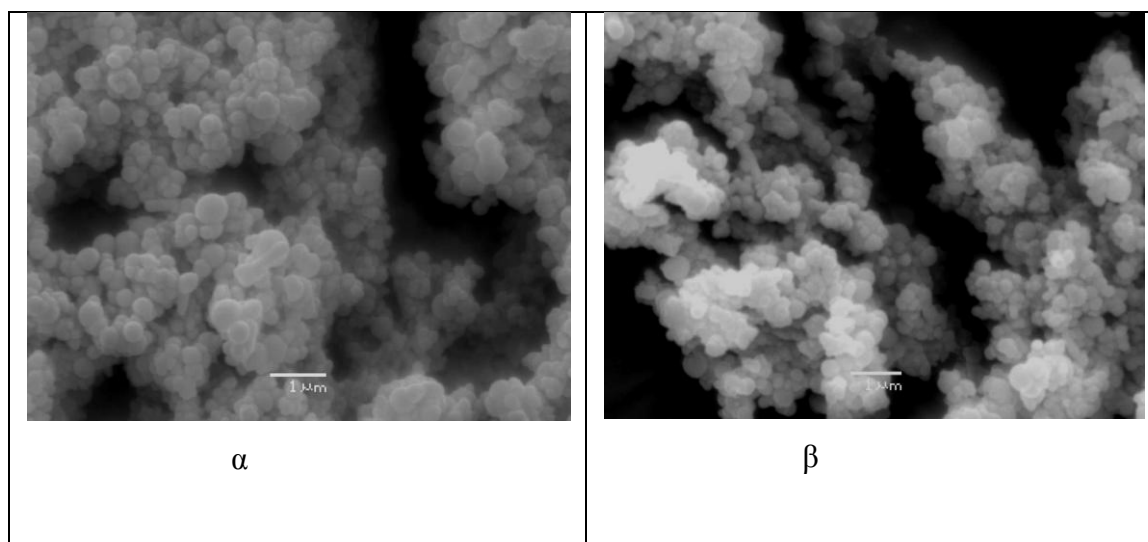
Τα ποσοστά της EGCG που προστέθηκαν στο διάλυμα των βιοπολυμερών ήταν 0,1 mg EGCG/mL διαλύματος και 0,2 mg EGCG/mL διαλύματος. Στη συνέχεια ακολούθησε ο ηλεκτροψεκασμός και η αποθήκευση των δειγμάτων σε διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασιών και υγρασίας, όπως αναφέρεται και στην πειραματική διαδικασία.

Οι μετρήσεις που έλαβαν χώρα ήταν η μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων με την ενθυλακωμένη EGCG καθώς και ο έλεγχος απόδοσης της ενθυλάκωσης αλλά και της απελευθέρωσης της EGCG με τη μέτρηση της απορρόφησης στο UV. η απελευθέρωση της EGCG ελέγχθηκε με τη βοήθεια των κάποιων πρότυπων καμπυλών βαθμονόμησης.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε ο ηλεκτροψεκασμός και για τις δύο ποσότητες EGCG ήταν για το ρυθμό ροής του διαλύματος (flow rate) στα 40 ± 2 $\mu\text{L}/\text{h}$ και για το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο (voltage) στα $19 \pm 0,5$ kV και τέλος η απόσταση του ακροφύσιου από τον συλλέκτη ήταν στα 13 cm. Τα δείγματα που παράχθηκαν από τον ηλεκτροψεκασμό αποθηκεύτηκαν στις συνθήκες που αναφέρονται στην πειραματική διαδικασία και με το πέρας του χρόνου που είχε οριστεί κατά τον πειραματικό σχεδιασμό έγιναν και οι ανάλογες μετρήσεις για το μέγεθος των σωματιδίων αλλά και την απελευθέρωση της EGCG.

3.6 Μικροδομή σωματιδίων με EGCG

Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις EGCG (0,1mg EGCG/ml διαλύματος και 0,2mg EGCG/ml διαλύματος) εξετάστηκαν με το SEM. Οι παρακάτω εικόνες δείχνουν τη μικροδομή των δειγμάτων με την ενθυλακωμένη EGCG.



Εικόνα [24]: Εικόνες από το SEM για τα σωματίδια μετά την ενθυλάκωση της EGCG. α) 0,01% κβ EGCG β) 0,02% κβ EGCG

Όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες τα διαλύματα WPI-BC ακόμα και με την προσθήκη της EGCG, μετά τον ηλεκτροψεκασμό είχαν σφαιρική δομή. Είναι γνωστό πως η μορφολογία των ηλεκτροψεκασμένων υλικών κυρίως εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά του αρχικού πολυμερικού διαλύματος (Rubio et al, 2012). Η σφαιρική δομή είναι χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων σωματιδίων τα οποία περιέχουν σφαιρικής δομής πρωτεΐνες όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, έτσι λοιπόν και μετά την ενσωμάτωση της EGCG αν αυτή έχει γίνει με επιτυχία θα πρέπει η δομή να είναι σφαιρική όπως και ήταν. Άρα σε πρώτο στάδιο η ενσωμάτωση της EGCG μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής. Σε περίπτωση που δεν ήταν επιτυχής η ενσωμάτωση είναι πιθανό τα σωματίδια να διαμορφώνονταν σε άλλη δομή και όχι στη σφαιρική ή η EGCG να συσσωρευόταν στην επιφάνεια των σωματιδίων. Σε προηγούμενη μελέτη όπου έγινε ενθυλάκωση κατεχινών τα νανοσωματίδια μαλτοδεξτρίνης που παράχθηκαν με τη μέθοδο του spray-drying ήταν επίσης σφαιρικά (Ferreira et al, 2008).

3.7 Απόδοση ενσωμάτωσης της EGCG στα διαλύματα WPI-BC

Για να μελετηθεί η απόδοση ενσωμάτωσης της EGCG αρχικά μετρήθηκε η απορρόφησή της, στα διάφορα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Η EGCG έχει μέγιστη απορρόφηση στα 280nm (Rocha et al., 2011).

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και έτσι κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης για την απορρόφηση της EGCG σε διάφορα μέσα με διαφορετικό pH.

Από τις καμπύλες αυτές προκύπτει μια γραμμική εξίσωση τύπου $y=ax+b$ όπου y είναι η απορρόφηση της EGCG (Abs) και x η ποσότητα της EGCG που περιέχεται στο διάλυμα.

Αυτό που ελέγχθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν το ποσοστό της EGCG που παρέμενε κάθε φορά στα δείγματα με το πέρασ του χρόνου και κάτω από τις συνθήκες που είχαν οριστεί κάθε φορά. Για τη συγκεκριμένη μελέτη μετρήθηκε και το ποσοστό ενσωμάτωσης του βιοενεργού συστατικού στα νανοσωματίδια του συστήματος WPI-BC μέσω της απορρόφησης. Για να επιβεβαιωθεί η απόδοση ενθυλάκωσης της EGCG έγινε η μέτρηση της απορρόφησης για τα δείγματα την ημέρα όπου παρασκευάστηκαν τα δείγματα. Έτσι για την περίπτωση της ποσότητας της EGCG στα 0,1 mg/ml διαλύματος WPI-BC η απόδοση ενσωμάτωσης έφτασε στο $51 \pm 8\%$, ενώ για τη διπλάσια ποσότητα της EGCG η απόδοση ήταν στο $30 \pm 5\%$.

Πίνακας [2]: Ποσοστό ενσωμάτωσης της EGCG και μέγεθος σωματιδίων την ημέρα 0.

	%EE	Διάμετρος (nm)
0.1EGCG	51±8	202±2
0.2 EGCG	30±5	237±6
Μάρτυρας	-	182±3

Γενικά η EGCG έχει υδρόφιλο χαρακτήρα και έτσι σε συγκεκριμένες ποσότητες μπορεί να ενθυλακωθεί σε συστήματα που περιέχουν πρωτεΐνη, αλληλεπιδρώντας με αυτήν ανάλογα με τις αναλογίες του συστήματος. Οι πολυφαινόλες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες ή οι πολυσακχαρίτες, με αντιστρεπτό ή μη αντιστρεπτό τρόπο. Στην περίπτωση του αντιστρεπτού τρόπου δημιουργούνται μη πολικοί δεσμοί, όπως δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβοι δεσμοί και δυνάμεις van der Waals.

Στις μη αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυφαινολών και των μακρομορίων που λαμβάνουν χώρα οι δεσμοί είναι ομοιοπολικοί (Bourvellec et al, 2012).

Οι πολυσακχαρίτες όπως είναι η BC έχει αποδειχθεί πως μπορούν να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση που μπορεί να έχουν οι πρωτεΐνες με τις πολυφαινόλες. Αυτή η υπόθεση μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα των πολυσακχαριτών να δημιουργούν ένα τριαδικό σύστημα πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη-πολυφαινόλης το οποίο θα έχει ενισχυμένη διαλυτότητα στα υδατικά διαλύματα. Μία άλλη υπόθεση είναι πως οι πολυσακχαρίτες ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες και καταλύουν την αλληλεπίδρασή τους με τις πολυφαινόλες ενθυλακώνοντας τις δεύτερες (Luck et al, 1994).

Η μικρή απόδοση ενθυλάκωσης της EGCG όταν βρίσκεται σε ποσότητα 0,2 mg/ml πιθανόν να οφείλεται στην υπόθεση που έχει γίνει πως υπάρχει μια κρίσιμη ποσότητα EGCG όπου μπορεί να ενθυλακωθεί και αυτή είναι στο 0,1mg/ml, όπου πάνω από αυτή την ποσότητα η EGCG μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες του διαλύματος (Zhong and Shahidi, 2011).

3.8 Μέγεθος νανοσωματιδίων

Το μέγεθος των σωματιδίων μετά την ενσωμάτωση της EGCG φάνηκε να έχει κάποια αύξηση. Με την προσθήκη 0,01%κβ EGCG η μέση τιμή της διαμέτρου των σωματιδίων έφτασε στα 202nm, ενώ με την προσθήκη της EGCG σε συγκέντρωση 0,02%κβ έφτασε στα 237nm. Το μέγεθος των σωματιδίων πριν την ενθυλάκωση της EGCG όπως προέκυψε από τις μετρήσεις ήταν στα 182nm. Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στην ενθυλάκωση βιοενεργών συστατικών και πως επηρεάζεται το μέγεθος των σωματιδίων που τα ενθυλακώνουν. Προηγούμενη μελέτη αναφέρει πως κατά την ενθυλάκωση β-καροτένιου σε WPC δημιουργήθηκαν σφαιρικά σωματίδια τα οποία είχαν περιβάλει το β-καροτένιο. Μετά την ενθυλάκωση του βιοενεργού το μέγεθος των σωματιδίων αυξήθηκε (Lopez-Rubio et al, 2012). Άλλες μελέτες συνδύασαν το γεγονός της αύξησης του μεγέθους των σωματιδίων ή της διαμέτρου των ινών στην περίπτωση της ηλεκτρονηματοποίησης με την αύξηση των ιδιοτήτων των διαλυμάτων.

Σε άλλη έρευνα όπου αφορούσε την ενσωμάτωση EGCG σε ζείνη, η διάμετρος των ινών φάνηκε να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτές οι οποίες είχαν παρασκευαστεί μόνο με ζείνη. Αυτό δικαιολογείται λόγω της συσσωμάτωσης της EGCG στις ίνες της ζείνης (Li et al, 2009).

Στο σύστημα πολυβυνιλικής αλκοόλης με τη βανιλίνη η διάμετρος των ινών αυξήθηκε κατά την προσθήκη της δεύτερης λόγω της αύξησης της επιφανειακής ενέργειας και της μείωσης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του διαλύματος (Kayaci et al, 2012).

Αντίθετα κατά την ενθυλάκωση του γαλικού οξέος σε ίνες ζείνης παρατηρήθηκε πως με την αύξηση της ποσότητας του βιοενεργού συστατικού αυξανόταν και η διάμετρος των ινών που παρασκευάζονταν κατά την ηλεκτρονηματοποίηση. Αυτό το αποτέλεσμα από τους συγγραφείς της συγκεκριμένης μελέτης έγκειται στο γεγονός της αύξησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και του ιζώδους του διαλύματος (Neo et al, 2013).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα από υπόλοιπες έρευνες βγαίνει το συμπέρασμα πως η αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων κατά την ενθυλάκωση ενός βιοενεργού συστατικού έχει να κάνει με το πώς το βιοενεργό αυτό αλληλεπιδρά με τα συστατικά των σωματιδίων.

3.9 Συνθήκες αποθήκευσης νανοσωματιδίων

Αφού επιβεβαιώθηκε πως η EGCG έχει ενσωματωθεί στα νανοσωματίδια του μείγματος WPI-BC, τα δείγματα που προέκυψαν από την ενσωμάτωση των δύο διαφορετικών ποσοτήτων EGCG αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές συνθήκες κάθε φορά, ώστε να ελεγχθεί κατά πόσο οι αλλαγές στη σχετική υγρασία περιβάλλοντος και την υγρασία, την θερμοκρασία αλλά και το pH των νανοσωματιδίων επηρεάζουν την παραμονή της EGCG σε αυτά.

3.9.1 pH

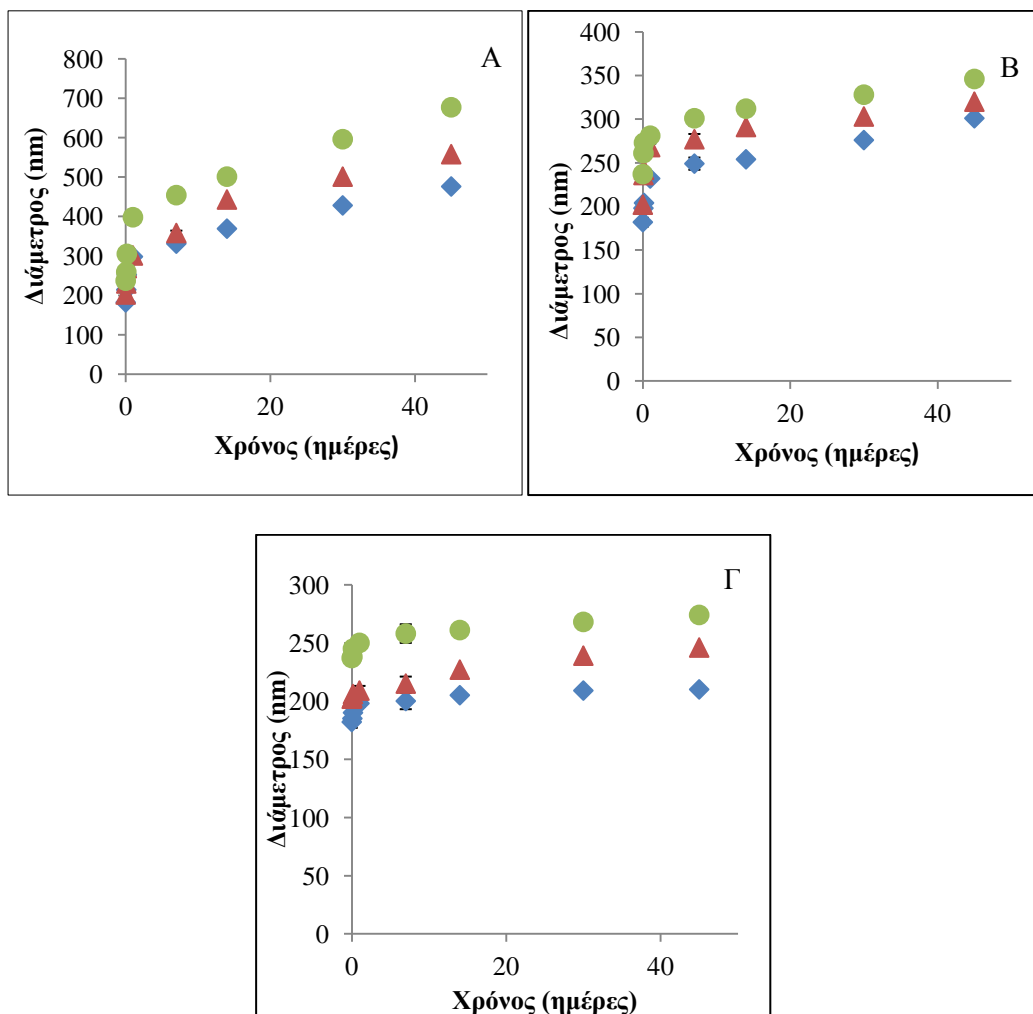
Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με την ενσωματωμένη EGCG και στις δύο ποσότητες 0,1 mg και 0,2 mg/ml διαλύματος διαλύθηκαν όπως αναφέρθηκε και στην πειραματική πορεία σε ρυθμιστικά διαλύματα τριών διαφορετικών pH. Οι τιμές για το pH των διαλυμάτων αυτών ήταν 3, 6 και 9.

Από τη στιγμή που διαλύθηκαν τα νανοσωματίδια στα ρυθμιστικά διαλύματα έγιναν μετρήσεις πάνω στο μέγεθος των νανοσωματιδίων και μετρήσεις απορρόφησης ώστε να αποδοθεί τελικά το ποσοστό παραμονής της EGCG σε αυτά. Οι δύο τύπων μετρήσεις έγιναν για την ώρα μηδέν όπου διαλύθηκαν τα νανοσωματίδια στα ρυθμιστικά διαλύματα και μετά για τις δύο και τέσσερις ώρες παραμονής σε αυτά υπό ανάδευση.

Μετά το πέρας των τεσσάρων ωρών έγιναν οι ίδιες μετρήσεις για 1, 7, 14, 30, και 45 ημέρες παραμονής στα ρυθμιστικά διαλύματα αφού είχαν αποθηκευτεί σε σκοτεινό μέρος. Εκτός από τα δύο δείγματα με τις διαφορετικές ποσότητες EGCG η ίδια διαδικασία έγινε και για την EGCG.

Έγινε μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων που περιείχαν EGCG και στις δύο συγκεντρώσεις (0,01 % κβ EGCG και 0,02 % κβ EGCG) αλλά και ενός δείγματος χωρίς ενσωματωμένη EGCG (Blank). Στο παρακάτω γράφημα [11] απεικονίζονται οι αλλαγές στο μέγεθος των νανοσωματιδίων σε σχέση με τη διάλυσή τους σε διάφορα διαλύματα με διαφορετικά pH αλλά και σε σχέση με το χρόνο παραμονής τους σε αυτά. Αυτό που διαπιστώθηκε αρχικά είναι πως για και για τις τρεις τιμές pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων όπου διαλύθηκαν τα δείγματα, με το πέρας του χρόνου το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων αυξήθηκε με σταθερό ρυθμό. Με τη διάλυση των νανοσωματιδίων στα ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών pH παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος αυτών αυξανόταν με το πέρας του χρόνου, ωστόσο όχι στο ίδιο ποσοστό όσο αυξανόταν το pH.

Πιο συγκεκριμένα για τα νανοσωματίδια με συγκέντρωση EGCG 0,1mg/ml διαλύματος όταν διαλύθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3 παρατηρήθηκε μια αύξηση της διαμέτρου τους από τα 202nm στα 558nm την 45^η ημέρα παραμονής τους, ενώ στο διάλυμα όπου η τιμή του pH ήταν στο 9 η μέση διάμετρος τους αυξήθηκε από τα 202nm στα 246nm. Το ίδιο συνέβη και με τα νανοσωματίδια τα οποία περιείχαν 0,2mg EGCG/ml διαλύματος. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τα νανοσωματίδια στα οποία δεν είχε ενσωματωθεί ποσότητα EGCG.



Γράφημα[11]: Μέγεθος νανοσωματιδίων σε σχέση με το χρόνο και το pH.

A) pH 3, B) pH 6, Γ) pH 9. ♦Blank ▲0,1 EGCG, • 0,2 EGCG

Το γεγονός αυτό μπορεί να επιβεβαιώσει πως το μέγεθος των νανοσωματιδίων διαμορφώνεται όχι μόνο από την ποσότητα της EGCG αλλά και από το πώς αλληλεπιδρά αυτή με το σύστημα των WPI-BC αλλά ακόμα περισσότερο πως αντιδρά αυτό στις διάφορες συνθήκες αποθήκευσής του.

Όσον αφορά την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων όπως φαίνεται στο Παράρτημα (Γράφημα [Π3] [Π4] [Π5]) παρατηρήθηκε πως σε όλες τιμές των pH δεν ήταν σταθερή και αυξήθηκε.

Το γεγονός της αύξησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων πιθανόν να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις της WPI με την BC, αφού όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η ανάμειξη των δύο αυτών πολυμερών προκαλεί την αναδιαμόρφωση της μικροδομής των πρωτεϊνών οι οποίες αποκτούν μια πιο ανοικτή δομή (Kriegel et al. 2009).

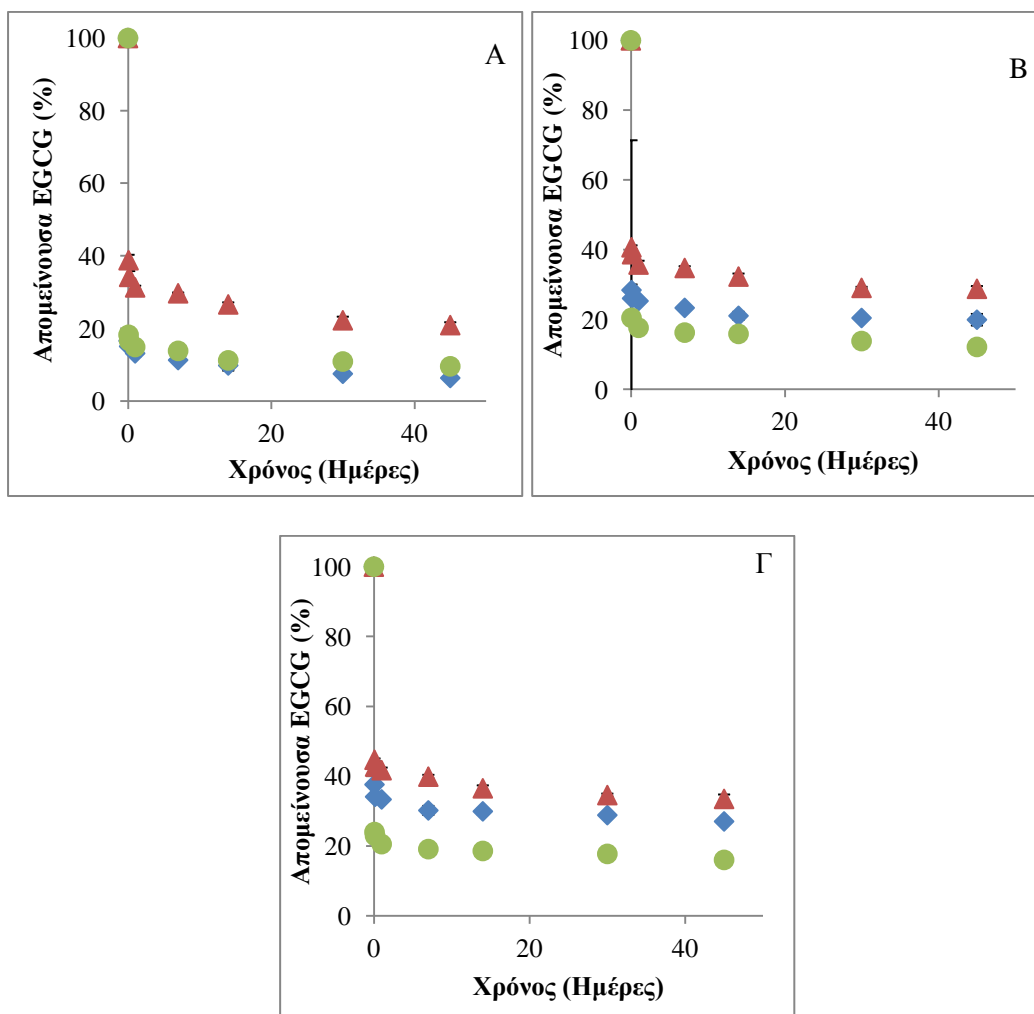
Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς ήταν σε όλες τις περιπτώσεις πάνω από τη μονάδα ($PDI > 1$), γεγονός που αποδεικνύει και ότι τα νανοσωματίδια βρίσκονται σε πολυδιασπορά, η οποία αυξάνεται όσο παραμένουν τα δείγματα στα ρυθμιστικά διαλύματα.

Η αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων συνάδει με το ποσοστό απελευθέρωσης της EGCG στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3 όπως φαίνεται και στο γράφημα [12](A) όπου αναπαρίσταται η ποσότητα της EGCG που έχει παραμείνει όταν τα δείγματα διαλύθηκαν στο διάλυμα με pH 3, με το πέρας του χρόνου .

Στο γράφημα [12] αναπαρίσταται η ποσότητα της EGCG που έχει παραμείνει στα δείγματα κατά τη διάλυση τους σε διαλύματα με διάφορα pH σε συνάρτηση με το χρόνο. Η ποσότητα της EGCG που απελευθερώνεται όταν τα νανοσωματίδια έχουν διαλυθεί σε αυτό το διάλυμα όπου το pH ήταν στο 3 είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την απελευθέρωση της στα άλλα διαλύματα όπου το pH τους είναι 6 και 9. Κατά την παραμονή των νανοσωματιδίων στα ρυθμιστικά διαλύματα αποθηκεύτηκε επίσης σε αυτά και EGCG χωρίς να είναι ενθυλακωμένη και παρατηρήθηκε και η πορεία αυτής σε όλο το χρόνο της αποθήκευσης της. Τα αποτελέσματα που αναμενόταν ήταν το ποσοστό απελευθέρωσης της καθαρής EGCG να είναι μεγαλύτερο σε σχέση με την ενθυλακωμένη στο σύστημα WPI-BC. Αυτό επιβεβαιώθηκε μόνο στην περίπτωση όπου η ποσότητα EGCG που είχε ενσωματωθεί σε αυτά τα συστήματα ήταν 0,01% κβ, και για όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα στα οποία διαλύθηκαν. Δηλαδή για τις τρεις τιμές pH στο 3, στο 6 και στο 9 το ποσοστό απελευθέρωσης της καθαρής EGCG έφτασε σε ποσοστά 93,6%, 80% και 73% ενώ για την 0,01% κβ EGCG ήταν 79%, 71.1% και 66% αντίστοιχα, γεγονός το οποίο ήταν και το αναμενόμενο. Βάσει της στατιστικής μέτρησης τα ποσοστά αυτά διαφέρουν

Η EGCG όταν βρεθεί σε όξινο περιβάλλον δείχνει να είναι αρκετά σταθερή, σε αντίθεση με την παραμονή της σε αλκαλικό περιβάλλον όπου υποβιβάζεται (Bazinet et al, 2010). Όταν η EGCG είναι ενθυλακωμένη στο σύστημα WPI-BC τα ποσοστά παραμονής της είναι μεγαλύτερα, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή προστασία της από το εκάστοτε περιβάλλον η οποία όμως ήταν σε μικρά ποσοστά.

Σε έρευνα σχετικά με το ρυθμό αποδόμησης της EGCG σε αλκαλικό περιβάλλον αποδείχθηκε πως με την ενθυλάκωση του βιοενεργού συστατικού από ένα σύστημα χιτοσάνης με πολυτριφωφορικό η αποδιοργάνωση του έγινε σε πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τη μη ενσωματωμένη EGCG (Dude et al, 2012). Η απελευθέρωση της EGCG σε συγκέντρωση 0,02%κβ όμως κατά την παραμονή της στα ρυθμιστικά διαλύματα με pH 6 και 9 παρουσίασε μεγαλύτερο ποσοστό απελευθέρωσης σε σχέση με την καθαρή EGCG. Οι βασικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στην WPI είναι η β-λακτογλοβουλίνη και η α-λακταλβουμίνη. Σε προηγούμενες μελέτες όπου ερευνήθηκε η ικανότητα της α-λακτογλοβουλίνης να συγκρατήσει την EGCG σε διάφορες τιμές pH αλλά και σε διάφορες θερμοκρασίες, η απελευθέρωση της EGCG σε διαλύματα μικρού pH γινόταν λόγω του ότι η πρωτεΐνη σε όξινα διαλύματα κατακρημνιζόταν (Wang et al, 2013). Έτσι και στην περίπτωση της συγκεκριμένης μελέτης η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει πιο εύκολα στην απελευθέρωση της EGCG αλλά και στην αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων.

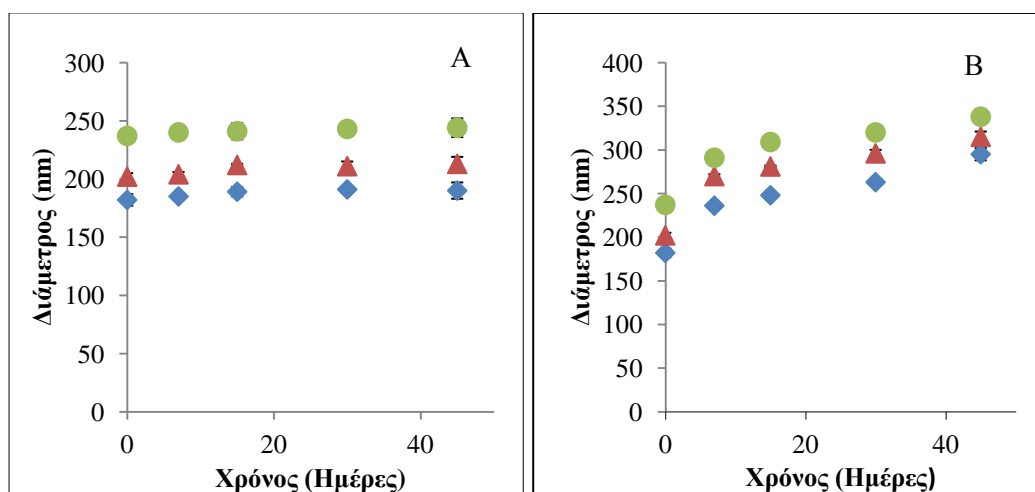


Γράφημα[12]: Απελευθέρωση EGCG σε σχέση με το χρόνο και τα διαφορετικά pH

A) pH 3, B) pH 6, Γ) pH 9. ◆EGCG ▲0,1 EGCG, ● 0,2 EGCG

3.9.2 Σχετική Υγρασία περιβάλλοντος

Οι ίδιες μετρήσεις για τα δείγματα έγιναν και σε διαφορετικές συνθήκες υγρασίας περιβάλλοντος για να μελετηθεί η απελευθέρωση της EGCG. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες 20%, 40%, 60% και 80% σχετικής υγρασίας και έγιναν μετρήσεις του μεγέθους των νανοσωματιδίων και της απόδοσης ενσωμάτωσης της EGCG. Κάποια από τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο γράφημα[13]



Γράφημα[13]: Μέγεθος νανοσωματιδίων σε σχέση με το χρόνο και διάφορες τιμές υγρασίας. A) 40% υγρασία B) 80% υγρασία ♦Blank ▲0,1 EGCG, •0,2 EGCG

Τα αποτελέσματα για την αλλαγή του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε περιβάλλον υγρασίας 20% και 60% απεικονίζονται στο Παράρτημα (Γράφημα [Π1]). Κατά την τοποθέτηση των δειγμάτων σε περιβάλλον με διαφορετικές υγρασίες παρατηρήθηκε αλλαγή στο μέγεθος των σωματιδίων αυτών που είχαν τοποθετηθεί σε περιβάλλον με πιο μεγάλο ποσοστό υγρασίας, δηλαδή για 60% και 80%. Για το δείγμα 0,01% κβ EGCG που τοποθετήθηκε σε περιβάλλον υγρασίας 20% μετά το πέρας των 45 ημερών δεν υπήρξε καμία αλλαγή στη μέση διάμετρο των νανοσωματιδίων. Κάτι ανάλογο συνέβη και στην περίπτωση του δείγματος 0,02% κβ EGCG.

Όσο μεγάλωνε το ποσοστό της υγρασίας παρατηρήθηκε μια μικρή άνοδος στις τιμές του μεγέθους των νανοσωματιδίων και για τις δύο περιπτώσεις συγκέντρωσης EGCG αλλά και για το δείγμα χωρίς την ενσωματωμένη EGCG (Blank).

Για παράδειγμα όταν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε περιβάλλον με υγρασία 40% το δείγμα 0,1 EGCG έδειξε να έχει μία αύξηση στο μέγεθος των νανοσωματιδίων από 202 nm στα 213nm μετά από 45 ημέρες ενώ για το περιβάλλον υγρασίας 80% η μέση διάμετρος τους αυξήθηκε από 202nm στα 315nm.

Αυτή η διαφοροποίηση στο μέγεθος σε σχέση με την υγρασία πιθανόν να έχει να κάνει με την σταθερότητα των πρωτεϊνών σε υγρό περιβάλλον άρα όσο αυξάνεται η υγρασία είναι λογικό να αυξάνεται και η διαλυτότητα των νανοσωματιδίων.

Επίσης η παρουσία της BC αυξάνει τη διαλυτότητα των νανοσωματιδίων έτσι σε ένα περιβάλλον με υψηλά ποσοστά υγρασίας το μέγεθος τους αυξάνεται.. Άρα λόγω της διόγκωσης των πολυμερών αυξάνεται και ο όγκος των σωματιδίων

Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων απεικονίζεται στο Παράρτημα στα γραφήματα [Π5] [Π6] και [Π7]. Από τη μελέτη του φάνηκε πως δεν αυξήθηκε η κατανομή για τα νανοσωματίδια που αποθηκεύτηκαν σε υγρασίες 20% και 40%, ενώ στις υγρασίες 60% και 80% παρατηρήθηκε μια αύξηση δηλαδή η κατανομή δεν ήταν σταθερή.

Ο δείκτης πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων ήταν μεγαλύτερος από τη μονάδα ($PDI > 1$), άρα υπήρχε πολυδιασπορά που όμως επειδή οι τιμές του PDI ήταν πολύ κοντά στη μονάδα η πολυδιασπορά δεν ήταν μεγάλη.

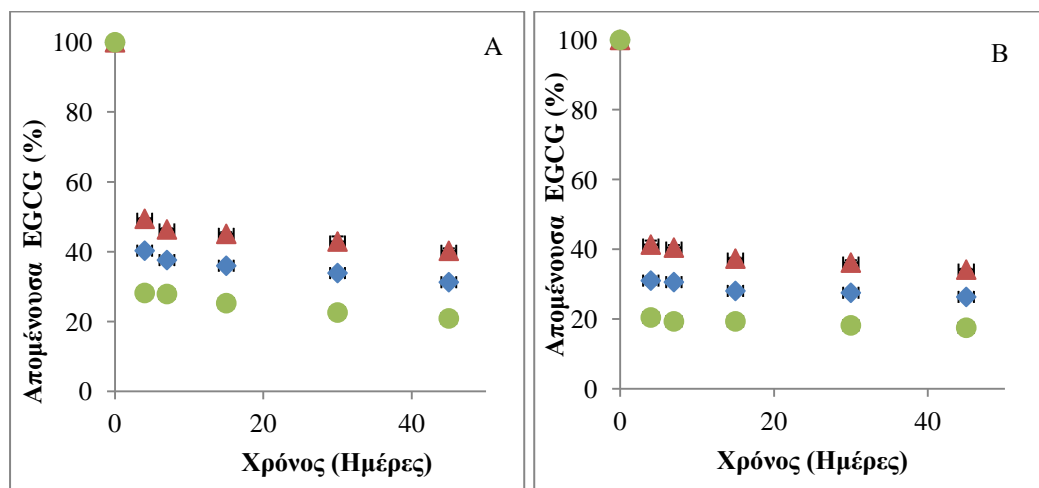
Το γράφημα [14] που απεικονίζει την απελευθέρωση της EGCG σε συνθήκες υγρασίας 40% και 80%. Στο Παράρτημα (Γράφημα [Π2]) παρουσιάζονται τα γραφήματα που απεικονίζουν τα ποσοστά της εναπομένουσας EGCG στα νανοσωματίδια όταν αυτά αποθηκεύτηκαν σε υγρασίες 20% και 80%. Παρατηρήθηκε πως μετά τις 15 ημέρες το ποσοστό της ενθυλακωμένης EGCG ήταν στο 50% και μειώθηκε λίγο μέχρι τις 45 ημέρες. Αυτό αποδεικνύει επίσης ότι η υγρασία του περιβάλλοντος που αποθηκεύονται τα νανοσωματίδια επηρεάζει τον ρυθμό απελευθέρωσης της EGCG, και ότι το ποσοστό που χάθηκε έχει να κάνει με τις αλληλεπιδράσεις της WPI με το βιοενεργό συστατικό. Σε προηγούμενη μελέτη όπου έγινε ενθυλάκωση EGCG σε ίνες ζείνης τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε υγρασία 75% η EGCG αντέδρασε με το νερό και η απελευθέρωσή της ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν σε περιβάλλον με 0% υγρασία, (Li et al, 2009).

Όπως και στην περίπτωση των μετρήσεων της απορρόφησης σε διαφορετικά pH έτσι και στις διαφορετικές υγρασίες φάνηκε η διαφορά στα ποσοστά απελευθέρωσης της EGCG, ανάμεσα στα δείγματα τα οποία περιείχαν 0,01 και 0,02 % κβ EGCG αντίστοιχα. Όπως ήταν αναμενόμενο, όταν στα δείγματα ήταν ενθυλακωμένη 0,1% EGCG τα ποσοστά απελευθέρωσης της ήταν μικρότερα σε σχέση με τα ποσοστά που αφορούσαν την ελεύθερη EGCG.

Αυτό όμως δε συνέβη και στην περίπτωση όπου η EGCG βρισκόταν σε ποσοστό 0,2% στο σύστημα WPI-BC. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα ποσοστά απελευθέρωσης του βιοενεργού συστατικού έφτασαν για τα νανοσωματίδια που είχαν αποθηκευτεί σε περιβάλλον με υγρασία 60% στο 73% ενώ για την ελεύθερη EGCG η απελευθέρωση της έφτανε σε ποσοστά 59%.

Αυτό το φαινόμενο είναι πιθανό να στηρίζεται στη θεωρία πως υπάρχει μια κρίσιμη ποσότητα της EGCG η οποία μπορεί να ενσωματωθεί στην WPI.

Σε μελέτες που έγιναν πάνω σε γαλακτώματα πρωτεϊνών με EGCG αποδείχθηκε πως όταν ξεπεραστεί το όριο ποσότητας η EGCG θα διαρρεύσει στην υδατική φάση του γαλακτώματος και θα συμπλοκοποιηθεί με την β-λακτογλοβουλίνη (Almajano et al, 2007).



Γράφημα[14]: Απελευθέρωση EGCG σε σχέση με το χρόνο σε διάφορες υγρασίες.

A)40% υγρασία, B)80% υγρασία. ♦EGCG ▲0,1 EGCG, • 0,2 EGCG

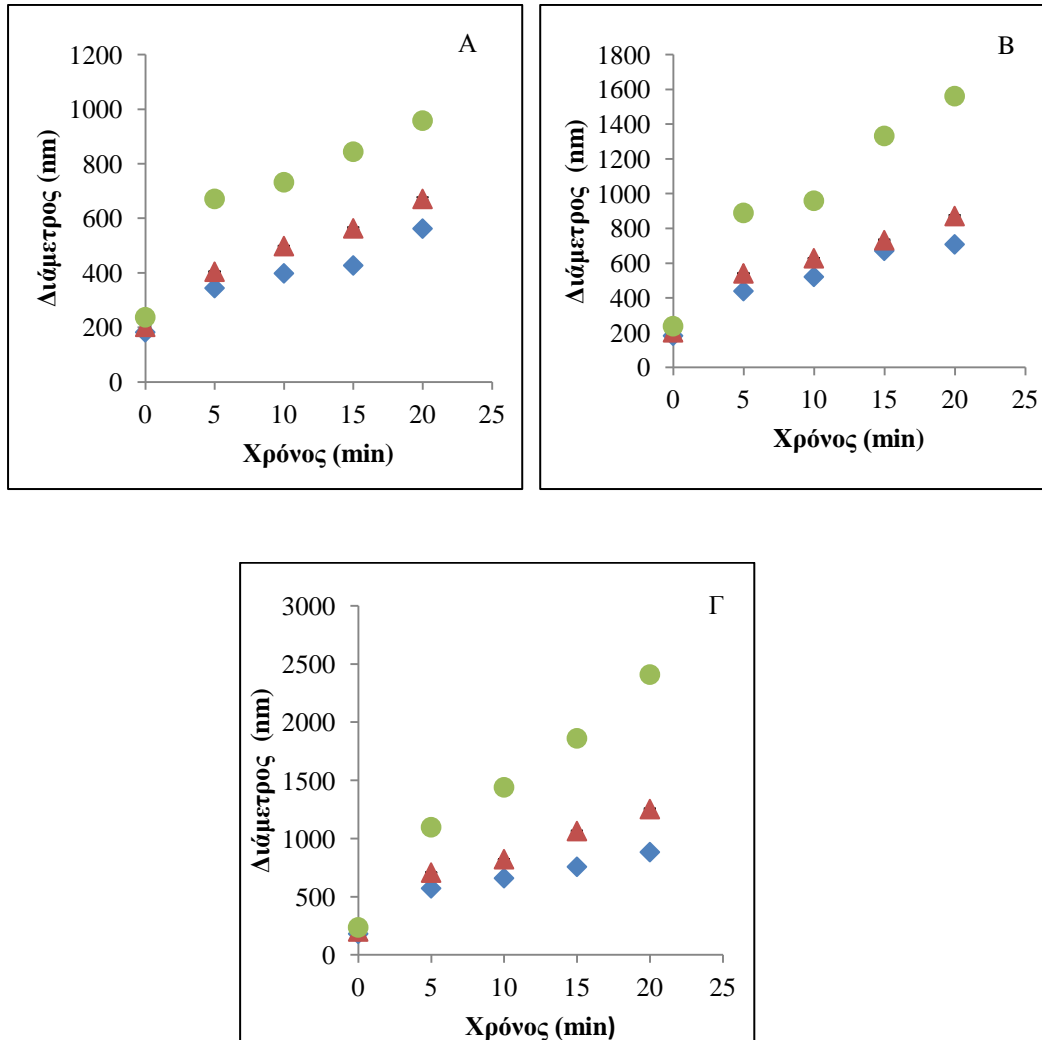
3.9.3 Θερμοκρασία

Έγινε επίσης έλεγχος της απελευθέρωσης της EGCG από τα δείγματα συστημάτων WPI-BC κατά την παραμονή αυτών σε διάφορες θερμοκρασίες. Τα νανοσωματίδια τοποθετήθηκαν σε απιονισμένο νερό, υπό ανάδευση, το οποίο έφτανε από τους 30° στους 90° C. Οι μετρήσεις έγιναν για τους 30°, 60° και 90° C σε χρονικό διάστημα των 20 λεπτών.

Τα αποτελέσματα για το μέγεθος (Γράφημα [14]) των νανοσωματιδίων έδειξαν μια αρκετά μεγάλη αύξηση από τα πρώτα 5 λεπτά του πειράματος και για τις τρεις περιπτώσεις των θερμοκρασιών. Για τα σωματίδια που περιείχαν την EGCG σε συγκέντρωση 0,1% από τα 202nm η διάμετρος τους έφτασε στα 671nm στους 30° C, στα 871nm στους 60° C και στα 1254nm στους 90° C στα 20 λεπτά παραμονής στο νερό.

Γενικά οι πρωτεΐνες ορού είναι θερμικά ευαίσθητες και παράγουν ιζήματα κατά τη διάρκεια μίας θερμικής επεξεργασίας (Tsakali et al, 2010).

Κατά τη διάλυση των νανοσωματιδίων σε μεγάλες θερμοκρασίες είναι πιθανό η αύξηση στο μέγεθος τους να οφείλεται στην κατακρήμιση των πρωτεϊνών.



Γράφημα[15]: Μέγεθος νανοσωματιδίων σε σχέση με το χρόνο σε διάφορες θερμοκρασίες.

A) 30°C, B) 60°C, C) 90°C. ♦EGCG ▲0,1 EGCG, • 0,2 EGCG

Στο γράφημα [15] απεικονίζεται το ποσό της EGCG που έχει απελευθερωθεί με την επιβολή θερμοκρασιών στους 30° 60° και 90° C σε σχέση με το χρόνο. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως σε όλα τα δείγματα η EGCG δεν παρέμεινε ενθυλακωμένη στα νανοσωματίδια. Το ποσοστό της εναπομένουσας EGCG μειώθηκε από τα πρώτα πέντε λεπτά στο 1%.

Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ευαισθησία της EGCG κατά την έκθεση της σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες οι οποίες οδηγούν και στην υποβάθμιση και τον επιμερισμό της.(Ananingsih et al, 2013). Άρα είναι πολύ σημαντική η αποφυγή θερμικής επεξεργασίας για τη διατήρηση της κατεχίνης.

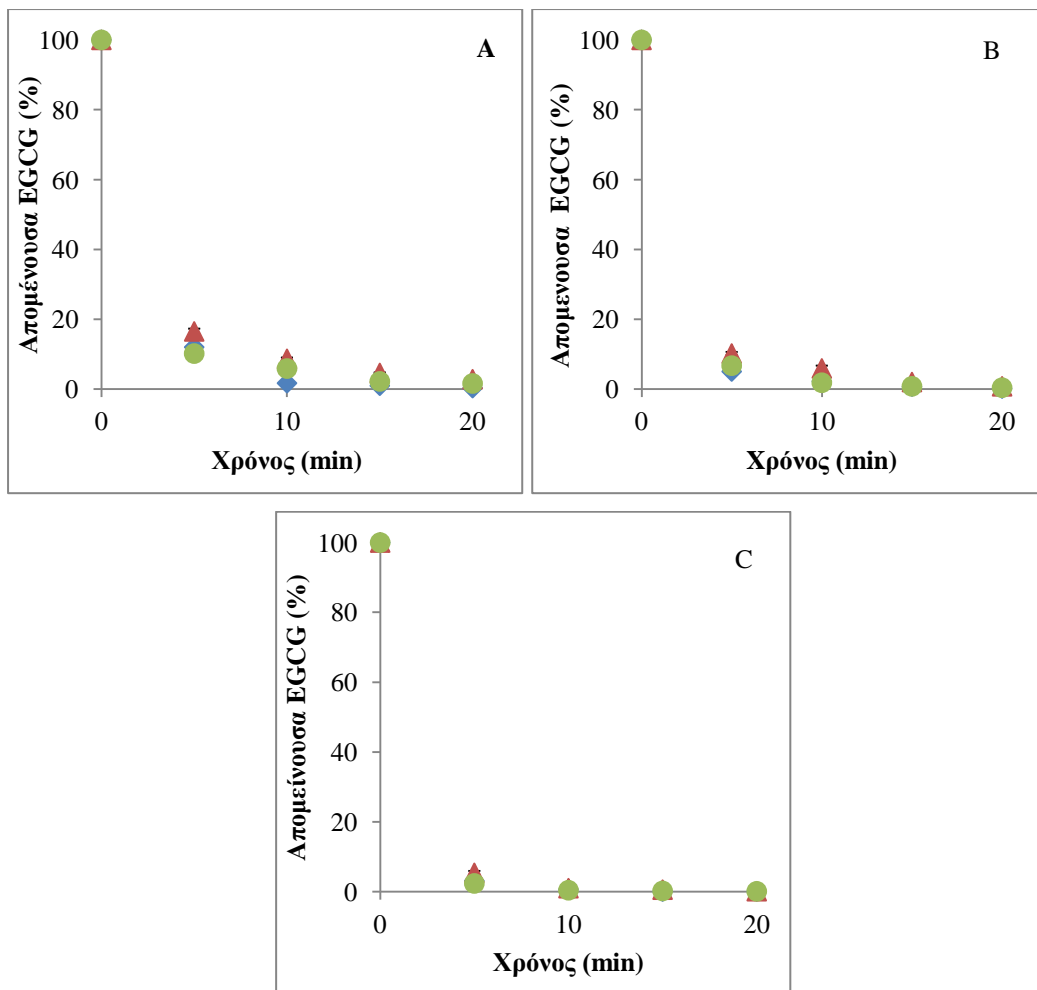
Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων απεικονίζεται στο Παράρτημα (Γράφημα [Π8] [Π9] [Π10]), για όλες τις θερμοκρασίες που έγιναν οι μετρήσεις.

Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως για όλες τις θερμοκρασίες υπήρξε μια αύξηση στην κατανομή του μεγέθους άρα δεν ήταν σταθερή.

Σε έρευνα μελετήθηκε η σταθερότητα του φυλλικού οξέος όταν δεν είναι ενθυλακωμένο σε κάποιο βιοπολυμερές αλλά και όταν είναι ενθυλακωμένο σε WPC ή σε άμυλο. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως το βιοενεργό συστατικό όταν παρέμεινε για 5 λεπτά στους 120° C αποδομήθηκε στο 100% ενώ στην περίπτωση που ήταν ενθυλακωμένο τα βιοπολυμερή κατάφεραν να το προστατέψουν.

Σε μελέτη σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις της EGCG με την β-λακτογλοβουλίνη (Zorilla et al, 2011), ειπώθηκε πως η πρωτεΐνη αυτή κατά την παραμονή της σε θερμοκρασίες πάνω από 50° C και σε ουδέτερο pH διασπάται και χάνει τον αρχικό της σχηματισμό εμφανίζοντας μια πιο υδρόφοβη συμπεριφορά. Αυτό είναι πιθανό να την καθιστά και θερμικά ευαίσθητη και έτσι να επιβεβαιώνεται η κατακρήμνιση της και η ταυτόχρονη απελευθέρωση της EGCG στις θερμοκρασίες 60° και 90° C όπου και έγιναν τα πειράματα.

Αυτό που παρατηρείται επίσης είναι πως η απελευθέρωση του βιοενεργού συστατικού γίνεται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και χωρίς σταθερό ρυθμό, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι μέσω του συστήματος WPI-BC σε τέτοιες θερμοκρασίες δε μπορεί να γίνει ελεγχόμενη απελευθέρωση της EGCG όπως είναι και το ζητούμενο. Παρόλα αυτά για τα δείγματα της ενθυλακωμένης EGCG τα ποσοστά του βιοενεργού συστατικού που παρέμεινε ενθυλακωμένο ήταν μεγαλύτερα σε σχέση με το μη ενθυλακωμένο, αλλά η αποικοδόμηση του βιοενεργού συστατικού πολύ υψηλή.



Γράφημα[16]: Απελευθέρωση EGCG σε σχέση με το χρόνο σε διάφορες θερμοκρασίες A)30° C, B)60° C, C)90° C. ◆EGCG ▲0,1 EGCG, • 0,2 EGCG

3.10 Συμπεράσματα

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ενθυλάκωση ενός βιοενεργού συστατικού σε σωματίδια μείγματος βιοπολυμερών. Πιο συγκεκριμένα έγιναν πειράματα για την ενσωμάτωση της EGCG σε σωματίδια μείγματος WPI και BC με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (Electrospraying).

Όλες οι ιδιότητες των διαλυμάτων φαίνεται πως επηρεάστηκαν από τη συγκέντρωση της BC. Η επιφανειακή τάση και η ηλεκτρική αγωγιμότητα αυξήθηκαν με την προσθήκη της BC, ενώ το ζ δυναμικό μειώθηκε. Η ρεολογική συμπεριφορά των δειγμάτων ήταν διαφορετική όταν αυξήθηκε και η ποσότητα της BC.

Κατά την απουσία της BC ή και με την παρουσία μικρών συγκεντρώσεων BC το ιξώδες των δειγμάτων έδειχνε να έχουν νευτώνεια συμπεριφορά ανεξάρτητα με τη συγκέντρωση της WPI. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του πολυσακχαρίτη τα μείγματα απέκτησαν ιξωδοελαστική συμπεριφορά, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία της BC αλλά και στις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που είχε με την WPI.

Η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού ήταν ο καθοριστικός παράγοντας για τη σωστή επιλογή του διαλύματος το οποίο θα προχωρήσει στη δεύτερη φάση του πειράματος όπου ήταν η ενθυλάκωση της EGCG. Κατά τον ηλεκτροψεκασμό υπήρξαν πολλά προβλήματα για τα διαλύματα που περιείχαν 30% κβ WPI αφού η μεγάλη συγκέντρωση της έκανε αδύνατη τη διαδικασία.

Τα συστήματα με συγκεντρώσεις 10% και 20% κβ WPI είχαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τον ηλεκτροψεκασμό. Δηλαδή οι παράμετροι της διαδικασίας όπως ο ρυθμός ροής του διαλύματος στο σύστημα αλλά και το επιβαλλόμενο ηλεκτρικό φορτίο δεν είχαν ιδιαίτερες αποκλίσεις.

Μετά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού έγινε εξέταση των δειγμάτων με SEM. Τα δείγματα είχαν σφαιρική δομή και υπήρξαν διαφορές στα μεγέθη των σωματιδίων τα οποία όμως είχαν μέγεθος σε κλίμακα νανομέτρων.

Η επιλογή του δείγματος για τη δεύτερη πειραματική φάση, έγινε με βάση τις ιδιότητες του διαλύματος, τη σταθερότητα του κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού αλλά και τη μικροδομή και το μέγεθος των σωματιδίων. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για την ενθυλάκωση της EGCG ήταν το δείγμα που περιείχε 20%κβ WPI και 8%κβ BC. Οι τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας της επιφανειακής τάσης αλλά και του ζ-δυναμικού του συγκεκριμένου διαλύματος ήταν οι κατάλληλες ώστε να επιτευχθεί επιτυχώς ο ηλεκτροψεκασμός του αλλά και το ζητούμενο σχήμα και μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων.

Παρασκευάστηκαν δείγματα τα οποία περιείχαν 0,1mg EGCG/ml διαλύματος αλλά και 0,2mg/ml διαλύματος. Η απόδοση ενσωμάτωσης της για το δείγμα 0,01 % κβ EGCG ήταν 51% ενώ για το 0,02 % κβ EGCG ήταν 30%. Η χαμηλή ενσωμάτωση της EGCG στα νανοσωματίδια της WPI-BC αποδίδεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις της EGCG με τις πρωτεΐνες ορού. Η χαμηλή ενσωμάτωση στο δείγμα 0,2 % κβ EGCG αποδίδεται στο γεγονός πως πάνω από κάποια ποσότητα το βιοενεργό συστατικό δε μπορεί να αλληλεπιδράσει με το σύστημα και έτσι απελευθερώνεται από αυτό.

Στις μετρήσεις του μεγέθους των νανοσωματιδίων με την ενθυλακωμένη EGCG και για τις δύο ποσότητες, παρατηρήθηκε μια αύξηση η οποία οφείλεται στην παρουσία του βιοενεργού συστατικού.

Έγιναν μετρήσεις ώστε να παρατηρηθεί η αλλαγή του μεγέθους των νανοσωματιδίων όταν αυτά βρίσκονται σε συγκεκριμένες συνθήκες, όπως είχαν οριστεί από τον πειραματικό σχεδιασμό. Οι συνθήκες αυτές ήταν η παραμονή των νανοσωματιδίων σε ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικό pH σε τιμές 3, 6 και 11. Στο όξινο pH τα νανοσωματίδια έδειξαν μια μεγαλύτερη αύξηση στη διάμετρό τους με το πέρασ του χρόνου ενώ σε αλκαλικό pH η αύξηση ήταν σε μικρότερο εύρος. Η παρατήρηση αυτή έχει να κάνει με τη συμπεριφορά του μείγματος WPI-BC αλλά και με τη σταθερότητα της EGCG σε διάφορα pH.

Με τη μελέτη της απελευθέρωσης του βιοενεργού από τα νανοσωματίδια παρατηρήθηκε ότι στο όξινο διάλυμα η ποσότητα που παρέμεινε στα σωματίδια ήταν μικρότερη παρά το γεγονός ότι σε αλκαλικό περιβάλλον η EGCG αποκτά μια μη σταθερή δομή και κατακρημνίζεται. Παρόλα αυτά σε σύγκριση με την μη ενθυλακωμένη EGCG για όλες τις τιμές του pH τα ποσοστά παραμονής ήταν μεγαλύτερα, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το σύστημα WPI-BC μπορεί να την προστατέψει από τις εξωτερικές συνθήκες.

Τα σωματίδια με την ενθυλακωμένη EGCG που αποθηκεύτηκαν σε περιβάλλον με διαφορετική υγρασία έδειξαν να έχουν αλλαγές στο μέγεθος τους αλλά και στα ποσοστά απελευθέρωσης του βιοενεργού συστατικού. Η αύξηση της διαλυτότητας της BC κατά την παραμονή της σε υδατικά διαλύματα προκάλεσε και την αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων όσο αυξανόταν και το ποσοστό της υγρασίας. Όσο αυξανόταν επίσης η υγρασία μειωνόταν και το ποσοστό παραμονής της ενθυλακωμένης EGCG επιβεβαιώνοντας έτσι και την αύξηση διαλυτότητας του συστήματος σε αυξημένα ποσοστά υγρασίας.

Στις αντίστοιχες μετρήσεις που έγιναν για τις αλλαγές στο μέγεθος των νανοσωματιδίων κατά την παραμονή τους σε διάφορες θερμοκρασίες παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες αλλαγές.

Η διάμετρος των νανοσωματιδίων αυξανόταν όσο αυξανόταν και η θερμοκρασία του νερού στο οποίο διαλύθηκαν. Επίσης τα ποσοστά της απομένουσας EGCG στα νανοσωματίδια ήταν πολύ μικρά και η EGCG απελευθερώθηκε πολύ γρήγορα μέσα σε χρονικό διάστημα των 5 λεπτών σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Τα αποτελέσματα αυτά αποδίδονται στο γεγονός ότι η EGCG αλλά και η WPI είναι θερμοευαίσθητες και κατά την έκθεσή τους σε μεγάλες θερμοκρασίες κατακρημνίζονται. Έτσι τα νανοσωματίδια δεν ήταν αποτελεσματικά ως προς την προφύλαξη αλλά και τη σταθερή απελευθέρωση της EGCG.

Γενικά τα νανοσωματίδια του συστήματος WPI-BC φαίνεται να μπορούν να ενθυλακώσουν την EGCG προστατεύοντας την από το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται αλλά και να επιτρέψουν την σταθερή της απελευθέρωση.

Το pH του περιβάλλοντος παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των νανοσωματιδίων και στην απελευθέρωση της EGCG. Σε ένα περιβάλλον με ουδέτερο pH η απελευθέρωση της EGCG είναι πιθανό να γίνεται με πιο σταθερούς ρυθμούς αφού το σύστημα WPI-BC μπορεί να πιο σταθερό και να γίνει πιο αποτελεσματική η προστασία της χωρίς να κατακρημνιστεί.

Τα νανοσωματίδια μπορούν να προστατέψουν το βιοενεργό συστατικό ανεξάρτητα με την υγρασία του περιβάλλοντος πετυχαίνοντας τη σταθερή απελευθέρωσή του. Στην περίπτωση όπου γίνονται διεργασίες σε μεγάλες θερμοκρασίες η EGCG δε μπορεί να παραμείνει ενσωματωμένη στα νανοσωματίδια, γεγονός που καθιστά αδύνατη τη χρήση αυτών των συμπλεγμάτων σε τρόφιμα στα οποία είναι απαραίτητες διαδικασίες αποστείρωσης ή παστερίωσης.

3.11 Μελλοντική έρευνα

Χρειάζεται μελλοντική έρευνα στην ενσωμάτωση βιοενεργών συστατικών, ώστε να επιτευχθεί μια πιο αποτελεσματική ενσωμάτωση τους, αλλάζοντας τις αναλογίες των βιοπολυμερών που αποτελούν το προστατευτικό υλικό τους ή τη προσθήκη ίσως κάποιου άλλου συστατικού. Ως προς την προστασία της EGCG θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω οι συνθήκες στις οποίες αποθηκεύονται τα νανοσωματίδια. Δηλαδή θα μπορούσε να γίνει αποθήκευση των νανοσωματιδίων με την ενθυλακωμένη EGCG σε θερμοκρασίες μικρότερες των 25°C. Μια άλλη παράμετρος που μπορεί να μελετηθεί είναι οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της EGCG όταν αυτή είναι ενθυλακωμένη στο συγκεκριμένο σύστημα σε σχέση με τη μη ενθυλακωμένη. Επίσης μελλοντικά θα πρέπει τα νανοσωματίδια να προστεθούν σε διάφορα τρόφιμα με διαφορετικά pH, συνθήκες αποθήκευσης και υγρασίας ώστε να μελετηθεί η απελευθέρωση της EGCG αλλά και η αντιοξειδωτική της ικανότητα συνδυαστικά.

3 Βιβλιογραφικές αναφορές

Aceituno-Medina M., Mendoza S., Lagaron J. M., López-Rubio A., (2013). Development and characterization of food-grade electrospun fibers from amaranth protein and pullulan blends, *Food Research International*, 54, 667–674

Agoda G.,-Tandjawa, S. Durand, S. Berot, C. Blassel, C. Gaillard, C. Garnier , J.-L. Doublier, (2010). Rheological characterization of microfibrillated cellulose suspensions after freezing. *Carbohydrate Polymers*, 80, 677–686

Alamed J., Wilailuk C., Julian D., McClements, Decker E.A., (2009). Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2969–2976

Almajano M. P, Delgado M. E., Gordon M. E., (2007). Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate, *Food Chemistry*, 101, 126–130

Almerva B., Deng W, Fahmy T. M., Gomez A , (2010). Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery, *Journal of Colloid and Interface Science*, 343, 125–133

Analysis. In food analysis, *Food Science Text Series*, 541-554

Ananingsih V. K., Sharma A. , Zhou W., (2013). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection, *Food Research International*, 50, 469–479

Anges T., Dimartino S., Lee S., Kelvin K. T. G., Wen J., Oey I., Ko S., Kwak H.S., (2016). Interfacial structures of whey protein isolate (WPI) and lactoferrin on hydrophobic surfaces in a model system monitored by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and their formation on nanoemulsions, *Food Hydrocolloids*

Arts M.J.T.J., G.R.M.M. Haenen, H.-P. Voss, A. Bast, (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*, 39,787–791

Arts M. J. T., Haenen G. R. M. M., Wilms L.E., Beetstra S. A. J. N., Heinjen C.l G. M, Voss H.P, Bast A., (2002). Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity, *J. Agric. Food Chem*,50, 1184-1187

Bazinet L, Araya-Farias M., Doyen A., Trudel D., Tetu B., (2010). Effect of process unit operations and long-term storage on catechin contents in EGCG-enriched tea drink, *Food Research International*, 43, 1692–1701

Bhushani J. A and Anandharamakrishnan C., (2014). Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications, *Trends in Food Science & Technology*, 38, 21-33

Bock N, T.R. Dargaville, M.A. Woodruff, (2012). Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art, *Progress in Polymer Science* , 37, 1510– 1551

Bonnaillie L. M. and Tomasula P. M., (2008). Whey Protein Fractionation, In *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, edited by Charles I. Onwulata. Peter J. Huth pp 15-38 USA IFT Press

Boland M.,(2011).Whey proteins, Woodhead Publishing Limited, Riddet Institute, Massey University, New Zealand, (30-55)

Bourvellec C., & Renard C.M.G.C., (2012). Interactions between Polyphenols and Macromolecules:Quantification Methods and Mechanisms, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 213–248

Chakraborty S., Liao I.C., Adler A., Leong K. W., (2009). Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1043–1054

Chawla P. R., Bajaj I. B., Survase S.A. and Singhal R.S., (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications, *Food Technol. Biotechnol.* 47 (2) 107–124

Chung, Y.S. Chung, J.Y. Yang, G.Y.Li, C. Meng, X. Lee, M.J. (2000). Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. *Biofactors*, 73-79

Daubert C. R. and Foegeding E. A., (2010). *Rheological Principles for Food*

Doshi Jayesh, Darrell H. Reneker, (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Journal of Electrostatics*, 35, 151-160

Dreosti I.E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutrition*, Volume 16, 692-694

Du G-J., Zhang Z., Wen X. D., Yu C., Calway T., Yuan C. S, and Wang C. Z., (2012). Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea, *Nutrients*, 4, 1679-1691

Dube A., Ken Ng, Nicolazzo J. A., Larson I., (2012). Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution, *Food Chemistry* 122 662–667

Enayati M., Chang M. W., Bragman F., Edirisinghe M., Stride E., (2011). Electrohydrodynamic preparation of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 382, 154–164

Erba D., Riso P., Bordoni A., Foti P., Biagib P. L., Testolin G., (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 144– 149

Faezah E., Tasirin S. M., Rahman N. A., (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application, *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2 (113-119)

Ferreira, Rocha S., Gomes J., Pereira M., Coelho M., (2008). Encapsulation of Antioxidants by Spray Drying, AIDIC Conference Series Vol.8 (REED BUSINESS INTERNATIONAL copyright) (2008) 119

Foegeding E.A & Davis J.P, (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach, Food Hydrocolloids, 25, 1853-1864

Frankel E. N and German J. B., (2006). Perspective antioxidants in foods and health: problems and fallacies in the field. J Sci Food Agric, 86, 1999–2001

Frankel E. N., Huang S. W., Kanner J. and German J. B., (1994). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 1054-1059

Freeman J.,(1996). Rheological Methods in Food Process Engineering, Freeman Press, 418

Frenot A., Chronakis I.S., (2003). Polymer nanofibers assembled by electrospinning, Current Opinion in Colloid and Interface Science, 8, 64–75

Gomez L. G., Mascaraque, Lagaron J e M., Lopez-Rubio A., (2015). Electrospayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods, Food Hydrocolloids, 49, 42-52

Harold G. N, (1992), Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry, Preventive Medicine,21, 334-350

Hayati, Man Y. B.C, Tan C. P., Aini I. N.,(2009). Droplet characterization and stability of soybean oil/palm kernel olein O/W emulsions with the presence of selected polysaccharides, Food Hydrocolloids, 23, 233–243

Iguchi M., Yamanaka S., Buthiono A., (2000). Review Bacterial cellulose—a masterpiece of nature’s arts. Journal of materials science, 35, 261-270

Jaworek A., Sobczyk A. T., (2008). Electrospaying route to nanotechnology: An overview, *Journal of Electrostatics*, 66, 197–219

Kaltsa O, Paximada P., Mandala I., Scholten E., (2014) Physical characteristics of submicron emulsions upon partial displacement of whey protein by a small molecular weight surfactant and pectin addition, *Food Research International*, 66(0), 401-408

Kayaci F., Uyar T., (2012). Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature

Khan N., Mukhtar H., (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, 519–533

Klaessig F., Marrapese M., and Abe S., (2011). Current Perspectives in Nanotechnology Terminology and Nomenclature, *Nanostructure Science and Technology*, 21-52

Klemm D, Schumann, Udhardt U, & Marsch S, (2001). Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery, *Prog. Polym. Scie*, 26, 1561-1603

Klemm D. D, Heublein B., Fink H. P, Bohn A., (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Angew. Chem. Int. Ed* (44) 3358–339

Kondo.K, Kurihara M., Miyata N., Suzuki T., Toyoda M., (1999). Scavenging mechanisms of (-) Epigallocatechin Gallate and (-)- Epicatechin Gallate on Peroxyl Radicals and formation of Superoxide during the inhibitory action, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 27, Nos. 7/8, pp. 855–863

Kriegel C., Kit K.M., McClements D.J., Weiss J., (2009). Electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions, *Polymer* 50(1), 189-200

Lambert JD, Kim DH, Zheng R, Yang CS, (2006). Transdermal delivery of (-)-epigallocatechin-3-gallate, a green tea polyphenol, in mice, *J Pharm Pharmacol*, 58(5), 599-604

Lee K.Y., Jeong L., Kang Y. O., Lee S. J., Park W. H., (2009). Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1020–1032

Leman J and Kinsella J.E., (1989). Surface activity, film formation and emulsifying properties of milk proteins . *CRC Crit, Rev. Food Sci. Nutr.* 28:115-138

Li Y., Lim L.-T., Kakuda Y., (2009). Electrospun Zein Fibers as Carriers to Stabilize (–)-Epigallocatechin Gallate, *Journal of Food Science*, Vol. 74, Nr. 233-240

López-Rubio A., Sanchez E., Wilkanowicz S., Sanz Y., Lagaron J. M., (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids, *Food Hydrocolloids*, 28, 159-167

Lopez-Rubio.A, Lagaron J. M., (2012). Whey protein obtain through electrospraying for the encapsulation of bioactives, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 200-206

Luck G., Liao H., Murray, N. Grimmer J., Warminski H. R., Williamson E. E., Lilley M. P., T. H., and Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* ,37. 357–371

McClements, D.J (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173-177

McClements, D.J, (2005). *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*, second ed. CRC Press, Boca Raton

McClements, D.J, (2011). Edible nanoemulsions: Fabrication, properties and functional performance. *Soft Matter*, 2011,7,2297-2316

Nagy K., Marie-Claude Courtet-Compondu, Gary Williamson, Serge Rezzi, Martin Kussmann, Andreas Rytz, (2012). Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food Chemistry*, 132, 1333–1339

Bhardwaj N., Kundu S. C., (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances* 28, 325–347

Neo Y.Ping, Ray S., Jin J., Gizdavic-Nikolaidis M., Nieuwoudt M. K., Liu D., Quek S.Y., (2013). Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system, *Food Chemistry*, 136, 1013–1021

Okiyarna A., Shirae H., Kana H. and Yamanaka S., (1992). Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. . *Food Hydrocolloids* Vol.no 6, 471-477

Okiyarna A., Motoki S. and Yamanaka S., (1993). Bacterial cellulose III. Development of a new form of cellulose. *Food Hydrocolloids* Vol.no 6, 493-501

Paximada P, Koutinas A.A., Scholten E., Mandala I.G., (2016) Effect of bacterial cellulose addition on physical properties of WPI emulsions. Comparison with common thickeners, *Food Hydrocolloids* 54, Part B, 245-254.

Paximada P, Tsouko E., Kopsahelis N., Koutinas A. A., Mandala I., (2016) Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions, *Food Hydrocolloids*, 53, 225-232

Papadopoulou A., Rebecca J., Green and Richard A. Frazier, (2005). Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 158-163

Pelipenko J., Kristl J., Rosik R., Baumgartner S., Kocbek P., (2012). Interfacial rheology: An overview of measuring techniques and its role in dispersions and electrospinning, *Acta Pharm*, 62, 123–140

Rao M A., (1995) *Flow and Functional Models for Rheological Properties of Fluid Foods*

Reneker D. H., Yarin A., Fong H. and Koombhongse S., (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning, *Journal of applied Physics*, Vol 87, No 9, 4537-4547

Robin O, Turgeon S., Paquin P., (1992). Functional Properties of Milk Proteins, in *Dairy Science and Technology Handbook*, edited by Y.H.Hui, 277-353, VCH Publishers, Inc

Rocha S, Generalov R., Pereira M.do C., Peres I., Juzenas P. & Coelho AN. M., (2011). Epigallocatechin gallate-loaded polysaccharide nanoparticles for prostate cancer chemoprevention, *Nanomedicine*, 6(1), 79–87

Jovanović S., Barać M., Maćej O., (2005). Whey proteins-Properties and Possibility of Application, *Mljekarstvo* 55 (3) 215-233 stability of vanillin, *Food Chemistry*, 133,641–649

Steffe J, (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*, Second Edition, Chapter 5, p317

Tabilo-Munizaga G., Barbosa-Canovas G.V., (2005). Rheology for the food industry, *Journal of Food Engineering*, 67, 147–156

Tsakali E., Petrotos K., Alessandro A., Goulas P., (2010). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products, Conference Paper, Conference: 6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry FOODSIM 2010, At CIMO Research Centre, Braganca, Portugal

Tunick M. H., (2008). Whey Protein Production and Utilization: A Brief History. In *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, edited by Charles I. Onwulata. Peter J. Huth pp 1-13 USA IFT Press

Varnam A H. and Sutherland J.P., (1994). Dairy Protein Products In Milk and Milk Products. Technology, Chemistry, and Microbiology pp (159-181) London Chapman & Hall

Wang X., Zhang J., Lei F., Liang C., Yuan F., Gao Y., (2013). Covalent complexation and functional evaluation of (-)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin, Food Chemistry, 150, 341–347

Wei Z., Wei Y., Fan R, Yuan F., Gao Y., (2015). Evaluation of structural and functional properties of protein EGCG complexes and their ability of stabilizing a model b-carotene emulsion, Food Hydrocolloids, 45, 337-350

Wongsasulak S., Kit K.M., McClements D. J., Yoovidhya T., Weiss J., (2007). The effect of solution properties on the morphology of ultrafine electrospun egg albumene/PEO composite fibers, Polymer, 48, 448-457

Shi Z., Zhang Y., Phillips G. O, Yang G., (2013). Utilization of Bacterial Cellulose in Food. Food Hydrocolloids, 1-7

Zhong Y. & Shahidi F., (2011). Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 6526-6533

Zhong. Y, Chiou Y. S, Pan M. H., Shahidi F., (2012). Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages, Food Chemistry. 134, 742–748

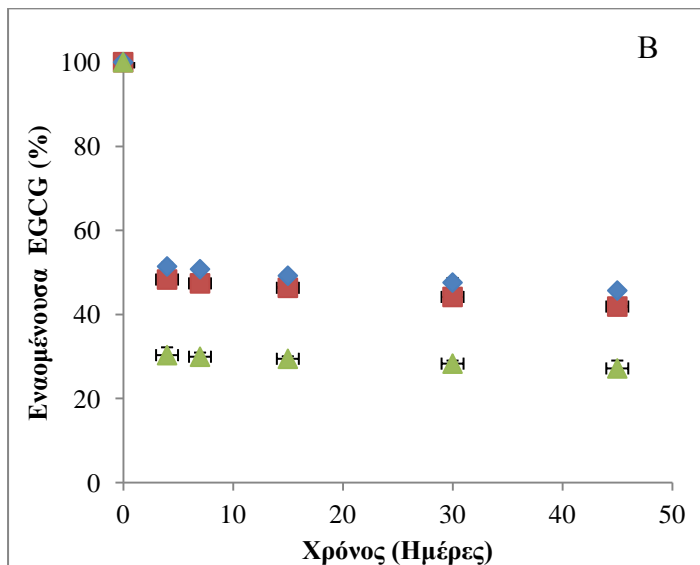
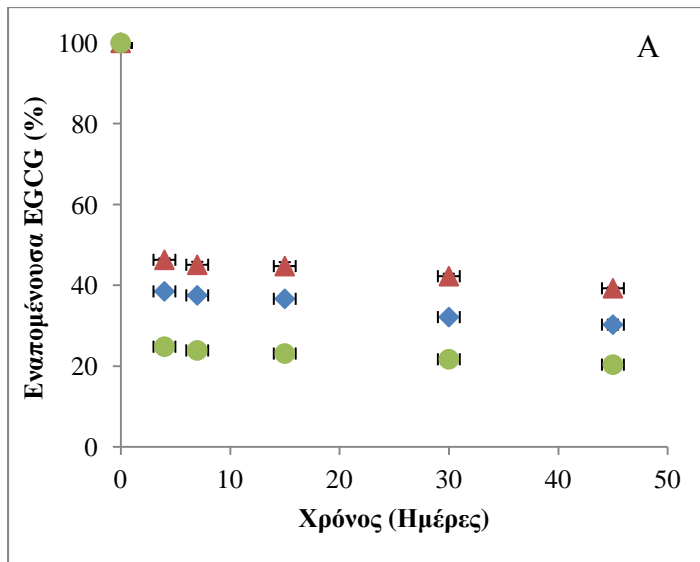
Zorilla R., Liang L., Remondetto, Subirade M., (2011). Interaction of epigallocatechin-3-gallate with β -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication, Dairy Sci. & Technol., 91:629–644

Ελληνικές βιβλιογραφικές αναφορές

Παπαϊωάννου Θ.Α, Μηχανική των Ρευστών, Β Έκδοση, Αθήνα 2002, Τόμος 2

5. Παράρτημα

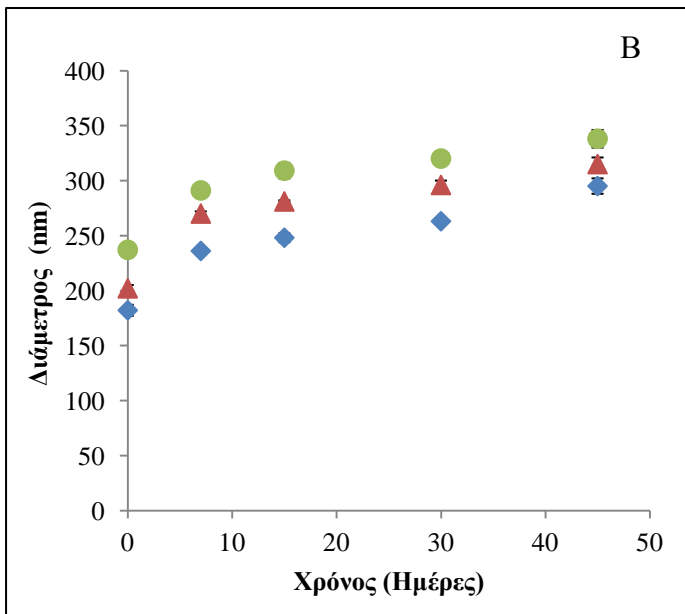
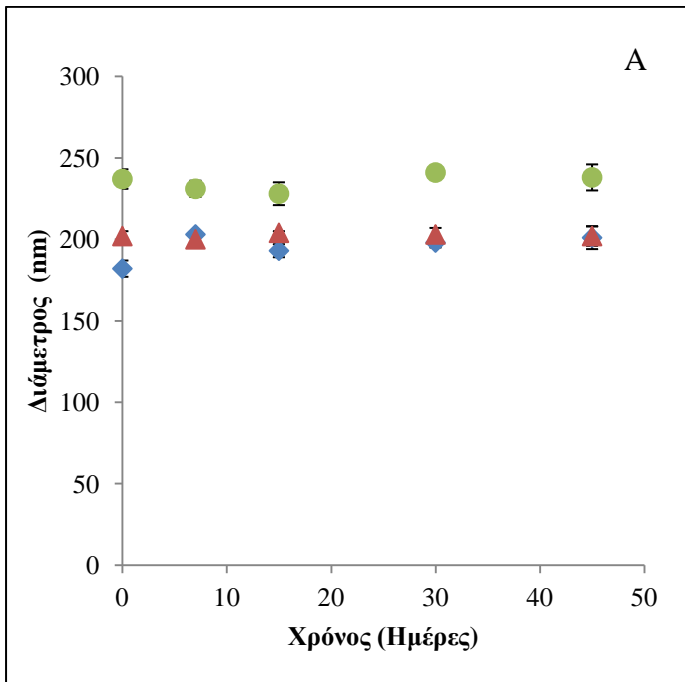
Στα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται το ποσοστό της εναπομένουσας EGCG στα δείγματα σε διάφορες υγρασίες



Γράφημα[Π1]: Απελευθέρωση EGCG σε σχέση με το χρόνο σε διάφορες υγρασίες.

A) 20% υγρασία, B) 60% υγρασία. ♦EGCG ▲ 0,1 EGCG, • 0,2 EGCG

Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζεται η αλλαγή μεγέθους των νανοσωματιδίων με την ενθυλακωμένη EGCG σε διάφορες υγρασίες

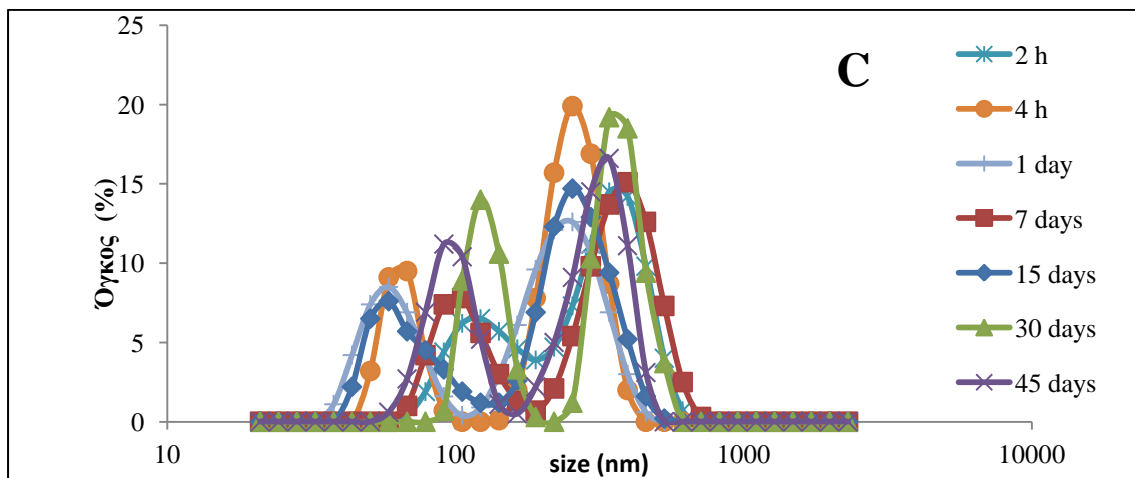
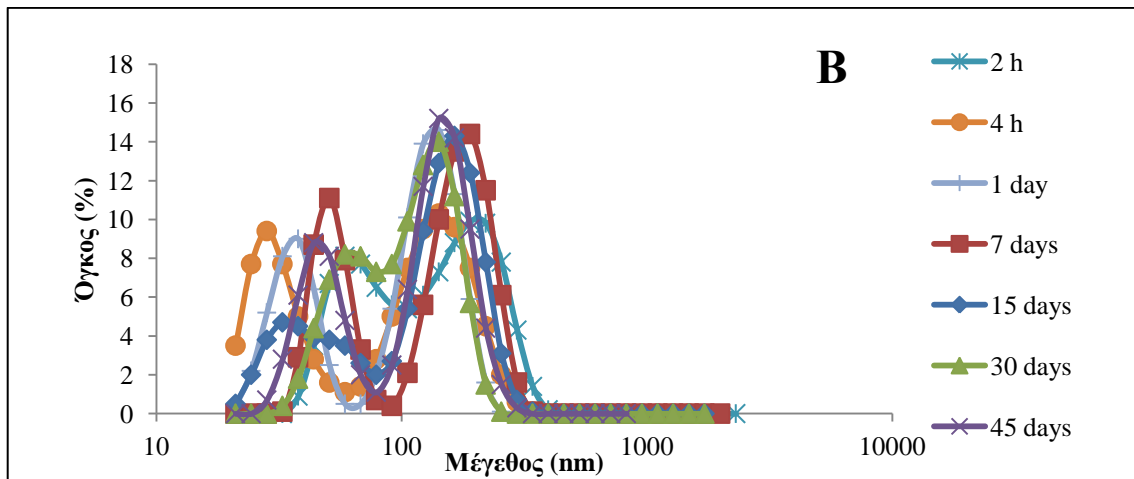
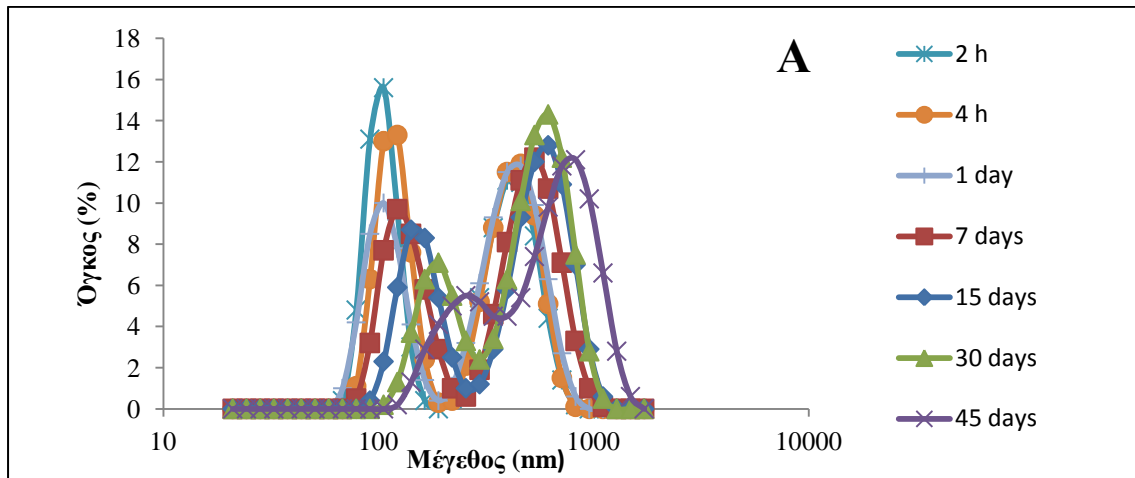


Γράφημα[Π2]: Μέγεθος νανοσωματιδίων σε σχέση με το χρόνο και διάφορες τιμές υγρασίας.

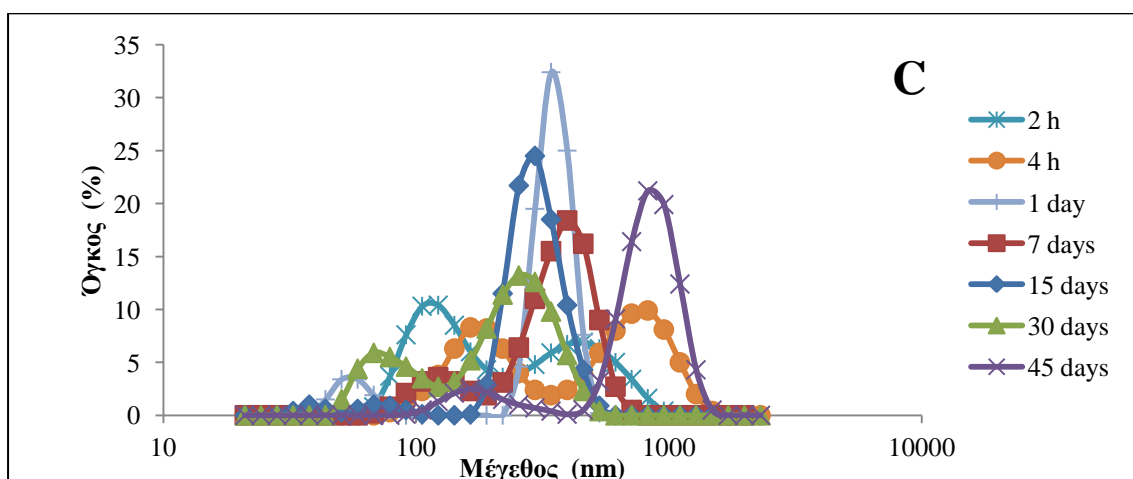
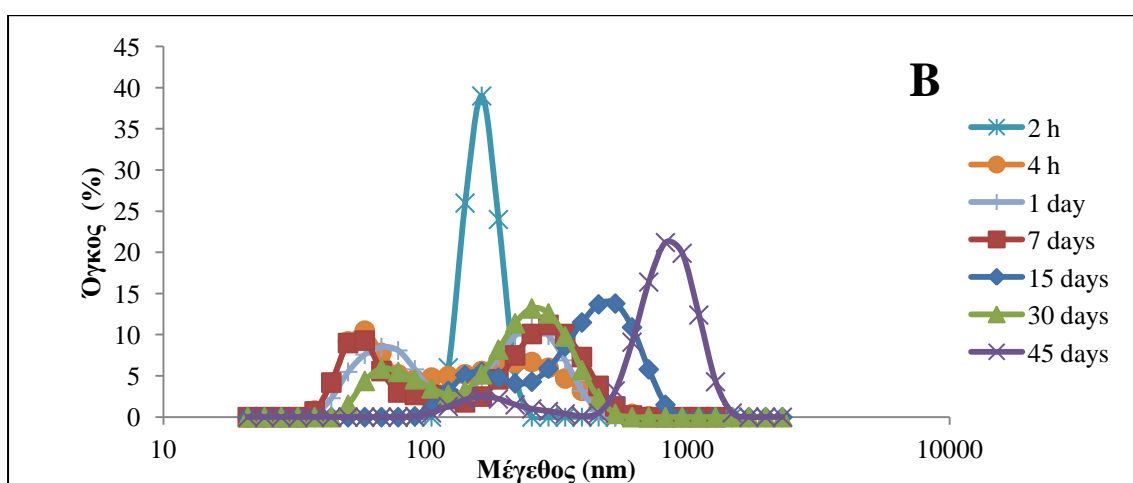
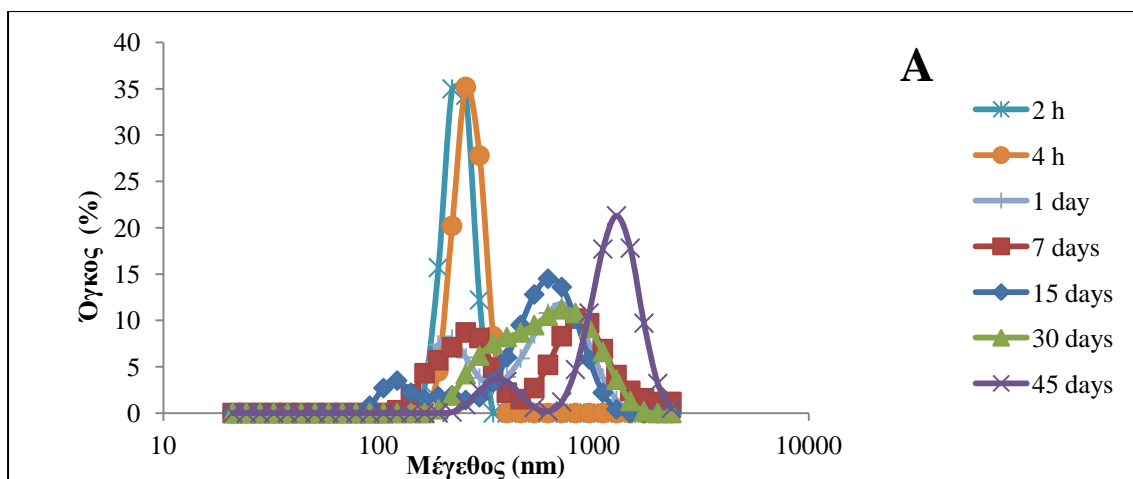
A)20% υγρασία B)60% υγρασία ♦Blank ▲0,1 EGCG,

●0,2 EGCG

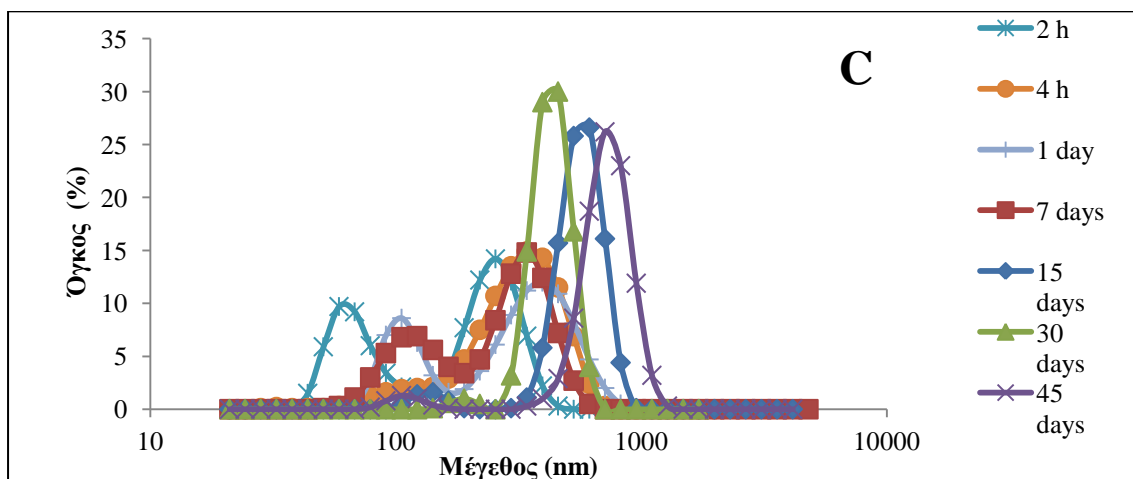
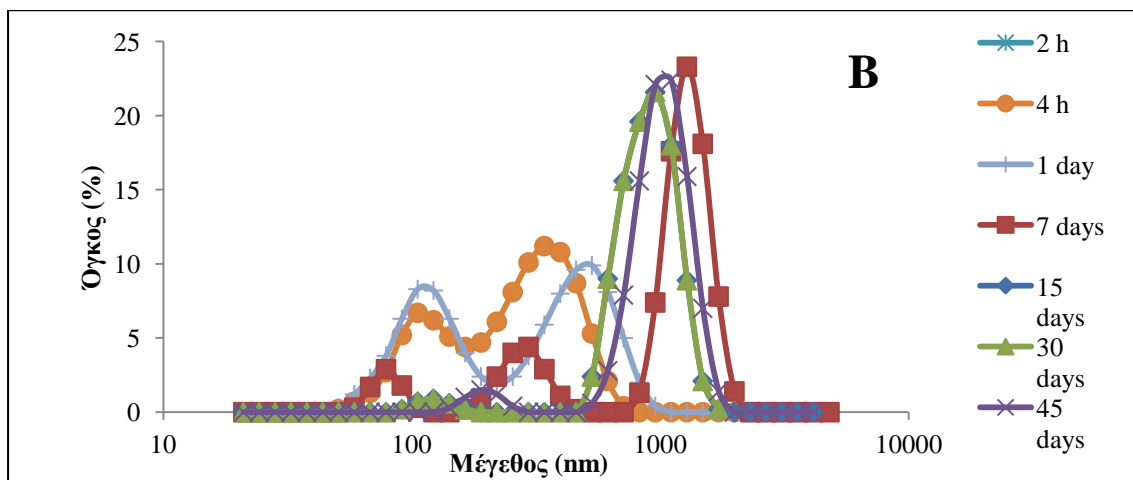
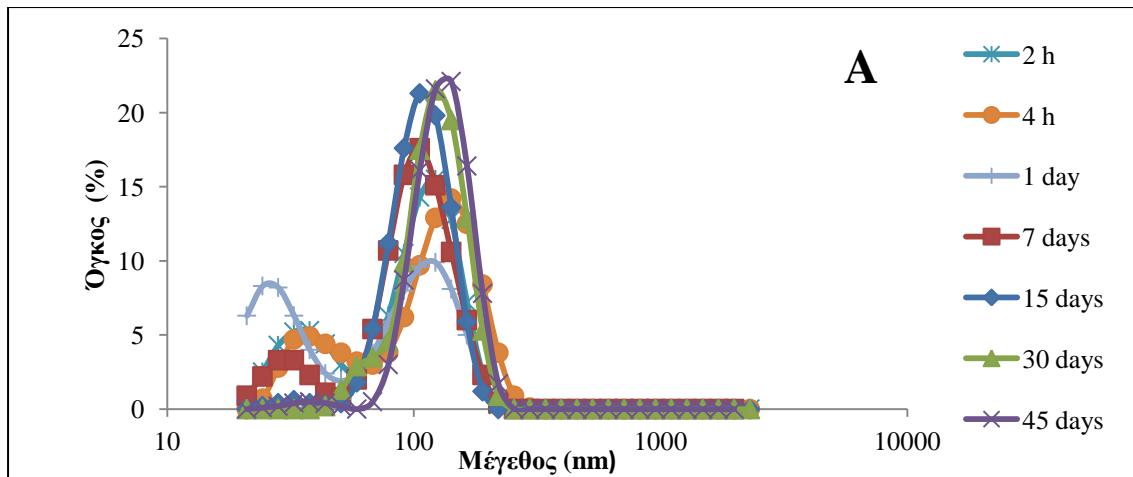
Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζονται οι κατανομές του μεγέθους των νανοσωματιδίων με την ενθυλακωμένη EGCG στις διάφορες συνθήκες που αποθηκεύτηκαν.



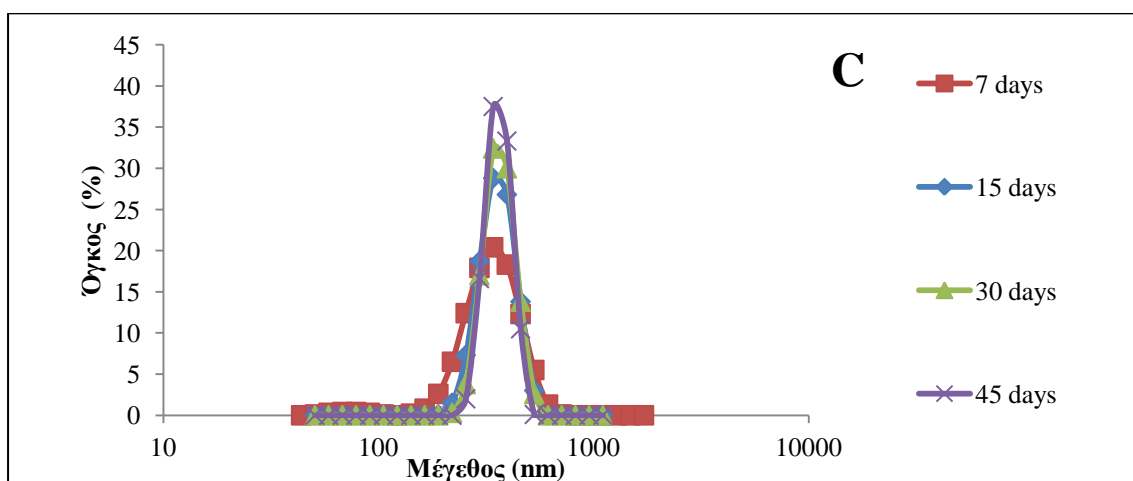
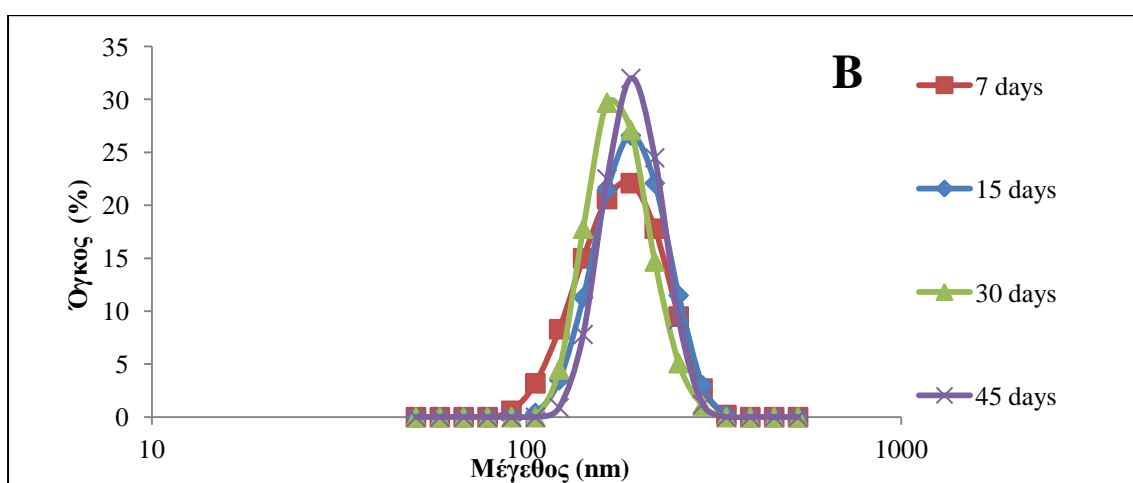
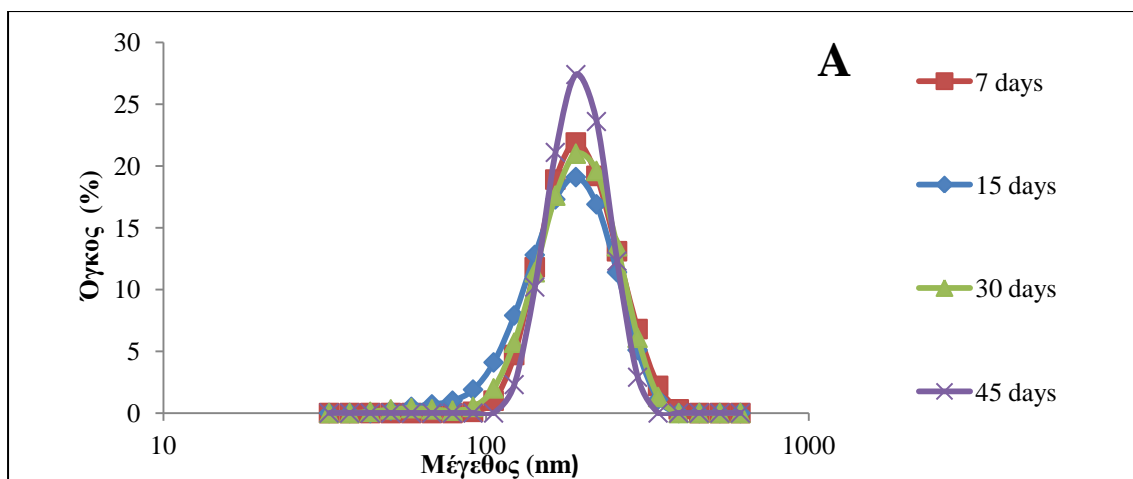
Γράφημα [Π3]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε pH 3 (A) blank, (B) 0,1 EGCG (C) 0,2 EGCG



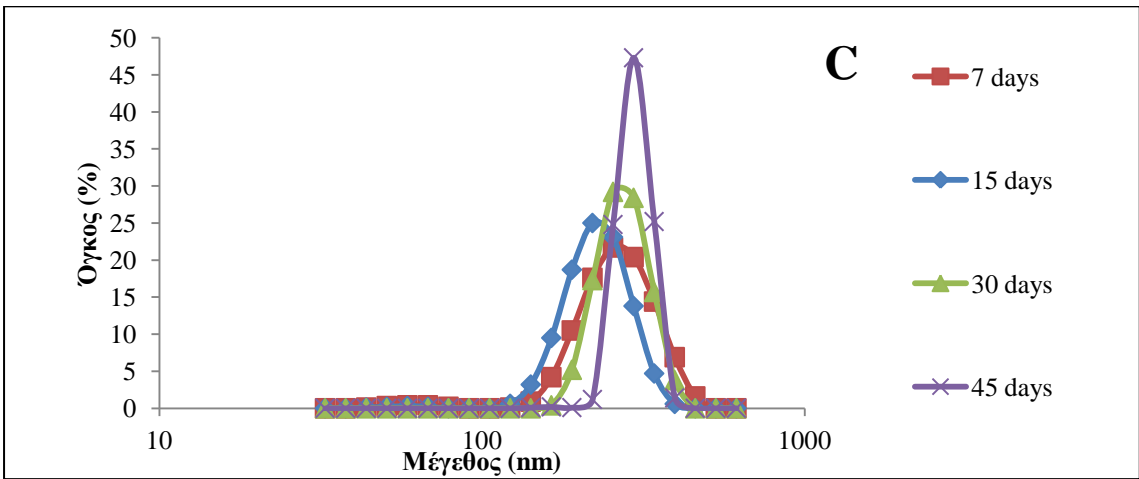
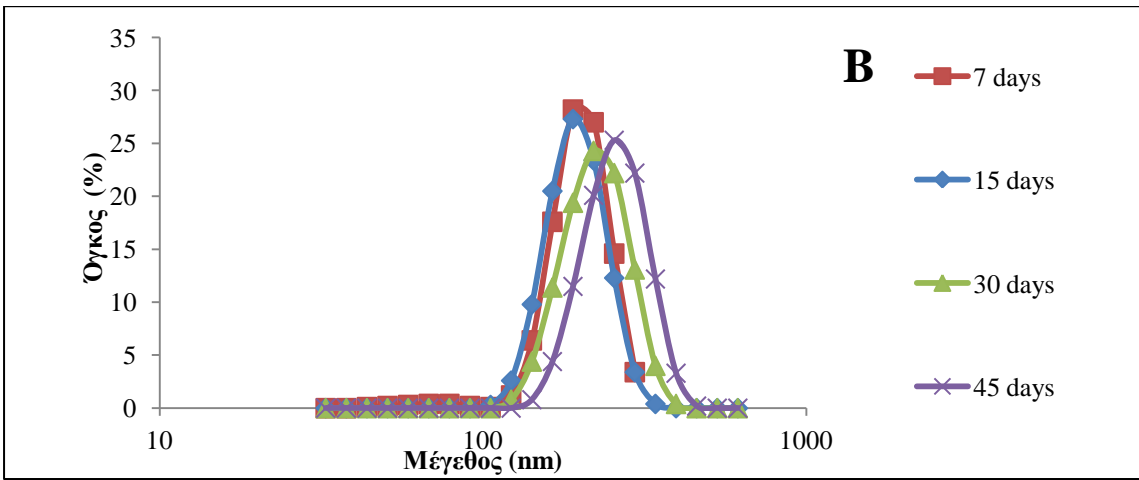
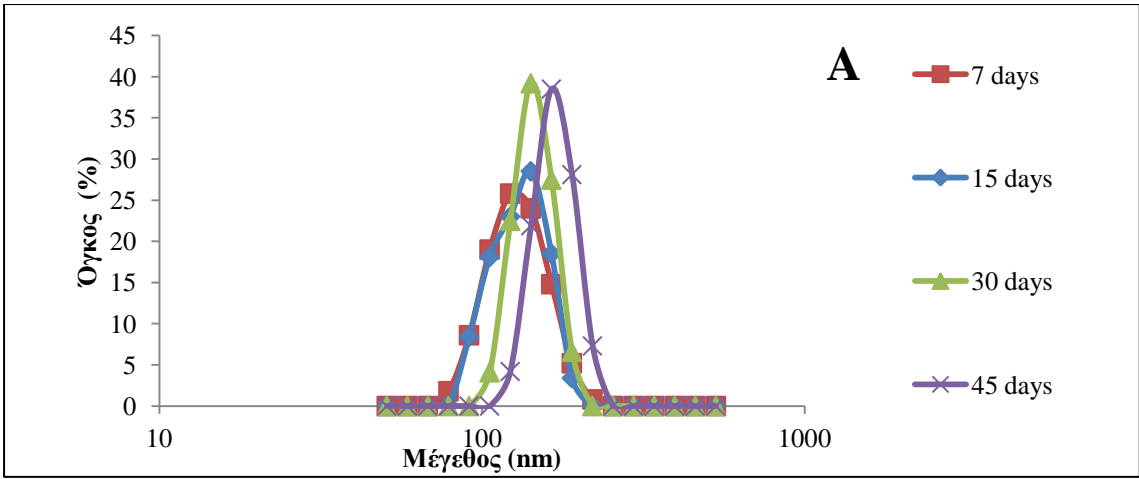
Γράφημα [Π3]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε pH 6 (A) blank, (B) 0,1 EGCG (C) 0,2 EGCG



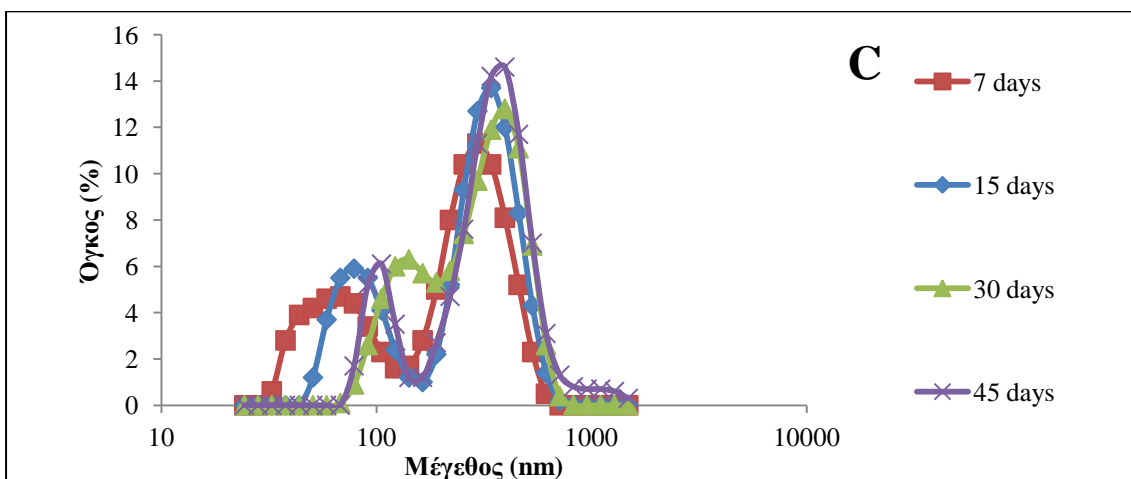
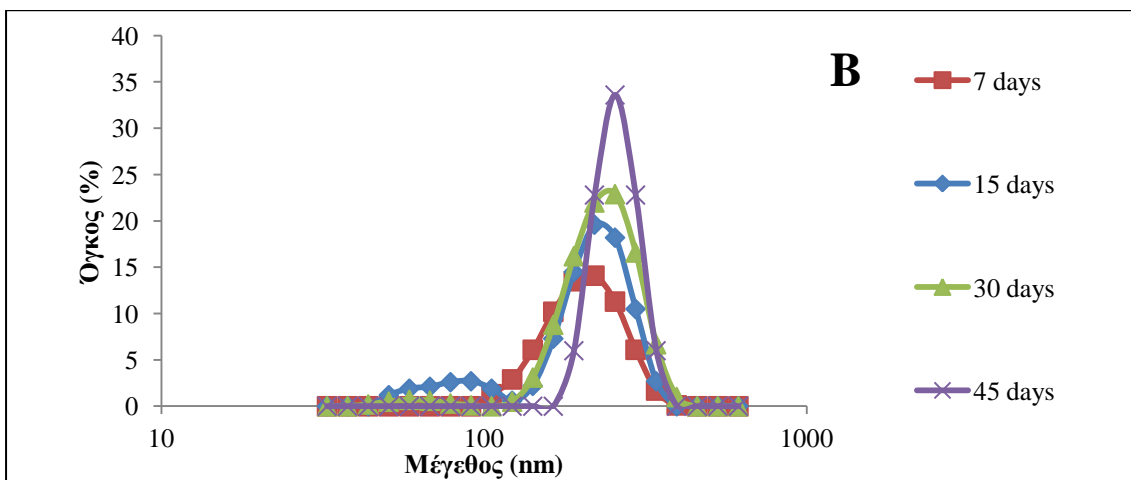
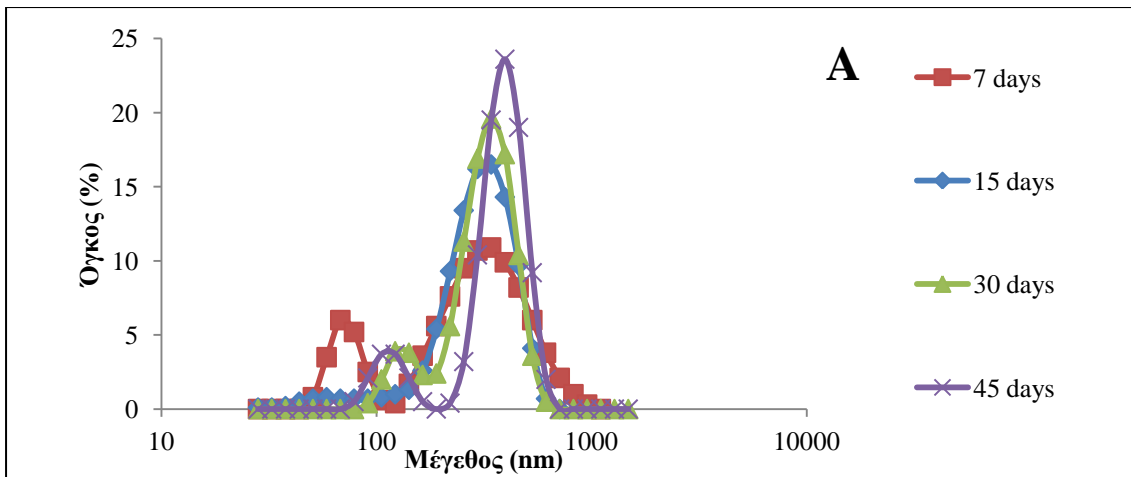
Γράφημα [Π3]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε pH 9 (A) blank, (B) 0,1 EGCG (C) 0,2 EGCG



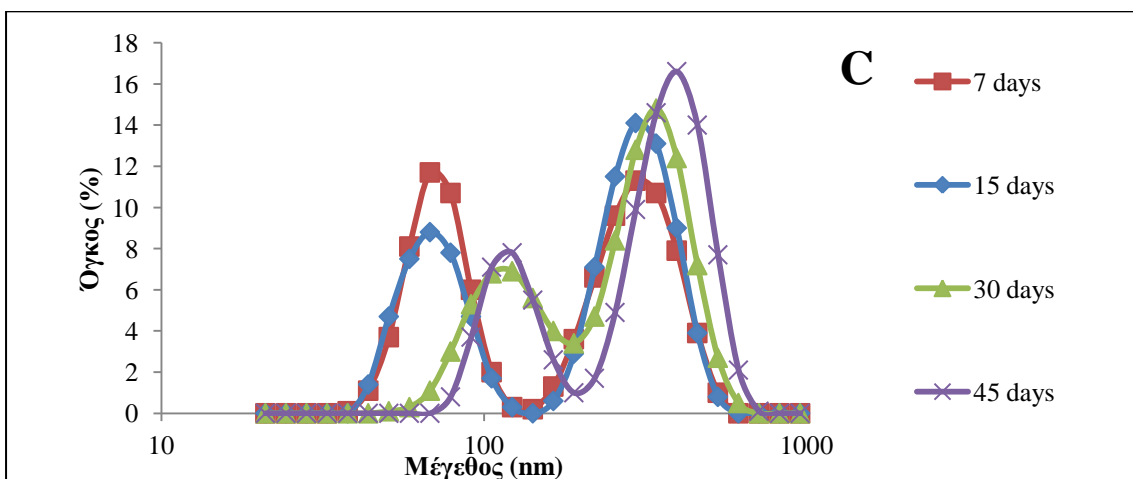
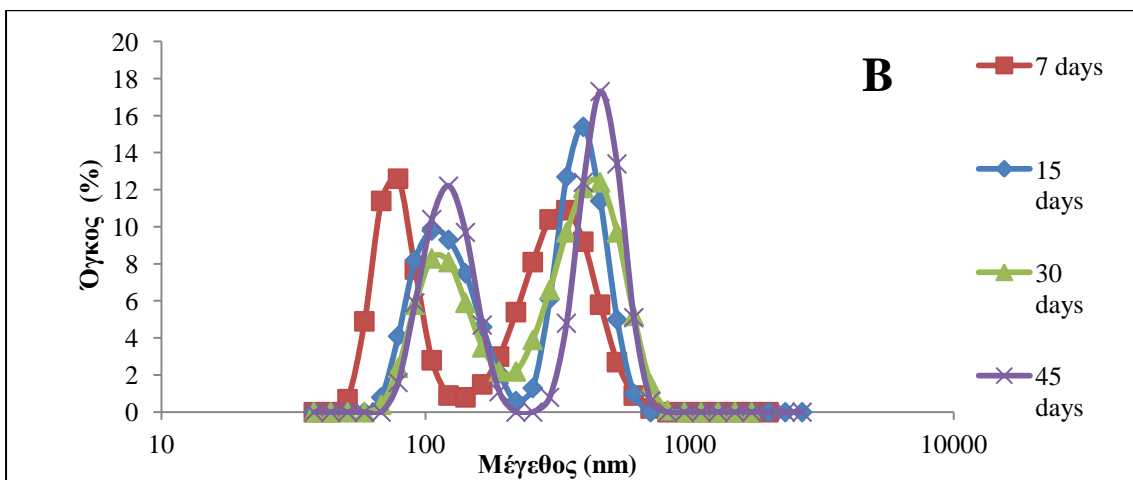
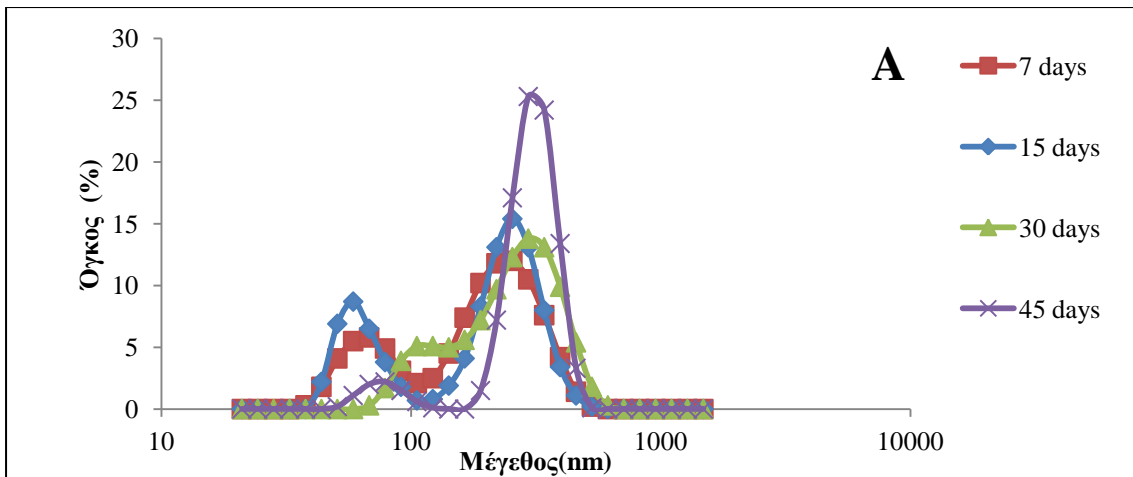
Γράφημα [Π4]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε υγρασία 20% (A) blank, (B) 0,1 EGCG, (C) 0,2 EGCG



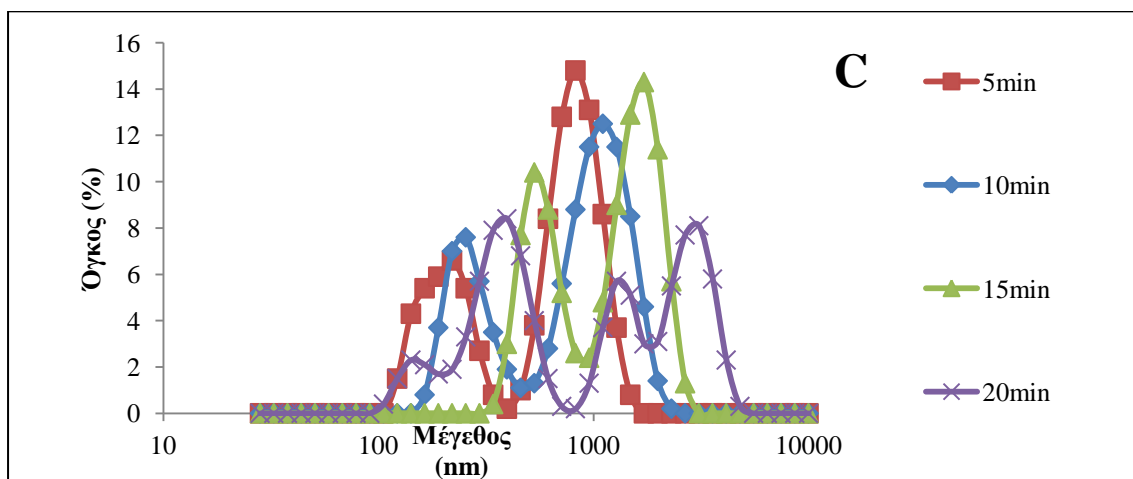
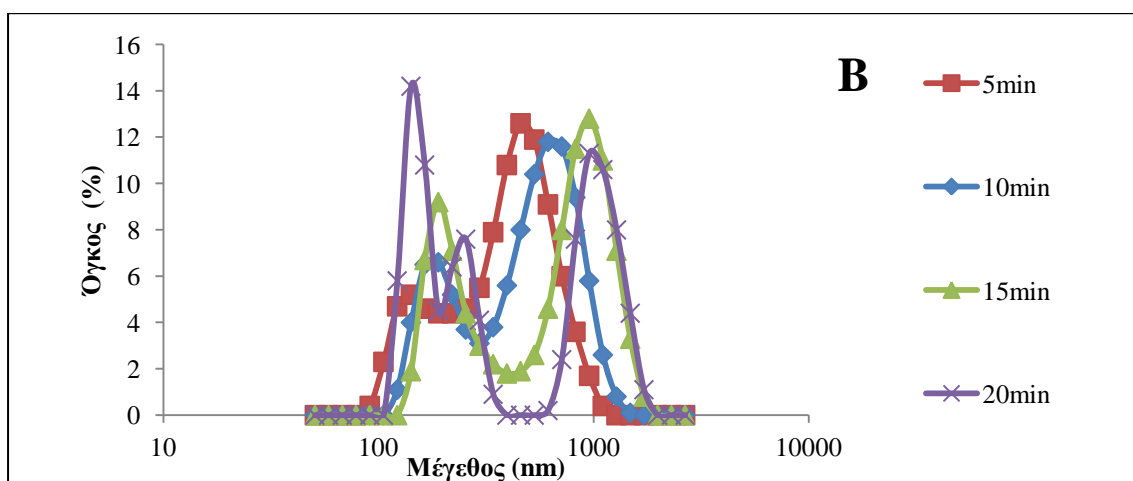
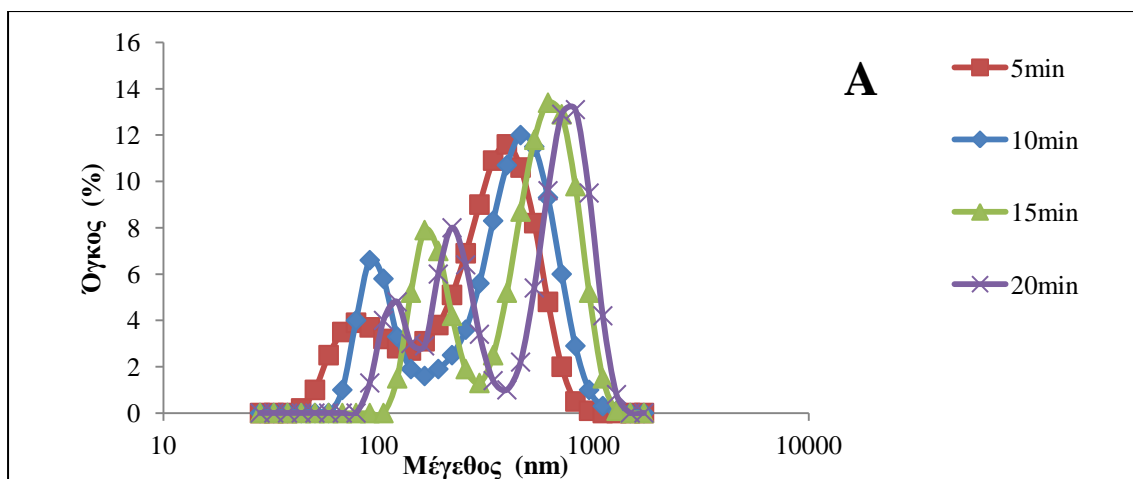
Γράφημα [Π15]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε υγρασία 40% (A) blank, (B) 0,1 EGCG, (C) 0,2 EGCG



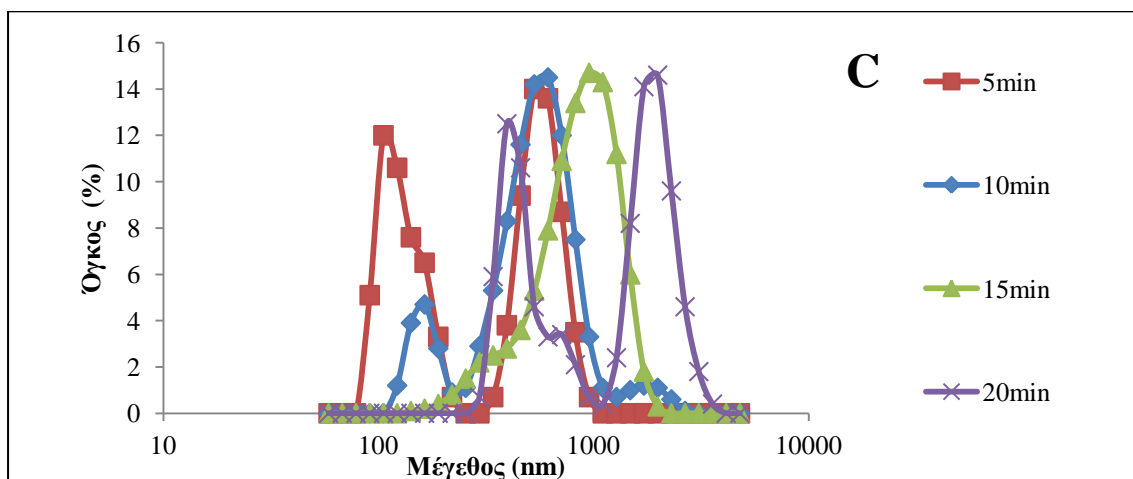
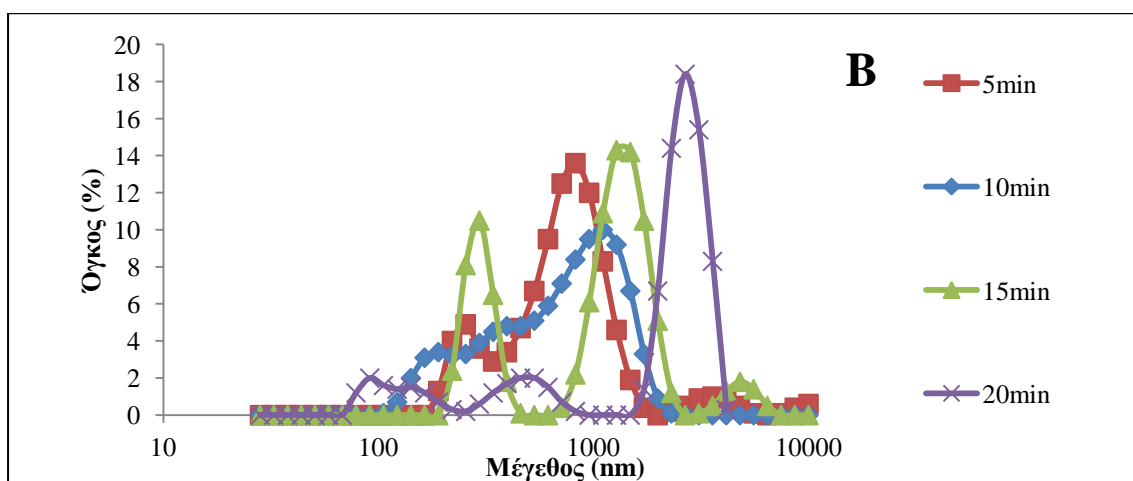
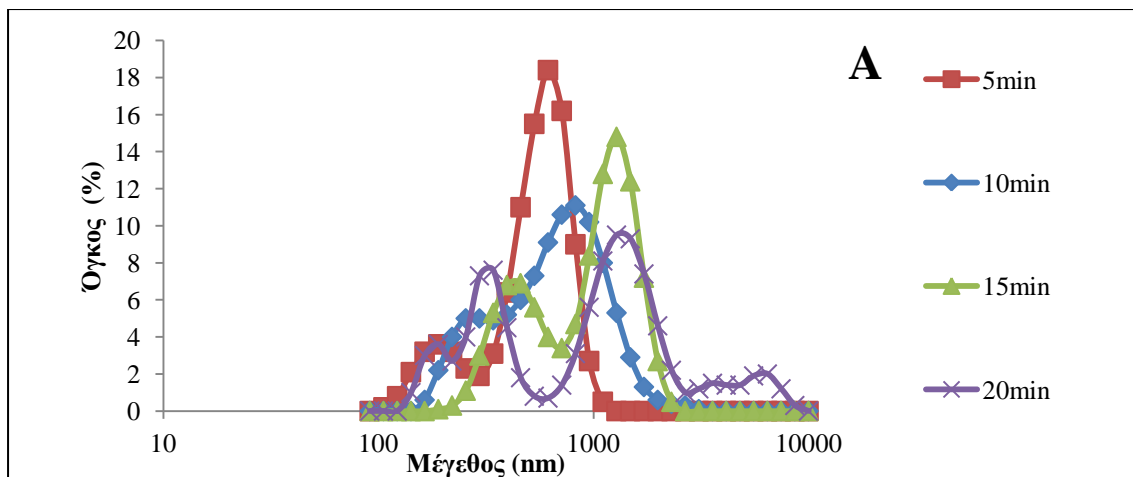
Γράφημα [Π6]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε υγρασία 20% (A) blank, (B) 0,1 EGCG, (C) 0,2 EGCG



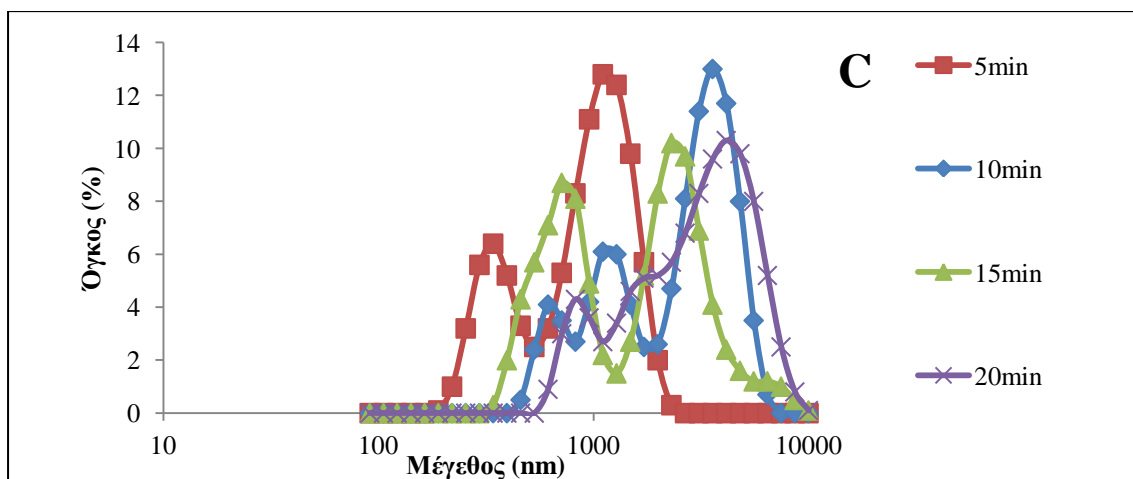
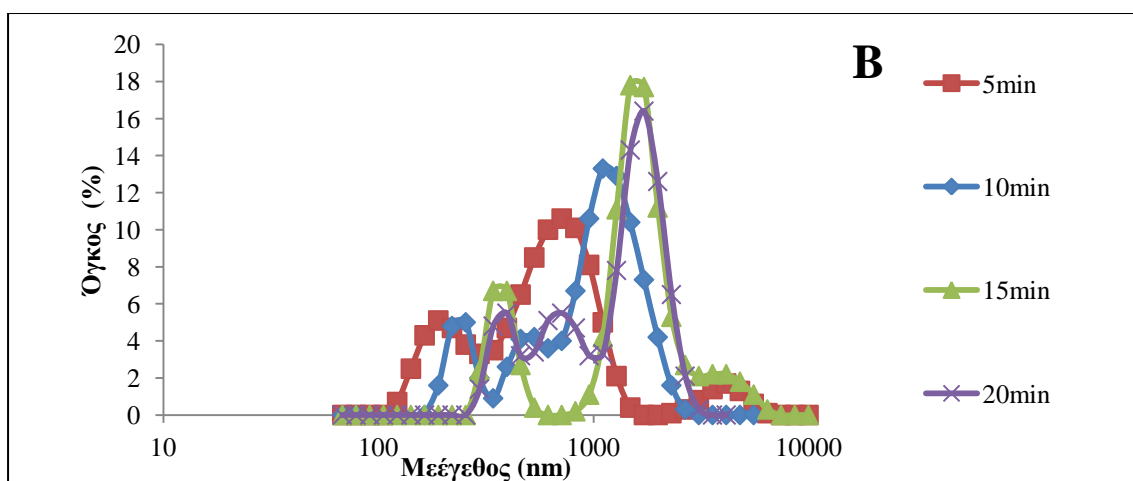
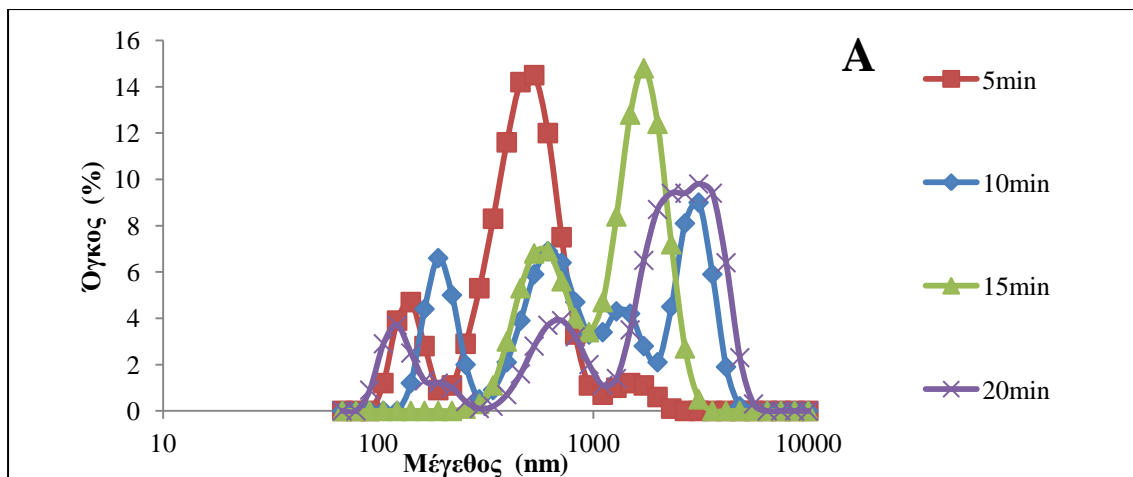
Γράφημα [Π17]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε υγρασία 80% (A) blank, (B) 0,1 EGCG, (C) 0,2 EGCG



Γράφημα [Π8]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε θερμοκρασία 30° C (A) blank, (B) 0,1 EGCG, (C) 0,2 EGCG



Γράφημα [Π9]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε θερμοκρασία 60° C (A) blank, (B) 0,1 EGCG, (C) 0,2 EGCG



Γράφημα [Π10]: Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων σε θερμοκρασία 90° C (A) blank, (B) 0,1 EGCG, (C) 0,2 EGCG

5.Ευρετήριο γραφημάτων

Γράφημα [1]: Απεικόνιση πολυδιασποράς στα διαλύματα BC-WPI	53
Γράφημα [2]: Μέσος όρος διαμέτρου σωματιδίων BC-WPI.....	55
Γράφημα [3]: Ηλεκτρική αγωγιμότητα διαλυμάτων BC-WPI.	56
Γράφημα [4]: Επιφανειακή τάση διαλυμάτων BC-WPI.....	58
Γράφημα [5]: ζ-δυναμικό διαλυμάτων WPI-BC. × 0%κβ WPI	59
Γράφημα [6]: Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων 10%κβ WPI σε σχέση με την προσθήκη BC.....	61
Γράφημα [7]: Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων με 20%κβ WPI σε σχέση με τη συγκέντρωση της BC.....	61
Γράφημα [8]: Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων 30%κβ WPI σε σχέση με την προσθήκη της BC.....	62
Γράφημα [9]: Επιφανειακό ιξώδες διαλυμάτων WPI-BC (A) 10% WPI, (B) 20%WPI, (C) 30%WPI.	65
Γράφημα [10]: Ιξώδες (A) και επιφανειακό ιξώδες (B) για τα διαλύματα WPI-BC.....	67
Γράφημα [11]: Μέγεθος νανοσωματιδίων σε σχέση με το χρόνο και το pH A) pH 3, B) pH 6, C) pH 11.....	74
Γράφημα [12]: Απελευθέρωση EGCG σε σχέση με το χρόνο και τα διαφορετικά pH A) pH 3, B) pH 6, C) pH 11.....	76
Γράφημα [13]: Μέγεθος νανοσωματιδίων σε σχέση με το χρόνο και διάφορες τιμές υγρασίας. A) 40% υγρασία B) 80% υγρασία.....	77
Γράφημα [14]: Απελευθέρωση EGCG σε σχέση με το χρόνο σε διάφορες υγρασίες..... A) 40% υγρασία, B) 80% υγρασία.	79
Γράφημα [15]: Μέγεθος νανοσωματιδίων σε σχέση με το χρόνο σε διάφορες θερμοκρασίες. A) 30° C, B) 60° C, C) 90° C.....	80
Γράφημα [16]: Απελευθέρωση EGCG σε σχέση με το χρόνο σε διάφορες θερμοκρασίες A) 30° C, B) 60° C, C) 90° C.	82

6.Ευρετήριο εικόνων και πινάκων

Εικόνα [1]: Χημικές δομές και ταξινόμηση των πολυφαινολών στο τσάι	13
Εικόνα [2]: Πλεονεκτήματα προϊόντων που έχουν δημιουργηθεί με electrospinning και electrospraying	18
Εικόνα [3]: Απεικόνιση της BC	22
Εικόνα [4]: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων στο εσωτερικό και στη επιφάνεια του ρευστού	26
Εικόνα [5]: Μέτρηση επιφανειακής τάσης με τη μέθοδο Du Nouÿ ring.....	26
Εικόνα [6]: Μεταφορά των ιόντων στο διάλυμα	27
Εικόνα [7]: Ρεολογικά διαγράμματα ρευστών.....	29
Εικόνα [8]: Γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων	31
Εικόνα [9]: Σύστημα μέτρησης με Du Nouy Ring	32
Εικόνα [10]: Διάγραμμα τρόπου λειτουργίας Zeta Sizer.....	33
Εικόνα [11]:Μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης.....	34
Εικόνα [12]: Απεικόνιση δείγματος σκόνης WPI από το SEM.....	34
Εικόνα [13]: Διαδικασία επιχρύσωσης δειγμάτων (a),επιχρυσωμένα δείγματα(b).....	35
Εικόνα [14]: Αρχή λειτουργίας φασματόμετρου	36
Εικόνα [15]: Κύρια μέρη φασματοφωτόμετρου	36
Εικόνα [16]: Φιαλίδια με BC κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης	40
Εικόνα [17]: Δείγμα διαλύματος που προορίζεται για τον ηλεκτροψεκασμό	42
Εικόνα [18]: Γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων	43
Εικόνα [19]: Γεωμετρία Du Nouy ring.....	44
Εικόνα [20]: Συσκευή Electrospinning.....	45
Εικόνα [21]: Δείγμα μετά τη διαδικασία του Electrospraying	47
Εικόνα [22]: Εικόνες δειγμάτων μετά τον ηλεκτροψεκασμό [a]:10%κβWPI-8%BC [b] 20%κβ WPI-8%BC [c] 30%κβ WPI-1%κβ BC [d] 30%κβ WPI-8% BC	51
Εικόνα [23]: Εικόνες μικροδομής δειγμάτων από το SEM	52
Εικόνα [24]: Εικόνες από το SEM για τα σωματίδια μετά την ενθυλάκωση της EGCG.a)0.01%κβEGCG b) 0,02%κβ EGCG.....	69
Πίνακας [1]: Συνδυασμοί ποσοτήτων stock BC και WPI.....	41
Πίνακας [2]: Ποσοστό ενσωμάτωσης της EGCG και μέγεθος σωματιδίων την ημέρα 0.....	71

