

**Μέθοδοι ενθυλάκωσης βιοτεχνολογικά
παραγόμενων καροτενοειδών σε φυσικά
πολυμερή με στόχο την ενσωμάτωσή τους σε
συστήματα καινοτόμων τροφίμων**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ΑΡΓΥΡΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλονιάς

**Μέθοδοι ενθυλάκωσης βιοτεχνολογικά
παραγόμενων καροτενοειδών σε φυσικά
πολυμερή με στόχο την ενσωμάτωσή τους σε
συστήματα καινοτόμων τροφίμων**

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Νικόλαος Κοψαχείλης

Το όνομα του επιβλέποντος εδώ

Αικατερίνη Παπαδάκη

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

Δήμητρα Δημητρέλλου

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

Περιεχόμενα	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ	10
1.1 Κατηγορίες.....	10
1.1.1 Γενικά: δομή, ονοματολογία.....	10
1.2 Τρόποι παραγωγής καροτενοειδών.....	12
1.2.1 Χημική σύνθεση	12
1.2.2 Εκχύλιση από φυτικές πηγές.....	13
1.2.3 Βιοτεχνολογική παραγωγή.....	14
1.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα καροτενοειδών.....	20
1.4 Εφαρμογές & αγορά των καροτενοειδών.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ.....	25
2.1 Γενικά	25
2.1.1 Εισαγωγή στην ενθυλάκωση	25
2.1.2 Υλικά τοιχώματος	26
2.1.3 Διαδικασία ενθυλάκωσης	27
2.1.4 Μέθοδοι ελεγχόμενης απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας	28
2.1.5 Καινοτομίες στην μικροενθυλάκωση των τροφίμων	30
2.2 Μέθοδοι ενθυλάκωσης.....	31
2.2.1 Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying).....	31
2.2.2 Ψύξη με ψεκασμό (Spray cooling)	32
2.2.3 Διαχωρισμός φάσεων (Coacervation).....	32
2.2.4 Επίστρωση σε ρευστοποιημένη κλίνη (Fluidized bed coating)	34
2.2.5 Εξώθηση (Extrusion)	34
2.2.6 Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)	35
2.2.7 Ενσωμάτωση σε κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrin inclusion)	35
2.3 Πλεονεκτήματα ενθυλάκωσης λειτουργικών συστατικών- πλεονεκτήματα ενθυλάκωσης καροτενοειδών.	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΣΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ	39
3.1 Άμυλο και παράγωγα αμύλου.....	39
3.2 Κόμμεα	43
3.3 Φυτικές ίνες	43
3.4 Πρωτεΐνες.....	45
3.5 Λιπίδια.....	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ.....	50
4.1 Μέθοδοι εγκλεισμού καροτενοειδών	50
4.1.1 Μελέτη ενθυλάκωσης καροτενοειδών με λυοφιλίωση.....	50
4.1.2 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με την μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό.	50
4.1.3 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με την μέθοδο συνκρυστάλλωσης	52
4.1.4 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με τεχνική ηλεκτροϊνοποίησης	54
4.1.5 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με χρήση λιποσωμάτων.....	55
4.1.6 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με συνθέτη συσσωμάτωση	57
4.2 Ενσωμάτωση ενθυλακωμένων καροτενοειδών στα τρόφιμα και περιπτώσεις μελέτης.....	59
4.2.1 Χρήση ενθυλακωμένης ασταξανθίνης σε μοντέλου ποτού.....	59
4.2.2 Χρήση ενθυλακωμένου λυκοπενίου σε φρεσκοκομμένα μήλα	59
4.2.3 Χρήση ενθυλακωμένων καροτενοειδών καρότου σε τηγανίτες από tapioca	60
4.2.4 Χρήση ενθυλακωμένης ζεαξανθίνης σε γιαούρτι.....	61
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Καροτενοειδή

1.1: Συντακτικός τύπος μορίου ισοπρενίου.....	10
1.2: Δομές σημαντικότερων καροτενοειδών.....	11
1.3: Έσοδα από την αγορά καροτενοειδών των ΗΠΑ, ανά κατηγορία, 2014 – 2025 (σε USD).....	24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μικροενθυλάκωση

2.1: Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας ενθυλάκωσης με τεχνολογία ξήρανσης.....	28
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μέσα εγκλεισμού

3.1: Δομή αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης.....	40
3.2: Δομή πολυγαλακτουρονικού οξέος.....	44
3.3: Δομή ινουλίνης.....	44
3.4: Δομή κυτταρίνης.....	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Εγκλεισμός καροτενοειδών σε φυσικά πολυμερή

4.1: Εικόνα σύνθετων νανοϊνών από SEM (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Σάρωσης).....	54
4.2: Δομή λιποσώματος.....	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μέσα εγκλεισμού

3.1: Συνοπτική παρουσίαση των μέσων εγκλεισμού της ενότητας.....	48
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Εγκλεισμός καροτενοειδών σε φυσικά πολυμερή

4.1: Επισκόπηση ερευνών που αναφέρονται στην μικροενθυλάκωση καροτενοειδών σε καθαρή μορφή ή σε σύνθετα εκχυλίσματα.....	57
--	----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, πλούσιων σε συστατικά που προασπίζουν την υγεία, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τομείς έρευνας στη βιομηχανία των τροφίμων τα τελευταία χρόνια. Λειτουργικά συστατικά με τεράστιο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία των τροφίμων αποτελούν τα καροτενοειδή. Πρόκειται για χρωστικές κόκκινου, κίτρινου και πορτοκαλί χρώματος που υπάρχουν φυσικά σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά. Μπορούν να παραχθούν με εκχύλιση από άλλους οργανισμούς, με χημική σύνθεση είτε βιοτεχνολογικά. Τα καροτενοειδή παρουσιάζουν τεράστια εμπορική αξία καθώς παρέχουν στον οργανισμό σημαντικά οφέλη λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, ενώ φέρονται να διαθέτουν αντικαρκινική δράση. Ωστόσο λόγω της ευοξειδωτής φύσης τους, η προσθήκη τους στα τρόφιμα αποτελεί ένα μεγάλο αντικείμενο έρευνας. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας όσον αφορά τις μεθόδους ενθυλάκωσης καροτενοειδών, τα καταλληλότερα μέσα εγκλεισμού καθώς επίσης και την παρουσίαση πετυχημένων μελετών περίπτωσης σε τρόφιμα. Η εξέλιξη τέτοιων τεχνικών είναι σημαντική για την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων τροφίμων, πλούσιων σε λειτουργικά συστατικά. Οι κύριες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για να ενθυλακωθούν καροτενοειδή είναι η μέθοδος της ξήρανσης με ψεκασμό, η λυοφιλίωση, η συνκρυστάλλωση και η ηλεκτροϊνοποίηση. Σπουδαίο ρόλο στην εφαρμογή της εκάστοτε τεχνικής, παίζει το υλικό μέσα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός της ουσίας, το οποίο θα πρέπει να παρέχει προστασία στην ενθυλακωμένη ουσία καθώς και την δυνατότητα απελευθέρωσής της όταν είναι απαραίτητο. Παρόλη την καινοτομία των διαφορετικών μεθόδων, απαιτείται ακόμα έρευνα για την επιτυχημένη χρήση των ενθυλακωμένων καροτενοειδών στη βιομηχανία των τροφίμων.

ABSTRACT

The development of functional foods rich in health-promoting ingredients is one of the most important areas of research in the food industry in recent years. Carotenoids are considered functional ingredients of great interest to the food industry. These are red, yellow and orange pigments naturally present in various food categories such as fruits and vegetables. They can be produced by extraction from other organisms, by chemical synthesis or biotechnologically. Carotenoids are of enormous commercial value, providing plenty significant health benefits due to their antioxidant properties, while many studies corroborate on their anti-cancer activity. However, these compounds tend to get oxidized easily, rendering their addition to food a major research topic. The purpose of this study is to review the literature regarding carotenoid encapsulation methods as well as to present successful case studies of their incorporation in foodstuffs. The development of such techniques is important for the production of innovative food products rich in functional ingredients. The main techniques that have been used to encapsulate carotenoids are spray-drying, freeze-drying, co-crystallization and electrospinning. The encapsulation material plays a pivotal role as it provides protection to the encapsulated substance and controls its release when necessary. Despite the innovation of the different methods, research is still required for the successful use of encapsulated carotenoids in the food industry.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι απαιτήσεις των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί σε τέτοιο βαθμό έτσι ώστε ο κλάδος της επιστήμης των τροφίμων να αναζητά συνεχώς καινοτόμες ιδέες για βελτιωμένα προϊόντα. Το ενδιαφέρον των καταναλωτών επικεντρώνεται κυρίως στα τρόφιμα με φυσικά συστατικά που μπορούν να προάγουν την υγεία τους.

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα βιοενεργά ή βιοδραστικά συστατικά. Πρόκειται για ουσίες που είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι μπορούν να επιτελέσουν μία ευεργετική λειτουργία στον οργανισμό (Alongi & Anese 2021). Οι ουσίες αυτές, ανάλογα με την κατηγορία που ανήκουν μπορούν να ωφελήσουν με διαφορετικό τρόπο. Για παράδειγμα τα λιπαρά οξέα προλαμβάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων ενώ τα καροτενοειδή εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό χάρις στην αντιοξειδωτική τους δράση (Alongi & Anese 2021). Η προτίμηση των καταναλωτών στις βιοδραστικές ουσίες έδωσε το έναυσμα στους επιστήμονες να αναπτύξουν μεθόδους έτσι ώστε να δημιουργήσουν καινοτόμα τρόφιμα.

Στα καινοτόμα προϊόντα ανήκουν τα λειτουργικά ή βιολειτουργικά τρόφιμα. Παρόλο που το ερευνητικό ενδιαφέρον και η αγορά των βιολειτουργικών τροφίμων αυξάνονται εκθετικά, πολλοί ενδιαφερόμενοι ανά την Ευρωπαϊκή Ένωση εμφανίζονται αποπροσανατολισμένοι. Ο λόγος αφορά ουσιαστικά την έλλειψη γνώσεων το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αποτελεσματική ανάπτυξη τους (Alongi & Anese 2021). Αυτό έχει δημιουργήσει μια συζήτηση σχετικά με τον ορισμό των βιολειτουργικών τροφίμων που συνεχίζεται για περισσότερα από 20 χρόνια και είναι ακόμα ανοιχτός. Ο όρος «βιολειτουργικό τρόφιμο» γενικά αναφέρεται σε προϊόντα που παρέχουν μια ευεργετική δράση στον οργανισμό, πέρα από τις ήδη υπάρχουσες ιδιότητές τους (Alongi & Anese 2021). Γενικότερα στον τομέα των τροφίμων έχουν οριστεί μονοσήμαντα από τη νομοθεσία της ΕΕ και εκτός ΕΕ, σε περιπτώσεις όπως τα συμπληρώματα διατροφής και τα τρόφιμα για ιατρική χρήση με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ακόμη ένας αποκλειστικός ορισμός για τα βιολειτουργικά τρόφιμα (Alongi & Anese, 2021). Στην πραγματικότητα, οι όροι θρεπτικά και βιολειτουργικά τρόφιμα συχνά συγχέονται και εναλλάσσονται. Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για να προταθεί ένας κοινά αποδεκτός ορισμός. Η τελευταία πρόταση ήταν αυτή που παρουσίασε το Functional Food Center (FFC) το

2018 περιγράφοντας τα λειτουργικά τρόφιμα ως «φυσικά ή επεξεργασμένα τρόφιμα που περιέχουν βιολογικά ενεργές ενώσεις που, σε καθορισμένες, αποτελεσματικές και μη τοξικές ποσότητες, παρέχουν μια κλινική απόδειξη και τεκμηριωμένο όφελος για την υγεία χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους βιοδείκτες για την πρόληψη, διαχείριση ή θεραπεία μιας χρόνιας νόσου ή των συμπτωμάτων της» (Gur et al., 2018). Με βάση αυτόν τον ορισμό, ένα συμβατικό προϊόν που περιέχει συστατικά που επηρεάζουν θετικά την υγεία θα μπορούσε να θεωρηθεί και ως λειτουργικό τρόφιμο. Ωστόσο, ένας τέτοιος ορισμός δεν είναι πλήρως αποδεκτός. Για να αποφευχθεί αυτή η σύγχυση ο όρος «βιολειτουργικό τρόφιμο» χρησιμοποιείται επί του παρόντος κυρίως ως ιδίωμα μάρκετινγκ (Martirosyan & Singh, 2015).

Αυτή η εργασία επικεντρώνεται στα ωφέλιμα για τον οργανισμό καροτενοειδή τους τρόπους με τους οποίους παράγονται και την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα τροφίμων μέσω της διαδικασίας της ενθυλάκωσης.

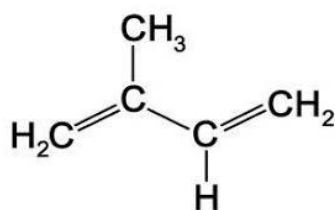
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ

1.1 Κατηγορίες

1.1.1 Γενικά: δομή, ονοματολογία

Παρόλο που στην σημερινή αγορά υπάρχουν σωρεία χρωστικών ουσιών, μία από τις δημοφιλέστερες και συνάμα ενδιαφέρουσες κατηγορίες είναι τα καροτενοειδή. Αυτές οι ουσίες μπορούν να εντοπιστούν σε φρούτα, λαχανικά, λουλούδια, ψάρια, μικροοργανισμούς κλπ. και είναι υπεύθυνα για τα χρώματα κόκκινο, κίτρινο και πορτοκαλί (Stern, 2009). Είναι εξαιρετικά διαλυτά σε μη πολικούς διαλύτες, όπως για παράδειγμα σε βρώσιμα λίπη και έλαια, και είναι κατά βάση αδιάλυτα στο νερό. Για αυτόν τον λόγο χαρακτηρίζονται και ως «λιποχρώματα» (Belitz, 2014).

Από χημικής πλευράς τα καροτενοειδή ανήκουν στην οικογένεια των τερπενοειδών δηλαδή ενώσεων που δημιουργούνται από μονάδες ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3 βουταδιένιο κατά IUPAC) και συνήθως αποτελούνται από 40 άτομα άνθρακα (τετρατερπένια με οχτώ μόρια ισοπρενίου). Το χρώμα των καροτενοειδών οφείλεται στην ύπαρξη των διπλών δεσμών του ισοπρενίου. Ο τρόπος σύνδεσης των ισοπρενών ομάδων είναι ο λεγόμενος head- to-tail και εφαρμόζεται μέχρι το κέντρο του μορίου. Από εκεί και ύστερα η σειρά αντιστρέφεται σε tail-to-tail. Ο λόγος που γίνεται είναι για να υπάρχει συμμετρία στο μόριο.



Εικόνα 1.1: Συντακτικός τύπος μορίου ισοπρενίου

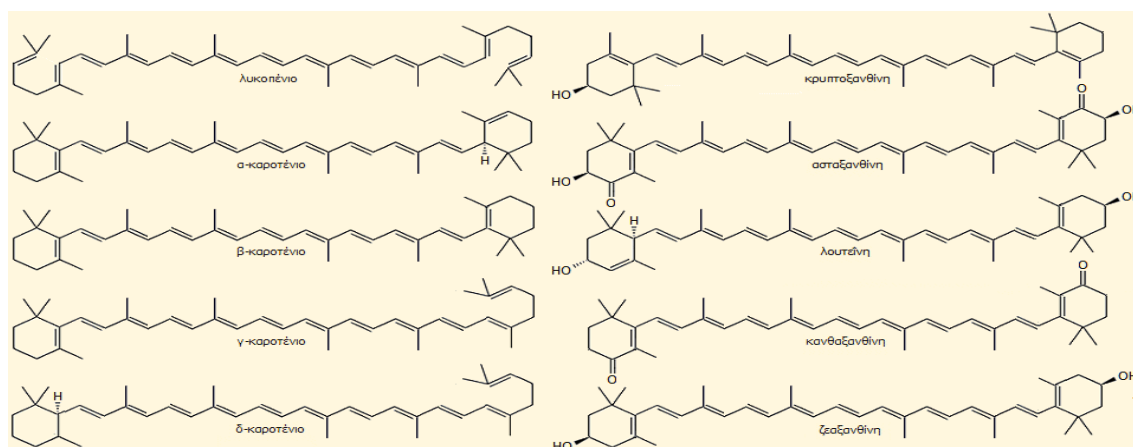
Με βάση τη δομή τους, τα καροτενοειδή μπορούν να παραχθούν με τις διαδικασίες της υδρογόνωσης, αφυδρογόνωσης, κυκλοποίησης, οξείδωσης ή ακόμα και με συνδυασμό των διαδικασιών. Η αντίδραση της κυκλοποίησης μπορεί να εμφανιστεί στη μια ή και στις δυο C9 τερματικές ομάδες. Όσον αφορά την ονοματολογία, μια μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η γενική λέξη «καροτένιο» με παράθεση δυο ελληνικών γραμμάτων ανάλογα με το είδος των C9 τερματικών

ομάδων (Belitz, 2014). Τα γράμματα που χρησιμοποιούνται είναι ψ (ακυκλικό) , β,ε (κυκλοεξάνιο), κ (κυκλοπεντάνιο).

1.1.2 Σημαντικά καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή απαντώνται με περισσότερες από 700 δομές (Saini et al., 2018). Γενικά όμως χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες με βάση τη λειτουργική τους ομάδα: τα καροτένια (απλοί υδρογονάνθρακες χωρίς οξυγόνο) και τις ξανθοφύλλες (δομές με οξυγόνο).

Το πιο απλό καροτένιο είναι το λυκοπένιο και είναι υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα σε αρκετές τροφές με χαρακτηριστικότερη τη τομάτα. Στα άκρα του δεν περιέχονται κυκλικές δομές, επομένως σύμφωνα με την προηγούμενη ονοματολογία χαρακτηρίζεται ως ψ, ψ-καροτένιο. Εξαιτίας αυτής της έλλειψης, το λυκοπένιο δεν μπορεί να συμπεριφερθεί ως προβιταμίνη Α, ωστόσο αποτελεί την πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό όλων των καροτενοειδών. Εξίσου σημαντικά καροτένια είναι το α και β καροτένιο (κίτρινη χρωστική). Δομικά είναι σχεδόν παρόμοια με εξαίρεση τη θέση ενός διπλού δεσμού στην μια από τις δυο κυκλικές τερματικές ομάδες. Το ανθρώπινο σώμα έχει την δυνατότητα να μετατρέψει και τα δυο καροτένια σε βιταμίνη Α προσδίδοντας ευεργετικές δράσεις στον οργανισμό.



Εικόνα 1.2: Δομές σημαντικότερων καροτενοειδών

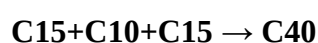
Οι ξανθοφύλλες λόγω της ύπαρξης του οξυγόνου στο μόριο τους χαρακτηρίζονται ως πολικά καροτενοειδή. Ανάλογα με τις υδροξυ- ομάδες που περιέχουν ταξινομούνται σε μονοϋδροξυλιωμένες ξανθοφύλλες, ενώ αν έχουν δυο ή περισσότερες σε διυδροξυλιωμένες και πολυυδροξυλιωμένες αντίστοιχα. Η πιο σημαντική ξανθοφύλλη ονομάζεται ασταξανθίνη. Πρόκειται για κόκκινη χρωστική η οποία εντοπίζεται συνήθως στο κέλυφος των αστακών με τη μορφή εστέρα. Άλλες σημαντικές ξανθοφύλλες είναι η λουτεΐνη που εντοπίζεται στα πράσινα φύλλα και στον κρόκο αυγού, η ζεαξανθίνη που βρίσκεται στο καλαμπόκι, η κανθαξανθίνη που χρησιμοποιείται ως χρωστική στα τρόφιμα κ.ά. (Belitz, 2014).

1.1 Τρόποι παραγωγής καροτενοειδών

1.2.1 Χημική σύνθεση

Η διαδικασία παραγωγής καροτενοειδών με την μέθοδο της χημικής σύνθεσης αναπτύχθηκε το 1950 από τους Karrer, Eugster, Inhoffen και Milas. Τέσσερα χρόνια αργότερα παραγόταν ήδη σε βιομηχανική κλίμακα το συνθετικό β,β-καροτένιο που χρησιμοποιούταν ως βαφή τροφίμων και ζωοτροφών. Παρόλο που υπάρχουν περισσότερα από 700 φυσικά καροτενοειδή, ελάχιστα από αυτά παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το λυκοπένιο, η κανθαξανθίνη, το β,β-καροτένιο, η αποκαροτενάλη και η κυτραναξανθίνη. Για την χημική παραγωγή καροτενοειδών χρησιμοποιούνται οι ενώσεις Grignard και οι αντιδράσεις Wittig (Alvarez et al., 2014).

Οι αντιδράσεις Wittig παράγουν αλδεΐδες από κετόνες ή από άλλες αλδεΐδες. Για την πραγματοποίηση τους βασικό ρόλο παίζουν ειδικά παράγωγα της τριφαινυλοφωσφίνης. Ένας τρόπος για την παραγωγή καροτενοειδών με την μέθοδο Wittig είναι με συνδυασμό δυο μορίων άλατος φωσφονίου, όπου το καθένα θα περιέχει 15 άτομα C και ένα μόριο διαλδεΐδης με 10 άτομα C. Στην συνέχεια, τα προϊόντα της αντίδρασης υποβάλλονται σε αντίδραση ισομερισμού, έτσι ώστε να σχηματιστούν συμμετρικές ενώσεις με 40 άτομα C. Το σχήμα της αντίδρασης είναι το εξής:



Όπου:

C15: Άλας φωσφονίου

C10: Διαλδεΐδη

C40: Τετρατερπένιο

Η άλλη μέθοδος χημικής σύνθεσης καροτενοειδών γίνεται με τη χρήση οργανομεταλλικών ενώσεων Grignard. Για να χρησιμοποιηθούν αυτές οι ενώσεις πρέπει να συνδυαστεί ένα μόριο δικετόνης και δυο μεθανόλης. Με αυτόν τρόπο παράγεται ένωση με 40 άτομα C (Britton et al., 1996; Alvarez et al., 2014).

Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το συνθετικό β-καροτένιο μπορεί να έχει καρκινογόνο δράση (Black, 2004; Radomska et al 2018). Αυτός ήταν ένας θεμελιώδης λόγος για την αναζήτηση μεθόδων παραγωγής φυσικών καροτενοειδών τα οποία άλλωστε μπορούν να συντεθούν από μικροοργανισμούς με φυσικό τρόπο.

1.2.2 Εκχύλιση από φυτικές πηγές

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει μελετημένες κινήσεις που αποσκοπούν στην ανάπτυξη βελτιωμένων μεθόδων εκχύλισης των καροτενοειδών. Τα φυσικά καροτενοειδή μπορούν να εξαχθούν από φυτικές πηγές όπως οι ντομάτες, τα φύκια και οι μύκητες. Ωστόσο, η ανάκτησή τους γίνεται σε χαμηλά ποσοστά, καθώς υπάρχουν διάφοροι φυσικοί και χημικοί παράγοντες που εμποδίζουν την μεταφορά των καροτενοειδών κατά την εκχύλιση. Σε περίπτωση παρουσίας διαφορετικών καροτενοειδών σε ένα σύστημα, η ταυτόχρονη εξαγωγή τους είναι επίσης δύσκολη λόγω των ποικίλων επίπεδων πολικότητας που διαθέτουν. Επιπρόσθετα ο ευοξειδωτος χαρακτήρας των καροτενοειδών δεν τους επιτρέπει να εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες, στο φως και σε οξέα ενώ πρέπει να αποφεύγονται και οι παρατεταμένοι χρόνοι εκχύλισης.

Λόγω της υδρόφοβης φύσης τους, τα καροτενοειδή μπορούν να εκχυλιστούν συμβατικά με τη χρήση οργανικών διαλυτών. Για την εκχύλιση μη πολικών καροτενίων ή εστεροποιημένων ξανθοφυλλών, εξαιρετική χαρακτηρίζεται η επιλογή μη πολικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, ο πετρελαϊκός αιθέρας ή το τετραϋδροφουράνιο (THF). Αντίθετα οι πολικοί διαλύτες όπως η αιθανόλη, η ακετόνη και ο αιθανικός αιθυλεστέρας είναι καταλληλότεροι για την εξαγωγή

πολικών καροτενοειδών. Οι μέθοδοι με τις οποίες γίνεται η εκχύλιση καροτενοειδών από φυσικές πηγές ταξινομούνται σε πέντε βασικές κατηγορίες:

- i. Η εκχύλιση με μέθοδο Soxhlet, διαβροχή, μικροκύματα (MAE: microwave assisted extraction), υπέρηχους (UAE: ultrasound assisted extraction).
- ii. Η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (ASE: accelerated solvent extraction), επίσης γνωστή ως εκχύλιση υπό πίεση.
- iii. Με εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά πεδία (PEF: pulsed electric fields).
- iv. Η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (SFE: supercritical fluid extraction), η οποία είναι συχνά βασισμένη στη χρήση υπερκρίσιμου CO₂ (SC-CO₂) ως διαλύτη, με μικρή δόση οργανικού συνδιαλύτη πχ αιθανόλη.
- v. Με εκχύλιση η οποία υποβοηθείται από ένζυμα (EAE: enzyme assisted extraction).

Οι διαφορές αυτών των μεθόδων, αφορούν τον τρόπο διάρρηξης των κυττάρων καθώς και τον βαθμό της θερμοκρασίας και της πίεσης που εφαρμόζεται για την εκχύλιση των καροτενοειδών.

1.2.3 Βιοτεχνολογική παραγωγή

Τα καροτενοειδή έχουν αποκτήσει ιδιαίτερα υψηλή αξία, καθώς βρίσκουν μια πληθώρα εφαρμογών σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς, όπως ο χημικός, ο φαρμακευτικός, των τροφίμων, των καλλυντικών κ.λ.π. (Mata-Gómez et al., 2014). Το γεγονός ότι μπορούν να προσφέρουν πολλαπλές ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό έχει οδηγήσει σε ακόμα πιο αυξημένο ενδιαφέρον τόσο από τις εταιρείες όσο και από τους ερευνητές. Η παραγωγή καροτενοειδών με τις διαδικασίες της εκχύλισης και της χημικής σύνθεσης περιορίζεται σε χαμηλές αποδόσεις και κατά συνέπεια υψηλό κόστος παραγωγής (Mata-Gómez et al., 2014). Ακόμα, με την χημική σύνθεση μπορούν να προκύψουν απόβλητα με τοξική δράση για το περιβάλλον. Αυτό ώθησε τους ερευνητές να αναζητήσουν μεθόδους μικροβιακής παραγωγής καροτενοειδών οι οποίες φέρονται να παρουσιάζουν υψηλότερες αποδόσεις από τις προαναφερθείσες (Mata-Gómez et al., 2014). Επιπλέον η μικροβιακή παραγωγή μπορεί να αποδειχθεί πιο προσιτή οικονομικά καθώς υπάρχει η δυνατότητα χρήσης θρεπτικών υποστρωμάτων χαμηλού κόστους τα οποία δεν θα είναι επιβλαβή για το περιβάλλον όπως για παράδειγμα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα (Mata-Gómez et al., 2014).

Τα καροτενοειδή είναι ευρέως κατανεμημένα σε μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των φυκιών, των μυκήτων και των ζυμομυκήτων (Mata-Gómez et al., 2014). Μεταξύ των βακτηρίων που έχουν μελετηθεί περισσότερο στην παραγωγή καροτενοειδών είναι τα *Corynebacterium michiganense*, *Micrococcus roseus*, *Bradyrhizobium spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Gordonia jacobaea*, *E. coli*, *Dietzia natronolimnaea*, *P. carotinifaciens* και *Pseudomonas putida* (Nasravadi & Razavi, 2010; Martínez-Cámara et al 2021). Τα μικροφύκη υπάρχουν στη φύση ως μονοκυτταρικός τύπος, και είναι πλούσια σε καροτενοειδή, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες (Ng et al., 2020). Λόγω της ταχείας ανάπτυξης και της ισχυρής προσαρμοστικότητας των μικροφυκών, περισσότεροι ερευνητές επιλέγουν τα μικροφύκη ως την κύρια πρώτη ύλη για την εξαγωγή καροτενοειδών. Έχουν υπάρξει πολλές αναφορές για την παραγωγή καροτενοειδών από μικροφύκη, όπως τα *Haematococcus lacustris*, *H. rubicundus*, *Coelastrella aeroterretrica* και *Bracteacoccus aggregatus* (Alcaíno et al., 2016, Novoveská et al., 2019).

Πολλές ζύμες που ανήκουν σε διαφορετικά γένη έχουν μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες ως πιθανοί αποτελεσματικοί παραγωγοί διαφόρων χρωστικών (ιδιαίτερα μιγμάτων καροτενοειδών). Μεταξύ αυτών, το πιο ανερχόμενο είναι το *Phaffia rhodozyma*. Επιπρόσθετα οι ζύμες, του γένους *Rhodotorula*, διαθέτουν ορισμένα είδη όπως τα *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. acheniorum* και *R. graminis* που αναγνωρίζονται ως παραγωγοί καροτενοειδών. Επίσης οι ζύμες του γένους *Sporobolomyces* όπως οι *S. roseus*, *S. salmonicolor* και *S. patagonicus* έχουν μελετηθεί για την παραγωγή καροτενοειδών. Μάλιστα οι τελευταίες αναφέρονται ως οι πιο αναγνωρισμένες παραγωγοί β-καροτενίου, επομένως είναι και οι πιο μελετημένες (Mata-Gómez et al., 2014).

Μερικά καροτενοειδή που μπορούν να παραχθούν από ζυμομύκητες είναι:

- Το β-καροτένιο είναι μια ισοπρενοειδής ένωση με χημικό τύπο $C_{40}H_{56}$ και μοριακό βάρος 536,88 g/mol. Λόγω της δομής και του συστήματος των διπλών δεσμών, αυτή η ένωση παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 450 nm και τα χρώματα της είναι το κίτρινο και το πορτοκαλί (Gul et al., 2015; Grune et al., 2010).

- Το τορουλένιο (3', 4'-διδεϋδρο-β, ψ-καροτένιο) αποτελείται από 13 συζευγμένους διπλούς δεσμούς και έχει θελκτικό χρώμα. Η αντιοξειδωτική του δράση είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης των διπλών δεσμών. Εντούτοις διαθέτει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το β-καροτένιο, λόγω των περισσότερων διπλών δεσμών που διαθέτει στην δομή του (Sakaki et al, 2001, 2002).
- Η ασταξανθίνη (3,3'-διυδροξυ-β, β-καροτινη-4,4'-διόνη) εντοπίζεται στο κέλυφος των καβουριών και των αστακών (συνήθως ως εστέρας π.χ. διπαλμιτικός εστέρας). Κατά το μαγείρεμα τους απελευθερώνουν την ασταξανθίνη ως κόκκινη χρωστική (Belitz, 2014).
- Η κανθαξανθίνη (β-β'-καροτένιο-4, 4'-διόνη) είναι μια κετο-καροτίνη που βρίσκεται πολλές στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών (Hannibal et al, 2000).

Παρόλο που υπάρχει ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που μπορούν να βιοσυνθέσουν καροτενοειδή, συνεχίζουν να λείπουν βασικές πληροφορίες σχετικά με τις στρατηγικές για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα. Αν και υπάρχουν πολλοί τρόποι για να διεγερθούν οι βιοσυνθετικοί οδοί καροτενοειδών στους ζυμομύκητες, το ενδιαφέρον εξακολουθεί να επικεντρώνεται στα ανεξερεύνητα σημεία που αφορούν την επιλογή υπερπαραγωγικών στελεχών που θα είναι το σημαντικότερο βήμα για την βελτιστοποίηση της βιοτεχνολογικής παραγωγής χρωστικών (Mussagy et al., 2021).

Ομοίως, πολύ σημαντική είναι η γνώση των εργαλείων της μεταβολικής μηχανικής του χειρισμού της βιοσυνθετικής οδού για την παραγωγή καροτενοειδών από ζυμομύκητες. Το 1964 μια έρευνα (Simpson et al., 1964), περιέγραψε μια πιθανή βιοσυνθετική οδό για την σύνθεση καροτενοειδών. Το 1993 ο Goodwin αναθεώρησε τις γενικές οδούς για τη βιοσύνθεση των καροτενοειδών από ζυμομύκητες και κατέληξε ότι η έχει τρία στάδια:

- Η σύνθεση ξεκινάει με τη μετατροπή του ακετυλο συνενζύμου Α (CoA) σε 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλ-CoA (HMG-CoA). Η αντίδραση καταλύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται συνθάση HMG-CoA. Στη συνέχεια το HMG-CoA μετατρέπεται σε μεβαλονικό οξύ (MVA), μια διαδικασία που αποτελεί τον πρώτο πρόδρομο της βιοσυνθετικής οδού των τερπενοειδών. Το MVA, με τη

βοήθεια του ενζύμου MVA κινάση, φωσφορυλιώνεται και αποκαρβοξυλιώνεται σε πυροφωσφορικό ισοπεντενυλεστέρα (IPP).

- Στη συνέχεια το IPP ισομερίζεται σε πυροφωσφορικό διμεθυλαυλεστέρα (DMAPP) και με την προσθήκη τριών μορίων IPP στο DMAPP, σε πυροφωσφορικό γερανυλγερανυλεστέρα (GGPP). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο πρενυλτρανσφεράση. Η συμπύκνωση δύο μορίων GGPP παράγει το φυτοένιο (που είναι το πρώτο C₄₀ καροτένιο της βιοσυνθετικής οδού). το οποίο στη συνέχεια είναι αποκορεσμένο για να σχηματίσει λυκοπένιο.
- Πολλά κυκλικά καροτενοειδή παράγονται από το λυκοπένιο. Μερικά από αυτά είναι το β-καροτένιο, το τορουλένιο, το γ-καροτένιο, το τορουλαροδίνη ακόμα και η ασταξανθίνη όταν υφίσταται πολλές αντιδράσεις.

Όπως προαναφέρθηκε, η παραγωγή μικροβιακών καροτενοειδών σε βιομηχανική κλίμακα πρέπει να αναζητά διαδικασίες χαμηλού κόστους, με υψηλές αποδόσεις και χωρίς επιπτώσεις για το περιβάλλον. Ωστόσο, η βιοτεχνολογική σύνθεση των καροτενοειδών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που εμπλέκονται στις διαδικασίες σχετικές με την απόδοση και το κόστος λειτουργίας (Mata-Gómez et al., 2014). Μερικοί από αυτούς τους σημαντικούς παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι:

- Ο τύπος και η σύνθεση του υποστρώματος επηρεάζουν άμεσα την απόδοση της παραγωγής καροτενοειδών καθώς και το κόστος των βιοτεχνολογικών διεργασιών. Τα υποστρώματα που αποτελούνταν από σακχαρόζη και γλυκόζη ήταν οι πιο αναφερόμενες πηγές άνθρακα στη βιοπαραγωγή καροτενοειδών (Valduga et al., 2009). Οι Marova et al. (2009) αναφέρουν ότι οι καλύτερες συνθήκες για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση καροτενοειδών είναι η διατήρηση υψηλών ρυθμών ανάπτυξης των κυττάρων και η διαθεσιμότητα πηγών άνθρακα. Ως εκ τούτου, διάφορα υποπροϊόντα και πρώτες ύλες από βιομηχανίες τροφίμων ή αγροβιομηχανίες έχουν διερευνηθεί ως πολλά υποσχόμενα υποστρώματα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και την παραγωγή καροτενοειδών, λόγω της υψηλής διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και του χαμηλού κόστους (Willen-Silva et al., 2021). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι μελέτες στις οποίες

χρησιμοποιηθεί υδρολύματα πολτού ζαχαρότευτλων (Martins et al., 2021) και υδρολυμάτων ψευδολιναριολυ (Bertacchi et al., 2020) για παραγωγή διαφόρων καροτενοειδών.

- Η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην παραγωγή καροτενοειδών από ζυμομύκητες, καθώς επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων και την παραγωγή μεταβολιτών. Η δράση της εντοπίζεται στην αλλαγή των βιοσυνθετικών οδών, συμπεριλαμβανομένης της καροτενογένεσης. Η επίδραση της θερμοκρασίας εξαρτάται από την ποσότητα του προϊόντος και από τον μικροοργανισμό (Orosa et al., 2005; Vijayalakshmi et al., 2001; Aksu & Eren, 2005; Bhosale & Gadre, 2001). Οι Malisorn και Suntornsuk το 2008 αξιοποίησαν την επίδραση της θερμοκρασίας σε σχέση με την παραγωγή καροτενοειδών και βιομάζας στο *Rhodotorula glutinis*, αναφέροντας τιμές θερμοκρασίας για μέγιστη παραγωγή τους 29 και 30°C , αντίστοιχα.
- Ο αερισμός είναι μια εξίσου σημαντική παράμετρος, επειδή η καροτενογένεση είναι μια αερόβια διαδικασία και ως εκ τούτου ο ρυθμός ροής του αέρα στην καλλιέργεια του ζυμομύκητα είναι ένας ουσιαστικός παράγοντας για την αφομοίωση του υποστρώματος, για τον ρυθμό ανάπτυξης, τη μάζα των κυττάρων και την καροτενογένεση (Mata-Gómez et al., 2014). Ο περιορισμός του οξυγόνου επηρέασε αρνητικά την παραγωγή βιομάζας του *Rhodosporidium toruloides* (NCYC 921) και, κατά συνέπεια, τη συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε σιρόπι χαρουπόπολτου (Martins et al., 2018). Οι Valduga et al. (2009) ανέφεραν ότι η μεγιστοποίηση της παραγωγής καροτενοειδών από το *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) επετεύχθη με ρυθμό αερισμού 1,5 vvm και 180 rpm. Η σημασία της διαδικασίας αερισμού κατά την ζύμωση σε αγροβιομηχανικά μέσα καταδείχθηκε επίσης από τους Borba et al. (2018). Αναλυτικότερα, η παραγωγή καροτενοειδών από το *Sporidiobolus pararoseus*, ήταν 3,5 φορές υψηλότερη (1969 µg/L) σε βιοαντιδραστήρα υπό ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού (158 rpm και 1,2 vvm) από την τιμή που βρέθηκε κατά την ανάδευση σε ανακινούμενες φιάλες (100–200 rpm).
- Η ταχύτητα ανάδευσης μπορεί να αποφέρει υψηλότερες αποδόσεις στην κυτταρική ανάπτυξη και κατά συνέπεια στην παραγωγή καροτενοειδών. Οι

Tinoi et al. (2005) χρησιμοποιώντας υδρολυμένο υπολειμματικό αλεύρι mung φασολιών ως υπόστρωμα, παρατήρησαν ότι η χαμηλότερη κυτταρική ανάπτυξη του *R. glutinis* εμφανίστηκε σε χαμηλούς ρυθμούς ανάδευσης (100 έως 150 rpm) λόγω της μείωσης της διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών στην κυτταρική επιφάνεια ενώ για το σπάσιμο των κυττάρων χρειάστηκε ανάδευση σε υψηλούς ρυθμούς (>250 rpm). Για την παραγωγή καροτενοειδών από τον *R. glutinis*, οι El-Banna et al. (2012) ανέφεραν ότι επετεύχθη η υψηλότερη περιεκτικότητα σε καροτενοειδή (1,9 µg/mL) μετά από καλλιέργεια στους 25 °C και κατά τη διάρκεια συνεχούς ανάδευσης στα 100 rpm.

- Τα μεταλλικά ιόντα έχουν μεγάλο αντίκτυπο σε όλες τις πτυχές της μικροβιακής αύξησης. Το κάλιο και το μαγνήσιο είναι τα κύρια στοιχεία στα μικροβιακά κύτταρα, ενώ το νάτριο, το ασβέστιο και ο ψευδάργυρος είναι μεταλλικά ιόντα απαραίτητα για τη μικροβιακή αύξηση (Mata-Gomez et al., 2014). Το κάλιο, το μαγνήσιο και το νάτριο αποτελούν τις ενεργές ομάδες ορισμένων ενζύμων στα κύτταρα, τα οποία έχουν τη λειτουργία της ρύθμισης του μεταβολισμού των κυττάρων καθώς και της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Locascio et al., 2019). Όταν το *H. pluvialis* καλλιεργήθηκε σε ένα μέσο που περιείχε άλατα σιδήρου, η παραγωγή ασταξανθίνης αυξήθηκε σε κάποιο βαθμό. Η υψηλή συσσώρευση ασταξανθίνης προκαλείται από άλατα σιδήρου λόγω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες διεγείρουν τη σύνθεση καροτενοειδών στα κύτταρα (Jannel et al., 2020). Τέλος, μετά την προσθήκη $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 και Na_2CO_3 , η παραγωγικότητα της βιομάζας και της ασταξανθίνης αυξήθηκε κατά 17% και 54% στο τέλος της φωτοτροφικής φάσης και της φωτοεπαγόμενης φάσης, αντίστοιχα (Azizi et al., 2020).
- Το φως είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την μικροβιακή παραγωγή καροτενοειδών καθώς βελτιώνει την καροτενογένεση (Mata-Gomez et al., 2014). Οι μικροοργανισμοί πρέπει να προστατεύονται από το φως που μπορεί να προκαλέσει βλάβη και η καροτενογένεση είναι ένας μηχανισμός με φωτοπροστατευτικές ιδιότητες (Raja et al., 2007). Η παραγωγή καροτενοειδών επηρεάζεται θετικά από το λευκό φως ενώ η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από τον μικροοργανισμό. Μια έρευνα μελέτησε τη σχέση μεταξύ των καροτενοειδών και της εργοστερόλης

και της αντοχής των κυττάρων στην υπεριώδη ακτινοβολία σε στελέχη του *R. mucilaginosa* και ανέφερε ότι τα στελέχη με υπερχρωματισμό έδειξαν ενισχυμένη επιβίωση (250%). Έδειξαν επίσης ότι η υψηλότερη παραγωγή τορουλαροδίνης βελτιώνει την επιβίωση των ζυμομυκήτων στο υπεριώδες φως (Moline et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, οι Yen και Zhang (2011) αξιολόγησαν την παραγωγικότητα σε β-καροτενίο σε έναν αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με δύο λαμπτήρες LED (δίοδος εκπομπής φωτός) με αποτέλεσμα συγκέντρωση του να φθάσει τα 24,6 $\mu\text{g g}^{-1}$. Από την άλλη η αντίστοιχη συγκέντρωση του β-καροτενίου χωρίς την επίδραση του φωτός ήταν 14,69 $\mu\text{g g}^{-1}$.

- Οι διαλύτες και οι φυσικοχημικοί παράγοντες έχουν μελετηθεί σχετικά με την επίδρασή τους στην καροτενογένεση. Οι Kim et al. (2003) παρατήρησαν ότι η κυτταρική μάζα του μικροοργανισμού *P. rhodozyma* και η παραγωγή ασταξανθίνης διεγείρεται με την προσθήκη αιθανόλης (10 g L⁻¹) και οξικού οξέος (5 g L⁻¹). Τα αποτελέσματα ήταν 45,62 mg L⁻¹ και 43,87 mg L⁻¹ συγκέντρωσης καροτενοειδών, αντίστοιχα (Kim et al., 2003).

1.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα καροτενοειδών

Λόγω της αερόβιας φύσης του, ο ανθρώπινος οργανισμός είναι αναγκασμένος να εκτίθεται καθημερινά σε μια κατηγορία ουσιών που ονομάζονται προ-οξειδωτικά. Αυτές οι ενώσεις έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες, είτε δημιουργώντας δραστικά είδη οξυγόνου είτε αναστέλλοντας αντιοξειδωτικά συστήματα. Επιπλέον οι περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες (π.χ. UV, ιοντίζουσες ακτινοβολίες, ρύποι και βαρέα μέταλλα) συμβάλλουν σημαντικά στην αύξηση της παραγωγής αντιδρώντων οξυγόνου, προκαλώντας επομένως οξειδωτικό στρες που οδηγεί σε βλάβη των κυττάρων και των ιστών (Pizzino et al 2017). Τα καροτενοειδή αποτελούν μέρος του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των ανθρώπων αλλά και των ζώων.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκύψει από την δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερων ρίζων τις οποίες τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού δεν μπόρεσαν να εξουδετερώσουν εγκαίρως. Η διαρκής επίδραση του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό μπορεί να του αποφέρει σημαντικές παθολογικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακές παθήσεις ενώ σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να

προκαλέσει ακόμα και θάνατο. Επιπλέον μπορεί να αποφέρει προβλήματα αισθητικής φύσεως, καθώς επιστημονικές μελέτες αναφέρουν ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην πρόωγη γήρανση του (Badhani et al., 2015).

Οι ελεύθερες ρίζες ως υποπροϊόντα του οξυγόνου παράγονται κατά την διαδικασία της εσωτερικής καύσης του, για την παραγωγή ενέργειας και την λειτουργία βασικών δομών. Ο οργανισμός μπορεί να χρησιμοποιήσει προς όφελος του τις ελεύθερες ρίζες, σε συγκεκριμένη όμως ποσότητα, ιδίως για την πρόληψη δημιουργίας λοιμώξεων.

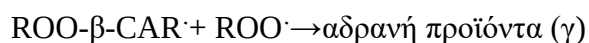
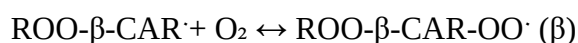
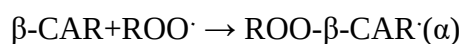
Παρόλο που τα καροτενοειδή είναι κατανεμημένα σε διάφορα φυσικά συστήματα, υπάρχουν λίγες μόνο ενώσεις που εμπλέκονται στην ανθρώπινη υγεία, με πιο χαρακτηριστικές το β-καροτένιο, τη λουτεΐνη και το λυκοπένιο. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συνδέσει δίαιτες που περιλαμβάνουν τροφές πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά (π.χ. Μεσογειακή Διατροφή) συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για αρκετές εκφυλιστικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων τύπων καρκίνου, καρδιαγγειακών ή οφθαλμολογικών παθήσεων (Stahl et al 2004).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των καροτενοειδών, από χημικής άποψης, στηρίζεται στην μακριά αλυσίδα πολυενίου καθώς πρόκειται για ένα πολύ δραστικό σύστημα διπλών δεσμών με μεγάλο αριθμό ηλεκτρονίων. Αυτό τα καθιστά ευπαθή σε προσβολή από ηλεκτρόφιλα αντιδραστήρια. Συνεπώς τα δομικά χαρακτηριστικά των καροτενοειδών κατέχουν σημαντικό ρόλο για τη χημική τους δραστικότητα σε οξειδωτικούς παράγοντες και τις ελεύθερες ρίζες και κατά συνέπεια για κάθε ρόλο αντιοξειδωτικού (Jorgensen & Skibsted, 1993; Farombi & Burton, 1999).

Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι η ικανότητα σβέσης των καροτενοειδών έναντι του μονατομικού οξυγόνου και των ελεύθερων ριζών, ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες εξαρτάται από τον βαθμό υποκατάστασής τους. Για παράδειγμα η ασταξανθίνη, με δυο καρβονυλικές και δυο υδροξυλικές ομάδες, φέρεται να είναι περίπου 10 φορές πιο αποτελεσματική από τη ζεαξανθίνη, τη λουτεΐνη, την τουναξανθίνη, την κανθαξανθίνη και το β-καροτένιο, όλα με λιγότερους υποκατάστατες, καθώς και 100 φορές πιο αποτελεσματική από την α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) όσον αφορά την αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων που προκαλείται από ενεργές μορφές οξυγόνου. Επίσης βρέθηκε ότι οι αντιοξειδωτικές

δράσεις της κανθαξανθίνης και της ασταξανθίνης έχουν μεγαλύτερη διάρκεια από αυτές της ασταξανθίνης και του β-καροτενίου. Έχει προταθεί για αυτό το φαινόμενο ότι η υποκατάσταση οξο-ομάδας, η οποία βρίσκεται στην θέση 4 ή 4' της ανθρακικής αλυσίδας, αυξάνει την αποτελεσματικότητα δέσμευσης υπεροξυδικών ριζών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ικανότητα του μορίου οξυγόνου να δεσμεύει ηλεκτρόνια μειώνει σημαντικά την μη ζευγαρωμένη πυκνότητα ηλεκτρονίων στην ανθρακική αλυσίδα μειώνοντας την αντιδραστικότητα της εκάστοτε ρίζας-με επίκεντρο τον άνθρακα προς το ελεύθερο μοριακό οξυγόνο (Terao, 1989; Miki, 1991).

Οι Burton και Ingold το 1984, περιέγραψαν τον μηχανισμό με τον οποίο το β-καροτένιο δρα ως αντιοξειδωτικό.



Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, το πρώτο βήμα είναι η προσθήκη μιας ρίζας υπεροξυλίου (ROO·) σε κατάλληλο διπλό δεσμό του καροτενοειδούς (β-CAR) (α). Η ρίζα με επίκεντρο τον άνθρακα που προκύπτει αντιδράει γρήγορα και αμφίδρομα με το οξυγόνο έως ότου σχηματιστεί μια νέα αλυσίδα (ROO-β-CAR-OO·) που θα φέρει την ρίζα υπεροξειδίου (β). Αυτή η ρίζα είναι σταθεροποιημένη σε τέτοιο βαθμό, έτσι ώστε όταν μειωθεί η πίεση του οξυγόνου, η ισορροπία της αντίδρασης (β) μετατοπίζεται αρκετά προς τα αριστερά με αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης ριζών υπεροξειδίου και κατά συνέπεια τον κατευνασμό της αυτοοξειδωσης στο σύστημα (Britton, 1995). Επιπλέον το προϊόν ρίζας-καροτενίου (ROO-β-CAR-OO·) μπορεί να υποστεί πλήρη αδρανοποίηση εφόσον αντιδράσει με άλλη ρίζα υπεροξυλίου (γ).

Συμπερασματικά τα καροτενοειδή μπορούν να έχουν λειτουργικούς ρόλους στα βιολογικά συστήματα. Αυτό έχει οδηγήσει στην πεποίθηση ότι η κατανάλωση πολύ υψηλών δόσεων ενός καροτενοειδούς π.χ. β-καροτενίου θα έχει ευεργετικές δράσεις στον οργανισμό. Ωστόσο αυτό μπορεί να μην έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς παραβλέπεται η αλληλεπίδραση των καροτενοειδών με άλλα διατροφικά συστατικά (συμπεριλαμβανομένων άλλων αντιοξειδωτικών) καθώς και η

τύχη των αντιοξειδωτικών αυτών καθυλών όταν βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες που καταπιάνονται με αυτά ζητήματα, ενώ έχουν γίνει έρευνες και στο πρόσφατο παρελθόν όπως αυτή των Truscott, Edge 2018.

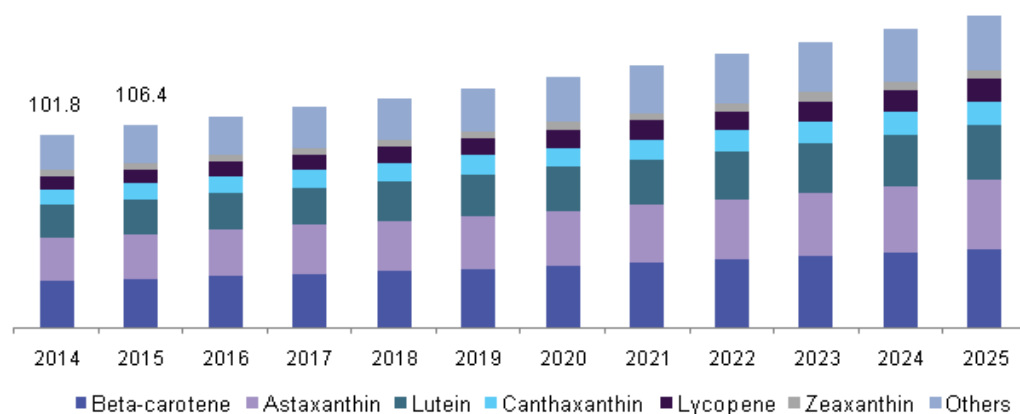
1.4 Εφαρμογές & αγορά των καροτενοειδών

Το χρώμα είναι ένα σημαντικό οργανοληπτικό χαρακτηριστικό που σχετίζεται με την ασφάλεια και τη θρεπτική αξία των τροφίμων και επηρεάζει ιδιαίτερα την προτίμηση των καταναλωτών. Ειδικά τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σημαντικά η ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με τη χρήση συνθετικών χρωστικών τροφίμων, καθώς όλο και περισσότερες μελέτες συνηγορούν ότι παρουσιάζουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία. Στα πλαίσια της ανάπτυξης μιας καινοτόμου βιομηχανίας τροφίμων που ακολουθεί τις αρχές της αειφορίας και τις κυκλικής οικονομίας η ζήτηση φυσικών χρωστικών έχει αυξηθεί, συμπεριλαμβανομένου και των καροτενοειδών (Lourenço-Lopes et al., 2021). Αυτές οι ουσίες χρησιμοποιούνται για τις χρωστικές τους ιδιότητες καθώς και για το αντιοξειδωτικό τους δυναμικό αλλά και τις βιολογικές τους λειτουργίες (π.χ. ως προβιταμίνες Α). Τα καροτενοειδή μπορούν είτε να εφαρμοστούν απευθείας ως συστατικά στα τρόφιμα όπως σε ποτά ή ζυμαρικά, μεταξύ άλλων (Giuffrida et al., 2020; Cheng et al., 2020) είτε έμμεσα, μέσω της προσθήκης τους στη διατροφή των ζώων για τη βελτίωση της χρώσης των προϊόντων που παράγουν όπως τα αυγά ή ακόμα και την σάρκα των ψαριών (Breithaupt, 2007; Liu et al., 2012; Moreno et al., 2020). Επιπλέον, τα καροτενοειδή έχουν επισημανθεί ως πολλά υποσχόμενα συστατικά σε ενεργές μεμβράνες συσκευασίας. Η συμπερίληψή τους σε προστατευτικές μεμβράνες μπορεί να βελτιώσει τον χρόνο αποθήκευσης, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής του προϊόντος, αλλά και να προσδώσει κάποιες από τις ιδιότητες των καροτενοειδών (π.χ. αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας) στο τελικό προϊόν (Xu et al., 2020; Stoll et al., 2019).

Μία από τις κύριες βιομηχανίες όπου έχουν εφαρμοστεί τα καροτενοειδή είναι οι υδατοκαλλιέργειες. Τα εργοστάσια ψαριών χρησιμοποιούν χρωστικές ουσίες όπως το β-καροτένιο που είναι σημαντική πηγή προβιταμίνης Α, ενώ έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα και το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, ενισχύοντας την ανάπτυξη τους και αποτρέποντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων

(Hassaan et al., 2021). Άλλη βιομηχανία όπου χρησιμοποιούνται ευρέως οι χρωστικές ουσίες είναι τα πουλερικά. Η ΕΕ ενέκρινε χρωματισμούς κρόκου αυγού και ιστών πουλερικών με καροτενοειδή κίτρινου και κόκκινου χρώματος, συμπεριλαμβανομένης της λουτεΐνης, της ζεαξανθίνης, της β-κρυπτοξανθίνης, της βιολακανθίνης και της καψανθίνης (Grashorn et al., 2016). Τα καροτενοειδή μπορούν επίσης να ενσωματωθούν σε υλικά συσκευασίας για τη βελτίωση της συντήρησης των τροφίμων. Τα καροτενοειδή όπως το λυκοπένιο ή το β-καροτένιο αποτρέπουν τις χρωματικές αλλοιώσεις λόγω διεργασιών οξείδωσης και βλαβών που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία, παρέχοντας σταθερότητα στα πολυμερή συσκευασίας (Stoll et al., 2019). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι οι χρωστικές μπορούν να μεταφερθούν από την ενεργή συσκευασία στα τρόφιμα, μεταφέροντας έτσι τις ευεργετικές τους ιδιότητες.

Το μέγεθος της παγκόσμιας αγοράς των καροτενοειδών υπολογίστηκε σε 1,21 δισεκατομμύρια δολάρια το 2015 και αναμένεται να σημειώσει σημαντική αύξηση λόγω της αυξανόμενης χρήσης τους σε πολλούς και διαφορετικούς βιομηχανικούς τομείς (Grand View Research, 2015). Η αυξημένη τάση για κατανάλωση υγιεινών και φυσικά παραγομένων τροφίμων μαζί με την κατανάλωση συμπληρωμάτων λόγω προβλημάτων υγείας είναι πιθανό να ενισχύσει την ανάπτυξη.



Εικόνα 1.3: Έσοδα της αγοράς καροτενοειδών των ΗΠΑ, ανά κατηγορία, 2014 - 2025 (σε USD). (Grand View Research, 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

2.1 Γενικά

2.1.1 Εισαγωγή στην ενθυλάκωση

Οι διεργασίες της ενθυλάκωσης αναπτυχθήκαν πριν από περίπου 50 χρόνια. Τα ενθυλακωμένα προϊόντα βρήκαν άμεσα πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, ειδικά όσον αφορά ευαίσθητες ουσίες όπως χρωστικές, αρωματικές ενώσεις, βιταμίνες και άλλα ευαίσθητα συστατικά τροφίμων προκειμένου να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής τους (Ray et al., 2016). Περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση συστατικών τροφίμων, ενζύμων, κυττάρων ή άλλων υλικών (δραστικές ουσίες) σε μια άλλη ουσία (υλικό τοιχώματος). Το αποτέλεσμα είναι η ελεγχόμενη παραγωγή σωματιδίων στην κλίμακα του νανομέτρου (νανο-ενθυλάκωση), του μικρομέτρου (μικρο-ενθυλάκωση) ή των χιλιοστών.

Η ενθυλακωμένη ουσία, εκτός από δραστική, μπορεί να ονομαστεί ως φάση βασική, ενεργή, εσωτερική, ωφέλιμη και πλήρωσης. Η ουσία που ενθυλακώνει ονομάζεται επικαλυπτόμενη, κέλυφος, μεμβράνη, κάψουλα, υλικό μεταφοράς, εξωτερική φάση ή μήτρα (Wandrey et al., 2009; Fang & Bhandari, 2010). Η τεχνολογία ενθυλάκωσης έχει χρησιμοποιηθεί στον τομέα των τροφίμων για την παροχή υγρών και στερεών συστατικών ως αποτελεσματικό φράγμα έναντι περιβαλλοντικών παραμέτρων όπως το οξυγόνο, το φως, οι ελεύθερες ρίζες κ.λπ. (Desai & Park, 2005). Οι βιοδραστικές ουσίες μπορούν να προστατευτούν με την τεχνική ενθυλάκωσης όταν εγκλωβίζονται μέσα σε ένα υλικό τοιχώματος (Saenz et al., 2009).

Οι βιοδραστικές ουσίες διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος, την πολικότητα, τη διαλυτότητα κ.λπ. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι πρέπει να εφαρμοστούν διαφορετικές στρατηγικές ενθυλάκωσης προκειμένου να ικανοποιηθούν οι συγκεκριμένες μοριακές και φυσικοχημικές απαιτήσεις (Augustin and Hemar, 2009; Kailasapathy, 2002). Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό του υλικού τοιχώματος πρέπει να είναι κατάλληλα για τρόφιμα, να είναι βιοδιασπώμενα και ικανά να σχηματίζουν φράγμα μεταξύ της εσωτερικής φάσης και του εκάστοτε περιβάλλοντος χώρου. Μεταξύ των κατάλληλων υλικών, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα για ενθυλάκωση σε εφαρμογές τροφίμων είναι οι πολυσακχαρίτες

(Ray et al., 2016). Οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια χαρακτηρίζονται επίσης κατάλληλα για ενθυλάκωση. Οι εφαρμογές της, εκτός από τον τομέα των τροφίμων, λαμβάνουν χώρα και στη γεωργία, τη φαρμακοβιομηχανία, τη βιοτεχνολογία και τη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας. Η ξήρανση με ψεκασμό είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική ενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων επειδή είναι ευέλικτη, λειτουργική αλλά και οικονομική (Ray et al., 2016).

Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της ενθυλάκωσης. Για παράδειγμα, αυτή η τεχνολογία μπορεί να παρέχει προστατευτικό φράγμα μεταξύ των ευαίσθητων βιοενεργών υλικών και του περιβάλλοντος, και έτσι, να επιτρέπει τη διαφοροποίηση της γεύσης και του αρώματος, να καλύπτει την δυσάρεστη γεύση ή οσμή, να σταθεροποιεί τα συστατικά των τροφίμων ή να αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Ένας από τους σημαντικότερους λόγους για την ενθυλάκωση των δραστικών συστατικών είναι η παροχή βελτιωμένης σταθερότητας στα τελικά προϊόντα και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Επιπλέον, η ενθυλάκωση χρησιμοποιείται για να καλύψει κάποια δυσάρεστη γεύση κατά την κατανάλωση του φαγητού, όπως η πικρή γεύση και η στυπτικότητα των πολυφαινόλων. Επιπρόσθετα, η ενθυλάκωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση κυττάρων ή ενζύμων σε εφαρμογές επεξεργασίας τροφίμων, όπως διαδικασία της ζύμωσης ή κάποια άλλη διαδικασία παραγωγής μεταβολιτών. Υπάρχει μια αυξανόμενη ζήτηση για εξεύρεση κατάλληλων λύσεων που παρέχουν υψηλή παραγωγικότητα με ταυτόχρονη, επαρκή ποιότητα στα τελικά διατροφικά προϊόντα (Nedovic et al., 2011).

2.1.2 Υλικά τοιχώματος

Η επιλογή της μεθόδου μικροενθυλάκωσης και των υλικών τοιχώματος είναι λίαν σημαντική. Με βάση το υλικό επιλέγεται και η μέθοδος. Τα υλικά τοιχώματος, μπορούν να επιλεγθούν από μια μεγάλη ποικιλία φυσικών ή συνθετικών πολυμερών, ανάλογα με το υλικό που πρόκειται να ενθυλακωθεί και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στις τελικές μικροκάψουλες. Η σύνθεση του υλικού τοιχώματος είναι βασικότερος παράγοντας για τις λειτουργικές ιδιότητες της μικροκάψουλας καθώς και για την χρησιμότητα της στη βελτίωση της απόδοσης του ενθυλακωμένου συστατικού. Ένα υλικό τοιχώματος για να χαρακτηριστεί ιδανικό πρέπει να πληροί τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

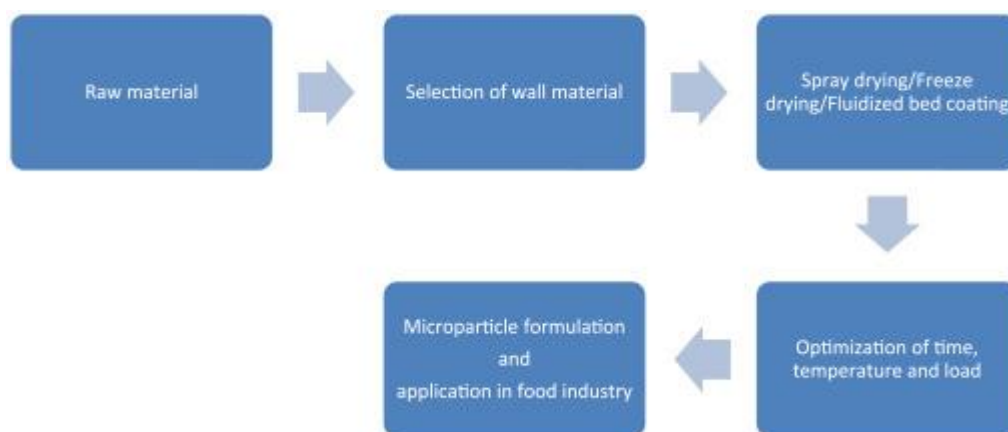
- Να έχει καλές ρεολογικές ιδιότητες σε υψηλές συγκεντρώσεις και να είναι εύχρηστο κατά την ενθυλάκωση.
- Να έχει την ικανότητα να διασκορπίζει ή να γαλακτοματοποιεί την δραστική ουσία και να σταθεροποιεί το παραγόμενο γαλάκτωμα.
- Να μην αντιδρά με την ουσία που θα εγκλωβιστεί τόσο κατά την επεξεργασία όσο και κατά την παρατεταμένη αποθήκευση.
- Να έχει την ικανότητα να συγκρατεί την δραστική ουσία εντός της δομής του κατά την επεξεργασία ή την αποθήκευση.
- Να μπορεί να ελευθερώνει πλήρως τον διαλύτη ή άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της ενθυλάκωσης υπό ξήρανση ή άλλες συνθήκες αποδιαλυτοποίησης.
- Να παρέχει απόλυτη προστασία στην δραστική ουσία από περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. οξυγόνο, θερμότητα, φως, υγρασία).
- Να είναι διαλυτό σε αποδεκτούς από τη βιομηχανία τροφίμων διαλύτες (π.χ. νερό, αιθανόλη).
- Να είναι χημικά αδρανές με τα ενεργά υλικά του πυρήνα.
- Να είναι φθηνό και να έχει τις προδιαγραφές για να χρησιμοποιείται στον τομέα των τροφίμων.

Επειδή κανένα υλικό επικάλυψης δεν μπορεί πρακτικά να πληροί όλα τα κριτήρια που αναφέρονται παραπάνω, χρησιμοποιούνται υλικά επικάλυψης σε συνδυασμούς είτε προστίθενται τροποποιητές όπως σαρωτές οξυγόνου, αντιοξειδωτικά, χηλικοί παράγοντες και επιφανειοδραστικές ουσίες. Ταυτόχρονα εξετάζονται χημικές τροποποιήσεις των υπαρχόντων υλικών επικάλυψης για τον χειρισμό των ιδιοτήτων τους. Τα τροποποιημένα υλικά επικάλυψης που προκύπτουν παρουσιάζουν καλύτερες φυσικές και μηχανικές ιδιότητες σε σύγκριση με μεμονωμένα υλικά επικάλυψης (Desai & Jin Park, 2005).

2.1.3 Διαδικασία ενθυλάκωσης

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες τεχνικές για την ενθυλάκωση ενώσεων με εφαρμογή στα τρόφιμα. Παρόλο που έχουν αναφερθεί πολλές διαδικασίες ενθυλάκωσης, καμία από αυτές δεν μπορεί θεωρείται πανάκεια για όλα τα βιοενεργά συστατικά τροφίμων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το κάθε συστατικό έχει τη δική

του χαρακτηριστική μοριακή δομή (Augustin & Hemar, 2009). Δεδομένου ότι οι ενώσεις ενθυλάκωσης είναι πολύ συχνά σε υγρή μορφή, πολλές τεχνολογίες βασίζονται στην ξήρανση. Διαφορετικές τεχνικές όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η επίστρωση με ρευστοποιημένη κλίνη και η ξήρανση με ψύξη είναι η πλέον χρησιμοποιούμενες βιοενεργών συστατικών (Zuidam & Heinrich, 2009). Μια απλοποιημένη διαδικασία ενθυλάκωσης με τεχνολογία ξήρανσης παρουσιάζεται στην εικόνα 2.1.



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας ενθυλάκωσης με τεχνολογία ξήρανσης (Sohini et al., 2016).

2.1.4 Μέθοδοι ελεγχόμενης απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας

Η μικροενθυλάκωση θεωρείται αποτελεσματική μόνο εάν η δραστική ουσία προστατεύεται μέχρι την στιγμή της απελευθέρωσή της. Για τον σκοπό αυτό (την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας) υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί. Αυτοί περιλαμβάνουν την αποδόμηση, τη διάχυση, τη διάλυση, την εφαρμογή πίεσης και την αλλαγή της θερμοκρασίας και του pH (Choudhury et al., 2021). Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται βασίζονται στις ιδιότητες της δραστικής ουσίας και του υλικού του τοιχώματος. Ακολουθούν μερικοί από τους μηχανισμούς (Choudhury et al., 2021):

- *Διάχυση*: Η διάχυση της δραστικής ουσίας συμβαίνει συνήθως όταν το τοίχωμα της μικροκάψουλας είναι άθικτο και ένα ρευστό διεισδύει μέσα από το τοίχωμα, διαλύεται μέσα σε αυτό και η δραστική ουσία διασκορπίζεται έξω μέσω των πόρων.

- *Διάλυση*: Εδώ η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας εξαρτάται από τη διαλυτότητα του υλικού του τοιχώματος στο ρευστό διάλυσης. Αναλυτικότερα, το υλικό τοιχώματος χάνει την ικανότητα του να είναι άθικτο όταν έρχεται σε επαφή με το ρευστό με αποτέλεσμα να διαλυτοποιείται και να απελευθερώνει τη δραστική ουσία. Ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται από τις ιδιότητες του υλικού του τοιχώματος, κυρίως το πάχος, και του ρευστού διαλύσης.
- *Ωσμωση*: Κατά την οσμωτική απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, το τοίχωμα της μικροκάψουλας συμπεριφέρεται ως ημιπερατή μεμβράνη, η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη διαφορετικής ωσμωτικής πίεσης για κάθε πλευρά του τοιχώματος. Λόγω αυτής της διαφοράς πίεσης, η δραστική ουσία μετακινείται από το εσωτερικό της κάψουλας προς το εξωτερικό.
- *Αποδόμηση*: Σε αυτή τη μέθοδο απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας, ένζυμα όπως οι πρωτεάσες και οι λιπάσες, χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων στο υλικό του τοιχώματος, με αποτέλεσμα να σπάσει και να απελευθερωθεί η δραστική ουσία.
- *Αλλαγή στο pH*: Η αλλαγή στο pH μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, καθώς μπορεί να επηρεάσει το υλικό του τοιχώματος, το οποίο ενώ μπορεί να παραμένει ανέπαφο υπό όξινες συνθήκες. Ωστόσο, αύξηση του αν pH μέχρις ότου προκύψουν αλκαλικές συνθήκες, οδηγεί σε διαλυτοποίηση του υλικού τοιχώματος και απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας.
- *Μεταβολές θερμοκρασίας*: Η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας μπορεί να προαχθεί αλλάζοντας τη θερμοκρασία, στην οποία εκτίθενται οι μικροκάψουλες. Για την απελευθέρωση του πυρήνα με τη μεσολάβηση της θερμοκρασίας, εμπλέκονται δύο διαφορετικοί μηχανισμοί:
 - (α) Ο ένας ονομάζεται θερμοευαίσθητη απελευθέρωση, όπου το υλικό του τοιχώματος καταρρέει όταν εκτίθεται σε μια θερμοκρασία, που ονομάζεται κρίσιμη, πέρα από την οποία δεν μπορεί να αντέξει και διαστέλλεται.
 - (β) Ο άλλος μηχανισμός ονομάζεται απελευθέρωση ενεργοποιημένης αντίδρασης, στον οποίο το υλικό του τοιχώματος αρχίζει να λιώνει όταν εκτίθεται σε αυξημένη θερμοκρασία και, ως εκ τούτου, απελευθερώνει την δραστική ουσία.

2.1.5 Καινοτομίες στην μικροενθυλάκωση των τροφίμων

Η μικροενθυλάκωση ήταν μια καινοτόμος τεχνολογία όταν αναπτύχθηκε για πρώτη φορά. Ωστόσο, παρόλο που σήμερα είναι ευρέως διαδεδομένη σε διαφορετικούς κλάδους, υπάρχει ακόμα χώρος για καινοτομία (Gaonkar et al., 2014). Αυτό που επιδιώκουν οι ερευνητές για την βιομηχανία των τροφίμων είναι η ανάπτυξη νέων τεχνικών μικροενθυλάκωσης καθώς και υλικών (Vimala et al., 2018).

Ενώ οι καινοτομίες στα υλικά είναι πιο δύσκολο να επιτευχθούν στη βιομηχανία τροφίμων λόγω κανονιστικών περιορισμών, υπάρχουν διαφορετικά συστατικά τροφίμων που μπορούν να υποστούν επεξεργασία και να χρησιμοποιηθούν για την ενθυλάκωση άλλων συστατικών τροφίμων ή και βιοδραστικών ενώσεων (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015). Για παράδειγμα, η ένωση του κυτταρικού τοιχώματος του *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε ως νέο υλικό τοιχώματος για την ενθυλάκωση προβιοτικών και πρόσφερε προστατευτικές ιδιότητες και αντίσταση έναντι προσομοιωμένων γαστρεντερικών καταστάσεων (Mokhtari et al., 2017). Επιπλέον, ένα νέο σύμπλοκο εγκλεισμού αμυλόζης χρησιμοποιήθηκε ως αποτελεσματικό σύστημα ενθυλάκωσης για το β-καροτένιο, το οποίο ήταν σε θέση να βελτιώσει τη σταθερότητά του σε σύγκριση με φυσικά μείγματα (Kong et al., 2018). Εκτός από τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία τροφίμων, μπορούν να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν εύκολα στην ενεργή συσκευασία τροφίμων, νέα υλικά τοιχώματος από πολυμερή, με λιγότερα ρυθμιστικά εμπόδια. Για παράδειγμα, η καρβακρόλη μικροενθυλακώθηκε με β-κυκλοδεξτρίνη και ενσωματώθηκε σε μεμβράνες αλγινικού νατρίου, που χρησιμοποιήθηκαν ως υλικό συσκευασίας τροφίμων. Αυτές οι μεμβράνες ήταν αποτελεσματικές στη βελτίωση της σταθερότητας των συσκευασμένων συστατικών καθώς και της αντιμυκητιακής δράσης (Cheng et al., 2019).

Εκτός από τη χρήση της μικροενθυλάκωσης ως εργαλείο για νέες εφαρμογές στην συσκευασία τροφίμων, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός καινοτομιών που σχετίζεται με την εφαρμογή νέων τεχνικών μικροενθυλάκωσης. Παρόλο που έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές και προσφέρουν εξαιρετικά αποτελέσματα σε κλίμακα R&D, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες (οικονομικοί λόγοι, δυνατότητα επέκτασης) που θα καθορίσουν εάν αυτές οι τεχνικές θα υιοθετηθούν από τη βιομηχανία τροφίμων με την πάροδο του χρόνου (Gaonkar et al., 2014). Μια καινοτόμος τεχνική

που έχει προοπτικές να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα είναι η ηλεκτροϋδροδυναμική εξαέρωση. Τα χαρακτηριστικά που την κάνουν να ξεχωρίζει είναι η αναπαραγωγιμότητα, η βιωσιμότητα και η επεκτασιμότητα της (Sverdlov, 2018).

2.2 Μέθοδοι ενθυλάκωσης

2.2.1 Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μια τεχνική στην οποία, ένα διάλυμα τροφοδοσίας, το οποίο είναι ένα μείγμα του υλικού προς ενθυλάκωση και του υλικού του τοιχώματος, ψεκάζεται μέσα σε ένα θάλαμο μέχρι να σχηματιστεί ομίχλη. Κατόπιν η ομίχλη μετατρέπεται σε σκόνη με εφαρμογή ζεστού αέρα. Ανάλογα με διαφορετικούς παράγοντες όπως τα χαρακτηριστικά του διαλύματος τροφοδοσίας και τις συνθήκες λειτουργίας, μπορεί να παραχθεί σκόνη με διαφορετικό μέγεθος σωματίων. Το τελικό αποτέλεσμα της μεθόδου είναι το υλικό που μας ενδιαφέρει να παγιδευτεί στην αποξηραμένη σκόνη. Μερικά από τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου:

- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαφορετικούς παράγοντες ενθυλάκωσης.
- Είναι οικονομική και ευέλικτη μέθοδος.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλούς διαφορετικούς τύπους υλικών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με μεγάλη κλίμακα.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει επιτυχή εφαρμογή αυτής της τεχνικής στην ενθυλάκωση. Η ελαιορητήνη κάρδαμου ενθυλακώθηκε μέσα σε ένα μείγμα μαλτοδεξτρίνης, από τροποποιημένο αμύλο και αραβικό κόμμι χρησιμοποιώντας ξήρανση με ψεκασμό και τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη προστασία των ελαιορητινών (Krishnan et al., 2005). Μια άλλη έρευνα ανέφερε επιτυχή ενθυλάκωση της γεύσης σουμάκ σε χλωριούχο νάτριο χρησιμοποιώντας ξήρανση με ψεκασμό (Bayram et al., 2005).

Αν και η ξήρανση με ψεκασμό είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για μικροενθυλάκωση με πολλά τεκμηριωμένα πλεονεκτήματα, ορισμένες μελέτες έχουν εντοπίσει ορισμένα μειονεκτήματα. Για

παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι όταν ο ζεστός αέρας χρησιμοποιείται ως μέσο ξήρανσης για την ενθυλάκωση των ω-3 λιπαρών οξέων, η αποξηραμένη σκόνη έχει σωματίδια με εξαιρετικά πορώδη δομή, καθιστώντας την πιο επιρρεπή στην οξείδωση, μειώνοντας τη διάρκεια ζωής της (Fang et al., 2006). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τον Kolanowski το 2005, κατά την παρασκευή σκόνης ψεκασμού με αποξηραμένο ιχθυελαίου. Έτσι, μπορεί να ειπωθεί ότι η ξήρανση με ψεκασμό μπορεί να είναι αποτελεσματική μέθοδος ενθυλάκωσης ανάλογα με το είδος στο οποίο εφαρμόζεται.

2.2.2 Ψύξη με ψεκασμό (Spray cooling)

Η μέθοδος ενθυλάκωσης με χρήση ψύξης με ψεκασμό είναι πολύ παρόμοια με την ξήρανση με ψεκασμό στην εφαρμογή της. Ουσιαστικά η ειδοποιός διαφορά της είναι η χρήση κρύου αέρα σε αυτήν. Σε αυτή την περίπτωση το διάλυμα τροφοδοσίας, το μείγμα υλικού ενθυλάκωσης και το υλικό τοιχώματος ψεκάζονται για να σχηματιστεί μια ομίχλη μέσα σε έναν θάλαμο, στον οποίο ρέει κρύος αέρας. Η χαμηλή θερμοκρασία εντός του θαλάμου έχει ως αποτέλεσμα τη στερεοποίηση των μικροσταγονιδίων, οδηγώντας στο σχηματισμό της μικροενθυλακωμένης σκόνης. Αυτή η τεχνική έχει επίσης τεράστιες δυνατότητες. Μερικές επιτυχημένες εφαρμογές αυτής της τεχνικής ενθυλάκωσης περιλαμβάνουν την μικροενθυλάκωση τοκοφερολών εντός λιπιδικής μήτρας, με αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης έως και 90% (Gamboa et al., 2011), καθώς και την ενθυλάκωση σιδήρου, ιωδίου και βιταμίνης Α σε υδρογονωμένο φοινικέλαιο για ενίσχυση του αλατιού, όπου οι μικροκάψουλες που σχηματίστηκαν ήταν εξαιρετικά σταθερές (Wegmüller et al., 2006).

Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει επίσης ορισμένα τεκμηριωμένα μειονεκτήματα. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροκάψουλες που σχηματίζονται με την τεχνική ψύξης με ψεκασμό δεν είναι πολύ σταθερές και αυτό οδηγεί σε αποβολή του υλικού προς ενθυλάκωση κατά την αποθήκευση (Jenning et al., 2000, Müller et al., 2002).

2.2.3 Διαχωρισμός φάσεων (Coacervation)

Ο διαχωρισμός φάσεων είναι μια απλή τεχνική που αφορά το σχηματισμό ενός ομοιογενούς στρώματος, του πολυμερούς υλικού του τοιχώματος, γύρω από το υλικό προς ενθυλάκωση. Αυτό επιτυγχάνεται αλλάζοντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού του τοιχώματος με μεταβολή της θερμοκρασίας, του pH ή της ιοντικής ισχύος. Εδώ, το υλικό προς ενθυλάκωση και το υλικό του τοιχώματος αναμιγνύονται έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα μη αναμίξιμο διάλυμα. Στη συνέχεια, ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιείται αλλάζοντας την ιοντική ισχύ, το pH ή τη θερμοκρασία για να σχηματιστούν συσσωρευτές, οι οποίοι είναι μικροσκοπικά υγρά σταγονίδια, που αποτελούνται από πολυμερή σε πυκνή μορφή. Στη συνέχεια οι συσσωρευτές περιβάλλουν το υποψήφιο υλικό, σχηματίζοντας τις μικροκάψουλες. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο υδατικών μέσων είναι υπεύθυνη για τη μετάβαση από υγρό σε ζελατινοειδές (ιοντική ζελατινοποίηση) και κατά συνέπεια των σχηματισμό συσσωρευτών. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται βασικά για την ενθυλάκωση υδρόφιλων μορίων. Η δημιουργία συσσωματώματος που περιλαμβάνει μόνο ένα πολυμερές υλικό ονομάζεται απλός διαχωρισμός φάσεων (simple coacervation) (Choudhury et al., 2021). Ένα παράδειγμα τέτοιου πολυμερούς μπορεί να είναι το αλγινικό νάτριο. Αναλυτικότερα, το αλγινικό νάτριο διαλύεται σε νερό και η δραστική ένωση που χρειάζεται να ενθυλακωθεί, η οποία συνήθως αφορά κάποιο έλαιο, αναμιγνύεται σε αυτό και το γαλάκτωμα που σχηματίζεται απελευθερώνεται σε σταγόνες σε ένα μέσο, όπως το χλωριούχο ασβέστιο, μέχρις ότου να σχηματιστεί γέλη. Η ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ αλγινικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου οδηγεί στον σχηματισμό αδιάλυτων πολυμερών, αλγινικού ασβεστίου (Choudhury et al., 2021). Έχουν αναφερθεί αρκετές μελέτες με επιτυχή εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής μικροενθυλάκωσης. Το γλυκό πορτοκαλέλαιο ενθυλακώθηκε με αυτή τη μέθοδο, με πρωτεΐνης σόγιας (SPI) ως υλικό τοιχώματος (Jun-xia et al., 2011). Σε περίπτωση που η τεχνική περιλαμβάνει περισσότερα από ένα πολυμερή, χαρακτηρίζεται σύνθετος διαχωρισμός φάσεων (complex coacervation) (Choudhury et al., 2021). Ένα συνηθισμένο παράδειγμα σύνθετης συσσωμάτωσης περιλαμβάνει πολυμερή, ζελατίνη και αλγινικά. Η ζελατίνη διαλυτοποιείται σε νερό σε όξινο pH για να ληφθούν θετικά φορτία και τα αλγινικά σε νερό σε βασικό pH για να ληφθούν αρνητικά φορτία. Η δραστική ένωση που πρόκειται να ενθυλακωθεί αναμειγνύεται στο αλγινικό διάλυμα και ομογενοποιείται κατάλληλα. Το αλγινικό διάλυμα στη συνέχεια αναμιγνύεται εντατικά με το διάλυμα ζελατίνης και η θερμοκρασία αυξάνεται μέχρι να ξεκινήσει η χημική αντίδραση μεταξύ τους. Η δραστική ένωση

εγκλωβίζεται με το σχηματισμό πολυκατιονικού-πολυανιονικού αδιάλυτου πολυμερούς γύρω της. Οι Liu et al. (2010), πραγματοποίησαν ενθυλάκωση για τη σταθεροποίηση του λινελαίου με τη μέθοδο του σύνθετου διαχωρισμού φάσεων. Εδώ, τα αντίθετα φορτισμένα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν ως υλικά τοιχώματος ήταν η ζελατίνη και το αραβικό κόμμι. Εναπόθεση αυτών των υλικών επικάλυψης γύρω από τον πυρήνα ξεκίνησε με αλλαγή του pH του μέσου. Ωστόσο, η χρήση αυτής της μεθόδου είναι περιορισμένη καθώς λειτουργεί καλύτερα σε συγκεκριμένο εύρος τιμών pH και με ορισμένα διαλύματα ηλεκτρολυτών και κολλοειδών (Choudhury et al., 2021).

2.2.4 Επίστρωση σε ρευστοποιημένη κλίνη (Fluidized bed coating)

Η επίστρωση ρευστοποιημένης κλίνης είναι μια μέθοδος ενθυλάκωσης στην οποία το υποψήφιο υλικό ρευστοποιείται μέσω του αέρος και στην συνέχεια ψεκάζεται με ένα υλικό επίστρωσης. Διαφορετικές μέθοδοι επίστρωσης ρευστοποιημένης κλίνης είναι: (α) ψεκασμός από πάνω (β) ψεκασμός από κάτω και (γ) εφαπτομενικός ψεκασμός. Σε αυτή τη μέθοδο ενθυλάκωσης, η απόδοση επίστρωσης του υλικού τοιχώματος εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους όπως ο ρυθμός τροφοδοσίας του υλικού τοιχώματος, η πίεση ψεκασμού του ακροφυσίου, η θερμοκρασία και η ταχύτητα του αέρα εισόδου κ.λπ. Οι Coronel-Aguilera και San Martín-González (2015) ενθυλάκωσαν το β-καροτένιο, αφού πρότερα είχε υποστεί ξήρανση με ψεκασμό, με υδροξυπροπυλική κυτταρίνη χρησιμοποιώντας την μέθοδο επίστρωσης σε ρευστοποιημένη κλίνη. Εδώ, η θερμοκρασία και ο ρυθμός τροφοδοσίας της υδροξυπροπυλοκυτταρίνης μεταβλήθηκαν για να καθοριστεί πώς οι εν λόγω παράγοντες επηρέασαν την ικανότητα σχηματισμού φιλμ του υλικού επικάλυψης και, ως εκ τούτου, τη σταθερότητα του β-καροτενίου κατά την αποθήκευση.

2.2.5 Εξώθηση (Extrusion)

Η τεχνολογία εξώθησης ως μέθοδος μικροενθυλάκωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μικροκαψουλών υψηλής πυκνότητας. Για την εφαρμογή της είναι απαραίτητο, η βιοδραστική ουσία και το υλικό τοιχώματος να μην είναι αναμίξιμα. Στην συνέχεια, τα υλικά περνούν με τέτοιο τρόπο ώστε το υλικό του τοιχώματος να περιβάλλει την ουσία και να περνούν μέσω ομόκεντρων

ακροφυσίων, σχηματίζοντας έτσι σταγονίδια με την ουσία πλέον ενθυλακωμένη. Στη συνέχεια η στερεοποίηση γίνεται είτε με ψύξη είτε χρησιμοποιώντας κατάλληλο λουτρό πηκτωματοποίησης όπου τα σταγονίδια πέφτουν και στερεοποιούνται λόγω του σχηματισμού συμπλόκου. Τα ενθυλακώματα που σχηματίζονται χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο είναι σχετικά μεγαλύτερα σε μέγεθος από αυτά που σχηματίζονται χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε άλλη μέθοδο. Επιπρόσθετα, αυτή η τεχνολογία είναι χρήσιμη για περιορισμένο αριθμό υλικών τοιχώματος (Choudhury et al., 2021).

2.2.6 Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)

Η ενθυλάκωση με εφαρμογή της μεθόδου γαλακτωματοποίησης γίνεται με διασπορά του βιοδραστικού παράγοντα σε οργανικό διαλύτη που περιέχει το υλικό τοιχώματος. Το διασπαρμένο υλικό στη συνέχεια γαλακτωματοποιείται στο λάδι ή στο νερό και προστίθεται σταθεροποιητής γαλακτώματος. Η ενθυλάκωση του βιοδραστικού παράγοντα γίνεται με το σχηματισμό ενός συμπαγούς πολυμερούς στρώματος γύρω του, με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Αυτή είναι μια από τις συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές ενθυλάκωσης καθώς οι διαδικασίες που εμπλέκονται είναι πολύ απλές ενώ χρησιμοποιείται ευρέως για την ενθυλάκωση ενζύμων και μικροοργανισμών. Οι Song et al. (2013) μελέτησαν την ενθυλάκωση προβιοτικών σε αλγινική-χιτοζάνη με τη χρήση της μεθόδου γαλακτωματοποίησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν καλύτερη αντοχή των προβιοτικών υπό γαστρεντερικές συνθήκες.

2.2.7 Ενσωμάτωση σε κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrin inclusion)

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες, ικανοί να σχηματίζουν συμπλέγματα εγκλεισμού με πολλές οργανικές ενώσεις. Διαθέτουν εσωτερικά μη πολική κοιλότητα και υδροξυλομάδες στην επιφάνεια. Ο σχηματισμός συμπλοκών εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών με υδρόφοβες ενώσεις λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια της πρώτης λόγω της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης μεταξύ της επιφάνειας της κυκλοδεξτρίνης και των συμμετεχόντων ενώσεων. Υπάρχουν ωστόσο και άλλες δυνάμεις, όπως οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και οι δυνάμεις van der Waals, που θα μπορούσαν επίσης να εμπλέκονται στο σχηματισμό των συμπλεγμάτων

(Rakmai et al., 2018). Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη λήψη συμπλεγμάτων εγκλεισμού με κυκλοδεξτρίνη. Μερικές από αυτές είναι:

(α) *Μέθοδος συγκαταβύθισης*: αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τις μη υδατοδιαλυτές ουσίες. Σε αυτή τη μέθοδο, η ένωση που θα ενθυλακωθεί διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες όπως βενζόλιο, χλωροφόρμιο, διαιθυλαιθέρας, κ.λπ. και στο διάλυμα που προκύπτει, η κυκλοδεξτρίνη, η οποία έχει διαλυθεί σε νερό, προστίθεται σε κατάλληλη ποσότητα με κατάλληλη ανάδευση. Το διάλυμα στη συνέχεια ψύχεται, έτσι ώστε να γίνει η λήψη των σύνθετων κρυστάλλων. Τέλος, οι κρύσταλλοι πλένονται με από οργανικό διαλύτη και ξηραίνονται.

(β) *Ξήρανση με κατάψυξη ή λυοφιλίωση*: αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για θερμοευαίσθητες ενώσεις. Η κατάλληλη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης και η υποψήφια για ενθυλάκωση ουσία διαλύονται σε νερό με κατάλληλη ανάδευση. Το διάλυμα στη συνέχεια ξηραίνεται με ψύξη και η σκόνη που λαμβάνεται πλένεται με έναν οργανικό διαλύτη και ξηραίνεται υπό κενό.

(γ) *Ξήρανση με ψεκασμό*: αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται μόνο για τα θερμοσταθερά μόρια. Η κυκλοδεξτρίνη και η ένωση που πρόκειται να ενθυλακωθεί διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει υπόκειται έπειτα σε ξήρανση σε στεγνωτήριο ψεκασμού.

Σε πολλές εφαρμογές που σχετίζονται με τα τρόφιμα, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση γευστικών ενώσεων, καθώς παρέχουν καλύτερη συγκράτηση, προστασία και ενισχύουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση. Οι Furuta et al. (2008) εξήγησαν λεπτομερώς την παγίδευση των γεύσεων των τροφίμων σε κυκλοδεξτρίνες, χρησιμοποιώντας ξήρανση με κατάψυξη και ξήρανση με ψεκασμό. Διαφορετικές τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, (2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη, τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη, τριακετυλική β-κυκλοδεξτρίνη) χρησιμοποιήθηκαν για τη συμπερίληψη αρωμάτων και συγκεκριμένα των d-λιμονένιο, ισοθειοκυανικό αλλύλιο και l-μενθόλη. Η συμπερίληψη των αρωμάτων στην κυκλοδεξτρίνη έγινε με την παρασκευή διαλυμάτων, τα οποία στη συνέχεια ξηράνθηκαν με ψεκασμό ή λυοφιλιώθηκαν. Ανάλογα με τη διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μέσα για την ενθυλάκωση.

2.3 Πλεονεκτήματα ενθυλάκωσης λειτουργικών συστατικών- πλεονεκτήματα ενθυλάκωσης καροτενοειδών.

Η χρήση τεχνικών μικροενθυλάκωσης προσφέρει πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως:

- *Αυξημένη σταθερότητα και συνεπώς αυξημένη διάρκεια ζωής και αποτελεσματικότητα:* Χάρη την προστασία που παρέχει το υλικό τοιχώματος, η δραστική ουσία μπορεί να προστατευτεί από την έκθεση σε επιβλαβείς συνθήκες περιβάλλοντος όπως υγρασία, φως, οξυγόνο, pH και θερμότητα, αποφεύγοντας έτσι την υποβάθμισή της (Aizpurua-Olaizola et al., 2016).
- *Ελεγχόμενη απελευθέρωση:* ανάλογα με την τεχνική μικροενθυλάκωσης και το υλικό τοιχώματος, ο μηχανισμός απελευθέρωσης μπορεί να ενεργοποιηθεί από διαφορετικούς παράγοντες όπως η διάλυση, η θερμοκρασία, η πίεση, το pH και τα ένζυμα (Esser-Kahn et al., 2011). Για να επιτευχθεί ένας συγκεκριμένος μηχανισμός απελευθέρωσης, είναι απαραίτητο να σχεδιαστεί το σύστημα έχοντας με γνώμονα τη στιγμή της απελευθέρωσης. Ανάλογα με το σχεδιασμό του συστήματος, μόλις η μικροκάψουλα εκτεθεί στον παράγοντα ενεργοποίησης, η απελευθέρωση μπορεί να είναι άμεση ή να διατηρηθεί με την πάροδο του χρόνου (Lakkis, 2007). Επιπλέον, η απελευθέρωση μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να συμβεί σε ένα συγκεκριμένο στάδιο επεξεργασίας, αποθήκευσης ή κατανάλωσης, ή ακόμα και σε μια συγκεκριμένη θέση μέσα στο σώμα για μικροκάψουλες που περιέχουν φάρμακα ή δραστικά συστατικά τροφίμων (Anal & Singh 2007).
- *Ευκολία χειρισμού και ακρίβεια:* η μικροενθυλάκωση επιτρέπει βελτιωμένη ικανότητα ροής και χειρισμού των δραστικών συστατικών μειώνοντας την κολλητικότητα, την υγροσκοπικότητα ή τροποποιώντας το σημείο τήξης τους. Μπορεί επίσης να επιτρέψει τη μετατροπή υγρών ουσιών σε ευκολα διαχειρίσιμη ξηρή σκόνη ελεύθερης ροής (Bakry et al., 2016; Frascareli et al., 2012).
- *Συγκράτηση γεύσης, χρώματος και οσμής* (Pimparade et al., 2015; Laokuldilok et al., 2016).
- *Πρόληψη αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών συστατικών μιας φόρμουλας* (Champagne & Fustier, 2007).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει γενική προσέγγιση που να ισχύει για όλα τα σχέδια μικροκάψουλας. Για κάθε δραστική ουσία και την εφαρμογή της απαιτείται συγκεκριμένος σχεδιασμός συστήματος, λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιότητες του υλικού τοιχώματος, τον σκοπό της μικροενθυλάκωσης, τις επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες και τον μηχανισμό απελευθέρωσης, καθώς και τις συνθήκες επεξεργασίας και τις απαιτήσεις αποθήκευσης (Dias et al., 2015). Από την στιγμή που υπάρχουν τόσοι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι απαραίτητο να κατανοούνται πλήρως οι ιδιότητες και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ δραστικής ουσίας και υλικό τοιχώματος για να επιτευχθεί η επιθυμητή απόδοση ενθυλάκωσης (Arenas-Jal et al., 2020).

Όσον αφορά την ενθυλάκωση καροτενοειδών (και άλλων χρωστικών), η στρατηγική της νανο-ενθυλάκωσης ή των νανογαλακτωμάτων, με χρήση σταγονιδίων (μεγέθους 100 nm ή και λιγότερο) μαζί με νερό, χρώμα και γαλακτωματοποιητή μπορεί να αποφέρει πλεονεκτήματα όπως ισχυρότερη κινητική σταθερότητα και αντοχή σε χημικές και φυσικές αλλαγές λόγω μεγαλύτερης επιφάνειας (Gupta et al., 2016; Sen et al., 2019). Υπάρχουν διάφορες μελέτες σχετικά με τη θετική επίδραση των νανογαλακτωμάτων στη σταθερότητα του β-καροτενίου (Yi et al., 2014; Sen et al., 2019). Αν και είναι γνωστό ότι διάφορες νανοδομές προσδίδουν σταθερότητα στα καροτενοειδή, οι ενθυλακωμένες νανοκάψουλες πολυμερών παρουσιάζουν πλεονεκτήματα όπως σταθερότητα κατά την αποθήκευση, υψηλή αποτελεσματικότητα στην ενθυλάκωση και ελεγχόμενη απελευθέρωση του καροτενοειδούς (Dos Santos et al., 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΣΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

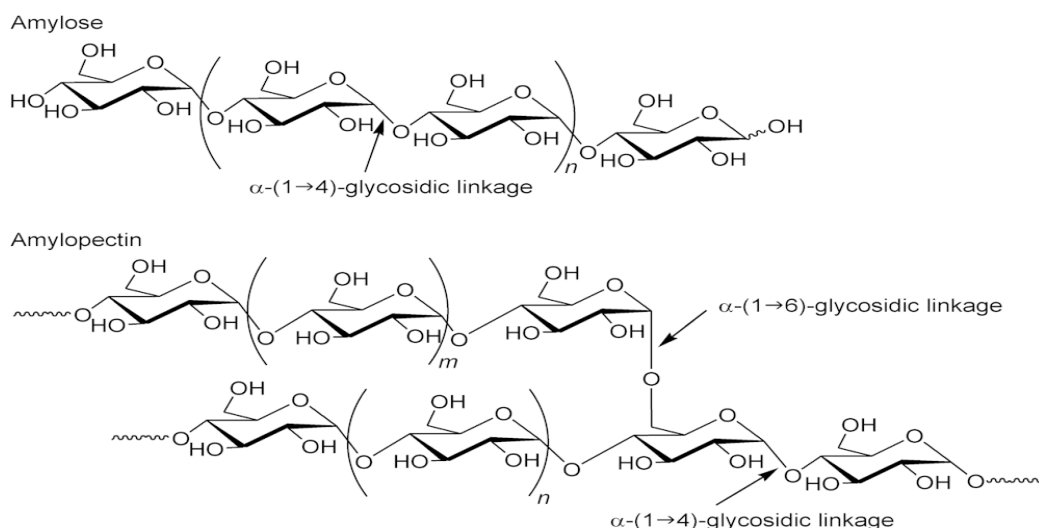
Το επίπεδο απόδοσης και αποτελεσματικότητας της μικροενθυλάκωσης είναι σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση της καταλληλότητας του εκάστοτε υλικού τοιχώματος αντικατοπτρίζοντας τον βαθμό ενσωμάτωσης της βιοδραστικής ουσίας και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη απόδοση μικροενθυλάκωσης, τα υλικά τοιχώματος θα πρέπει να επιλέγονται με βάση τις ειδικές ανάγκες των φυσικών βιοδραστικών ουσιών, όπως οι οργανοληπτικές ιδιότητες, η φυσικοχημική σταθερότητα, η βιοδραστική συγκράτηση, η φόρτωση και η απελευθέρωση (Wei & Huang, 2019). Συνολικά, τα ιδανικά υλικά τοιχώματος πρέπει να έχουν υψηλή διαλυτότητα, χαμηλή υγροσκοπικότητα, αποτελεσματική γαλακτωματοποίηση, ικανότητα κάλυψης γεύσης, σχηματισμό φιλμ και γέλης καθώς και χαμηλό οικονομικό κόστος. Εν τω μεταξύ, τα συμπυκνωμένα διαλύματα πρέπει να έχουν σχετικά χαμηλό ιξώδες για να μπορέσει να γίνει ο ψεκασμός της βιοδραστικής ουσίας και ταυτόχρονα να μην καταστραφεί ή υποβαθμιστεί κατά την διάρκεια του εγκλεισμού της. Γενικά, τα συστήματα τοιχωμάτων μικροενθυλάκωσης μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: υλικά τοιχώματος απλού τύπου (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες ή υδρόφιλα κόμματα) και υλικά τοίχου μικτού τύπου (Wangxing et al., 2021).

Οι υδατάνθρακες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα υλικά τοιχώματος λόγω της υψηλής τους ικανότητας συγκράτησης νερού αλλά και του χαμηλού ιξώδους ακόμα και σε περιπτώσεις που φέρουν υψηλή περιεκτικότητα σε κάποια βιοδραστική ουσία. Παρόλα αυτά οι υδατάνθρακες δεν είναι επιθυμητά υλικά τοιχώματος για υδρόφοβες δραστικές ουσίες λόγω του υψηλού πορώδους και της χαμηλής ικανότητας γαλακτωματοποίησης, που μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε χαμηλή απόδοση μικροενθυλάκωσης και χαμηλή θερμοκρασία μετάπτωσης υάλου. Γενικά, χρειάζεται να τροποποιηθούν χημικώς ή να συνδυαστούν με άλλα υλικά τοιχώματος (πρωτεΐνες ή υδατοδιαλυτά κόμματα) (Wangxing et al., 2021).

3.1 Άμυλο και παράγωγα αμύλου

Το άμυλο είναι ένας ενεργειακός και αποθεματικός πολυσακχαρίτης που βρίσκεται στα λαχανικά με τη μορφή κόκκων. Οι κόκκοι αμύλου σχηματίζονται από τα πολυμερή αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη, με το πρώτο να χαρακτηρίζεται από μια

γραμμική αλυσίδα που αποτελείται από μόρια d-γλυκόζης ενωμένα με α (1 $\rightarrow$ 4) γλυκοζιτικούς δεσμούς και το δεύτερο από μια διακλαδισμένη αλυσίδα από μόρια d-γλυκόζης που ενώνονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς α (1 $\rightarrow$ 4) και α (1 $\rightarrow$ 6), δημιουργώντας σημεία διακλάδωσης. Η αμυλοπηκτίνη είναι υπεύθυνη για τις κρυσταλλικές ζώνες στο φυσικό άμυλο, ενώ η αμυλόζη ευνοεί το σχηματισμό δικτύων αμύλου κατά τη διαδικασία της ζελατινοποίησης (Ribeiro et al., 2021).



Εικόνα 3.1: Δομή αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης.

Τα άμυλα που διατίθενται στο εμπόριο (π.χ. καλαμπόκι, πατάτα, σιτάρι, ρύζι και μανιόκα) έχουν χρησιμοποιηθεί ως υλικά τοιχώματος. Για παράδειγμα, το άμυλο αραβοσίτου έχει χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση βιταμινών (Palma-Rodriguez, et al., 2013), αντιοξειδωτικών, (Deladino et al., 2015, Tonon et al., 2010) χρωστικών, (Spada et al 2012, Loksuwan, 2007) γεύσεων, (Ordoñez, 2014) μικροοργανισμών, αλλά και πρωτεϊνών και φάρμακων (Janaswamy, 2014). Άλλες μη συμβατικές πηγές αμύλου (αμάρανθος, κινόα, pinhão, ταπιόκα, taro, κ.λπ.) έχουν αξιολογηθεί ως προς την ενθυλάκωση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων. Η πολύπλοκη μικροδομή των κόκκων αμύλου με μεσοπορότητα και μικρά ανοίγματα επιτρέπει τη μεταφορά των δραστικών ενώσεων στα εξωτερικά στρώματα ενώ με ένα περαιτέρω προστατευτικό στρώμα (π.χ., χιτοζάνη), οι δραστικές ενώσεις προστατεύονται από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός και οξυγόνου. Μια ιδιαίτερα προστατευτική διάταξη αποτελείται από σφαιρικά συσσωματώματα, τα οποία συντίθενται με τη χρήση υδατικών διαλυμάτων από μικρούς κόκκους αμύλου (Javier et al., 2017). Η γεωμετρία των μικρών κόκκων αμύλου επιτρέπει τη συμπαγή συσκευασία, δημιουργώντας μια δομή που προσφέρει μέγιστη κατακράτηση των

δραστικών ενώσεων καθώς και περιορισμό επιπτώσεων όπως το σπάσιμο κατά την επεξεργασία. Η χρήση σφαιρικών αδρανών με βάση το άμυλο ως προστατευτικές δομές αυξάνεται τα τελευταία χρόνια, κυρίως στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων.

Το φυσικό άμυλο χρησιμοποιείται συνήθως σε μικροενθυλάκωση με την μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό, όπου το διάλυμα της βιοδραστικής ουσίας τροφοδοτείται σε στεγνωτήριο ψεκασμού με διεσπαρμένο άμυλο. Με αυτή τη μέθοδο ενθυλάκωσης, η κοκκώδης δομή του φυσικού αμύλου παραμένει σχεδόν αμετάβλητη (Gonzalez-Soto et al., 2011). Το μέγεθος, η επιφάνεια, η κρυσταλλικότητα, η αναλογία αμυλόζης: αμυλοπηκτικής και το μοριακό βάρος των φυσικών κόκκων αμύλου έχουν ισχυρή επίδραση στα χαρακτηριστικά της ενθυλάκωσης-απελευθέρωσης. Ωστόσο, η χρήση φυσικών αμύλων για το σκοπό αυτό μπορεί να αποφέρει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως την μη δυνατότητα ζελατινοποίησης και την αύξηση του ιξώδους της πάστας αμύλου, που μπορεί να μειώσει την ανάκτηση των μικροσωματιδίων στο τέλος της διαδικασίας. Επιπλέον ενώ, το άμυλο με υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλοπηκτική προσφέρει υψηλή σταθερότητα και προστασία της βιοδραστικής ουσίας, το άμυλο με υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη εμφανίζει μη αποδεκτή συμπεριφορά ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Μια άλλη δυσμενής επίδραση παρατηρήθηκε για μεθόδους ενθυλάκωσης με χρήση πάστας θερμού αμύλου, κατά την οποία δεν σχηματίζονται συσσωματώματα. Αυτό υποδηλώνει ότι οι θερμές συνθήκες είναι ακατάλληλες για ενθυλάκωση διότι η εσωτερική διάταξη των κόκκων αμύλου και η ικανότητα συγκράτησης της βιοδραστικής ουσίας επηρεάζονται αρνητικά καθώς οι κόκκοι αμύλου ζελατινοποιούνται μερικώς και διαρρέουν αμυλόζη από ενοποιημένα δίκτυα 3D η οποία προκαλεί χαμηλή ικανότητα απελευθέρωσης (Javier et al., 2017). Συνήθως, τα φυσικά άμυλα συνδυάζονται με άλλα υλικά όπως η γλυκερίνη, τα κόμμεα και οι πρωτεΐνες για να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά γαλακτωματοποίησης και τη διαλυτότητά τους, εξασφαλίζοντας υψηλή απόδοση ενθυλάκωσης και σταθερότητα του προϊόντος (Javier et al., 2017). Για τον περιορισμό αυτών των επιπτώσεων, έχουν προταθεί αρκετές τροποποιήσεις αμύλου, κυρίως αυτές που θα μπορούν να μειώνουν το ιξώδες της πάστας και να επιτρέπουν τον σχηματισμό του υμενίου που είναι απαραίτητο για την ενθυλάκωση, όπως η δεξτρίνοποίηση, η οξειδωση και η συμπερίληψη λιπόφιλων ομάδων. (Storz & Steffens, 2004; Sweedman et al., 2013).

Η δεξτρίνοποίηση του αμύλου πραγματοποιείται με μερική υδρόλυση του. Αυτό επιτυγχάνεται με δράση ενζύμων ή με θερμά οξέα και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δεξτρινών. Η τιμή του ισοδύναμου δεξτρόζης (DE) υποδεικνύει τον βαθμό υδρόλυσης αμύλου στο τέλος της δεξτρίνοποίησης, εκφρασμένος ως ολικά αναγωγικά σάκχαρα σε σύγκριση με τη γλυκόζη, σε ξηρή βάση. Ο μονοσακχαρίτης γλυκόζη έχει $DE = 100$, ενώ το τυπικό φυσικό άμυλο έχει $DE = 0$ και οι μαλτοδεξτρίνες έχουν DE μικρότερο από 20. Η μαλτοδεξτρίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διαδικασίες μικροενθυλάκωσης, καθώς έχει την ικανότητα να σχηματίζει φιλμ χωρίς σημαντικές αυξήσεις στο ιξώδες των διαλυμάτων ενθυλάκωσης (Loret et al., 2004; Storz & Steffens, 2004). Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα πολυμερή, ως βοήθημα ξήρανσης, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των συνολικών στερεών στο διάλυμα και μειώνοντας το κόστος επεξεργασίας (κόστος ενέργειας και πρώτων υλών), αντικαθιστώντας εν μέρει άλλα ακριβότερα πολυμερή (Mahdavi et al., 2014; Rosa et al., 2019; Stoll et al., 2016).

Η διαδικασία οξειδωσης του αμύλου είναι μια τεχνική χαμηλού κόστους, που πραγματοποιείται μέσω ζύμωσης και ακολουθείται από υπεριώδη ακτινοβολία, από έκθεση στον ήλιο ή μέσω της χρήσης οξειδωτικών παραγόντων, όπως το υποχλωριώδες νάτριο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτή η τεχνική προάγει τον αποπολυμερισμό του αμύλου και τη μείωση του ιξώδους της πάστας. Η οξειδωση εισάγει μικρές ποσότητες καρβοξυλικών και καρβονυλικών ομάδων στο μόριο του αμύλου, μειώνοντας τη συσχέτιση μεταξύ μορίων αμυλόζης, παράγοντας λιγότερο παχύρρευστες πάστες και λιγότερο σταθερά πηκτώματα, σε σύγκριση με το φυσικό άμυλο (Dias et al., 2011).

Η εισαγωγή λιπόφιλων ομάδων πραγματοποιείται με την παραγωγή ενός αλκενυλο-ηλεκτρικού εστέρα του αμύλου, ο οποίος προάγει την προσκόλληση μιας υδρογονανθρακικής αλυσίδας στο πολυμερές του υδατάνθρακα. Αυτή η τροποποίηση πραγματοποιείται με τη δράση του οκτενυλο-ηλεκτρικού ανυδρίτη (OSA), στον οποίο υδρόφοβες οκτενυλικές ομάδες συνδέονται ομοιοπολικά με υδροξύλια που είναι διαθέσιμα από τα υπολείμματα γλυκόζης αμύλου, δίνοντας στο πολυμερές έναν αμφιφιλικό χαρακτήρα. Εκτός από την ικανότητα γαλακτωματοποίησης και τη μείωση του μήκους της αλυσίδας του πολυμερούς, που μειώνει το ιξώδες της πάστας χωρίς να διακυβεύεται η ικανότητα σχηματισμού φιλμ, η παρουσία οκτενυλίου μπορεί να μειώσει και την υγροσκοπικότητα του αμύλου, που είναι ένα επιθυμητό

χαρακτηριστικό, καθώς αυξάνει τη σταθερότητα των μικροκαψουλών που παράγονται με αυτό το υλικό. Ωστόσο, η χρήση του οκτενυλο-ηλεκτρικού ανυδρίτη στην τροποποίηση του αμύλου για τρόφιμα είναι περιορισμένη λόγω της τοξικότητάς του και η FDA (Food and Drug Administration) έχει επιτρέψει ως μέγιστη ποσότητα 3% w/w OSA στη διαδικασία τροποποίησης του αμύλου για διατροφικούς σκοπούς (Agama-Acevedo & Bello-Perez, 2017; Sweedman et al., 2013).

3.2 Κόμμεα

Τα κόμμεα (γκουάρ, λοκούστα, ξανθάνη, καραγενάνη, άγαρ, φουρσελάνες, αλγινικά, gelan, curdlan, Arabica, Acacia) είναι υδροκολλοειδή από φυτικές και μικροβιακές πηγές. Συγκεκριμένα είναι πολύπλοκα πολυμερή, που σχηματίζονται από μονομερή υδατανθράκων. Λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν φιλμ και γέλη, αυτοί οι πολυσακχαρίτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες μικροενθυλάκωσης πολλών φυσικών προϊόντων, όπως βαφές, αρώματα και βιοδραστικές ενώσεις (Amaral et al., 2019; Jantarathin et al., 2017; Pieczykolan & Kurek, 2019). Σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα περισσότερα από αυτά τα υδροκολλοειδή προάγουν την αύξηση του ιξώδους του διαλύματος, γεγονός που μπορεί να περιορίσει τη χρήση τους. Επιπλέον, εξακολουθεί να υπάρχει το πρόβλημα που αφορά το κόστος παραγωγής, αφού ορισμένα κόμμεα είναι σχετικά ακριβά.

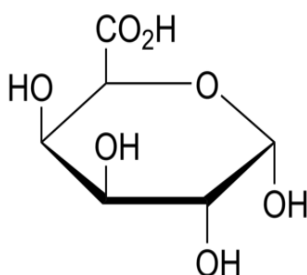
Το αραβικό κόμμι είναι ένα από τα πιο σημαντικά υλικά τοιχώματος που χρησιμοποιείται για αρωματικές ενώσεις και χρωστικές λόγω του ότι μπορεί να λειτουργεί ως σταθερό γαλάκτωμα καθώς και να συγκρατεί πτητικά συστατικά. Το αραβικό κόμμι μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα μέσα ενθυλάκωσης στην παραγωγή σκόνης από εκχυλίσματα χρωστικών. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένα προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση του συγκεκριμένου είδους κόμμεος, συμπεριλαμβανομένου του υψηλού κόστους και της περιορισμένης δυνατότητας εφοδιασμού (Özkan & Bilek, 2014).

3.3 Φυτικές ίνες

Οι ίνες είναι πολυσακχαρίτες, κυρίως φυτικής προέλευσης. Πολλές φυτικές ίνες έχουν χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες μικροενθυλάκωσης, ούσες συνδεδεμένες με άλλα πολυμερή, όπως το άμυλο και οι μαλτοδεξτρίνες. Μεταξύ αυτών, μπορούν να

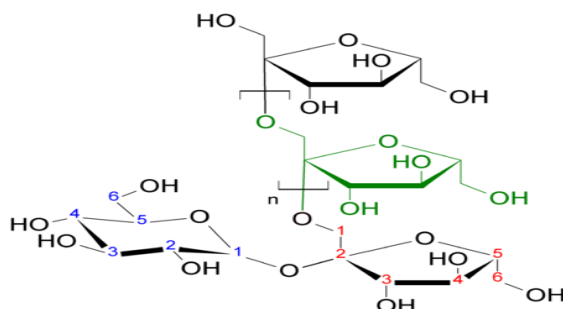
αναφερθούν η πηκτίνη, η κυτταρίνη και τα παράγωγά της (καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη και μικροκρυσταλλική κυτταρίνη), η ινουλίνη κ.λπ. (Ribeiro et al., 2021).

Η πηκτίνη είναι ένα πολυμερές που βρίσκεται στο μεσαίο έλασμα και το κυτταρικό τοίχωμα των ανώτερων φυτών, και είναι διαμορφωμένη σε έναν μεθυλιωμένο εστέρα πολυγαλακτουρονικού οξέος. Αυτό το πολυμερές μπορεί να αποτελείται από 17 διαφορετικούς τύπους μονοσακχαριτών, ενώ το d-γαλακτουρονικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία, ακολουθούμενο από τη d-γαλακτόζη και την l-αραβινόζη. Η πηκτίνη έχει μελετηθεί εκτενώς ως υλικό τοιχώματος για την ενθυλάκωση αρκετών βιοδραστικών ενώσεων, κυρίως σε συνδυασμό με πρωτεΐνες (Rehman et al., 2019; Wusigale et al., 2020; Yabe, 2018). Έχει αναφερθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υλικό τοιχώματος για ελεγχόμενη απελευθέρωση, στοχευμένη παροχή και προστασία φυσικών βιοδραστικών συστατικών (Rehman et al., 2019).



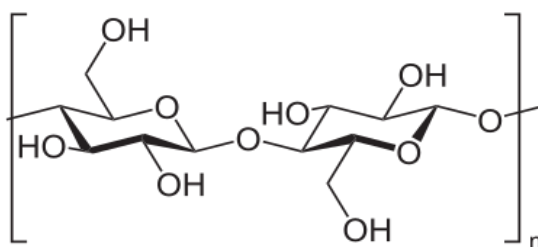
Εικόνα 3.2: Δομή πολυγαλακτουρονικού οξέος.

Η ινουλίνη είναι ένα πολυμερές που αποτελείται ουσιαστικά από φρουκτόζη και εμφανίζεται ως απόθεμα υδατανθράκων σε πολλά είδη φυτών. Λόγω της αναγνωρισμένης πρεβιοτικής του δράσης καθώς και της ικανότητάς του να σχηματίζει φιλμ και γέλη, αυτός ο πολυσακχαρίτης έχει χρησιμοποιηθεί ως υλικό τοιχώματος στην ενθυλάκωση βιοδραστικών ενώσεων, βαφών και προβιοτικών μικροοργανισμών (Lacerda et al., 2016; Pieczykolan & Kurek, 2019; Rosolen et al., 2019).



Εικόνα 3.3: Δομή ινουλίνης.

Η κυτταρίνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους, με δομικές λειτουργίες σε φυτικούς οργανισμούς. Τα παράγωγα κυτταρίνης, ιδιαίτερα η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη και η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστατικά και πρόσθετα τροφίμων ενώ παρουσιάζουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για να είναι υποψήφια υλικά τοιχώματος σε διεργασίες ενθυλάκωσης. Μελέτες μικροενθυλάκωσης έχουν χρησιμοποιήσει τη σύνδεση αυτών των δύο υλικών μεταξύ τους και με άλλα πολυμερή, για την ενθυλάκωση πολλών ενώσεων, όπως οι βαφές και οι πολυφαινόλες, εκτός από τους μικροοργανισμούς (Feng et al., 2018; Gaonkar et al., 2014; Huq et al., 2017; Wang et al., 2017; Zheng et al., 2011).



Εικόνα 3.4: Δομή κυτταρίνης.

3.4 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι πολύπλοκα πολυμερή που αποτελούνται από αμινοξέα, με διαφορετικές ιδιότητες, ανάλογα με τη σύσταση, το μέγεθος και τη δομική τους διαμόρφωση. Αρκετές πρωτεΐνες έχουν γαλακτωματοποιητική ιδιότητα και ικανότητες σχηματισμού φιλμ και γέλης, που είναι επιθυμητά χαρακτηριστικά στην διαδικασία της ενθυλάκωσης. Ωστόσο, παράγοντες όπως το ισοηλεκτρικό σημείο και η θερμοκρασία ζελατινοποίησης θα πρέπει να ληφθούν υπόψη, με στόχο την προσαρμογή του pH και των παραμέτρων θερμοκρασίας κατά τη διαδικασία ενθυλάκωσης. Άλλες σημαντικές παράμετροι που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη αποτελούν η γνώση της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται, καθώς μερικοί παράγοντες μπορούν να προάγουν την καθίζησή της, όπως η παρουσία αλάτων και οργανικών διαλυτών (Damodaran et al., 2018).

Στις διεργασίες ενθυλάκωσης, οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η ζελατίνη, η πρωτεΐνη σόγιας και η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, μόνες ή σε

συνδυασμό με άλλα πολυμερή, τόσο για τη διαθεσιμότητά τους όσο και για το χαμηλότερο κόστος τους, σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες. Η ζελατίνη είναι ένα κολλαγόνο που προέρχεται από συνδετικούς ή επιδερμικούς ιστούς ζώων και έχει καλή ικανότητα γαλακτωματοποίησης, σχηματισμού φιλμ και υδατοδιαλυτότητας. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος χωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες. Η μία ονομάζεται συμπυκνωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPC) και η άλλη απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της WPI είναι περισσότερο από 90% ενώ της WPC είναι περίπου 30-80%, επομένως η WPI είναι πιο κατάλληλη ως γαλακτωματοποιητής (Keogh & O’Kennedy, 1999). Οι Faladt et al. (2001) επισήμαναν ότι το καζεϊνικό νάτριο είναι καλύτερο υλικό τοιχώματος από την πρωτεΐνη ορού γάλακτος, επειδή έχει καλύτερη αντοχή στη θερμότητα. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες σόγιας και ορού γάλακτος δεν αυξάνουν σημαντικά το ιξώδες των διαλυμάτων ενθυλάκωσης, το οποίο είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό των υλικών τοιχωμάτων. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένοι περιορισμοί κατά τη χρήση πρωτεϊνών ως υλικού τοιχώματος, όπως η πιθανή αλλεργιογόνος δράση τους και το υψηλό κόστος τους, καθώς οι πολυσακχαρίτες και τα λίπη είναι πιο προσιτά υλικά (Mahdavi et al., 2016; Rascón et al., 2011; Rosolen et al., 2019; Rudke et al., 2019).

3.5 Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι μια κατηγορία ενώσεων με μεγάλη ποικιλία έχοντας ως κοινό χαρακτηριστικό την ικανότητα να διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. Η δομή, η σύνθεση και το μέγεθός τους μπορούν να επηρεάσουν άλλα χαρακτηριστικά, όπως την ικανότητα πακεταρίσματος και το σημείο τήξης (Ribeiro et al., 2021).

Για την ενθυλάκωση, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα λιπίδια είναι εκείνα με γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες, όπως είναι τα φωσφολιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των λεκιθινών και λιπών με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία έχουν πλαστικές ιδιότητες για να λειτουργούν ως υλικά τοιχώματος. Τα λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα υλικά, όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες (Gonçalves et al., 2016; Huq et al., 2017; Maurya et al., 2020; Łozińska et al., 2020).

Οι Łozińska et al. (2020) προχώρησαν σε έρευνα σχετικά με το ποιο υλικό τοιχώματος ήταν το καταλληλότερο για την ενθυλάκωση ιχθυελαίου. Αυτό που

διαπιστώθηκε ήταν ότι η επικάλυψη του ιχθυελαίου με ένα στρώμα άλλου λιπιδίου, που περιέχει ακόμη και μόνο κορεσμένα λιπίδια, δεν επιβράδυνε την τάγγιση του ελαίου. Το πραγματικά εκπληκτικό όμως ήταν ότι η χρήση μιγμάτων πρωτεϊνών και υδατανθράκων παρέχει χειρότερα αποτελέσματα από τη χρήση αυτών των ενώσεων χωριστά. Την υψηλότερη προστασία παρείχαν τα μείγματα πρωτεϊνών και λιπιδίων. Μια τέτοια κατάσταση συμβαίνει όταν το έλαιο μικροενθυλακώνεται σε αποξηραμένα και προεπεξεργασμένα κύτταρα ζύμης. Τα κύτταρα ζυμομύκητα με το έγκλειστο ιχθυέλαιο μπορούν να επικαλυφθούν με επιπλέον πολυμερείς ενώσεις, όπως η υδροξυ-προπυλομεθυλοκυτταρίνη (Czerniak et al., 2015). Μια τέτοια προσέγγιση επιτρέπει τη λήψη ιχθυελαίου που περικλείεται σε τοιχώματα κατασκευασμένα από μείγμα πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων που προστατεύουν την δραστική ουσία καλύτερα από οποιαδήποτε άλλη επικάλυψη.

Αντίστοιχα οι Gonçalves et al. (2016) μελέτησαν την μικροενθυλάκωση της βιταμίνης Α. Ανέφεραν μεταξύ άλλων τη χρήση λιπιδίων ως υλικό τοιχώματος στις μεθόδους γαλακτωματοποίησης, τη χρήση λιποσωμάτων τα οποία αποτελούνται από λιπιδικά συστήματα διπλής στιβάδας που είναι ομόκεντρα γύρω από έναν υδατικό χώρο (Fang & Bhandari, 2010) καθώς και τη χρήση στερεών νανοσωματιδίων λιπιδίων.

Μερικές φορές τα μέσα εγκλεισμού ενός συγκεκριμένου τύπου δεν μπορούν να ικανοποιήσουν τις απαιτούμενες ιδιότητες ενός υλικού τοιχώματος και μια εναλλακτική λύση είναι η χημική τροποποίηση τους για να αποκτήσουν τις ιδανικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, οι Peng et al. (2010) συνέθεσαν το «mPEG-g-CS», ένα παράγωγο χιτοζάνης ως νέο υλικό τοιχώματος για να ενθυλακώσουν έλαιο φυκιών, το οποίο βελτίωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητά της. Ωστόσο, η ανάπτυξη νέων υλικών τοιχώματος απαιτεί γενικά υψηλό κόστος. Μια άλλη εφικτή και βολική μέθοδος είναι η ενσωμάτωση άλλων μέσων εγκλεισμού ως τροποποιητές, έτσι ώστε να προκύψει ένα αναμιγμένο υλικό τοιχώματος. Πάνω σε αυτό οι Augustin et al. (2019) πρότειναν τη χρήση προϊόντων αντίδρασης Maillard πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε υψηλές θερμοκρασίες για τη βελτίωση της σταθερότητας των πρωτεϊνών και της γαλακτωματοποιητικής ιδιότητας των υδατανθράκων. Τα προϊόντα είχαν καλές αντιοξειδωτικές λειτουργίες και μπορούσαν να σχηματίσουν ένα σταθερό προστατευτικό κέλυφος για την ενθυλάκωση των ευοξειδωτών συστατικών. Εν ολίγοις, η βελτίωση της απόδοσης του υλικού ενός τοιχώματος

εξακολουθεί να επιλύεται κυρίως με το συνδυασμό διαφορετικών μέσων εγκλεισμού. Συνήθως, εισάγονται επίσης ορισμένοι γαλακτωματοποιητές, πλαστικοποιητές, αντιοξειδωτικά κ.λπ. για να ενισχύσουν τα πλεονεκτήματα των αυθεντικών υλικών τοιχώματος ή να εξαλείψουν τα δικά τους μειονεκτήματα.

Πίνακας 3.1: Συνοπτική παρουσίαση των μέσων εγκλεισμού της ενότητας.

Υλικά τοιχώματος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Παραδείγματα υλικών τοιχώματος	Πηγές
Άμυλο	Οι μικροί κόκκοι αμύλου προσφέρουν μέγιστη κατακράτηση των δραστικών ενώσεων, χαμηλό κόστος (τεχνική οξείδωσης)	Μη ικανοποιητικός σχηματισμός φιλμ, χαμηλή ικανότητα γαλακτωματοποίησης, υψηλό πορώδες, κακή ελεγχόμενη απελευθέρωση	Άμυλο αραβοσίτου, άμυλα εμπορίου, μαλτοδεξτρίνη	Wangxing et al., (2018); Ribeiro et al., (2021)
Κόμμεα	Ικανότητα σχηματισμού φιλμ και γέλης, καλή γαλακτοματοποίηση	Υψηλό κόστος, περιορισμένη δυνατότητα εφοδιασμού	-Εκχυλίσματα φυτών (π.χ. αραβικό κόμμι). -Μικροβιακής παραγωγής (π.χ. ξανθάνη). -Εκχυλίσματα φυκιών (πχ αλγινικά)	Ribeiro et al., (2021); Özkan & Bilek, (2014)
Φυτικές ίνες	Ικανότητα σχηματισμού φιλμ και γέλης, ευεργετικές ικανότητες (πρεβιοτική δράση ινουλίνης), ελεγχόμενη απελευθέρωση, στοχευμένη	Μη ικανοποιητικός σχηματισμός φιλμ, χαμηλή ικανότητα γαλακτωματοποίησης, υψηλό πορώδες	Κυτταρίνη και παράγωγα της, πηκτίνη, ινουλίνη	Rehman et al., (2019); Ribeiro et al., (2021); Wangxing et al., (2018)

	παροχή, προστασία φυσικών βιοδραστικών συστατικών			
Πρωτεΐνες	Καλή διαλυτότητα, γαλακτωματοποίηση, χαμηλό κόστος, όχι αύξηση του ιξώδους πάστας	Υψηλό κόστος, πιθανή αλλεργιογόνος δράση	ζελατίνη, πρωτεΐνη σόγιας, πρωτεΐνη ορού γάλακτος	Wangxing et al., (2018); Ribeiro et al., (2021)
Λιπίδια	Ικανότητα να διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες, γαλακτιματοποίηση, πλαστικές ιδιότητες	Ορισμένα είδη λιπιδίων αποδίδουν καλύτερα σε συνδυασμό με άλλα μέσα	φωσφολιπίδια (π.χ. λεκιθίνες), λιποσώματα	Ribeiro et al., (2021); Łozińska et al., (2020)
Ανάπτυξη νέων υλικών τοιχώματος	Αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καλύτερη προστασία της βιοδραστικής ουσίας	Υψηλό κόστος	χρήση προϊόντων αντίδρασης Maillard πρωτεϊνών και υδατανθράκων	Peng et al., (2010); Augustin et al., (2019)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

4.1 Μέθοδοι εγκλεισμού καροτενοειδών

4.1.1 Μελέτη ενθυλάκωσης καροτενοειδών με λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση, γνωστή και ως κατάψυξη με ψεκασμό βασίζεται στη διαδικασία της εξάχνωσης, κατά την οποία το νερό, το οποίο βρίσκεται μέσα σε ένα σύστημα κενού, μετατρέπεται απευθείας σε ατμό, χωρίς να περάσει από την υγρή φάση. Στην τεχνική της λυοφιλίωσης, τα συστατικά των τροφίμων δεν εκτίθενται σε θερμική θέρμανση, γεγονός που οδηγεί σε καλύτερης ποιότητας τελικό προϊόν. Κατ' επέκταση αυτή η τεχνική βρίσκει ευρεία εφαρμογή για την ενθυλάκωση θερμοευαίσθητων συστατικών όπως χρωστικές ουσίες, πρωτεΐνες, ζυμομύκητες κ.λπ. (Ciurzynska & Lenart, 2011). Αυτή η τεχνική ενθυλάκωσης προσφέρει καλή προστασία στα καροτενοειδή και ως εκ τούτου υπάρχουν αρκετές μελέτες που να αφορούν την μικροενθυλάκωση καροτενοειδών με λυοφιλίωση (Arof et al., 2018; Sutter et al., 2007).

Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τους Nogueira et al. (2017), αφορούσε την μικροενθυλάκωση καροτενοειδών που παράχθηκαν από τη ζύμη *Phaffia rhodozyma* με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης, χρησιμοποιώντας πρωτεΐνη σόγιας ως υλικό τοιχώματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η απόδοση των μικροκάψουλων έφθανε το 97.46% στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε αναλογία πρωτεΐνης σόγιας-καροτενοειδών ίση με 1:2, γεγονός που δείχνει πολύ μικρές απώλειες των καροτενοειδών κατά τη διαδικασία. Αντιθέτως, η απόδοση της ενθυλάκωσης ήταν ίση με 65%, που σημαίνει ότι το 35% των καροτενοειδών δεν προστατευόταν από την ενθυλάκωση. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα συνηγορούσαν ότι η μέθοδος δύναται να χρησιμοποιηθεί και σε τρόφιμα ως μέθοδος προστασίας θερμοευαίσθητων συστατικών όπως είναι τα καροτενοειδή.

4.1.2 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με την μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό.

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος μικροενθυλάκωσης σε βιομηχανικό επίπεδο, επειδή είναι γρήγορη, απλή και έχει χαμηλό κόστος σε σύγκριση με άλλες τεχνικές (Zimmer et al., 2022).

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Santos et al. (2021), χρησιμοποιήθηκε το έλαιο tucumã προκειμένου να παραχθεί σκόνη με την μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό. Παρόλο που το έλαιο tucumã περιέχει υψηλές ποσότητες καροτενοειδών (κατά συνέπεια και τις ωφέλιμες ιδιότητες τους) η εφαρμογή του σε προϊόντα διατροφής αποδεικνυόταν δύσκολη λόγω της υδρόφοβης φύσης του και της ευαισθησίας στην αποικοδόμηση. Ο στόχος της μελέτης ήταν να παραχθούν σκόνες λαδιού Tucumã με ξήρανση με ψεκασμό και να αξιολογηθούν οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, η σταθερότητα αποθήκευσης και η *in vitro* πέψη. Πιο συγκεκριμένα οι μελετητές αξιολογήσαν διαφορετικές αναλογίες λαδιού (100, 200 και 300 g/kg) και θερμοκρασίες ξήρανσης (120 και 180°C). Η οξειδωτική σταθερότητα του ελαίου και των σκονών αξιολογήθηκαν με την μέθοδο Rancimat στους 120°C, ενώ η ικανότητα συγκράτησης καροτενοειδών προσδιορίστηκε κατά τη διάρκεια 125 ημερών στους 25°C. Τα σωματίδια που ξηράνθηκαν στους 120°C παρουσίασαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε καροτενοειδή (52,9-162,1 mg/kg) από εκείνη που παρήχθη στους 180°C (43,7-130,6 mg/kg) και κατά συνέπεια χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Η ενθυλάκωση αύξησε την οξειδωτική σταθερότητα (έως 177 φορές) του λαδιού σε υψηλή θερμοκρασία, ενώ απέφερε υψηλή ικανότητα συγκράτησης καροτενοειδών (73-85%) μετά την αποθήκευση, μεγάλη διασπορά του λαδιού στο νερό (93,8-98,1%) και την ελεγχόμενη απελευθέρωση καροτενοειδών κατά τα βήματα της πέψης, με συνολική απελευθέρωση 64%. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι οι σκόνες λαδιού tucumã είχαν τη δυνατότητα να ενσωματωθούν σε επεξεργασμένα τρόφιμα ως βιοδραστική ουσία.

Η μελέτη των Corrêa-Filho et al. (2019), αφορούσε την ενθυλάκωση καροτενίου με την μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό, χρησιμοποιώντας αραβικό κόμμι ως υλικό τοιχώματος, με σκοπό να αξιολογηθεί ταυτόχρονα η επίδραση της θερμοκρασίας εισόδου ξήρανσης και της συγκέντρωσης του υλικού τοιχώματος ακολουθώντας πρόγραμμα πειραματικού σχεδιασμού. Οι μεταβλητές απόκρισης ήταν η απόδοση ξήρανσης, η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, η φόρτωση σωματιδίων, η μορφολογία και το μέγεθος, καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των ενθυλακωμένων μορίων β-καροτενίου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση αραβικού κόμμιος και η θερμοκρασία εισόδου ξήρανσης επηρέασαν την απόδοση ξήρανσης, την απόδοση της ενθυλάκωσης και τις αποκρίσεις ικανότητας φορτίου. Οι περισσότερες από τις

μικροκάψουλες παρουσίασαν παρόμοια μορφολογία, συγκεκριμένα ένα μείγμα λείων και ρυτιδωμένων σωματιδίων, με διάμετρο μικρότερη από 10 μm. Από τις πειραματικές συνθήκες, η θερμοκρασία εισόδου ξήρανσης 173°C και η συγκέντρωση αραβικού κόμμεος 11,9% ήταν εκείνες που επέτρεψαν τη λήψη υψηλότερης περιεκτικότητας σε β-καροτένιο, υψηλότερη απόδοση ενθυλάκωσης και υψηλότερη απόδοση ξήρανσης.

Η εργασία των Glaucia Aguiar et al. (2012) αποσκοπούσε στην μικροενθυλάκωση του λυκοπενίου με την μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό, χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο άμυλο (Capsul®) ως υλικό τοιχώματος. Η ποσότητα του λυκοπενίου μεταβλήθηκε σε 5, 10 και 15% σε διάλυμα που περιείχε 30% στερεά συστατικά προκειμένου να ληφθούν οι μικροκάψουλες. Αυτές οι μικροκάψουλες αφού αξιολογήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα και τη μορφολογία τους υποβλήθηκαν σε δοκιμή σταθερότητας και εφαρμόστηκαν σε κέικ. Οι τιμές απόδοσης ενθυλάκωσης κυμαίνονταν μεταξύ 21 και 29%. Οι μικροκάψουλες είχαν στρογγυλεμένη εξωτερική επιφάνεια με σχηματισμό κοιλοτήτων και διέφεραν σε μέγεθος. Η δοκιμή σταθερότητας αποκάλυψε ότι η μικροενθυλάκωση προσέφερε μεγαλύτερη προστασία στο λυκοπένιο σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή του και παρατηρήθηκε ότι οι μικροκάψουλες ήταν σε θέση να απελευθερώσουν τη χρωστική ουσία και να χρωματίσουν το σύστημα τροφίμων που μελετήθηκε με ομοιογενή τρόπο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι δυνατή η ενθυλάκωση ελαιωδών διαλυμάτων λυκοπενίου χρησιμοποιώντας την τεχνική ξήρανσης με ψεκασμό και το τροποποιημένο άμυλο, Capsul, ως υλικό τοιχώματος. Ωστόσο, από τα σκευάσματα που μελετήθηκαν η ενθυλάκωση που περιείχε την μικρότερη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας (5%) ήταν πιο αποτελεσματική και παρείχε επίσης μεγαλύτερη σταθερότητα κατά την αποθήκευση. Οι μικροκάψουλες που μελετήθηκαν παρουσίασαν καλή λειτουργικότητα και καλές δυνατότητες χρήσης σε τρόφιμα αφού ήταν σε θέση να τα χρωματίσουν ομοιογενώς και να απελευθερώσουν το λυκοπένιο.

4.1.3 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με την μέθοδο συνκρυστάλλωσης

Η συνκρυστάλλωση είναι μια μέθοδος ενθυλάκωσης που έχει αυξήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια λόγω της απλότητας της λειτουργίας της (López-Córdoba & Navarro, 2018). Σε αυτή τη διαδικασία, η δραστική ουσία, σε

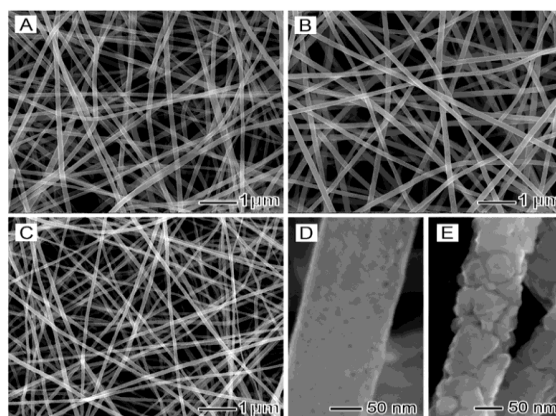
μορφή σταθεροποιημένης σκόνης, εισάγεται σε διάλυμα υπερκορεσμένης σακχαρόζης ώστε να λάβει χώρα μια ταυτόχρονη κρυστάλλωση, η οποία βοηθά στην παγίδευση της ουσίας στη σακχαρόζη (Bhandari & Hartel, 2002). Η στερεά και τέλεια κρυσταλλική δομή της σακχαρόζης μετατρέπεται σε συσσωματωμένους κρυστάλλους (λιγότερο από 30 μm σε ακανόνιστη και πορώδης δομή), οι οποίοι παρέχουν σημαντικό κενό χώρο και αυξημένη επιφάνεια για την ενσωμάτωση του δραστικού συστατικού (Bhandari & Hartel, 2002; Savjani, 2015). Η τεχνική της συνκρυστάλλωσης χρησιμοποιείται πιο συχνά στη φαρμακευτική βιομηχανία παρά στη βιομηχανία τροφίμων, ωστόσο, οι ερευνητές έχουν εντείνει τις προσπάθειές τους στη βελτιστοποίηση της ενθυλάκωσης βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα με συνκρυστάλλωση με σακχαρόζη (Chezanoglou & Goula, 2021). Η συνκρυστάλλωση με σακχαρόζη αποτελεί μια νέα, απλή και οικονομική μέθοδος ενθυλάκωσης που αυξάνει τη διατήρηση των ενθυλακωμένων υλικών (Jackson & Lee, 1991; López-Córdoba et al., 2014). Επιπλέον μπορεί να βελτιώσει τη διάλυση, τη δυνατότητα διασποράς, την ομοιογένεια, την υγροσκοπικότητα, την ενυδάτωση, τις αντισυσσωματωτικές ιδιότητες και τη θερμική σταθερότητα της δραστικής ουσίας. (Sanjay et al., 2014).

Στην έρευνα των Kaur et al. (2021) χρησιμοποιήθηκε η συνκρυστάλλωση προκειμένου να επιτευχθεί αύξηση της σταθερότητας των καροτενοειδών που εξάγονται από τα καρότα (π.χ. β -καροτένιο). Οι ενθυλακωμένοι συν-κρυστάλλοι αξιολογήθηκαν βάσει της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης, την αντιοξειδωτική τους δράση, τη θερμική συμπεριφορά, τις φυσικοχημικές και δομικές τους ιδιότητες. Η συνκρυστάλλωση των καροτενοειδών με σακχαρόζη έδειξε αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης 77,58% και αντιοξειδωτική δράση 68% σε δοκιμές με την ελεύθερη ρίζα DPPH. Το θερμογράφημα DSC επιβεβαίωσε τη θερμική σταθερότητα των ενθυλακωμένων με καροτενοειδή συνκρυστάλλων υποδεικνύοντας τις ενδόθερμες κορυφές στους 190 $^{\circ}\text{C}$. Το σχέδιο XRD και τα φάσματα FTIR αποκάλυψαν ότι η κρυσταλλική φύση της σακχαρόζης και των λειτουργικών ομάδων παρέμεινε η ίδια ακόμη και μετά τη συνκρυστάλλωση. Εικόνες που λήφθηκαν από μικροσκόπιο SEM εντόπισαν την ύπαρξη ακανόνιστων κοιλιοτήτων σε κυβικούς κρυστάλλους σακχαρόζης που αποφέρουν καλύτερη παγίδευση των καροτενοειδών στη σακχαρόζη. Ως εκ τούτου, η συνκρυστάλλωση βελτίωσε σημαντικά τη συνολική

σταθερότητα των καροτενοειδών και αυτοί οι συνκρυσταλλοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσική γλυκαντική χρωστική με αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

4.1.4 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με τεχνική ηλεκτροϊνοποίησης

Μεταξύ των πολλών διαφορετικών τεχνικών ενθυλάκωσης καροτενοειδών, η τεχνική ηλεκτροϊνοποίησης έχει κερδίσει εξέχουσα θέση λόγω της ευελιξίας, της απλότητας, της οικονομικής αποδοτικότητας και της παραγωγικότητάς της. Οι νανοΐνες που παράγονται με ηλεκτροϊνοποίηση έχουν πολλά δομικά και λειτουργικά πλεονεκτήματα, όπως μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, υψηλό πορώδες, υψηλή απόδοση ενθυλάκωσης ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς χρήση θερμότητας, η οποία παρέχει υψηλή σταθερότητα των ενθυλακωμένων ενώσεων (Bhardwaj & Kundu, 2010; Zhang et al., 2005). Η ηλεκτροϊνοποίηση είναι μια τεχνική που βασίζεται στην ηλεκτροστατική απόθεση μεταξύ των επιφανειακών φορτίων για τη συνεχή εξαγωγή νανο-ινών από ένα ελαστικό ρευστό με μεγάλο ιξώδες (διάλυμα πολυμερούς) (Xue et al., 2017). Οι νανο-ίνες είναι ουσιαστικά το υλικό τοιχώματος για τη βιοδραστική ουσία.



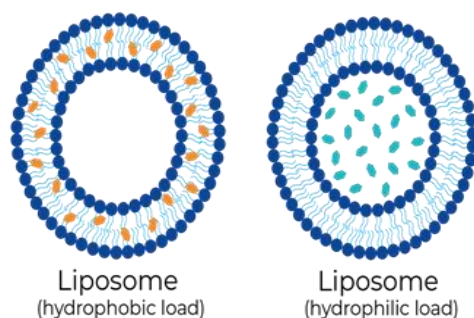
Εικόνα 4.1: Εικόνα σύνθετων νανοϊνών από SEM (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Σάρωσης) (Xue et al., 2017).

Σε μια εργασία που πραγματοποιήθηκε από τους Horuz & Belibağlı (2018) αποδείχθηκε η αποτελεσματικότητα της τεχνικής ηλεκτροϊνοποίησης, η οποία είχε ως στόχο την σταθεροποίηση καροτενοειδών που εξάγονται από φλοιό τομάτας. Οι νανοΐνες ζελατίνης που περιείχαν τα καροτενοειδή παρουσίασαν απόδοση ενθυλάκωσης άνω του 90%. Η ανάλυση SEM αποκάλυψε ότι οι ενθυλακωμένες ίνες παρουσίαζαν παρόμοια μορφολογία με τις καθαρές ίνες με λεία και ομογενώς κατανεμημένη μορφολογία. Η θερμική σταθερότητα του εκχυλίσματος βελτιώθηκε με

νανοενθυλάκωση. Τα φάσματα FTIR έδειξαν ότι τα καροτενοειδή που εκχυλίστηκαν ήταν συμβατά στις ίνες ζελατίνης έτσι ώστε να μπορούν να κλειστούν σε αυτές. Σε σύγκριση με τα απλώς εκχυλισμένα ελεύθερα καροτενοειδή, τα ενθυλακωμένα σε ίνες ζελατίνης διατήρησαν το λυκοπένιο και την αντιοξειδωτική τους δράση κατά τη διάρκεια αποθήκευσης 14 ημερών. Το πιο ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι η υδατοδιαλυτότητα του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος καροτενοειδούς ήταν πολύ ενισχυμένη σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο. Με αυτή τη μελέτη, έγινε αντιληπτό ότι η νανοενθυλάκωση με ηλεκτροϊονοποίηση είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη σταθεροποίηση των καροτενοειδών και τη βελτίωση της υδατοδιαλυτότητάς τους, επομένως είναι πολλά υποσχόμενη η χρήση τους στην επεξεργασία τροφίμων.

4.1.5 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με χρήση λιποσωμάτων.

Τα λιποσώματα είναι μεμβράνες διπλής στιβάδας που σχηματίζονται από την αυτοσυναρμολόγηση φωσφολιπιδίων, όπου το υδρόφιλο τμήμα και η διπλή στιβάδα λιπιδίων μπορούν να ενθυλακώσουν υδρόφιλα, υδρόφοβα και αμφίφιλα θρεπτικά συστατικά. Τα κύρια φωσφολιπίδια που χρησιμοποιούνται για να σχηματιστούν λιποσώματα είναι η λεκιθίνη σόγιας, η λεκιθίνη αυγού, η λεκιθίνη από θαλάσσιες πηγές και το φωσφολιπίδιο γάλακτος (Akbarzadeh et al., 2013; Imran et al., 2015; Thompson et al., 2007). Αυτά τα συστήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά επειδή έχουν τη δυνατότητα να ενθυλακώνουν λιπόφιλες ουσίες που είναι εξόχως σημαντικές σε εφαρμογές τροφίμων, όπως η βιταμίνη Ε, τα αιθέρια έλαια, τα υδρόφοβα πεπτίδια, η L-καρνοσίνη και τα καροτενοειδή (Mozafari et al., 2008; Taylor et al., 2005; Toniazzi et al., 2014). Γενικά, τα λιποσώματα είναι φυσικές, βιοαποικοδομήσιμες και μη τοξικές δομές, που παρουσιάζουν καλή σταθερότητα και επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία (πάνω από το σημείο τήξης των φωσφολιπιδίων: 180–200 °C) (Gouin, 2004).



Εικόνα 4.2: Δομή λιποσώματος. (www.pharmaexcipients.com).

Ιδιαίτερα σημαντική για τη βιομηχανία τροφίμων είναι η παραγωγή λιποσωμάτων σε ξηρή κατάσταση τα οποία ονομάζονται προλιποσώματα. Σε αυτή την περίπτωση, η διαδικασία συνδυάζεται με άλλες μεθόδους όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η κατάψυξη με ψεκασμό και η καθίζηση υπερκρίσιμου ρευστού. Με αυτό το τρόπο προκύπτει μια οικονομική και βιώσιμη εναλλακτική λύση για την ενθυλάκωση (Alves & Santana, 2004; Moraes et al., 2013; Xia et al., 2012). Η μέθοδος ξήρανσης με ψεκασμό είναι η πιο κοινή μέθοδος στη βιομηχανία τροφίμων, αποτελώντας την καλύτερη προτεινόμενη τεχνική για εφαρμογές ενθυλάκωσης με λιποσώματα.

Η μελέτη των Moraes et al. (2013) είχε σαν στόχο να διερευνήσει την αποτελεσματικότητα των προλιποσωμάτων στο να προάγουν την ενθυλάκωση του β-καροτενίου με την μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό καθώς και να αξιολογήσει την ικανότητα των λιποσωμάτων να διατηρήσουν το ενθυλακωμένο καροτενοειδές. Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή λήφθηκαν σκόνες που περιείχαν β-καροτένιο, υδρογονωμένη φωσφατιδυλοχολίνη και σακχαρόζη και χαρακτηρίστηκαν ως προς την κρυσταλλικότητα, τη μορφολογία, τη θερμική συμπεριφορά, την πυκνότητα, τη διαλυτότητα και την υγροσκοπικότητα. Η διατήρηση του β-καροτενίου στη σκόνη αξιολογήθηκε κάτω από δυο διαφορετικές συνθήκες. Η πρώτη ήταν η αποθήκευση σε κανονική ατμόσφαιρα και η δεύτερη υπό κενό αέρος. Το προλιπόσωμα εμφάνισε εξαιρετική διαλυτότητα, με όλα τα συστατικά ενσωματωμένα στη μήτρα και ικανό να διατηρήσει περισσότερο από το 90% του ενθυλακωμένου β-καροτενίου για 60 ημέρες αποθήκευσης στο ψυγείο υπό κενό αέρος. Τα διασκορπισμένα λιποσώματα διατήρησαν το μέσο μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ηλεκτρικό δυναμικό Zeta για 100 ημέρες αποθήκευσης. Μετά από 60 ημέρες, η αποικοδόμηση του ενθυλακωμένου β-καροτενίου ήταν ελάχιστη με καλή διατήρηση του χρώματος του.

4.1.6 Ενθυλάκωση καροτενοειδών με συνθέτη συσσωμάτωση

Η μέθοδος περιλαμβάνει χρήση δύο ή και περισσότερων μέσων εγκλεισμού για ενθυλάκωση βιοδραστικών ουσιών. Με αυτό τον τρόπο προκύπτει ένα καινούριο υλικό τοιχώματος με περισσότερα πλεονεκτήματα. Για παράδειγμα, στη μελέτη των Zhou et al. (2018) η μέθοδος της συνθέτης συσσωμάτωσης χρησιμοποιήθηκε για την ενθυλάκωση εστεροποιημένων ασταξανθινών. Αναλυτικότερα, οι εστεροποιημένες μικροκάψουλες ασταξανθίνης παρασκευάστηκαν μέσω ηλεκτροστατικής συμπλοκοποίησης πρωτεΐνης (ορού γάλακτος) και αραβικού κόμμεος με ρύθμιση του pH στο 4,0. Οι εστεροποιημένες ασταξανθίνες χρησιμοποιούνται ως λειτουργικά θρεπτικά συστατικά σε πολλά προϊόντα διατροφής. Παρόλα αυτά, η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της κακής υδατοδιαλυτότητάς τους, της χημικής αστάθειας και της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς τους. Συνολικά, αυτή η μελέτη απέδειξε ότι τα σταγονίδια εστεροποιημένης ασταξανθίνης θα μπορούσαν να ενθυλακωθούν στο σύνθετο υλικό τοιχώματος πρωτεΐνης/κόμμεος με την μέθοδο της σύνθετης συσσωμάτωσης. Για το σκοπό αυτό σχηματίστηκαν σχετικά μικρές και ομοιόμορφες μικροκάψουλες, με την πλειονότητα των σταγονιδίων εστεροποιημένης ασταξανθίνης να παγιδεύονται μέσα. Η μορφολογία των μικροκαψουλών εξαρτιόταν από την τιμή του pH, όπου εκείνες που αποθηκεύτηκαν κάτω από pH 4,0 ήταν πιο σταθερές από εκείνες με pH 3,0 και 7,0. Η ενθυλάκωση των εστεροποιημένων σταγονιδίων ασταξανθίνης μέσα στις μικροκάψουλες βελτίωσε σημαντικά τη σταθερότητά τους, το οποίο είναι πολύ σημαντικό για τα λειτουργικά συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, αποδείχτηκε, κατόπιν επαλήθευσης από μοντέλα *in vitro* όσο και *in vivo*, ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης και η έκταση της πέψης των μικροενθυλακωμένων εστεροποιημένων ασταξανθινών είχαν βελτιωθεί. Αυτό αποδεικνύει ότι τα εστεροποιημένα σταγονίδια ασταξανθίνης απελευθερώνονται πλήρως από τις μικροκάψουλες μετά την κατάποση.

Πίνακας 4.1: Επισκόπηση ερευνών που αναφέρονται στην μικροενθυλάκωση καροτενοειδών σε καθαρή μορφή ή σε σύνθετα εκχυλίσματα

Τεχνική ενθυλάκωσης	Βιοδραστική ουσία	Υλικό τοιχώματος	Αποτελέσματα ενθυλάκωσης	Πηγές
Λυοφιλίωση	Καροτενοειδή που παράχθηκαν από την ζύμη <i>Phaffia</i>	Πρωτεΐνη σόγιας	Απόδοση ενθυλάκωσης 65%, απόδοση των μικροκαψουλών 97,46%	Nogueira et al., (2017)

	<i>rhodozyma</i>			
Ξήρανση με ψεκασμό	έλαιο Tucumã	-	Ικανότητα απελευθέρωσης καροτενοειδών 64%, υψηλή ικανότητα συγκράτησης καροτενοειδών (73-85%)	Santos et al., (2021)
Ξήρανση με ψεκασμό	β-καροτένιο	Αραβικό κόμμι	Υψηλότερη απόδοση ενθυλάκωσης και ξήρανσης στους 173°C και 11,9% αραβικό κόμμι	Corrêa-Filho et al., (2019)
Ξήρανση με ψεκασμό	Λυκοπένιο	Capsul®	Απόδοση ενθυλάκωσης 21 και 29%, καλή απελευθέρωση της χρωστικής ουσίας	Glaucia Aguiar et al., (2012)
Συνκρυστάλλωση	Καρότα	Σακχαρόζη	Αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης 77,85%, αντιοξειδωτική δράση 68%	Kaur et al., (2021)
Ηλεκτροϊνοποίηση	Φλούδες τομάτας	Νανοΐνες	Καλύτερη διατήρηση λυκοπενίου και αντιοξειδωτική δράση, αυξημένη υδατοδιαλυτότητα.	Horuz & Belibağlı, (2018)
Ξήρανση με ψεκασμό	β-καροτένιο	Προλιποσώματα	Εξαιρετική διαλυτότητα, ικανότητα συγκράτησης καροτενοειδών 90% για 60 μέρες αποθήκευση υπό κενό	Moraes et al., (2013)

Σύνθετη συσσωμάτωση	Εστεροποιημένες ασταξανθίνες	Ορός γάλακτος, αραβικό κόμμι	Βελτίωση σταθερότητας της βιοδραστικής ουσίας, ρυθμού απελευθέρωσης, έκταση της πέψης	Zhou et al., (2018)
------------------------	---------------------------------	---------------------------------	--	------------------------

4.2 Ενσωμάτωση ενθυλακωμένων καροτενοειδών στα τρόφιμα και περιπτώσεις μελέτης

4.2.1 Χρήση ενθυλακωμένης ασταξανθίνης σε μοντέλου ποτού

Τα υποπροϊόντα των καρκινοειδών είναι πολύτιμες πηγές ασταξανθίνης και πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ανάκτηση της και την περαιτέρω εφαρμογή της σε τρόφιμα. Μια τέτοια μελέτη αποτελεί η εργασία των Bassijeh et al. (2020), οι οποίοι ενέκτησαν σε πρώτη φάση μια λιπιδική φάση πλούσια σε ασταξανθίνη από απόβλητα γαρίδας και στην συνέχεια ενθυλάκωσαν το εκχύλισμα σε γαλακτώματα πολλαπλών στρωμάτων. Η σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε από ηλεκτροστατικά σύμπλοκα απομόνωσης πρωτεΐνης ορού τυρογάλακτος (WPI) και περσικού κόμμεος (PG), με διαφορετικές αναλογίες ανάμειξης WPI:PG (1:2–1:4). Τα προκύπτοντα γαλακτώματα στη συνέχεια υπέστησαν λυοφιλίωση. Η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης της ασταξανθίνης σε λυοφιλιωμένες σκόνες ήταν 42,9–49,8 g ασταξανθίνης/100 g ασταξανθίνης. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε ένα μοντέλο ποτού αποτελούμενο από νερό 89%, ζάχαρη 10% και κιτρικό οξύ 1% και μελετήθηκε η πιθανή εφαρμογή μικροκαψουλών ασταξανθίνης ως φυσική χρωστική σε σύγκριση με μια συνθετική χρωστική υπό την επίδραση του φωτός/σκότους, της θερμοκρασίας (4 και 25 °C) και του χρόνου (0–60 ημέρες). Στο μοντέλο του ροφήματος, η υψηλότερη θερμοκρασία αποθήκευσης και το φως ενίσχυσαν την αποικοδόμηση της ασταξανθίνης. Το μοντέλο ροφήματος που παρασκευάστηκε με ενθυλακωμένη ασταξανθίνη έλαβε χαμηλότερες βαθμολογίες στο χρώμα και την οσμή από εκείνο με τη συνθετική χρωστική. Δεδομένου ότι η φυσική ενθυλακωμένη ασταξανθίνη έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως λειτουργικό συστατικό σε ποτά, η βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων και η μελέτη των ιδιοτήτων απελευθέρωσης σε γαστρεντερικές καταστάσεις θα πρέπει να εξεταστούν στο μέλλον.

4.2.2 Χρήση ενθυλακωμένου λυκοπενίου σε φρεσκοκομμένα μήλα

Οι Benito et al. (2019) μελέτησαν τη δυνατότητα αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης φρεσκοκομμένων κόκκινων μήλων, μέσω της ενσωμάτωσης σε αυτά λυκοπενίου. Το λυκοπένιο, που υπό φυσικές συνθήκες δεν υπάρχει στη σάρκα του μήλου, είναι το καροτενοειδές στη φύση με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ειδικά τα *cis*- ισομερή του. Ο φλοιός της τομάτας είναι ένα υποπροϊόν χαμηλού κόστους με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε λυκοπένιο ($7,23 \text{ g kg}^{-1}$). Το λυκοπένιο δύναται να ενσωματωθεί στα τρόφιμα ως αντιοξειδωτικός παράγοντας για την αποφυγή της αμαύρωσης. Στη συγκεκριμένη μελέτη η εκχύλιση του λυκοπενίου από το φλοιό της τομάτας επιτεύχθηκε με θερμική επεξεργασία ($75 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 ώρα), διαδικασία που ευνόησε τον ισομερισμό *trans* – σε – *cis* λυκοπενίου, με την βοήθεια νανοσωματίδιων TiO_2 . Έπειτα τα εκχυλίσματα λυκοπενίου ενθυλακώθηκαν (αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης 92,2%) με τη μέθοδο σύνθετης συσσωμάτωσης. Η ενσωμάτωση των μικροσφαιρών λυκοπενίου στα φρεσκοκομμένα μήλα μείωσε την ενζυμική τους αμαύρωση σε πειράματα που διήρκησαν 9 ημέρες στους $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ χωρίς να επηρεάσουν τη φυσικοχημική ή μικροβιακή τους ποιότητα. Επιπλέον, η ενσωμάτωση μικροσφαιρών λυκοπενίου αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα των κομμένων μηλών έως και 56%. Οι μελετητές κατέληξαν ότι το εκχύλισμα πλούσιο σε λυκοπένιο από απόβλητα τομάτας δύναται να βρει μια πληθώρα εφαρμογών στη βιομηχανία των τροφίμων, ωστόσο απαιτείται βελτιστοποίηση τόσο της διαδικασίας εκχύλισης όσο και της μεθόδου ενθυλάκωσης.

4.2.3 Χρήση ενθυλακωμένων καροτενοειδών καρότου σε τηγανίτες από tapioca

Στην μελέτη των Parente et al. (2021) διερευνήθηκε η χρησιμότητα που μπορεί να αποφέρει η ενίσχυση του παραδοσιακού βραζιλιάνικου κόμμεος μανιόκας και των «τηγανίτων» ταπιόκας με καροτενοειδή από καρότα. Μικροσωματίδια εμπλουτισμένα σε καροτενοειδή παρασκευάστηκαν με συμπύκνωση στερεών από χυμό καρότου χρησιμοποιώντας την μέθοδο σύνθετης συσσωμάτωσης με πρωτεΐνη ορού γάλακτος και αραβικού κόμμεος (ως μέσα εγκλεισμού) σε αναλογία βάρους 1,5:1 και συν-ξηράνθηκαν με άμυλο μανιόκας. Η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή και η σταθερότητα κατά την εφαρμογή του προϊόντος αναλύθηκαν για τα μικροσωματίδια δύο προϊόντων: του κόμμεος μανιόκας και των «τηγανιτών» ταπιόκας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να εφαρμοστεί σύνθετη συσσωμάτωση ως μέθοδος για τη συμπύκνωση του χυμού καρότου, καθώς η απόδοση της αρχικής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή ήταν μεγαλύτερη από 90%. Η

περαιτέρω συν-ξήρανση αμύλου αυτού του υλικού είχε ως αποτέλεσμα να προκύψει ένα μικροσωματίδιο που διατήρησε το 79% της αρχικής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή. Χαμηλά επίπεδα απώλειας καροτενοειδών (22%) παρατηρήθηκαν κατά την παρασκευή «τηγανίτας» ταπιόκας χρησιμοποιώντας το ενισχυμένο κόμμι μανιόκας. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τηγανιτών ταπιόκας ήταν παρόμοιες τόσο όταν χρησιμοποιήθηκαν μικροσωματίδια όσο και με την άμεση προσθήκη χυμού καρότου. Επιπλέον, η χρήση καροτενοειδών σε μορφή ξηρής σκόνης διευκολύνει το χειρισμό και τη δοσολογία σε βιοτεχνικά και βιομηχανικά περιβάλλοντα και διασφαλίζοντας παράλληλα τη στόχευση της ημερήσιας πρόσληψης βιταμίνης Α. Πιο συγκεκριμένα η ενίσχυση του κόμμεος μανιόκας με μικροκάψουλες καροτενοειδών καρότου επιτρέπει την τυποποίηση της συγκέντρωσης της βιταμίνης Α και αυτό διευκολύνει την ακριβή προσέγγιση της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης καροτενοειδών στα προϊόντα ταπιόκας. Αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με τη χρήση χυμού καρότου, που δεν επιτρέπει τέτοια ελεγχόμενη προσθήκη καροτενοειδών. Επίσης, οι μικροκάψουλες είναι ευκολότερες στον χειρισμό και στη δοσολογία σε σχέση με προϊόντα υγρής μορφής υγρά, όπως ο χυμός καρότου που επιπλέον είναι πολύ ογκώδης και ευαίσθητος. Παρατηρήθηκαν μόνο μικρές απώλειες καροτενοειδών μετά την παρασκευή ταπιόκας υπό θερμική διεργασία (22%) και κατά τη διάρκεια αποθήκευσης ενός μήνα του ενισχυμένου κόμμεος μανιόκας στους 10 °C υπό συνθήκες προστασίας από το φως της ημέρας. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες υφής και το χρώμα των ενθυλακωμένων προϊόντων ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα που παρασκευάστηκαν με το χυμό καρότου.

4.2.4 Χρήση ενθυλακωμένης ζεαξανθίνης σε γιαούρτι

Στην μελέτη των De Campo et al. (2019) τα νανοσωματίδια ζεαξανθίνης και τα νανογαλακτώματα ζεαξανθίνης ενσωματώθηκαν στο γιαούρτι. Το γιαούρτι ελέγχου (R), το γιαούρτι που του προστέθηκαν νανοσωματίδια (P) και το γιαούρτι που του προστέθηκαν νανογαλακτώματα (E) αξιολογήθηκαν εβδομαδιαίως όσον αφορά το pH, την τιτλοδοτούμενη οξύτητα, το χρώμα, τις παραμέτρους υφής, το ιξώδες και τη συναίρεση κατά τη διάρκεια 28 ημερών. Η κατακράτηση ζεαξανθίνης στα δείγματα P και E προσδιορίστηκε επίσης κατά την αποθήκευση. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες και η μορφολογία αξιολογήθηκαν σε όλα τα δείγματα γιαουρτιού ενώ η βιοπροσβασιμότητα της ζεαξανθίνης μετά από *in vitro* πέψη αναλύθηκε στα P και E μετά την παρασκευή.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι όλα τα σκευάσματα γιαουρτιού εμφάνισαν μείωση του pH και αύξηση της οξύτητας στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης. Η ενσωμάτωση νανοσωματιδίων ζεαξανθίνης στο γιαούρτι μείωσε την υφή και το ιξώδες και αύξησε τη συναίρεση σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Ωστόσο, αυτές οι τροποποιήσεις δεν γίνονται οπτικά αντιληπτές κατά την αποθήκευση και στην αισθητηριακή ανάλυση. Στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης, η κατακράτηση ζεαξανθίνης ήταν υψηλότερη στο δείγμα P ($22,31 \pm 2,53\%$) από ότι στο δείγμα E ($16,84 \pm 0,53\%$). Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενδεικτικό της αποτελεσματικότητας των νανοσωματιδίων για την προστασία του καροτενοειδούς από την αποικοδόμηση και την εγγύηση της σταθερότητάς του κατά το χρόνο αποθήκευσης, όταν ενσωματώνεται στη μήτρα του γιαουρτιού. Η παρουσία νανοσωματιδίων στο γιαούρτι επιβεβαιώθηκε μέσω χρήσης του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης και παρά τη χαμηλότερη βιοπροσβασιμότητα της ζεαξανθίνης στο P σε σύγκριση με το E, η χρήση του P εξακολουθεί να παρουσιάζει πλεονεκτήματα, λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας που παρέχεται στο καροτενοειδές. Επιπλέον, η βιο-προσβασιμότητα της ζεαξανθίνης στο P υποδηλώνει ότι προώθησε μια ελεγχόμενη απελευθέρωση του καροτενοειδούς στο γιαούρτι. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη εμπλουτισμένων τροφίμων με νανοσωματίδια. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη βελτίωση της γεύσης και της επίγευσης του P, ώστε να είναι αποδεκτό από τους καταναλωτές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα καροτενοειδή ανήκουν αναμφίβολα στην κατηγορία των πιο σημαντικών βιοδραστικών ουσιών. Αυτό αποδεικνύεται στο ότι εκτός από την οργανοληπτική αναβάθμιση που μπορούν να προσδώσουν σε ένα τρόφιμο ως χρωστικές, παρέχουν και δράσεις που προάγουν την υγεία του ανθρώπου. Η πιο χαρακτηριστική από αυτές είναι η αντιοξειδωτική δράση μέσω της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών. Η βιοτεχνολογική παραγωγή των καροτενοειδών μέσω μικροοργανισμών αποτελεί την πιο συμφέρουσα οδό καθώς οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν καλύτερες αποδόσεις ενώ τα προϊόντα τους δεν παρέχουν κινδύνους (π.χ. το συνθετικό β-καροτένιο μπορεί να αποφέρει καρκινογόνο δράση). Ένας αποτελεσματικός τρόπος προκειμένου τα καροτενοειδή να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων είναι μέσω της ενθυλάκωσης. Πρόκειται για μια διαδικασία που μπορεί να αποφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως την προστασία των ενθυλακωμένων ουσιών ή την βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων ενός τρόφιμου. Κυρίως όμως μπορεί να αποφέρει βελτιωμένη σταθερότητα σε ένα προϊόν ακόμα και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του. Δεδομένου ότι η ενθυλάκωση εξελίσσεται συνεχώς έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι εφαρμογής της. Η πιο γνωστή είναι η μέθοδος ξήρανσης με ψεκασμό. Τα πιο διαδεδομένα μέσα για να ενθυλακωθεί ένα καροτενοειδές είναι οι υδατάνθρακες, καθώς αποτελούνται από πολλές ενώσεις (άμυλο, παράγωγα αμύλου, φυτικές ίνες κλπ.) που πληρούν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά. Επίσης, πολλά υποσχόμενη φέρεται να είναι η ανάπτυξη καινούργιων υλικών τοιχώματος με συνδυασμό διαφορετικών μέσων που θα παρέχουν στην δραστική ουσία περισσότερα πλεονεκτήματα. Από τις μελέτες που αναφέρθηκαν, φαίνεται ότι υπάρχουν παράγοντες που πρέπει να επιλυθούν έτσι ώστε να αρχίσουν να εφαρμόζονται στην βιομηχανία τροφίμων. Τα προβλήματα που σίγουρα θα αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικών ερευνών αφορούν κυρίως οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση και όψη των ενθυλακωμένων προϊόντων), αλλά και σταθερότητα των καροτενοειδών στα τρόφιμα. Επιπλέον, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν και κλινικές μελέτες οι οποίες θα αποδεικνύουν τόσο την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας, όσο και την θετική επίδραση στην υγεία του καταναλωτή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agama-Acevedo, E., Bello-Perez, L.A. (2017). Starch as an emulsions stability: The case of octenyl succinic anhydride (OSA) starch. *Current Opinion in Food Science*, 13, 78-83.
- Aizpurua-Olaizola, O., Navarro P., Vallejo A. et al. (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chemistry* 190, 614–621.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8 (1), 1-9.
- Aksu, Z., Eren, AT. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* 40, 2985-2991.
- Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2016). Carotenoid distribution in nature. *Carotenoids in nature*, 3-33.
- Alongi M., Anese M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods* 81, 104466.
- Álvarez, R., Vaz, B., Gronemeyer, H. de Lera, Á.R. (2014). Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chemical Reviews*, 114, 1–125.
- Alves, G.P., Santana, M.H.A. (2004). Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: Structural, thermodynamic and physical properties. *Powder Technology*, 145 (2), 139-148.
- Anal, A.K., Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology* 18, 240–251.
- Anandharamakrishnan, C., Ishwarya, S.P. (2015). *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*. Wiley, London.
- Arenas-Jal, M., Suñé-Negre, J.M., García-Montoya, E. (2020). An overview of microencapsulation in the food industry: opportunities, challenges, and innovations. *European Food Research and Technology* 246, 1371–1382.

- Arof, A.K., Nor, N.M., Ramli, N.R., Noor, I.M., Aziz, N., Taha, R.M. (2018). Color analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) as potential natural colorant. *Pigment & Resin Technology*, 47 (6), 485-489.
- Arzi, R. S., & Sosnik, A. (2018). Electrohydrodynamic atomization and spray-drying for the production of pure drug nanocrystals and co-crystals. *Advanced drug delivery reviews*, 131, 79-100.
- Assadpour, E., Mahdi Jafari, S. (2018). A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59 (19), 3129-3151.
- Augustin, M.A., Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients *Chemical Society Reviews*, 38, 902-912.
- Azizi, M., Motesha, H., Hashemi, M. (2020). Distinctive nutrient designs using statistical approach coupled with light feeding strategy to improve the *Haematococcus pluvialis* growth performance and astaxanthin accumulation. *Bioresource Technology*, 300,1225994.
- Badhani, B., Sharma, N., Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Rsc Advances*, 5(35), 27540-27557.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 143-182.
- Bassijeh, A., Ansari, S., Hosseini, S.M.H. (2020). Astaxanthin encapsulation in multilayer emulsions stabilized by complex coacervates of whey protein isolate and Persian gum and its use as a natural colorant in a model beverage. *Food Research International*. 137, 109689.
- Bayram, Ö.A., Bayram, M., & Tekin, A.R. (2005). Spray drying of sumac flavor using sodium chloride, sucrose, glucose and starch as carriers. *Journal of Food Engineering*, 69(2), 253– 260.
- Bertacchi, S., Bettiga, M., Porro, D., Branduardi, P. (2020). Camelina sativa meal hydrolysate as sustainable biomass for the production of carotenoids by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 1-10.

- Bhandari, B.R., Hartel, R.W. (2002). Co-crystallization of sucrose at high concentration in the presence of glucose and fructose. *Journal of Food Science*, 67 (5), 1797-1802.
- Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28 (3): 325-347.
- Bhosale, P., & Gadre, R. V. (2001). Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Letters in applied Microbiology*, 33(1), 12-16.
- Black, H. (2004). Pro-carcinogenic activity of β -carotene, a putative systemic photoprotectant. *Photochemical Photobiology Science*, 3, 753–758.
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69-74.
- Borba, C.M., Tavares, M.D., Moraes, C.C., Burkert, J.F.M. (2018). Carotenoid production by *Sporidiobolus pararoseus* in agroindustrial medium: Optimization of culture conditions in shake flasks and scale-up in a stirred tank fermenter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 35,509–520.
- Braga, A.B.A.C., Costa, C.J.M., Pomella, A.W.V., Ribeiro, E.J., Santos, L.D., Zotarelli M.F. (2019). Evaluation of lethality temperature and use of different wall materials in the microencapsulation process of *Trichoderma asperellum* conidias by spray drying. *Powder Technology*, 347, 199-206.
- Breithaupt, D.E. (2007). Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 501-506.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenes in relation to function. *The FASEB Journal* 15, 1551–1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (1995). Carotenoids. Volume 1A: isolation and analysis. Biel-Benken, Switzerland: Birkhauser-Verlag, 199-214.
- Britton, G., Pfander, H., & Liaaen-Jensen, S. (Eds.). (1996). Carotenoids, Volume 2: Synthesis (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Burgain, C., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.
- Burton, W.G., Ingold, K.U. (1984). Beta carotene: an unusual type of lipidantioxidant. *Science* 224:569–573.

- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Cheng, M., Wang, J., Zhang, R., Kong, R., Lu, W., & Wang, X. (2019). Characterization and application of the microencapsulated carvacrol/sodium alginate films as food packaging materials. *International journal of biological macromolecules*, 141, 259-267.
- Cheng, S. H., Khoo, H. E., Kong, K. W., Prasad, K. N., & Galanakis, C. M. (2020). Extraction of carotenoids and applications. In *Carotenoids: Properties, Processing and Applications* (pp. 259-288). Academic Press.
- Chezanoglou, E., Goula, A.M. (2021). Co-crystallization in sucrose: A promising method for encapsulation of food bioactive components. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 262-274.
- Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, 2(4), 426-442.
- Ciurzynska, A., Lenart, A. (2011). Freeze-drying-application in food processing and biotechnology-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 61 (3), 165-171.
- Coronel-Aguilera, C.P., San Martín-González, M.F. (2015). Encapsulation of spray dried β -carotene emulsion by fluidized bed coating technology. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 187–193.
- Corrêa-Filho, L. C., Lourenço, M. M., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Microencapsulation of β -carotene by spray drying: effect of wall material concentration and drying inlet temperature. *International journal of food science*, 2019.
- Corrêa-Filho, L., Lourenço, S., Duarte, D., Moldão-Martins, M., Alves, V. (2019). Microencapsulation of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Pomace Ethanolic Extract by Spray Drying: Optimization of Process Conditions. *Applied Sciences*, 9 (3), 612.
- Czerniak, A., Kubiak, P., Białas, W., Jankowski, T. (2015). Improvement of oxidative stability of menhaden fish oil by microencapsulation within biocapsules formed of yeast cells. *Journal of Food Engineering*, 167 (Part A): 2-11.

- De Campo, C., Assis, R.Q., da Silva, M.M, Costa, T.M.H, Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., De Oliveira Rios A., Hickmann Flôres, S.H. (2019). Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: Influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis. *Food Chemistry*, 301, 125230.
- Deladino, L. Teixeira, A.S. Navarro, A.S. Alvarez, I. Molina-García, A.D. Martino, M. (2015). Corn starch systems as carriers for yerba mate (*Ilex paraguariensis*) antioxidants. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 463–472.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 22, 179-192.
- Dias, A.R.G., Zavareze, E.D.R., Helbig, E., Moura, F.A., Vargas, C.G., Ciacco, C.F. (2011). Oxidation of fermented cassava starch using hydrogen peroxide. *Carbohydrate Polymers*, 86, 185-191.
- Dias, M. I., Ferreira, I. C., & Barreiro, M. F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food & function*, 6(4), 1035-1052.
- Dos Santos, P. P., Andrade, L. D. A., Flôres, S. H., & Rios, A. D. O. (2018). Nanoencapsulation of carotenoids: A focus on different delivery systems and evaluation parameters. *Journal of food science and technology*, 55(10), 3851-3860.
- Edge, R., & Truscott, T. G. (2018). Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids—a review. *Antioxidants*, 7(1), 5.
- El-Banna, A.A., El-Razek, A.M., El-Mahdy, A.R. (2012). Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food Nutrition and Science*. 3, 64–71.
- Esser-Kahn, A. P., Odom, S. A., Sottos, N. R., White, S. R., & Moore, J. S. (2011). Triggered release from polymer capsules. *Macromolecules*, 44(14), 5539-5553.
- Fang, X., Kikuchi, S., Shima, M., Kadata, M., Tsuno, T., & Adachi, S. (2006). Suppressive effect of alkyl ferulate on the oxidation of microencapsulated linoleic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(2), 97– 102.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 510-523.

- Farombi, E. O., & Britton, G. (1999). Antioxidant activity of palm oil carotenes in organic solution: effects of structure and chemical reactivity. *Food Chemistry*, 64(3), 315-321.
- Feng, Z.Z., Li, M.Y., Wang, Y.T., Zhu, M.J. (2018). Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: Microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. *LWT – Food Science and Technology*, 96, 152-160.
- Flores-Luna, C.H., Cordova-Ramirez, J.J., Ortiz-Pelayo, C., Femat, R., Lopez-Herrera, E.J. (2010). Batch and Fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using yucca fillifera date juice as substrate. *Biochemical engineering journal*, 53(1), 131-136.
- Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V., & Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and bioproducts processing*, 90(3), 413-424.
- Furuta, T. (2008). Microencapsulation of flavors and oil by cyclodextrin. Diss. Tottori University, nd Web.
- Galeotti, T., Calviello, G., Palozza, P., & Gaetani, S. (2003). Editorial| Molecular Aspects of Medicine-Volume 24, Issue 6. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 315-316.
- Gamboa, O. D., Gonçalves, L. G., Grosso, C. F. (2011). Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. *Procedia Food Science*, 1, 1732-1739.
- Gaonkar, A. G., Vasisht, N., Khare, A. R., & Sobel, R. (Eds.). (2014). *Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide*. Elsevier Science.
- Gibbs, F., Kermasha, S., Alli I., Mulligan Catherine, N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50, 213-224.
- Giuffrida, D, Zoccali, M, Mondello, L. (2020) Recent developments in the carotenoid and carotenoid derivatives chromatography-mass spectrometry analysis in food matrices. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 132, 116047.
- Gonçalves, A., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2016). Microencapsulation of vitamin A: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 76-87.

- Gonzalez-Soto, R.A., de la Vega, B., García-Suarez, F.J., Agama-Acevedo, E., Bello-Pérez L.A. (2011). Preparation of spherical aggregates of taro starch granules. *LWT - Food Science and Technology* 44(10), 2064–2069.
- Goodwin, T. W. (1980). Biosynthesis of carotenoids. In *The biochemistry of the carotenoids* (pp. 33-76). Springer, Dordrecht.
- Goodwin, T. W. (1993). [29] Biosynthesis of carotenoids: An overview. *Methods in enzymology*, 214, 330-340.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (7–8), 330-347.
- Grashorn, M. (2016). Feed additives for influencing chicken meat and egg yolk color. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (pp. 283-302). Woodhead Publishing.
- Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A. C., Stahl, W., Tang, G., ... & Biesalski, H. K. (2010). β -Carotene is an important vitamin A source for humans. *The Journal of nutrition*, 140(12), 2268S-2285S.
- Gul, K., Tak, A., Singh, A. K., Singh, P., Yousuf, B., & Wani, A. A. (2015). Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene-A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1018696.
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter* 12, 2826–2841,
- Gur, J., Mawuntu, M., & Martirosyan, D. (2018). FFC's advancement of functional food definition. *Functional Foods in Health and Disease*, 8(7), 385-397.
- Hannibal, L., Lorquin, J., D' Ortoli, N.A., García, N., Chaintreuil, C., Masson-Boivin, C., Dreyfus, B., Giraud, E. (2000). Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3850-3853.
- Hassaan, M.S, Mohammady, E.Y., Soaudy, MR, Sabae, S.A., Mahmoud A.M.A., El-Haroun, E.R. (2021). Comparative study on the effect of dietary β -carotene and phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 108, 63-72.

- Horuz, T. İ., & Belibağlı, K. B. (2018). Nanoencapsulation by electrospinning to improve stability and water solubility of carotenoids extracted from tomato peels. *Food chemistry*, 268, 86-93.
- Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Pérez, L. A., Alvarez-Ramirez, J., & Garcia, H. S. (2018). Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food reviews international*, 34(2), 148-161.
- Huq, T., Fraschini, C., Khan, A., Riedl, B., Bouchard, J., Lacroix, M. (2017). Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate Polymers*, 168, 61-69.
- Igreja, W. S., Maia, F. D. A., Lopes, A. S., & Chisté, R. C. (2021). Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8819.
- Igreja, W. S., Maia, F. D. A., Lopes, A. S., & Chisté, R. C. (2021). Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8819.
- Imran, M., Revol-Junelles, A.M., Paris, C., Guedon, E., Linder, M., Desobry, S. (2015). Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 62 (1), 341-349.
- Jackson, L.S., Lee, K. (1991). Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 24 (4), 289-297.
- Janaswamy, S. (2014). Encapsulation altered starch digestion: Toward developing starch-based delivery systems. *Carbohydrate polymers*, 101, 600-605.
- Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M., Petit, T. (2020). Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: Advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8, 1–48.
- Jennings, V., Thünemann, A. F., & Gohla, S. H. (2000). Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, 199(2), 167–177.

- Jorgensen, K., Skibsted, L. H. (1993). Carotenoid scavenging of radicals-effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z Lebensm Unters Forsch.* 196(5):423-9.
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125(4), 1267–1272.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3, 39-48.
- Kaur, P., Elsayed, A., Subramanian, J., & Singh, A. (2021). Encapsulation of carotenoids with sucrose by co-crystallization: Physicochemical properties, characterization and thermal stability of pigments. *LWT*, 140, 110810.
- Keogh, M.K., O’Kennedy, B.T. (1999) Milk fat microencapsulation using whey proteins *International Dairy Journal*, 9, 657-663.
- Kim, S. J., GEUN-JOONG, K. I. M., DON-HEE, P. A. R. K., & YEON-WOO, R. Y. U. (2003). High-level production of astaxanthin by fed-batch culture of mutant strain *Phaffia rhodozyma* AJ-6-1. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(2), 175-181.
- Kiokias, S., & Gordon, M. H. (2004). Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Reviews International*, 20(2), 99-121.
- Kolanowski, W. (2005). Bioavailability of omega-3 PUFA from foods enriched with fish oil: A mini review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(4), 335.
- Kong, L., Bhosale, R., & Ziegler, G. R. (2018). Encapsulation and stabilization of β -carotene by amylose inclusion complexes. *Food Research International*, 105, 446-452.
- Krishnan, S., Bhosale, R., & Singhal, R. S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61, 95– 102.
- Lacerda, E. C. Q., de Araujo Calado, V. M., Monteiro, M., Finotelli, P. V., Torres, A. G., & Perrone, D. (2016). Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohydrate polymers*, 151, 500-510.
- Lakkis, J.M. (2007). *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

- Laokuldilok, N., Thakeow, P., Kopermsub, P., & Utama-Ang, N. (2016). Optimisation of microencapsulation of turmeric extract for masking flavour. *Food Chemistry*, 194, 695-704.
- Li, C., Swofford, C. A., & Sinskey, A. J. (2020). Modular engineering for microbial production of carotenoids. *Metabolic Engineering Communications*, 10, e00118.
- Liu, C., Hu, B., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H. (2021). Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology*, 337, 125398.
- Liu, C., Hu, B., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H. (2021). Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology*, 337, 125398.
- Liu, S., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2010). Entrapment of flaxseed oil within gelatin-gum arabic capsules. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(7), 809-815.
- Liu, Y. Q., Davis, C. R., Schmaelzle, S. T., Rocheford, T., Cook, M. E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). β -Cryptoxanthin biofortified maize (*Zea mays*) increases β -cryptoxanthin concentration and enhances the color of chicken egg yolk. *Poultry Science*, 91(2), 432-438.
- Locascio, A., Andrés-Colás, N., Mulet, J. M., & Yenush, L. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to investigate plant potassium and sodium transporters. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2133.
- Loksuan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food hydrocolloids*, 21(5-6), 928-935.
- López-Córdoba, A., & Navarro, A. (2018). Physicochemical properties and stability of sucrose/glucose agglomerates obtained by cocrystallization. *Journal of Food Process Engineering*, 41(8), e12901.
- López-Córdoba, A., Deladino, L., Agudelo-Mesa, L., & Martino, M. (2014). Yerba mate antioxidant powders obtained by co-crystallization: Stability during storage. *Journal of Food Engineering*, 124, 158-165.
- Loret, C., Meunier, V., Frith, W.J., Fryer, P.J. (2004). Rheological characterization of the gelation behaviour of maltodextrin aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 57, 153-163.

- Lourenço-Lopes, C., Carreira-Casais, A., Fraga-Corral, M., Garcia-Oliveira, P., Soria, A., Jarboui, A., Barral, M., Otero P., Prieto, M. (2021). Carotenoids as Natural Colorful Additives for the Food Industry.
- Łozińska, N., Głowacz-Różyńska, A., Artichowicz, W., Lu, Y., Jungnickel, C. (2020). Microencapsulation of fish oil – determination of optimal wall material and encapsulation methodology. *Journal of Food Engineering*, 268(2), 109730.
- Lu, W., Yang, X., Shen, J., Li, Z., Tan, S., Liu, W., & Cheng, Z. (2021). Choosing the appropriate wall materials for spray-drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. *Powder Technology*, 394, 562-574.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International journal of biological macromolecules*, 85, 379-385.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Drying technology*, 32(5), 509-518.
- Malisorn, C., & Suntornsuk, W. (2008). Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 99(7), 2281-2287.
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M., Cifuentes, V. (2011). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin: biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 11, 190.
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., & Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95, S338-S342.
- Martínez-Cámara, S., Ibañez, A., Rubio, S., Barreiro, C., Barredo, J. L. (2021). Main carotenoids produced by microorganisms. *Encyclopedia*, 1(4), 1223-1245.
- Martínez-Hernández, G. B., Castillejo, N., & Artés-Hernández, F. (2019). Effect of fresh-cut apples fortification with lycopene microspheres, revalorized from tomato by-products, during shelf life. *Postharvest Biology and Technology*, 156, 110925.

- Martins, L.C., Palma, M., Angelov, A., Nevoigt, E., Liebl, W., Sá-Correia, I. (2021). Complete Utilization of the Major Carbon Sources Present in Sugar Beet Pulp Hydrolysates by the Oleaginous Red Yeasts. *Journal of Fungi*, 7, 215.
- Martins, V., Dias, C., Caldeira, J., Duarte, L. C., Reis, A., & da Silva, T. L. (2018). Carob pulp syrup: A potential Mediterranean carbon source for carotenoids production by *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology Reports*, 3, 177-184.
- Martirosyan, D.M., Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: What makes a new definition of functional food unique? *Functional Foods in Health and Disease*, 5, 209-223.
- Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-11.
- Mendes-Silva, T. C. D., Vidal, E. E., de Souza, R. F. R., Schmidt, K. C., Mendes, P. V. D., da Silva Andrade, R. F., da Silva, Oliveira, F. G., de Lucena, B. T. L., de Oliveira, M. B. M., dos Santos Correia, M. T., da Silva, M. V. (2021). Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. *Electronic Journal of Biotechnology*, 53, 44-53.
- Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and applied chemistry*, 63(1), 141-146.
- Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., Bergenståhl, B. (2001). Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 21(1-3), 47-58.
- Mokhtari, S., Jafari, S. M., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., & Ghorbani, M. (2017). The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel wall material for encapsulation of probiotics. *Food Research International*, 96, 19-26.
- Moliné, M., Flores, M. R., Libkind, D., Carmen Diéguez, M. D. C., Farías, M. E., & van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(8), 1145-1151.
- Moraes, M., Carvalho, J.M.P., Silva, C.R., Cho, S., Sola, M.R., Pinho, S.C. (2013). Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes

method: Characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *International Journal of Food Science and Technology*, 48 (2), 274-282.

- Mordi, R. C., Ademosun, O. T., Ajanaku, C. O., Olanrewaju, I. O., & Walton, J. C. (2020). Free radical mediated oxidative degradation of carotenes and xanthophylls. *Molecules*, 25(5), 1038.
- Moreno, J.A., Díaz-Gómez, J., Fuentes-Font, L., Angulo, E., Gosálvez, L.F., Sandmann G, Portero-Otin, M., Capell, T., Zhu, C., Christoue, P., Nogareda, C. (2020). Poultry diets containing (keto)carotenoid-enriched maize improve egg yolk color and maintain quality. *Animal Feed Science and Technology*. 260, 114334.
- Mozafari, M.R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., Demetzos, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. (2008). *Journal of Liposome Research*, 18 (4), 309-327.
- Müller, R. H., Radtke, M., Wissing, S. A. (2002). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2), 121–128.
- Mussagy, C. U., Khan, S., & Kot, A. M. (2021). Current developments on the application of microbial carotenoids as an alternative to synthetic pigments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.
- Nasrabadi, M. R. N., & Razavi, S. H. (2010). Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109(4), 361-368.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Ng, I. S., Keskin, B. B., & Tan, S. I. (2020). A critical review of genome editing and synthetic biology applications in metabolic engineering of microalgae and cyanobacteria. *Biotechnology Journal*, 15(8), 1900228.
- Nogueira, M. B., Prestes, C. F., & BURKERT, J. F. D. M. (2017). Microencapsulation by lyophilization of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* with soy protein as the encapsulating agent. *Food Science and Technology*, 37, 1-4.

- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine drugs*, 17(11), 640.
- Ordoñez, M., Herrera, A. (2014). Morphologic and stability cassava starch matrices for encapsulating limonene by spray drying. *Powder Technology*, 253, 89–97.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., & Abalde, J. J. B. T. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 96(3), 373-378.
- Özkan, G., & Bilek, S. E. (2014). Microencapsulation of natural food colourants. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3), 145-156.
- Palma-Rodriguez, H.M., Agama-Acevedo, E., Gonzalez-Soto, R.A., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., Bello-Perez, L.A. (2013). Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from different botanical sources. *Starch-Stärke*, 65, 584–592.
- Parente, G. D. L., de Melo, B. D. N., de Souza, J. A., da Conceição, M. M., Ubbink, J., & Braga, A. L. M. (2021). Fortification of traditional tapioca “pancakes” from the Brazilian northeast with microencapsulated carrot carotenoid. *LWT*, 152, 112301.
- Peng, H., Xiong, H., Li, J., Chen, L., & Zhao, Q. (2010). Methoxy poly (ethylene glycol)-grafted-chitosan based microcapsules: Synthesis, characterization and properties as a potential hydrophilic wall material for stabilization and controlled release of algal oil. *Journal of food engineering*, 101(1), 113-119.
- Pieczykolan, E., Kurek, M.A. (2019). Use of guar gum, gum Arabic, pectin, beta-glucan and inulin for microencapsulation of anthocyanins from chokeberry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 665-671.
- Pimparade, M.B., Morott, J.T., Park, J-B., Kulkarni, V.I., Majumdar, S., Murthy, S., Lian, Z., Pinto, E., Bi, V., Durig, T. (2015). Development of taste masked caffeine citrate formulations utilizing hot melt extrusion technology and in vitro-in vivo evaluations. *International journal of pharmaceutics*, 487, 167–176.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8416763.

- Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 517-523.
- Rakmai, J., Cheirsilp, B., Mejuto, J. C., Simal-Gándara, J., Torrado-Agrasar, A. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Industrial Crops and Products*, 111, 219–225.
- Rana, B., Bhattacharyya, M., Patni, B., Arya, M., & Joshi, G. K. (2021). The realm of microbial pigments in the food color market. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 603892.
- Rapoport, A., Guzhova, I., Bernetti, L., Buzzini, P., Kieliszek, M., & Kot, A. M. (2021). Carotenoids and some other pigments from fungi and yeasts. *Metabolites*, 11(2), 92.
- Rascón, M.P., Beristain, C.I., García, H.S., Salgado, M.A. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and soy protein isolate as wall materials. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 549-557.
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76-83.
- Rehman, A., T. Ahmad, R. M. Aadil, M. J. Spotti, A. M. Bakry, I. M., Khan, L., Zhao, T. Riaz, Q. Tong. 2019. Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science and Technology* 90:35–46.
- Ribeiro, J. S., & Veloso, C. M. (2021). Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, 112, 106374.
- Rocha, G.A., Fávaro-Trindade, C.S., Grosso, C.R.F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*. 90 (1), 37-42.
- Rosa, J.R., Nunes, G.L., Motta, M.H., Fortes, J.P., Weis, G.C.C., Hecktheuer L.H.R., et al. (2019). Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions *Food Hydrocolloids*, 89, 742-748.
- Rosolen, M.D., Weber Bordini, F., Diazde Oliveira, P., Rochedo Conceição, F., Scherer Pohndorf, R., Fiorentini, A.M., Padilha da Silva, W., Pieniz, S. (2019).

Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. LWT-Food Science and Technology, 115, 108411.

- Rudke A.R., Heleno S.A., Fernandes I.P., Prieto M.A., Gonçalves O.H. Rodrigues A.E., Ferreira I.C.F.R., Barreiro M.F. (2019). Microencapsulation of ergosterol and *Agaricus bisporus* L. extracts by complex coacervation using whey protein and chitosan: Optimization study using response surface methodology. LWT – Food Science and Technology, 103, 228-237.
- Saenz, C., Tapia, S., Chavez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) Food Chemistry, 14, 616-622.
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. Food chemistry, 240, 90-103.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Tada, A., Miki, W., & Komemushi, S. (2001). Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. Journal of bioscience and bioengineering, 92(3), 294-297.
- Sakaki, H., Nochide, H., Komemushi, S., & Miki, W. (2002). Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. Journal of bioscience and bioengineering, 93(3), 338-340.
- Sanjay, D., Manohar, S.R. Bhanudas. (2014). Pharmaceutical cocrystallization: A review. Indiana: Journal of Advanced Pharmacy Education & Research, 4 (4).
- Santos, P.D.F., Rubio, F.T.V., Balieiro, J.C.C., Thomazini, M., Favaro-Trindade, C.S. (2021). Application of spray drying for production of microparticles containing the carotenoid-rich tucumã oil (*Astrocaryum vulgare* Mart). LWT-Food Science and Technology, 143.
- Savjani, J. K. (2015). Co-crystallization: An approach to improve the performance characteristics of active pharmaceutical ingredients. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP), 147-151.
- Sen, T., Barrow, C. J., Deshmukh, S. K. (2019). Microbial pigments in the food industry-challenges and the way forward. Front. Nutr. 6, 1–14.
- Simpson, K. L., Nakayama, T. O. M., & Chichester, C. O. (1964). Biosynthesis of yeast carotenoids. Journal of bacteriology, 88(6), 1688-1694.
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., Ma, X. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohydrate Polymers, 96(1), 181–189.

- Spada, J.C. Noreña, C.P.Z. Marczak, L.D.F. Tessaro, I.C. (2012) Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydr. Polym.*, 89(4), 1166–1173.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- Stern, D. (Ed.). (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes: Volume 2 (Vol. 2)*. Academic Press.
- Stoll, L., Costa, T.M.H., Jablonski, A., Flores, S.H., Rios, A.O. (2016). Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 172-181.
- Stoll, L., Rech, R., Flôres, S. H., Nachtigall, S. M. B., & de Oliveira Rios, A. (2019). Poly (acid lactic) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. *Food chemistry*, 281, 213-221.
- Storz, E., Steffens, K.J. (2004). Feasibility study for determination of the dextrose equivalente (DE) of starch hydrolysis products with near-infrared spectroscopy (NIRS) *Starch Staerke*, 56, 58-62.
- Sutter, S. C., Buera, M. P., Elizalde, B. E. (2007). β -carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1-2), 45-54.
- Sutter, S.C., Buera, M.P., Elizalde, B.E. (2007). β -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. *International Journal of Pharmaceutics*, 332 (1–2), 45-54.
- Sweedman, M.C., Tizzotti, M.J., Schäfer, C., Gilbert, R.G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review *Carbohydrate Polymers*, 92, 905-920.
- Taylor, T.M., Weiss, J., Davidson, P.M., Bruce, B.D. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (7–8), 587-605.
- Terao, J. (1989) Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids* 24, 659–661
- Thompson, A.K., Mozafari, M.R., Singh, H. (2007). The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques. *Le Lait*, 87 (4–5), 349-360.

- Tinoi, J., Rakariyatham, N., Deming, R. L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40(7), 2551-2557.
- Toniazzo, T., Berbel, I.F., Cho, S., Trindade, C.S.F., Moraes, I.C., Pinho, S.C. (2014). β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. *LWT-food science and technology*, 59 (2), 1265-1273.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food research international*, 43(3), 907-914.
- Valduga E., Tatsch P.O., Tiggemann L., Zeni J., Colet R., Cansian J.M., Treichel H., Luccio M. (2009). Evaluation of the conditions of carotenoids production in a synthetic medium by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in a bioreactor. *International journal of food science & technology*, 44(12), 2445-2451.
- Valduga, E., Tatsch, P., Vanzo, L. T., Rauber, F., Di Luccio, M., & Treichel, H. (2009). Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(6), 1060-1065.
- Vijayalakshmi, G., Shobha, B., Vanajakshi, V., Divakar, S., & Manohar, B. (2001). Response surface methodology for optimization of growth parameters for the production of carotenoids by a mutant strain of *Rhodotorula gracilis*. *European Food Research and Technology*, 213(3), 234-239.
- Vimala Bharathi, S. K., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2018). Nano and microencapsulation using food grade polymers. In *Polymers for food applications* (pp. 357-400). Springer, Cham.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. E. (2010). Materials for encapsulation. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 31-100). Springer, New York, NY.
- Wang, W., Jung, J., Zhao Y. (2017). Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1246-1253.
- Wegmüller, R., Zimmermann, M. B., Bühr, V. G., Windhab, E. J., & Hurrell, R. F. (2006). Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing

iron, iodine, and vitamin A for use in food fortification. *Journal of Food Science*, 71(2), S181–S187.

- Wei, Z., & Huang, Q. (2019). Assembly of protein–polysaccharide complexes for delivery of bioactive ingredients: A perspective paper. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(5), 1344-1352.
- Wusigale, Liang L., Yangchao Luo. (2020). Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 391-403.
- Xia, F., Hu, D., Jin, H., Zhao, Y., Liang, J. (2012). Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. *Food Hydrocolloids*, 26 (2), 456-463.
- Xu, J., Wei, R., Jia, Z., Song, R. (2020). Characteristics and bioactive functions of chitosan/gelatin-based film incorporated with ϵ -polylysine and astaxanthin extracts derived from by-products of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Hydrocolloids*, 100, 105436.
- Xue, J., Xie, J., Liu, W., Xia, Y. (2017). Electrospun nanofibers: New concepts, materials, and applications. *Accounts of Chemical Research*, 50 (8): 1976-1987.
- Yabe T. (2018). New understanding of pectin as a bioactive dietary fiber. *Journal of Food Bioactives*, 3, 95-100.
- Yen, H. W., & Zhang, Z. (2011). Enhancement of cell growth rate by light irradiation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource technology*, 102(19), 9279-9281.
- Yi, J., Lam, T. I., Yokoyama, W., Cheng, L. W., & Zhong, F. (2014). Controlled release of β -carotene in β -lactoglobulin–dextran-conjugated nanoparticles' in vitro digestion and transport with Caco-2 monolayers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(35), 8900-8907.
- Young A.J., Lowe, G.L. (2018) Carotenoids-Antioxidant properties. *Antioxidants*, 7(2), 28.
- Zhang, Y., Lim, C.T., Ramakrishna, S., Huang, Z.M. (2005). Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16 (10), 933-946.
- Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., Sun, J. (2011). Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *Journal of Food Engineering*, 104, 89-95.

- Zhou, Q., Yang, L., Xu, J., Qiao, X., Li, Z., Wang, Y., Xue, C. (2018). Evaluation of the physicochemical stability and digestibility of microencapsulated esterified astaxanthins using in vitro and in vivo models. *Food Chemistry*, 260, 73-81.
- Ziegler, R. G. (1991). Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *The American journal of clinical nutrition*, 53(1), 251S-259S.
- Zimmer, T. B. R., Mendonça, C. R. B., & Zambiasi, R. C. (2022). Methods of protection and application of carotenoids in foods-A bibliographic review. *Food Bioscience*, 101829.
- Zuidam, N.J., Heinrich, J. Encapsulation of aroma Zuidam, N.J., Nedovic V.A. (Eds.). (2009). *Encapsulation technologies for food active ingredients and food processing*, Springer, Dordrecht, Netherlands, 127-160.

ΑΓΓΛΙΚΕΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

- Biochemistry “Bonding between amylopectin and amylose” <https://chemistry.stackexchange.com/questions/58080/bonding-between-amylopectin-and-amylose> 14 June 2022.
- Grand View Research, 2015, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/carotenoids-market>. 10 May 2022.
- Pharma excipients, <https://www.pharmaexcipients.com/news/cannabinoid-liposome-formulations/>. 19 September 2022

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2014). *Χημεία τροφίμων*. 4^η Έκδοση.
- Αναγνωστοπούλου Ελένη Μαρία. (2020). *Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και βιοχρωστικών*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Μεταπτυχιακή Μελέτη.
- Θανάσης Βαλαβανίδης, Καθηγητής - Κωνσταντίνος Ευσταθίου, Καθηγητής. (2013). *Η χημική ένωση του μήνα*. 4/4/2022.