



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάπτυξη βιοσυμβατών νανοδιασπορών για εφαρμογή σε
ιχθυοκαλλιέργειες και προμελέτη σκοπιμότητας για την ανάπτυξη νέου
προϊόντος**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ', ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

ΘΕΟΧΑΡΗ ΙΩΑΝΝΑ

A.M. 0007

ΑΘΗΝΑ, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF BIOLOGY, MEDICINAL CHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

Development of biocompatible nanodispersions for application in fish farming – Preliminary Feasibility study for a new product

SUPERVISOR: RESEARCHER C', VASSILIKI PAPADIMITRIOU

IOANNA THEOCHARI

A.M. 00007

ATHENS, 2017

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Βασιλική Παπαδημητρίου	Ερευνήτρια Γ'	
Βασιλική Πλέτσα	Ερευνήτρια Γ'	
Αικατερίνη Μούτου	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου, Ερευνήτρια Γ', που μου ανέθεσε την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ίδια καθώς και στον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, Διευθυντή Ερευνών για τις γνώσεις που μου προσέφεραν, για τις πολύτιμες συμβουλές τους, τη συμπαράστασή τους σε κάθε βήμα της εργασίας αυτής, καθώς για τη βοήθειά τους στην διεκπεραίωσή της. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Βασιλική Πλέτσα, Ερευνήτρια Γ', την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αικατερίνη Μούτου και τον Δρ. Παναγιώτη Χουντάλα για την συνεπή και συνεχή καθοδήγηση τους, καθώς ήταν πάντοτε διαθέσιμοι να μου προσφέρουν τη βοήθειά τους και τις γνώσεις τους σε όλα τα στάδια της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα επιθυμούσανα ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, ιδιαιτέρως όμως την Δρ. Μαρία Χατζηδάκη και την Υποψήφια Διδάκτωρα Ευγενία Μήτσου, οι οποίες με ενθάρρυναν σε καθημερινή βάση και μου προσέφεραν τις γνώσεις τους, τις συμβουλές τους, την καθημερινότητα, τον χρόνο και την υποστήριξή τους.

**Στον σύζυγό μου,
για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξή του**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ.....	6
ΣΚΟΠΟΣ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. Η ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΩΣ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟΣ ΚΛΑΔΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ.....	10
2.1 Η ιχθυοκαλλιέργεια στην Μεσόγειο σήμερα.....	10
2.2 Η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα.....	11
2.2.1 Ορισμός αγοράς στην Ελλάδα.....	11
2.2.2 Κατηγορίες Υδατοκαλλιέργειας.....	12
2.2.3 Ανταγωνισμός, δυνητικοί πελάτες και προμηθευτές	14
2.3 Η παραγωγή ιχθυοτροφών στην Ελλάδα.....	15
2.4 Η διατροφή των ιχθυδίων τσιπούρας και λαβρακίου.....	17
2.4.1 Ο ρόλος της ζωντανής τροφής στη διατροφή των ιχθυδίων	17
2.4.2 Τεχνητή τροφή.....	18
2.4.3 Μορφολογία πεπτικού συστήματος των ιχθύων	18
2.5 Θρυψίνη: Δομή και λειτουργία.....	20
3. ΝΑΝΟΔΙΑΣΠΟΡΕΣ & ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	22
3.1 Μικρογαλακτώματα.....	23
3.2 Νανογαλακτώματα.....	25
3.3 Συστατικά Μικρογαλακτωμάτων.....	26
3.3.1 Έλαιο	26
3.3.2 Επιφανειοενεργές Ουσίες	26
3.3.3 Συνεπιφανειοενεργές Ουσίες	27
3.4 Μικρογαλακτώματα Λεκιθίνης	28
3.5 Χρήσεις της λεκιθίνης	28
3.6 Εφαρμογές μικρογαλακτωμάτων.....	29
3.6.1 Εφαρμογή στην κοσμητολογία.....	29
3.6.2 Φαρμακολογική Εφαρμογή	29
3.6.3 Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων	30
4. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31

4.1 Υλικά	31
4.1.1 Έλαια και επιφανειοενεργά.....	31
4.1.2 Ένζυμο	31
4.1.3 Υδατική φάση	31
4.1.4 Αντιδραστήρια κινητικής μελέτης.....	31
4.2 Μέθοδοι	32
4.2.1. Τριγωνικό Διάγραμμα Φάσεων.....	33
4.2.2 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων	34
4.2.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός.....	35
4.2.4 Ενζυμική υδρόλυση σε μικρογαλακτώματα	36
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
5.1 Δομική μελέτη μικρογαλακτώματος.....	38
5.1.1 Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσης.....	38
5.1.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	40
5.2 Κινητική μελέτη ενζυμικής αντίδρασης.....	42
6. ΧΡΗΜΑΤΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟ ΠΛΑΝΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	47
6.1 Εξοπλισμός.....	48
6.2 Πρώτες ύλες.....	48
6.3 Ανθρώπινο δυναμικό	49
6.4 Λειτουργικά κόστη.....	49
6.5 Κεφάλαιο Κίνησης.....	49
6.6 Τιμολόγηση	50
6.7 Προβλεπόμενα έσοδα	51
6.8 Σύγκριση τεχνητής ιχθυοτροφής με νέα εμπλουτισμένη τεχνητή ιχθυοτροφή..	51
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΚΟΣΤΗ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΕΞΟΔΑ.....	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ – ΔΑΝΕΙΑ.....	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ – ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΚΙΝΗΣΗΣ & ΕΣΟΔΑ.....	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV – ΤΑΜΕΙΑΚΕΣ ΡΟΕΣ	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V – ΛΟΓΑΡΙΑΣΜΟΙ ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗΣ.....	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συγκεκριμένη μελέτη αφορά στην ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος που βασίζεται σε νανοδιασπορές ώστε να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικό διατροφής με εφαρμογή στην ιχθυοκαλλιέργεια. Οι νανοδιασπορές που αναπτύχθηκαν είναι βιοαποικοδομήσιμες, σταθερές στις συνθήκες του οργανισμού δέκτη, μη τοξικές (ακόμα και αν χρησιμοποιούνται παρατεταμένα) και αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα της βιοδραστικής ουσίας στον οργανισμό του ιχθύος. Αναπτύχθηκαν μικρογαλακτώματα τύπου νερό-σε-έλαιο (W/O) στα οποία πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση θρυψίνης, ένα από τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία του πεπτικού συστήματος των ιχθυδίων. Τα μικρογαλακτώματα W/O αποτελούν μια ειδική κατηγορία κολλοειδών που χαρακτηρίζονται από λεπτότατη διασπορά υδατικής φάσης σε ελαιώδη με μορφή σταγονιδίων σταθεροποιούμενα από μονοστιβάδα επιφανειοενεργών. Οι νανοδιασπορές αυτές αποτελούν ένα μέσο για τη διάλυτοποίηση και διασπορά, σε μη πολικό περιβάλλον, ουσιών με υδρόφιλο χαρακτήρα όπως τα ένζυμα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε δομική μελέτη των μικρογαλακτωμάτων απουσία και παρουσία της βιοδραστικής ουσίας. Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενζυμική υδρόλυση πρότυπου υποστρώματος της θρυψίνης στο περιβάλλον των μικρογαλακτωμάτων και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές. Η δομική μελέτη διενεργήθηκε με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) η οποία έδωσε πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος της διεσπαρμένης φάσης (νανοσταγονίδια νερού), την ομοιογένεια και τη σταθερότητα του συστήματος. Η μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας της ενθυλακωμένης θρυψίνης καθώς και ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών έγινε φασματοφωτομετρικά καθώς τα μικρογαλακτώματα είναι συστήματα διαυγή και επιτρέπουν την παρακολούθηση των αντιδράσεων με τρόπο ανάλογο των υδατικών διαλυμάτων.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε έρευνα και μελέτη της αγοράς των ιχθυοκαλλιεργειών και των ιχθυοτροφών σε εγχώριο επίπεδο και επίπεδο Μεσογείου. Προσδιορίστηκε το μέσο κόστος παραγωγής των ιχθυοτροφών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία και διενεργήθηκε προμελέτη σκοπιμότητας σχετικά με την είσοδο ενός νέου προϊόντος στην αγορά, βασισμένου στην τεχνολογία των μικρογαλακτωμάτων.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Νανοδιασπορές, Μικρογαλάκτωμα, Θρυψίνη, Λεκιθίνη,
Ιχθυοτροφή

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη βιοσυμβατών νανοδιασπορών για τον εγκλωβισμό και τη μεταφορά ενζύμου (θρυψίνη), ώστε να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικά διατροφής με εφαρμογή στην ιχθυοκαλλιέργεια. Η θρυψίνη, που έχει ενθυλακωθεί στα μικρογαλακτώματα που αναπτύχθηκαν, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία του πεπτικού συστήματος των ιχθυδίων. Παρόλα αυτά, οι συμβατικές ιχθυοτροφές αποτελούνται από ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια, δημητριακά, φυτικές πρωτεΐνες και προϊόντα ελαιούχων σπόρων που δεν διαθέτουν κάποιο από τα ένζυμα που απαιτούνται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι εταιρείες παραγωγής και εκτροφής ιχθυδίων να προμηθεύονται ζωντανή τροφή, για να αναπληρώσουν το διατροφικό κενό με αποτέλεσμα να αυξάνεται το κόστος παραγωγής τους. Οι νανοδιασπορές που παρασκευάστηκαν έχουν ως στόχο να λειτουργήσουν ως βάση για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος που θα συμβάλλει στην μείωση του κόστους παραγωγής των ιχθυδίων, καθώς ένα μεγάλο ποσοστό αυτού αποτελεί το κόστος των ιχθυοτροφών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους της πρωτογενούς παραγωγής της Ελλάδας και τον πλέον σημαντικό κλάδο ζωικής παραγωγής. Μέχρι το 1980, περιελάμβανε τις ιχθυοκαλλιέργειες εκτατικής μορφής των λιμνοθαλασσών και τις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων, κυρίως πέστροφας. Η υδατοκαλλιέργεια, αντιπροσώπευε μόλις το 2% της προσφοράς αλιευτικών προϊόντων της χώρας και το υπόλοιπο 98% προερχόταν από την ελεύθερη αλιεία. Τα δεδομένα αυτά άρχισαν να μεταβάλλονται με μεγάλη ταχύτητα από το 1980 και μετά, καθώς αναπτύχθηκαν οι εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες θαλασσινών μεσογειακών ειδών, κυρίως της τσιπούρας και του λαβρακιού. Το 2003 η προσφορά αλιευτικών προϊόντων από την υδατοκαλλιέργεια ξεπέρασε για πρώτη φορά την αντίστοιχη προσφορά από την αλιεία. Το 2014 εκτιμάται ότι το 69% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 31% από την αλιεία. Η δραστηριότητα αυτή έχει εξελιχθεί σε έναν από τους πλέον ανταγωνιστικούς τομείς της πρωτογενούς παραγωγής της χώρας που διατηρεί μια από τις ηγετικές θέσεις στην παραγωγή μεσογειακών ειδών σε ευρωπαϊκό, αλλά και διεθνές επίπεδο (Πηγή: ΣΕΘ).

Ανεξάρτητα από το μέγεθος και την οργάνωση μιας εταιρείας Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας, οι πηγές θρεπτικών συστατικών είναι η ζωντανή τροφή στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και οι τεχνητές ιχθυοτροφές στη συνέχεια, που συνολικά αποτελούν συνολικά σχεδόν το 70% του κόστους παραγωγής. Ένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας έγκειται στο γεγονός ότι η χρήση της ζωντανής τροφής στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια αυξάνει πολύ το κόστος παραγωγής. Παρόλα αυτά, η χρήση της κρίνεται αναγκαία εφόσον αποτελεί πηγή θρεπτικών συστατικών και ενζύμων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ιχθυδίων και τη σωστή λειτουργία του πεπτικού τους συστήματος.

Στην Ελλάδα υπάρχουν 8 παρασκευαστές τεχνητών ιχθυοτροφών, τρεις εκ των οποίων είναι εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας που κατέχουν ή συμμετέχουν σε εταιρείες παρασκευής ιχθυοτροφών. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη βιοσυμβατών νανοδιασπορών για τον εγκλωβισμό και τη μεταφορά ενζύμου (θρυψίνη), ώστε να προταθούν και να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικά διατροφής με εφαρμογή στην ιχθυοκαλλιέργεια. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατό να μειωθεί η χρήση της ζωντανής τροφής ως πηγή θρεπτικών και άλλων συστατικών με τελικό στόχο τη μείωση του κόστους παραγωγής των ιχθυδίων.

Το ενδιαφέρον της βιομηχανίας για την ανάπτυξη κολλοειδών νανοδιασπορών με σκοπό την ενθυλάκωση βιοδραστικών μορίων είναι ιδιαίτερα αυξημένο και επικεντρωμένο σε πολλούς διακριτούς τομείς όπως στην βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, αγροχημικών, φαρμάκων κ.α. Η ενθυλάκωση βιοδραστικών ουσιών όπως φάρμακα, βιταμίνες, ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, ένζυμα και αντιοξειδωτικά σε νανοδομές έχει ως σκοπό α) την προστασία από εξωγενείς παράγοντες κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και χορήγηση, β) την ανάγκη να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με άλλες ενώσεις γ) την ενσωμάτωση τους σε περιβάλλον αντίθετης πολικότητας και δ) την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας.

Τα κολλοειδή συστήματα διασποράς, περιέχουν νανοσωματίδια, σε μορφή σταγόνων, ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλεται ένα υγρό μέσο διασποράς. Οι πιο διαδεδομένες νανοδιασπορές τέτοιου τύπου είναι τα μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας αναπτύχθηκαν βιοσυμβατά μικρογαλακτώματα, οι ιδιότητες και οι εφαρμογές των οποίων θα αναλυθούν σε επόμενα κεφάλαια.

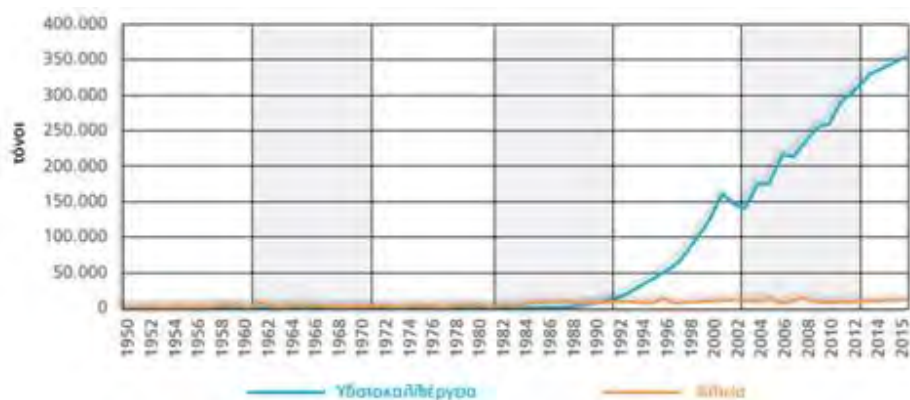


Εικόνα 1. Φωτογραφία εγκαταστάσεων θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας (Πηγή: ΣΕΘ)

2. Η ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΩΣ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟΣ ΚΛΑΔΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ

2.1 Η ιχθυοκαλλιέργεια στην Μεσόγειο σήμερα

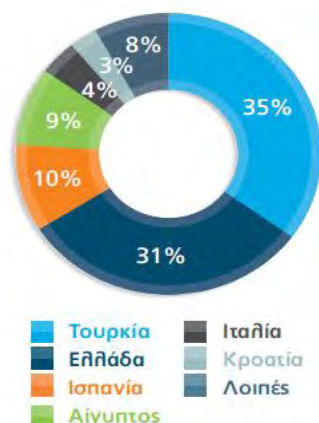
Τόσο στην Ελλάδα, όσο και στις υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου που δραστηριοποιούνται στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας, τα δυο είδη που καλλιεργούνται κατά κύριο λόγο είναι το λαβράκι και η τσιπούρα. Από το 1980 και έπειτα, η παραγωγή αυτών των δύο ειδών παρουσίασε σταδιακή αύξηση και το 1992 η προσφορά από την υδατοκαλλιέργεια (19.796 τόνοι) ξεπέρασε την αντίστοιχη προσφορά από την αλιεία (14.939 τόνοι). Τα τελευταία 20 χρόνια η ζήτηση αυτών των δύο ειδών καλύπτεται σχεδόν αποκλειστικά από την ιχθυοκαλλιέργεια, αφού πλέον η προσφορά από την αλιεία κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Συγκεκριμένα, το 2015 η συνολική προσφορά των δυο ειδών, τόσο από την θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια όσο και από την αλιεία, προσδιορίστηκε σε 373.412 τόνους εκ των οποίων το 96% (358.412 τόνοι) προέρχεται από την ιχθυοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 4% (περίπου 15.000 τόνοι) από την ελεύθερη αλιεία. Τα στοιχεία προέκυψαν από την εκτροφή τσιπούρας και λαβρακιού όπως καταγράφηκε το 2015 σε 23 χώρες, κυρίως από την περιφέρεια της Μεσογείου (Πηγή: ΣΕΘ).



Εικόνα 2. Παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού 1950-2015 στις χώρες της Μεσογείου (Πηγή: ΣΕΘ).

Οι χώρες της Μεσογείου παίζουν σημαντικό ρόλο κατέχοντας μεγάλο μερίδιο αγοράς, καθώς αντιπροσωπεύουν το 85% της παγκόσμιας παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού. Πιο αναλυτικά, το 2015, η Ελλάδα μαζί με την Τουρκία

πραγματοποίησαν το 66% της παγκόσμιας παραγωγής τσιπούρας και λαβρακίου, με ποσοστά 31% για την Ελλάδα και 35% για την Τουρκία, σύμφωνα με στοιχεία του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. (The state of Mediterranean and Black Sea fisheries, 2016, Food Agriculture Organism of United Nations, FAO).

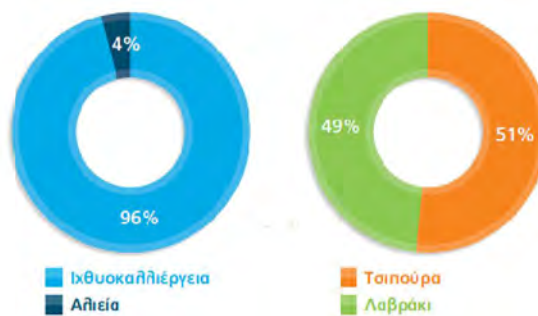


Σχήμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστιαίου μεριδίου παγκόσμιας παραγωγής λαβρακίου και τσιπούρας, 2015 (Πηγή: ΣΕΘ)

2.2 Η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

2.2.1 Ορισμός αγοράς στην Ελλάδα

Η Ελλάδα αποτελεί ηγέτιδα δύναμη στην παραγωγή λαβρακίου και τσιπούρας στην Μεσόγειο. Βάση των στοιχείων που προκύπτουν από ετήσιες αναφορές του Σύνδεσμου Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών (ΣΕΘ), την τελευταία πενταετία, τα δύο αυτά είδη είναι τα κύρια είδη παραγωγής με ελάχιστη διαφορά στα ποσοστά παραγωγής τους ανά έτος. Η κύρια διάθεση των δύο ειδών στην αγορά γίνεται μέσω των εταιρειών ιχθυοκαλλιέργειας ενώ σε ένα ποσοστό 4% μέσω της αλιείας σε ανοιχτή θάλασσα, όπως φαίνεται παρακάτω (σχήμα 2.3). Τα πλεονεκτήματα της Ελλάδας που ευνοούν την ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών είναι πολλά, μεταξύ όλων: διαθέτει μεγάλης έκτασης λεκάνες απορροής (θάλασσες, λιμνοθάλασσες, ποτάμια, πηγές), προσφέρει ευνοϊκές συνθήκες κλίματος για καλλιέργεια τόσο θερμόφιλων όσο και ψυχρόφιλων ειδών, σε πολλές περιοχές εντοπίζονται γεωθερμικά νερά.



Σχήμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστιαίας διάθεσης ιχθύων και ποσοστιαίας παραγωγής λαβρακίου και τσιπούρας στην Ελλάδα, 2010-2015 (Πηγή: ΣΕΘ).

Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Εξωτερικών («Η ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια και τα προϊόντα της στην παγκόσμια αγορά», Υπ. Εξωτερικών, Πλαίσιο Συνεργασίας της ΓΓ ΔΟΣ & ΑΣ και του ΣΕΘ, μελέτη Γραφείων ΟΕΥ), σήμερα υπάρχουν 318 μονάδες παραγωγής και απασχολούν άμεσα περίπου 10.000 εργαζόμενους. Οι περισσότερες μονάδες βρίσκονται σε απομακρυσμένες περιοχές, και καταλαμβάνουν συνολική θαλάσσια έκταση 7.8 τετραγωνικών χιλιομέτρων. Οι μονάδες αυτές ανήκουν σε 106 εταιρείες, οι μισές από τις οποίες δραστηριοποιούνται σε νομούς που βρίσκονται κοντά σε μεγάλα αστικά κέντρα. Οκτώ εταιρείες είναι εισηγμένες στο Χρηματιστήριο Αθηνών, με κεφαλαιοποίηση που ξεπερνά τα 350 εκ ευρώ.

2.2.2 Κατηγορίες Υδατοκαλλιέργειας

Η υδατοκαλλιέργεια είναι η καλλιέργεια ψαριών, καρκινοειδών, μαλακίων, υδρόβιων φυτών, άλγης και άλλων υδρόβιων οργανισμών. Περιλαμβάνει την καλλιέργεια πληθυσμών γλυκού, θαλασσινού νερού και υφάλμυρου νερού υπό ελεγχόμενες συνθήκες (<https://en.wikipedia.org/wiki/Aquaculture>). Μέσα από την παραγωγική διαδικασία, προκύπτουν προϊόντα τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν εμπορικά και να προσφέρουν ωφέλη υγείας στον καταναλωτή.

Ανάλογα με τα είδη που εκτρέφονται σε αυτές οι υδατοκαλλιέργειες χωρίζονται σε:

A) Καλλιέργειες γλυκών υδάτων: αφορούν τις καλλιέργειες που πραγματοποιούνται σε φυσικές, τεχνητές λίμνες ή ποτάμια. Τα είδη που καλλιεργούνται σε αυτές τις συνθήκες είναι κυρίως η πέστροφα, η τιλάπια και ο κυπρίνος.

B) Καλλιέργειες υφάλμυρων υδάτων: αφορούν τις καλλιέργειες σε λιμνοθάλασσες, εκβολές ποταμών και παραθαλάσσιους ελώδεις σχηματισμούς. Τα είδη που καλλιεργούνται σε αυτές τις συνθήκες είναι κυρίως το λαβράκι, οι κέφαλοικαι τα χέλια.

Γ) Καλλιέργειες αλμυρών υδάτων: αφορούν τις καλλιέργειες σε θαλάσσιες περιοχές. Τα είδη που καλλιεργούνται σε αυτές τις συνθήκες είναι κυρίως το λαβράκι, η τσιπούρα, το φαγκρί, ο κраниός, η γλώσσα αλλά και όστρακα και μαλάκια.

Η υδατοκαλλιέργεια θεωρείται μια βιομηχανία έντασης εργασίας, αλλά μια βιο-βιομηχανία υψηλού κινδύνου. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της υδατοκαλλιέργειας είναι ότι, ανάλογα με την εντατικοποίησή του, μπορεί να οργανωθεί στα ακόλουθα συστήματα.

A) Εκτατική υδατοκαλλιέργεια: Σε αυτή τη μορφή υδατοκαλλιέργειας υιοθετούνται παραδοσιακές τεχνικές υδατοκαλλιέργειας, για παράδειγμα την εξάρτηση από τη φυσική παραγωγικότητα της περιοχής και τη μικρή ιχθυοφόρτιση.

B) Εντατική υδατοκαλλιέργεια: Σε αυτή τη μορφή υδατοκαλλιέργειας υιοθετούνται τεχνικές καλλιέργειας στην οποία τηρούνται τεχνικές και επιστημονικές προδιαγραφές, όπως επιστημονικός σχεδιασμός περιβάλλοντος εκτροφής καισίτισης, συμπληρώματα διατροφής και εμπλουτισμός με απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Γίνεται πλήρης έλεγχος της υγείας των παραγόμενων ιχθύων και η παραγωγή πραγματοποιείται σε μεγάλα ποσοστά.

Γ) Ημιεντατική υδατοκαλλιέργεια: Σε αυτή τη μορφή υδατοκαλλιέργειας υιοθετούνται τεχνολογίες μεσαίου επιπέδου, υπάρχει μερική εξάρτηση από τη φυσική παραγωγικότητα, γίνεται έλεγχος της σίτισης και μικρές επεμβάσεις για εμπλουτισμό της καλλιέργειας με θρεπτικά συστατικά. Η παραγωγή κυμαίνεται σε μικρότερα ποσοστά από αυτά της εντατικής καλλιέργειας.(Πηγή: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO).

Η τσιπούρα και το λαβράκι, που εκτρέφονται στην Ελλάδα, είναι ευρύαλα ψάρια. Μπορούν να αναπυχθούν σε νερό μεγάλου εύρους αλατότητας, είναι

ανθεκτικά σε ασθένειες καθώς και σε μεταβολές της θερμοκρασίας. Επιπλέον παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με άλλα είδη κατά την παραγωγή. Η παραγωγική διαδικασία χωρίζεται σε δυο στάδια: την ιχθυογένεση και την πάχυνση των ιχθυδίων. Κατά την ιχθυογένεση, παράγεται και αναπτύσσεται ο γόνος τσιπούρας ή λαβρακίου στον ιχθυογεννητικό σταθμό μέχρι το βάρος του να φτάσει τα 2-3 γραμμάρια και μπορεί να θεωρηθεί τελικό προϊόν εφόσον πολλές εταιρείες εμπορεύονται γόνο. Κατά το στάδιο της πάχυνσης ο γόνος εκτρέφεται σε κλωβούς στη θάλασσα, σε ειδική μονάδα. Το τελικό βάρος των ιχθύων μετά το στάδιο της πάχυνσης και πριν διατεθούν στην αγορά κυμαίνεται από 300-500 γραμμάρια.

(Πηγή: https://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish).

2.2.3 Ανταγωνισμός, δυνητικοί πελάτες και προμηθευτές

Οι κυριότεροι όμιλοι που δραστηριοποιούνται στον τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών στην Ελλάδα είναι ο ΝΗΡΕΑΣ Α.Ε., η ΣΕΛΟΝΤΑ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΙΑ Α.Ε.Γ.Ε., η ΔΙΑΣ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ Α.Β.Ε.Ε., ο όμιλος ΑΝΔΡΟΜΕΔΑ. Παράλληλα, υπάρχουν πληθώρα μεγάλων, μικρών και μεσαίων επιχειρήσεων που δραστηριοποιούνται πολύ ενεργά και είναι κυρίως οικογενειακές επιχειρήσεις. Οι μικρότερες επιχειρήσεις αντιμετωπίζουν μεγάλο αριθμό προβλημάτων με βασικότερο το πρόβλημα της έλλειψης κεφαλαίου για τον εκσυγχρονισμό των εγκαταστάσεων και τη μείωση του λειτουργικού κόστους, ώστε να γίνουν ανταγωνιστικές έναντι των ομίλων. Επιπλέον, η έλλειψη ρευστότητας, οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην πώληση ιχθύων σε χαμηλότερη τιμή ή τη μείωση της παραγωγής τους λόγω της αδυναμίας των επιχειρήσεων να προμηθευτούν τις απαραίτητες πρώτες ύλες, όπως για παράδειγμα την ιχθυοτροφή. Στην Ελλάδα δραστηριοποιούνται εταιρείες που ασχολούνται τόσο με την ιχθυογένεση όσο και με την πάχυνση αλλά και εταιρείες που ασχολούνται μόνο με την πάχυνση του γόνου.

Για μια επιχείρηση ιχθυοκαλλιέργειας, δυνητικοί πελάτες δεν είναι μόνο οι τελικοί καταναλωτές του προϊόντος, αλλά και οι ενδιάμεσοι που εμπορεύονται το τελικό προϊόν. Έτσι οι πελάτες μιας εταιρείας ιχθυοκαλλιέργειας χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

A) Τελικοί Καταναλωτές: Εταιρείες του κλάδου έχουν ιδρύσει δικά τους καταστήματα και μέσω της απευθείας πώλησης των προϊόντων τους προσεγγίζουν τον τελικό καταναλωτή.

Β) Εταιρείες χονδρικής πώλησης/ Επίσημοι Διανομείς: Εταιρείες χονδρικής πώλησης που προμηθεύουν με το τελικό προϊόν εταιρείες λιανικής πώλησης.

Γ) Εταιρείες λιανικής πώλησης: Εταιρείες και καταστήματα από όπου προμηθεύονται οι τελικοί καταναλωτές το προϊόν.

Δ) Άλλες εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας: Εταιρείες που δραστηριοποιούνται μόνο στο στάδιο της πάχυνσης προμηθεύονται γόνο από επιχειρήσεις με ιχθυογεννητικές μονάδες.

Οι εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας προμηθεύονται πρώτες ύλες ανάλογα με τον τομέα στον οποίο δραστηριοποιούνται. Για παραδειγμα, μια εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας μπορεί να προμηθεύεται γόνο από άλλη εταιρεία, αν δεν τον παράγει η ίδια ή αν παράγει μικρότερη από την απαιτούμενη ποσότητα. Επιπλέον, πρώτη ύλη για την κάθε μονάδα αποτελεί η ιχθυοτροφή σε όλα τα στάδια της παραγωγής.

2.3 Η παραγωγή ιχθυοτροφών στην Ελλάδα

Ανεξάρτητα από το μέγεθος και την οργάνωση μιας εταιρείας ιχθυοκαλλιέργειας, η εκτροφή ιχθύων βασίζεται στα πρώτα στάδια στη χρήση ζωντανής τροφής και σε τεχνητές ιχθυοτροφές στη συνέχεια, και αποτελούν συνολικά σχεδόν το 70% του κόστους παραγωγής. Το υπόλοιπο 30% επιμερίζεται ανάλογα με το μέγεθος και την οργάνωση της κάθε εταιρείας σε εργατικά κόστη, αποσβέσεις στο κόστος διάθεσης και συσκευασίας καθώς και σε λοιπές δαπάνες.

Παράλληλα με την ανάπτυξη του κλάδου των ιχθυοκαλλιεργειών, αναπτύχθηκε τα τελευταία 30 χρόνια και ο κλάδος των ιχθυοτροφών. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι περισσότερες εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας προμηθεύονται τις απαραίτητες ποσότητες ιχθυοτροφής από το εξωτερικό. Σήμερα, λειτουργούν αρκετές εταιρείες που παράγουν ιχθυοτροφές όπως η BIOMAR A.E, η ΙΡΙΔΑ, η ΖΩΝΟΜΗ και άλλες. Επιπλέον πολλές εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας όπως η ΝΗΡΕΑΣ A.E. και η ΣΕΛΟΝΤΑ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΙΑ A.E.Γ.E. διαθέτουν μονάδες παραγωγής ιχθυοτροφών, οι οποίες χρησιμοποιούνται από την εταιρεία που τις παράγει αλλά και ως εμπορεύσιμο προϊόν.

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοτροφές είναι κυρίως ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια, δημητριακά, φυτικές πρωτεΐνες καθώς και προϊόντα ελαιούχων σπόρων, τα οποία εισάγονται κυρίως από την Νότια Αμερική, την Βόρεια Ευρώπη και την Αφρική. Την τελευταία πενταετία, σχεδόν το 95% των τροφών που καταναλώθηκαν παράχθηκε σε παρασκευαστήρια στην Ελλάδα (232.000 τόνοι), το 4,5% (11.000 τόνοι) εισήχθηκε από επιχειρήσεις χονδρικής πώλησης-επίσημους διανομείς του εξωτερικού, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό της τάξης του 0,6%, εισήχθηκε απευθείας από μονάδες παραγωγής του εξωτερικού (1.440 τόνοι) (Πηγή: ΣΕΘ).



Σχήμα 3. Διαγραμματική απεικόνιση πωλήσεων ιχθυοτροφών στην Ελλάδα την περίοδο 2010-2016 (Α' Εξάμηνο) (Πηγή: ΣΕΘ).

Όσον αφορά στο ύψος των πωλήσεων, το 2015 η αξία των πωλήσεων ανήλθε σχεδόν σε 262 εκ. ευρώ παρουσιάζοντας αύξηση 5,6% σε σχέση με τα προηγούμενα έτη. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι μεταξύ 2010 - 2015 η μέση τιμή ανά τόνο τροφής αυξήθηκε συνολικά κατά 11,5%. Το 2016 οι πωλήσεις τροφών ξεπέρασαν τους 250.000 τόνους (Πηγή: ΣΕΘ).



Σχήμα 4. Διαγραμματική απεικόνιση μέσης τιμής σε €/τόνο ιχθυοτροφής στην Ελλάδα την περίοδο 2010-2016 (Α' εξάμηνο) (Πηγή: ΣΕΘ).

2.4 Η διατροφή των ιχθυδίων τσιπούρας και λαβρακίου

Η διατροφή αποτελεί μια σειρά διαδικασιών με τις οποίες το ψάρι προσλαμβάνει και αφομοιώνει τροφή, χημικές ενώσεις και στοιχεία από το περιβάλλον, προκειμένου να επιβιώσει, να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί. Στη συνέχεια, ακολουθεί η πέψη της τροφής έτσι ώστε μέσω του μεταβολισμού η τροφή να διασπαστεί και να μετατραπεί σε κατάλληλες ενώσεις για τη θρέψη των κυττάρων και την παραγωγή της απαραίτητης ενέργειας. Μέσω της απέκκρισης, αποβάλλονται τα άχρηστα ή τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού της τροφής προς στο περιβάλλον (Αντωνοπούλου, 2015).

2.4.1 Ο ρόλος της ζωντανής τροφής στη διατροφή των ιχθυδίων

Η εκτροφή του γόνου είναι η ραχοκοκαλιά της βιομηχανίας της θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας γιατί είναι το στάδιο που ξεκινά η παραγωγή (Dhert et al., 2001 - Turingan et al., 2005). Η εφαρμογή νέων πρακτικών στην εκτροφή του γόνου και των ιχθυδίων είναι ιδιαίτερα αναγκαίες για την αναβάθμιση της παραγωγής τριτογενών ειδών και για την αποτελεσματική καλλιέργεια νέων. Όπως διατυπώνεται σε μελέτες, η τεχνητή ιχθυοτροφή δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί αποτελεσματικά και ο ρόλος των ζωντανών ιχθυοτροφών, για την επιτυχή εκτροφή του θαλάσσιου γόνου, είναι ζωτικής σημασίας δεδομένου του γεγονότος ότι είναι η κύρια πηγή διατροφής των εμπορικά εκτρεφόμενων ειδών (Mahjoub et al., 2013). Ως εκ τούτου, για να διατηρηθεί η αύξηση της παραγωγικότητας στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας, το στάδιο εκτροφής του γόνου πρέπει να ενισχυθεί μέσω της ζωντανής τροφής.

Οι Lavens και Sorgeloos (1996), έχουν υποστηρίξει ότι μια από τις προκλήσεις για την ανάπτυξη μιας βιώσιμης επιχείρησης υδατοκαλλιέργειας είναι η μείωση χρήσης ζωντανής τροφής στη φάση της εκτροφής-πάχυνσης. Η φάση του γόνου είναι το κρίσιμο στάδιο στην αναπαραγωγή των ψαριών, καθώς αυτό το στάδιο θα αποτελέσει το θεμέλιο για βασικές ιδιότητες των ψαριών όπως για παράδειγμα το επίπεδο stress, η αντοχή και ανθεκτικότητα στην ασθένεια, οι επιδόσεις αύξησης. Έτσι, η παροχή κατάλληλης ζωντανής τροφής είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχία των θαλάσσιων υδατοκαλλιεργειών. Οι ζωντανές τροφές θα πρέπει επίσης να είναι οικονομικά προσιτές για την επιχείρηση. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη ζωντανή ζωοτροφή στην υδατοκαλλιέργεια είναι η *Artemia nauplii* (Lavens et al, 1996 – Bengtson et al, 2003).

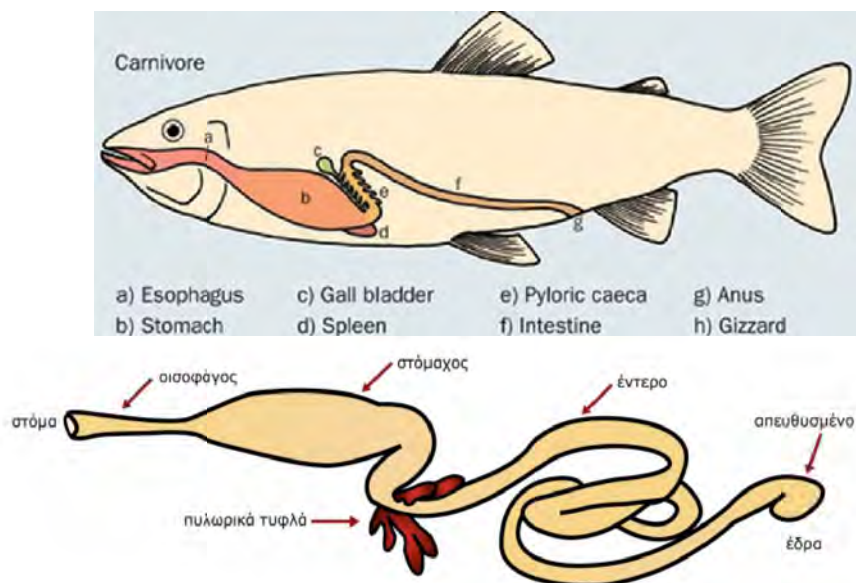
Υπάρχουν τρεις λόγοι για τη χρήση ζωντανών τροφών σε συνδυασμό με τις τυποποιημένες ιχθυοτροφές στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των ιχθυδίων. Πρώτον, η θρεπτική σύνθεση των ζωντανών τροφών ευνοεί την κατάποση, την πέψη και την αφομοίωση σε σύγκριση με την τυποποιημένη τροφή (Koven et al, 2001). Δεύτερον, πολλά είδη ιχθυδίων δεν διαθέτουν μεγάλο στόμα για να μπορούν να καταναλώσουν την τεχνητή ιχθυοτροφή (Lavens et al, 1996). Τρίτον, οι τροφές σε κίνηση είναι πιο ελκυστικές και διεγερτικές σε σχέση με τα αδρανή σωματίδια της τεχνητής τροφής (Bengtson et al, 2003 - Buskey et al, 2005). Ως αποτέλεσμα, οι ζωντανές τροφές ενισχύουν το ποσοστό επιβίωσης των ιχθυδίων.

2.4.2 Τεχνητή τροφή

Οι πρώτες ύλες για τις ιχθυοτροφές και γενικότερα για τις ζωοτροφές είναι ήπαραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, είτε προϊόντα που παράγονται αποκλειστικά για την παραγωγή των ιχθυοτροφών. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοτροφές είναι κυρίως ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια, δημητριακά, πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης έλαια από φυτικούς σπόρων. Τα ιχθυάλευρα παράγονται από διάφορα είδη ψαριών, κυρίως από μικρά λιπαρά ψάρια (ρέγγες, γαύρους, σαρδέλες). Χωρίζονται δε, σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη χώρα προέλευσης, τον τύπο επεξεργασίας που έχουν υποστεί, το είδος/είδη των ψαριών από τα οποία έχουν προέλθει και το χρώμα τους. Τα ιχθυάλευρα παράγονται μετά από θερμική επεξεργασία των ψαριών, ακολουθεί απομάκρυνση του νερού και του ελαίου μέσω μιας διεργασίας στην οποία σταδιακά αυξάνεται η πίεση που δέχεται το μείγμα. Στο τελευταίο στάδιο ακολουθεί ξήρανση (Αντωνοπούλου, 2015).

2.4.3 Μορφολογία πεπτικού συστήματος των ιχθύων

Τοσο στα αρχικά στάδια ανάπτυξης όσο και στα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια το πεπτικό σύστημα της τσιπούρας και του λαβρακίου είναι τυπικό των σαρκοφάγων ιχθύων. Αποτελείται από το στόμα, τον οισοφάγο, το στομάχι, τον πυλωρό, τα πυλωρικά τυφλά, το έντερο και την έδρα (βλ. Σχήμα 6) (Παπουτσόγλου, 2008). Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην χημική πέψη στους ιχθύες είναι υδρολάσες που καταλύουν την υδρόλυση πρωτεϊνών (πρωτεάσες, πεπτιδάσες), εστέρων (εστεράσες, λιπάσες) και υδατανθράκων (καρβοϋδράσες).



Σχήμα 6. Μορφολογία πεπτικού συστήματος τυπικού σαρκοφάγου ιχθύος.
(Αντωνοπούλου, 2015)

Η εντερική οδός των ιχθυιδίων είναι πολύ πιο απλά οργανωμένη και μικρότερη (συνήθως 0,5 φορές επί το μήκος σώματος) από αυτή των ενήλικων (Stroband et al, 1979). Αυτό μπορεί να εξηγήσει γενικά την αναγκαιότητα της ενσωμάτωσης της ζωντανής τροφής στη διατροφή τους. Υπάρχουν επίσης πολλές ενδείξεις ότι η χαμηλή παραγωγή ενζύμων συσχετίζεται με την απλή μορφολογική δομή του πεπτικού τους συστήματος. Επιπλέον, οι δυσκολίες στην εκτροφή των ιχθυιδίων με τεχνητές ιχθυοτροφές υποδεικνύει χαμηλότερη αποτελεσματικότητα της πέψης σε ορισμένα είδη, συμπεριλαμβανομένων της τσιπούρας και του λαβρακίου. Οι κύριες θέσεις έκκρισης των ενζύμων είναι το στομάχι, το πάγκρεας, η χολή, το έντερο και το συκώτι, ενώ σημαντικές ποσότητες απαντώνται και σε άλλους ιστούς όπως η σπλήνα, τα νεφρά και η καρδιά. Ενζυμική δράση έχει βρεθεί και στο τελικό τμήμα του εντέρου των ψαριών (Dabrowski et al., 1989). Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται τα ένζυμα που συναντάμε στα περισσότερα είδη ιχθύων, οι θέσεις έκκρισης και η δράση τους.

Πίνακας 1. Ένζυμα που συναντώνται στα περισσότερα είδη ιχθύων, οι θέσεις έκκρισης και η δράση τους (Βένου, 2003)

ΘΕΣΗ	ΕΝΖΥΜΟ / ΥΓΡΟ	ΔΡΑΣΗ
Στομάχι	HCl	Μείωση pH για τη δράση πεψινογόνου.
	Ζυμογόνο, πεψινογόνο, HCl, πεψίνη	Πρωτεολυτικά ένζυμα
	Αμυλάση	Υδατανθρακες
	Λιπάση	Λιπίδια
	Εστεράσες	Εστέρες (κατηγορία λιπιδίων)
Χιτίνωση	Χιτίνωση	Χιτίνη
	Αμινοπεπτιδάσες (αλκαλική και όξινη)	Διασπά πεπτιδικούς δεσμούς αμινοαδων
	Πολυνουκλεοσιδάση	Νουκλεϊκά οξέα
	Λεκιθιδάση	Φωσφολιπίδια σε γλυκερόλη, λιπαρά οξέα
Ένζυμα υδατανθράκων		
Χολή (εκκρίνεται από το συκώτι)	Χολικά άλατα, οργανικά ανιόντα, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, ανόργανα	Αλκαλοποίηση εντερικού υγρού, γαλακτοποιούν τα λιπίδια, επαναρροφούνται στο έντερο, επιστρέφουν στο συκώτι.
Πάγκρεας	Ένζυμα	Αποθηκεύονται σαν ζυμογόνα. Οι εντερι-κές πρωτεάσες μετατρέπουν το θρυψινογόνο σε θρυψίνη η οποία ενεργοποιεί άλλα.
	HCO ₃ ⁻	Εξουδετέρωση HCl, προετοιμασία εντέρου για αλκαλική πέψη.
	Πρωτεάσες	Βέλτιστη δράση σε pH 7.0
	Θρυψίνη	Διασπά πεπτιδικούς δεσμούς σε καρβοξυλομάδες Lys ή Arg.
	Χυμοθρυψίνη	Δρα σε πεπτίδια με καρβονύλια σε πλευρι-κές αρωματικές αλυσίδες.
	Ελαστάση	Προσβάλλει δεσμούς στην ελαστίνη.
	Καρβοξυπεπτιδάσες	Υδρολύει τελικούς πεπτιδικούς δεσμούς
	Αμυλάση	Πέψη υδατανθράκων σε μη όξινο pH.
	Χιτίνωση	Διάσπαση χιτίνης.
Λιπάσες	Υδρολύει τριγλυκερίδια, λίπη, φωσφολιπίδια, κηρώδεις εστέρες.	

In vitro πειράματα οδήγησαν πολλούς ερευνητές να υποθέσουν ότι εξωγενή ένζυμα τα οποία υπάρχουν σε άλλους οργανισμούς μπορεί να υποστηρίξουν τις πεπτικές διεργασίες στα ψάρια. Αυτή η ιδέα αναπτύχθηκε και από τους Dabrowski και Glogowski (1977a, b) οι οποίοι συνέκριναν τις πρωτεολυτικές δραστηριότητες των οργάνων του πεπτικού συστήματος των ιχθυιδίων σε σχέση με τα είδη διατροφής που καταναλώνονται κάθε μέρα. Τέλος, σε έρευνα των Lauff-Hoffer (1983), μελετήθηκε η δραστικότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων από τοπάγκρεας (θρυψίνη και χυμοθρυψίνη) καθώς και από το βλεννογόνο του εντέρου (αμινοπεπτιδάση). Τονίστηκε έντονα η σημασία των εξωγενών ενζύμων αφού μελετήθηκαν σε τρία είδη ψαριών σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντερικού τους σωλήνα.

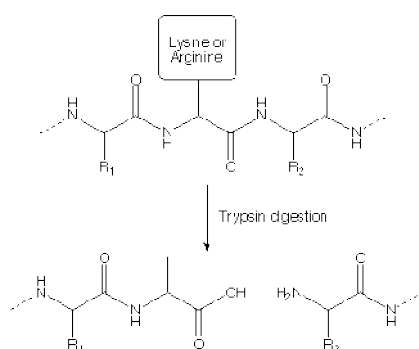
2.5 Θρυψίνη: Δομή και λειτουργία

Τα πεπτικά ένζυμα, που συντίθενται και εκκρίνονται από τα παγκρεατικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πέψη των τροφίμων καθώς προάγουν την πέψη των λιπών (λιπάσες), των πρωτεϊνών (πρωτεάσες) και των υδατανθράκων (αμυλάσες). Οι πρωτεάσες αντιπροσωπεύουν μία ποικίλη σειρά ενζύμων που δρουν

στους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνικών μορίων. Μπορούν να χωριστούν σε οικογένειες πρωτεασών που διαφέρουν σε σχέση με τη δομή και τον τύπο κατάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των σερίνης, της θρεονίνης, της κυστεΐνης, της ασπαρτικής και των μεταλλο-πρωτεασών. Η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη ανήκουν στις πρωτεάσες σερίνης καθώς φέρουν σερίνη και ιστιδίνη στο ενεργό τους κέντρο και παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες τόσο από άποψη δομής όσο και μηχανισμού κατάλυσης.

Στην πεπτική διαδικασία, η θρυψίνη παράγεται σε αδρανή μορφή από το πάγκρεας (θρυψινογόνο). Η ενζυμική της δραστηριότητα ενεργοποιείται στο δωδεκαδάκτυλο με την επίδραση της εντεροκινάσης και δρα συνεργιστικά με τις άλλες πρωτεάσες για να διασπάσει τα μόρια των πρωτεϊνών σε πεπτίδια και τελικά σε αμινοξέα. Η θρυψίνη συνεχίζει τη διαδικασία πέψης των πρωτεϊνών από το στομάχι στο λεπτό έντερο, όπου ένα ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον (περίπου pH 8) προάγει τη μέγιστη ενζυματική δραστητικότητα.

Η θρυψίνη διαφέρει από τη χυμοθρυψίνη ως προς την εξειδίκευση καθώς δρα σε πεπτιδικούς δεσμούς αποκλειστικά μετά από τα βασικά - αμινοξέα αργινίνη και λυσίνη. Η χυμοθρυψίνη δρα στην πεπτιδική αλυσίδα μετά από τα αρωματικά αμινοξέα τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, και τα υδρόφοβα λευκίνη, μεθειονίνη. Η θρυψίνη είναι το πιο εξειδικευμένο από όλα τα πρωτεολυτικά ένζυμα εφόσον καταλύει πιο περιορισμένο αριθμό δεσμών. (Πηγή: https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_5/Page1.htm).



Σχήμα 7. Υδρόλυση καρβονυλικού δεσμού από τη θρυψίνη

3. ΝΑΝΟΔΙΑΣΠΟΡΕΣ & ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.4.3 το πεπτικό σύστημα των ιχθύων διαθέτει απλούστερη οργάνωση σε σχέση με το πεπτικό σύστημα άλλων ειδών. Για αυτόν τον λόγο, η παραγωγή πεπτικών ενζύμων πραγματοποιείται σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις. Το γεγονός αυτό έχει αντίκτυπο σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των ιχθύων. Στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης, είναι απαραίτητη η χρήση ζωντανής τροφής, για την ενίσχυση του πεπτικού συστήματος, η οποία όμως αυξάνει πολύ το κόστος παραγωγής ιχθύων. Σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης, ο ρυθμός ανάπτυξης των ιχθύων, εκτός των άλλων, εξαρτάται από την μετατρεψιμότητα της ιχθυοτροφής σε βάρος, γεγονός το οποίο εξαρτάται άμεσα από την ποιότητα της πεπτικής διαδικασίας (Αντωνοπούλου, 2015). Σε αυτήν την περίπτωση επιμηκύνεται ο χρόνος στον οποίο τα ιχθύδια παραμένουν στους κλωβούς μέχρι να φτάσουν το επιθυμητό βάρος. Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ένα βιοσυμβατό μικρογαλάκτωμα με σκοπό να λειτουργήσει ως φορέας ενθυλάκωσης, μεταφοράς και προστασίας ενός πεπτικού ενζύμου όπως είναι η θρυψίνη. Το προτεινόμενο μικρογαλάκτωμα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί από εταιρείες παραγωγής ιχθυοτροφής για τον εμπλουτισμό της τεχνητής τροφής σε πεπτικά ένζυμα.

Κατά τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη διαμόρφωση βιοσυμβατών, μη τοξικών, και ασφαλών φορέων για την ενθυλάκωση, προστασία και μεταφορά βιοδραστικών μορίων με δυνατότητες εφαρμογής στον τομέα των τροφίμων. Η βιομηχανική παραγωγή των τροφίμων απαιτεί συχνά την προσθήκη λειτουργικών συστατικών. Τυπικά, αυτά χρησιμοποιούνται για να ελέγξουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων ενώ πρόσφατες εφαρμογές περιλαμβάνουν και προσθήκη συστατικών με πιθανά οφέλη υγείας (Deutch-Kolozon et al., 2011).

Η προσθήκη βιοδραστικών συστατικών σε προϊόντα διατροφής παρουσιάζει πολλές προκλήσεις για την επιστήμη και τεχνολογία των τροφίμων ιδίως όσον αφορούν:

1. Στην προστασία από εξωγενείς παράγοντες κατά την επεξεργασία και αποθήκευση.

2. Στην ανάγκη να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα συστατικά του τροφίμου-φορέα ή της συσκευασίας που το περικλείει.
3. Στην ενσωμάτωση λιπόφιλων ουσιών σε υδατικό περιβάλλον και το αντίθετο.

Η ενθυλάκωση βιοδραστικών συστατικών σε συστήματα στη νανοκλίμακα (νανοενθυλάκωση) συνδυάζει την προστασία τους από την υποβάθμιση με την αυξημένη απορρόφηση από τον οργανισμό, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των σωματιδίων που χρησιμοποιούνται ως νανοφορείς.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η βιομηχανία τροφίμων αντιμετωπίζει σοβαρούς περιορισμούς ως προς τα συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σχέση με άλλους τομείς βιομηχανικής παραγωγής (Narang et al., 2007). Αυτό συμβαίνει διότι πολλές τεχνικές και υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως σε τομείς που δεν αφορούν εδώδιμα προϊόντα δεν μπορούν να επεκταθούν στα τρόφιμα βάσει νομοθετικών κυρίως περιορισμών. Για το λόγο αυτό η τεχνική της νανοενθυλάκωσης στον τομέα των τροφίμων εστιάζει κυρίως σε υγρές νανοδιασπορές τύπου μικρογαλακτώματος, νανογαλακτώματος καθώς και νανολιποσώματα.

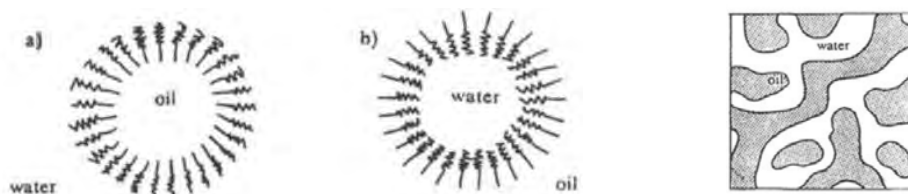
Στην παρούσα μελέτη προτείνεται η χρήση των μικρογαλακτωμάτων ως μέσα ενθυλάκωσης ενζύμων απαραίτων για τη σωστή λειτουργία του πεπτικού συστήματος των ιχθυδίων στους σταθμούς εκτροφής τους. Τα μικρογαλακτώματα αυτά θα μπορούν να ενσωματωθούν ως λιπαρή φάση στην ιχθυοτροφή που ήδη χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία της παραγωγής της και πριν το στάδιο της συσκευασίας.

3.1 Μικρογαλακτώματα

Ο όρος μικρογαλάκτωμα αναφέρεται σε θερμοδυναμικά σταθερά, οπτικά ισότροπα, κolloειδή συστήματα που σχηματίζονται αυθόρμητα με ανάμιξη ελαίων, επιφανειοενεργών ουσιών και υδατικής φάσης (Shinoda et al, 1987). Μίγματα αυτών των τριών συστατικών μπορούν να σχηματίσουν μια ποικιλία διαφορετικών συστημάτων, με την εναλλαγή της σύνθεσής τους και των περιβαλλοντικών συνθηκών (κυρίως της θερμοκρασίας). Με τον όρο «έλαιο» περιγράφεται κάθε υγρό αδιάλυτο στο νερό. Η παρουσία των επιφανειοενεργών μειώνει την μεσεπιφανειακή τάση μεταξύ νερού/ελαίου, σε σημείο που να επιτρέπει την αμοιβαία διαλυτότητα των

δύο υγρών. Τα επιφανειοενεργά είναι αμφίφιλες ενώσεις, εφόσον περιέχουν τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες ομάδες. Η μη πολική τους ουρά προσανατολίζεται στην υδρόφοβη περιοχή του ελαίου, ενώ η υδρόφιλη κεφαλή τους εισχωρεί στην υδατική φάση. Πολλές φορές για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των μικρογαλακτωμάτων είναι αναγκαία η προσθήκη συνεπιφανειοενεργών ουσιών όπως αλκοόλες μικρού και μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας (Papadimitriou et al., 2008).

Τα μικρογαλακτώματα είναι συστήματα χαμηλού ιξώδους και έχουν μεγάλη ικανότητα διαλυτοποίησης ενώσεων διαφορετικής πολικότητας. Συνήθως το μέγεθος των διεσπαρμένων σταγονιδίων κυμαίνεται από 5 έως 50 nm. Σε αντίθεση με τα συνήθη γαλακτώματα, τα μικρογαλακτώματα σχηματίζονται αυθόρμητα με απλή ανάμιξη των συστατικών τους και δεν απαιτούν χρήση μεθόδων υψηλής ενέργειας γαλακτωματοποίησης οι οποίες χρησιμοποιούνται γενικά για το σχηματισμό των συμβατικών γαλακτωμάτων. Υπάρχουν τρεις τύποι μικρογαλακτωμάτων (βλ. Σχήμα 3.1): μικρογαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (o/w), όπου η ελαιώδης φάση διασπείρεται μέσα στην υδατική φάση, μικρογαλακτώματα νερού-σε-έλαιο (w/o) όπου η υδατική φάση είναι διεσπαρμένη μέσα σε ένα ή περισσότερα έλαια, και οι δισυνεχείς διασπορές (Flanagan et al., 2006 – Mc Clements et al., 2011).



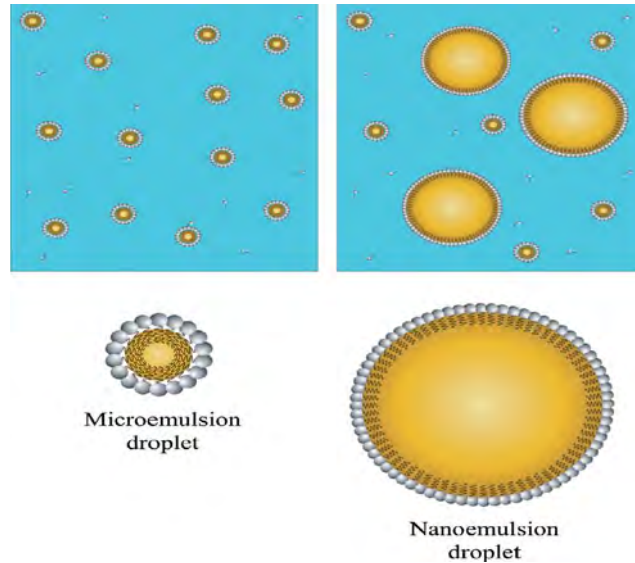
Σχήμα 8. Διαγραμματική Απεικόνιση τύπων μικρογαλακτωμάτων (α) μικρογαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (o/w), (β) μικρογαλακτώματα νερού-σε-έλαιο (w/o) και (γ) δισυνεχείς διασπορές (Lawrence et al, 1994).

Ο όρος μικρογαλακτώματα εμφανίστηκε το 1960 (Stoeckenius et al., 1960) ωστόσο αργότερα ανακαλύφθηκε ότι πρόκειται για δομές με διάμετρο μεγέθους νανοκλίμακας. Τα μικρογαλακτώματα βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς από τα φαρμακευτικά σκευάσματα, τρόφιμα, προϊόντα γεωργίας μέχρι και τα καλλυντικά.

3.2 Νανογαλακτώματα

Τα νανογαλακτώματα είναι κολλοειδή συστήματα διασποράς αποτελούμενα από δύο μη αναμίξιμα υγρά, από τα οποία το ένα βρίσκεται διεσπαρμένο σε μορφή νανοσταγονιδίων (ασυνεχής φάση) στη μάζα του άλλου υγρού (συνεχής φάση) και από επιφανειοενεργές ουσίες. Τα νανογαλακτώματα μπορεί να είναι διαυγή ή ελαφρώς θολά. Τα διεσπαρμένα σταγονίδια είναι σφαιρικού σχήματος με διάμετρο που συνήθως κυμαίνεται από 50 έως 200 nm. Αυτά σχηματίζονται από τη διάσπαση μεγαλύτερων σταγονιδίων, ήδη σχηματισμένων γαλακτωμάτων συνήθως μέσω τεχνικών ομογενοποίησης υψηλής ενέργειας. Τα νανογαλακτώματα χωρίζονται και αυτά σε νανογαλακτώματα νερού-σε-έλαιο (W/O) ή νανογαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (O/W). Είναι θερμοδυναμικά ασταθή αλλά είναι κινητικά σταθερά σε αντίθεση με τα μικρογαλακτώματα, τα οποία παρουσιάζουν θερμοδυναμική σταθερότητα (Mc Clements et al, 2012). Η επιστημονική κοινότητα πριν αρκετά χρόνια είχε υιοθετήσει τον όρο μικρογαλακτώματα, γενικά για τα γαλακτώματα που τα σταγονίδια τους βρίσκονται στην υπομικρομετρική κλίμακα. Για ιστορικούς λόγους και εφόσον τα μικρογαλακτώματα μελετήθηκαν νωρίτερα χρονικά σε σχέση με τα νανογαλακτώματα, έχουν επικρατήσει αυτοί οι ορισμοί, παρόλο που στα νανογαλακτώματα η μέση διάμετρος των νανοσταγόνων είναι μεγαλύτερη από την μέση διάμετρο των των νανοσταγόνων των μικρογαλακτωμάτων.

Τα νανογαλακτώματα βρίσκουν παρόμοια εφαρμογή με τα μικρογαλακτώματα σε πολλούς τομείς όπως η βιομηχανία τροφίμων, η φαρμακοβιομηχανία, η κοσμητολογία και η βιομηχανία καθαριστικών και αγροχημικών προϊόντων (Koroleva et al, 2012 – Wang et al, 2007). Λόγω της μικρότερης περιεκτικότητάς τους σε επιφανειοενεργές ουσίες, σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα, εμφανίζουν πλεονεκτήματα στη χρήση, ιδίως όταν όταν οι επιφανειοενεργές ουσίες υπόκεινται σε νομοθετικό περιορισμό. Συνήθως παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν, λόγω του περιορισμού τους προς τη σταθερότητά τους (Gutiérrez et al, 2008).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση δομών νανοσταγόνων μικρογαλακτώματος και νανογαλακτώματος αντίστοιχα (Mc Clements et al, 2012).

3.3 Συστατικά Μικρογαλακτωμάτων

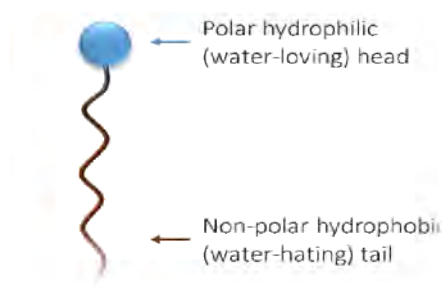
3.3.1 Έλαιο

Τα μικρογαλακτώματα που παρασκευάζονται στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι τύπου νερό-σε-έλαιο (W/O), συνεπώς τα έλαια αποτελούν τη συνεχή φάση. Τα έλαια, τα οποία χρησιμοποιούνται για παρασκευή μικρογαλακτωμάτων που προορίζονται για τη βιομηχανία τροφίμων, είναι βρώσιμα φυτικά έλαια όπως ελαιόλαδο (παρθένο και εξευγενισμένο), ηλιέλαιο, σογιέλαιο, τριγλυκερίδια μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας (Miglyol 818, Miglyol 812, Miglyol 810), εστέρες λιπαρών οξέων (μυριστικός και παλμιτικός ισοπροπυλεστέρας) καθώς και αιθέρια έλαια (λιμονένιο, θυμάρι, ρίγανη κ.α).

3.3.2 Επιφανειοενεργές Ουσίες

Οι επιφανειοενεργές ουσίες είναι αμφίφιλα μόρια καθώς εμφανίζουν δύο περιοχές διαφορετικής πολικότητας. Το μόριο περιέχει μια πολική κεφαλή η οποία είναι υδρόφιλη και προσανατολίζεται στην υδατική φάση του γαλακτώματος και μια μη πολική ουρά η οποία είναι υδρόφοβη και προσανατολίζεται προς την ελαιώδη φάση του γαλακτώματος (βλ. Σχήμα 9). Η παρουσία των επιφανειοενεργών ουσιών αυξάνει

την μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο υγρών με αποτέλεσμα η υδατική και η ελαιώδης φάση να βρίσκονται σε διασπορά η μία μέσα στην άλλη λόγω της μείωσης της επιφανειακής τάσης. Βέβαια, μόνο η ύπαρξη επιφανειοενεργών ουσιών δεν είναι πάντα ικανή για την μείωση της επιφανειακής τάσης στα αναγκαία επίπεδα για την δημιουργία μικρογαλακτωμάτων, για αυτόν τον λόγο πολλές φορές χρησιμοποιούνται και συνεπιφανειοενεργές ουσίες.



Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση μορίου επιφανειοενεργού

Οι επιφανειοενεργές ουσίες χωρίζονται σε κατηγορίες, ανάλογα με την ύπαρξη και το είδος του φορτίου στην πολική κεφαλή του μορίου. Οι κατηγορίες επιφανειοενεργών είναι οι εξής: α) η πολική κεφαλή να μην έχει φορτίο (μη ιοντικά επιφανειοενεργά) και β) η πολική κεφαλή να έχει φορτίο (ιοντικά επιφανειοενεργά). Η τελευταία αποτελείται από τρεις διακριτές υποκατηγορίες (Hines et al, 1997):

- ανιοντικά επιφανειοενεργά (anionic): η πολική κεφαλή είναι αρνητικά φορτισμένη.
- κατιοντικά επιφανειοενεργά (cationic): η πολική κεφαλή είναι θετικά φορτισμένη.
- αμφοτεριοντικά επιφανειοενεργά (zwitterionic): η πολική κεφαλή περιέχει και θετικά και αρνητικά φορτία.

3.3.3 Συνεπιφανειοενεργές Ουσίες

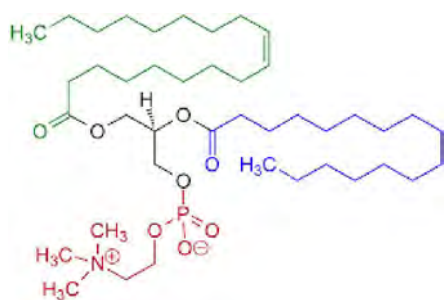
Συνεπιφανειοενεργή θεωρείται μια χημική ουσία η οποία προστίθεται σε ένα μικρογαλάκτωμα προκειμένου να βελτιώσει την αποτελεσματικότητας του επιφανειοενεργού. Τα μόρια αυτά κατανέμονται μεταξύ της συνεχούς φάσης και της μεσεπιφάνειας προκαλώντας αύξηση της καμπυλότητας της μονοστιβάδας των επιφανειοενεργών και επομένως σταθεροποίηση του συστήματος (Von Rybinski et al., 1998 – Cornel et al., 1986). Παραδείγματα συνεπιφανειοενεργών είναι αλκοόλες ή

αμίνες μικρού μήκους ανθρακικής αλυσίδας. Επίσης για τη σταθεροποίηση των μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιείται συχνά, η γλυκερόλη και η προπυλενογλυκόλη.

3.4 Μικρογαλακτώματα Λεκιθίνης

Η λεκιθίνη είναι το βασικότερο συστατικό των βιολογικών μεμβρανών. Ως λεκιθίνη, αναφέρονται τα μίγματα των φωσφολιπιδίων που λαμβάνονται από πηγές όπως το αυγό, η σόγια κ.α. Χρησιμοποιείται ως αμφοτεριοντικό επιφανειοενεργό καθώς περιέχει δύο μακρές υδρόφοβες αλυσίδες και μια αμφοτεριοντική κεφαλή (Shinoda et al., 1993). Το μόριο τείνει να έχει κυλινδρικό σχήμα και έτσι, τα συσσωματώματά της σχηματίζουν εύκολα στοιβάδες και ευνοείται η δημιουργία αντιστρόφων ή μη μικκυλίων.

Η λεκιθίνη είναι βιοσυμβατό επιφανειοενεργό και δημιουργεί μικρογαλακτώματα με μικρό μέγεθος σταγονιδίων και κατά συνέπεια συστήματα που αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών που έχουν εγκλωβισμένα στο εσωτερικό τους (Aboofazeli et al, 1994 – Kahlweit et al., 1995). Πέραν του ότι αποτελεί βασικό συστατικό των βιολογικών μεμβρανών είναι μη τοξική κατά την βρώση και μεταβολίζεται πλήρως από τον άνθρωπο. Μεγάλο ενδιαφέρον, τα τελευταία χρόνια, παρουσιάζει ενθυλάκωση τόσο μικρού όσο και μεγαλύτερου μοριακού βάρους ουσιών όπως φάρμακα, αμινοξέα, μικρά πεπτίδια, πρωτεΐνες και ένζυμα, σε μικρογαλακτώματα λεκιθίνης (Avramiotis et al., 1996 – Kiriazi et al., 2013).



Εικόνα 4. Χημική δομή Λεκιθίνης - Εικόνα 5. Λεκιθίνη σόγιας σε στερεή μορφή

3.5 Χρήσεις της Λεκιθίνης

Η λεκιθίνη είναι μια βιοσυμβατή επιφανειοενεργή ουσία, κατάλληλη για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό των ζωοτροφών σε φωσφολιπίδια και αποτελεί πηγή χολίνης. Ως επιφανειοενεργή ουσία,

βοηθά στην γαλακτωματοποίηση αλλά και στον εγκλωβισμό βιοδραστικών και φαρμακευτικών ουσιών σε νανοφορείς, με εφαρμογή στην κοσμητολογία αλλά και τη φαρμακοβιομηχανία. Επιπλέον, δρα ως παράγοντας ενυδάτωσης και ως φορέας σταθεροποίησης φαρμακευτικών σκευασμάτων. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της λεκιθίνης την καθιστούν ιδανική ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία τροφίμων καθώς μειώνει το ιξώδες, σταθεροποιεί τη σύνθεση των τροφίμων και ελέγχει τη ρευστότητα υλικών όπως η σοκολάτα. Βοηθά, επίσης, στην ομογενοποίηση των συστατικών των μιγμάτων και βελτιώνει τη διάρκεια ζωής κάποιων προϊόντων αλλά και την υφή τους. Χρησιμοποιείται αρκετά στη βιομηχανία τροφίμων, εκτός των άλλων και λόγω του χαμηλότερου κόστους της σε σχέση με άλλα επιφανειοενεργά.

3.6 Εφαρμογές μικρογαλακτωμάτων

3.6.1 Εφαρμογή στην κοσμητολογία

Τα μικρογαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα καθαρισμού δέρματος, σε αντηλιακά, σε προϊόντα περιποίησης μαλλιών κ.α. Το ανθρώπινο δέρμα είναι ελάχιστα διαπερατό από ιόντα και ουσίες, διαλυτοποιημένες σε αμιγώς υδατικά διαλύματα λόγω της ιδιότητας του δέρματος να λειτουργεί ως φραγμός εισόδου. Η απορρόφηση των βιοδραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των κρεμών, εξαρτάται από τους φορείς ενθυλάκωσης των ουσιών αυτών. Αν η ουσία είναι διαλυτή σε μια από τις φάσεις φορέα (o/w ή w/o) θα εισχωρήσει αποτελεσματικότερα στο δέρμα, λόγω της αλληλεπίδρασης της διεπιφάνειας του μικρογαλακτώματος με την μεμβράνη των δερματικών κυττάρων. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική εφαρμογή αποτελεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης των μικρογαλακτωμάτων ως φορείς βιοδραστικών ουσιών όπως οι βιταμίνες ή τα αντιοξειδωτικά. Μέσω των μικρογαλακτωμάτων τα παραπάνω προστατεύονται από την αυτόξειδωση (Boonme et al., 2007).

3.6.2 Φαρμακολογική Εφαρμογή

Η ενθυλάκωση βιοδραστικών ουσιών σε νανοδιασπορές τις «προστατεύει» καθ'όλη τη διάρκεια της πορείας τους προς το κύτταρο-στόχο και πιθανά αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητά τους. (Malam et al, 2007 – Sedef et al, 2016). Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει φαινόμενα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών με μικρογαλακτώματα που προορίζονται για χρήση στο στόμα, είτε μέσω τοπικής

εφαρμογής, είτε μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης. Ενδεικτικά, έχουν αναπτυχθεί μικρογαλακτώματα για την μεταφορά χημειοθεραπευτικών και άλλων βιοδραστικών ουσιών με πιθανή φαρμακολογική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων διαφόρων τύπων (Theochari et al, 2017 – Yallapu et al, 2012). Οι Petola et al (2002), ανέπτυξαν μικρογαλακτώματα λεκιθίνης στα οποία ενθυλακώθηκε οιστραδιόλη, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμασίες *in vitro* και μελετήθηκε η απελευθέρωση της ουσίας. Τέλος, οι Hu et al (2011) πραγματοποίησαν ενθυλάκωση ιβουπροφαίνης και ανέπτυξαν μικρογαλακτώματα για χορήγηση εκ του στόματος.

3.6.3 Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων

Η δυνατότητα παρασκευής μικρογαλακτωμάτων με σκοπό την χρήση τους ως φορείς ουσιών στην βιομηχανία τροφίμων είναι ένα σημαντικό πεδίο έρευνας. Βέβαια, εμφανίζονται πολλοί νομοθετικοί περιορισμοί για την επιλογή των πρώτων υλών ώστε τα μικρογαλακτώματα να είναι ασφαλή και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα, Εκτός από τη χρήση τους ως φορείς ενθυλάκωσης βιοδραστικών ουσιών με ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων (Rashidi et al, 2011 – Nazzaro et al, 2012) τα μικρογαλακτώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη νανοδόμηση διάφορων τροφίμων. Ειδικότερα μικρογαλακτώματα τύπου νερό σε έλαιο μπορούν να αντικαταστήσουν μέρος της λιπαρής φάσης ενός τροφίμου με αποτέλεσμα τη μείωση του περιεχόμενου λίπους αλλά και την ελάττωση του βαθμού επεξεργασίας (π.χ. μικρότερος χρόνος ομογενοποίησης) (Mitsou et al., 2016). Με ανάλογο τρόπο μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρογαλακτώματα ελαίου σε νερό για αντικατάσταση μέρους της υδατικής φάσης τροφίμων που βασίζονται σε γαλακτώματα. Πρόσφατα έχει αναφερθεί η ανάπτυξη βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων με εφαρμογή τη μεταφορά φυσικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα. Τα μικρογαλακτώματα αυτά βασίζονται σε λεκιθίνη, τριγλυκερίδια και αλκοόλες (Chatzidaki et al, 2015), καθώς και πολυσορβικά, λιμονένιο και αλκοόλες (Kalaitzaki et al, 2013).

4. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Υλικά

4.1.1 Έλαια και επιφανειοενεργά

Για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ως επιφανειοενεργό λεκιθίνη σόγιας καθαρότητας 90% από την Alfa Aesar (ΗΠΑ) και ως συνεχής λιπαρή φάση τριγλυκερίδια μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας (MTC-Miglyol 818) από την Sasol (Johannesburg, SouthAfrica). Το Miglyol 818 είναι τριγλυκερίδιο καπρικού/καπρυλικού οξέος με προσθήκη 4-5% λινελαϊκού οξέος.

4.1.2 Ένζυμο

Στα μικρογαλακτώματα πραγματοποιήθηκε εγκλωβισμός παγκρεατικής θρυψίνης τύπου I από βοοειδή, η οποία ήταν προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich (USA). Πυκνό διάλυμα του ενζύμου 48mg/mL παρασκευάστηκε σε διάλυμα HCl (pH 3) και διατηρήθηκε στην κατάψυξη. Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε ως είχε, χωρίς περαιτέρω στάδια καθαρισμού. Με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.

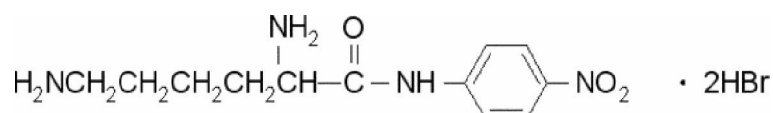
4.1.3 Υδατική φάση

Η υδατική φάση των μικρογαλακτωμάτων ήταν α) Μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0,1M (pH 8.5) με προπυλενολυκόλη και β) διάλυμα θρυψίνης σε μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0,1M (pH 8.5) – προπυλενογλυκόλης. Το διάλυμα θρυψίνης παρασκευάστηκε κατόπιν αραιώσης του πυκνού διαλύματος σε μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0,1M (pH 8.5) με προπυλενολυκόλη σε αναλογία 1:1. Για την παρασκευή της υδατικής φάσης των μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό το οποίο προήλθε από απομάκρυνση των ιόντων με τη συσκευή MilliQPlus της Millipore.

4.1.4 Αντιδραστήρια κινητικής μελέτης

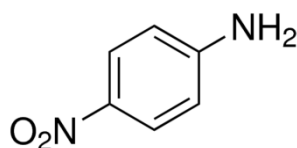
Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης και την κινητική μελέτη ήταν το L-lysine-

p-nitroanilidedihydrobromide (LNA), προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co (St. Louis, USA) του οποίου ο μοριακός τύπος εμφανίζεται στο σχήμα 10. Σαν διάλυμα παρακαταθήκης, παρασκευάστηκε διάλυμα LNA σε μεθανόλη 0,1M το οποίο αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη. Με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 10. Χημική δομή του L-lysine-p-nitroanilide dihydrobromide (LNA)

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ειδική μοριακή απορρόφηση του προϊόντος της ενζυμικής υδρόλυσης (p-νιτροανιλίνη) κατασκευάστηκε κατάλληλη πρότυπη καμπύλη. Για την κατασκευή της χρησιμοποιήθηκε p-νιτροανιλίνη η οποία ήταν προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich (USA) (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Χημική δομή της p-νιτροανιλίνης

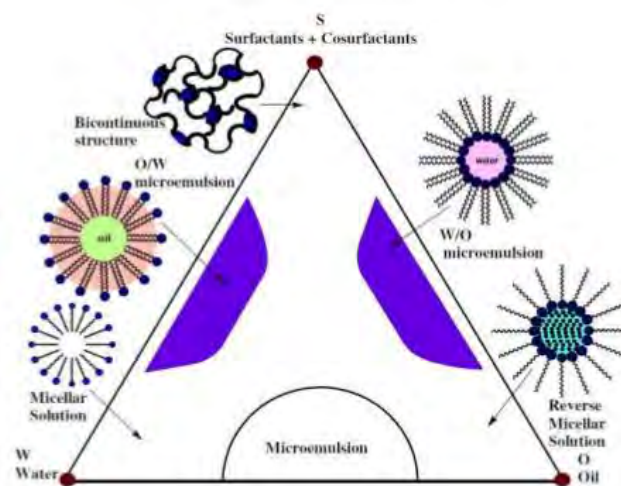
4.2 Μέθοδοι

Προκειμένου να αναπτυχθεί ένα μικρογαλάκτωμα ως μέσο ενθυλάκωσης βιοδραστικής ουσίας θα πρέπει αρχικά να γίνει προσδιορισμός των δομικών του χαρακτηριστικών τα οποία και θα αποτελέσουν την βάση για την μελέτη των δυνατοτήτων του συστήματος, την βελτιστοποίησή του και την ανάπτυξη νέων εφαρμογών. Στην παρούσα εργασία, η δομική μελέτη του προτεινόμενου συστήματος πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή ψευδοτριγωνικού διαγράμματος φάσεων και με την χρήση της τεχνικής της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός. Η κινητική μελέτη της ενζυμικής υδρόλυσης στο μικρογαλάκτωμα πραγματοποιήθηκε με μέτρηση απορρόφησης του σχηματιζόμενου προϊόντος στο ορατό με χρήση φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης U-2000, Hitachi, Japan.

4.2.1. Τριγωνικό Διάγραμμα Φάσεων

Για να περιγραφούν συστήματα τριών συστατικών με αναπαράσταση της σύστασής τους, χρησιμοποιούνται συνήθως τριγωνικά διαγράμματα φάσεων. Ένα τυπικό διάγραμμα φάσεων απεικονίζεται από ένα ισόπλευρο τρίγωνο (Σχήμα 12). Τα σημεία που αποτελούν τις κορυφές αντιστοιχούν σε τρία καθαρά συστατικά ή μείγματα δύο ή περισσοτέρων συστατικών σταθερής αναλογίας, συνεπώς το διάγραμμα που προκύπτει καλείται τριγωνικό ή ψευδο-τριγωνικό διάγραμμα φάσης, αντίστοιχα (N.A. Κατσάνος, 1999). Κάθε σημείο στο εσωτερικό του τριγώνου απεικονίζει μίγμα και των τριών συστατικών σε ορισμένη αναλογία.

Επιλέγοντας τα σημεία για τα οποία το σύστημα είναι μονοφασικό δημιουργούνται δυο διακριτές περιοχές στο διάγραμμα. Η μια είναι η περιοχή που το σύστημα είναι μονοφασικό και δεύτερη είναι η περιοχή που το σύστημα είναι πολυφασικό. Τα μικρογαλακτώματα εντοπίζονται στην μονοφασική περιοχή. Επίσης στην μονοφασική περιοχή του τριγωνικού διαγράμματος διακρίνονται μικρογαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό (O/W), μικρογαλακτώματα τύπου νερού σε έλαιο (W/O) και δισυνεχή μικρογαλακτώματα.



Σχήμα 12. Θεωρητική απεικόνιση τριγωνικού διαγράμματος φάσης (Malik et al, 2012)

Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να προσδιοριστεί η μονοφασική περιοχή συστήματος αποτελούμενου από έλαιο, επιφανειοενεργό και νερό εργαστήκαμε ως εξής. Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα λεκιθίνης/Miglyol 818 (1:4 κ.β) και διατηρήθηκε στους 25°C. Στη συνέχεια το διάλυμα λεκιθίνης/Miglyol 818

αναμίχθηκε με το Miglyo 818 σε αναλογίες από 1:9 έως 9:1 κατά βάρος (Εικόνα 6). Τα μείγματα τιτλοδοτήθηκαν με την υδατική φάση μέχρι να παρατηρηθεί θολότητα. Η υδατική φάση προέκυψε από ανάμειξη του ρυθμιστικού διαλύματος με την συνεπιφανειοενεργή ουσία (προπυλενογλυκόλη). Μετά από κάθε προσθήκη υδατικής φάσης τα συστήματα αναδεύονται μηχανικά και αφήνονται να ισορροπήσουν για 24 ώρες, σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 25° C. Σημειώνεται η ποσότητα υδατικής φάσης κατά βάρος που καταναλώθηκε. Τα μικρογαλακτώματα που προκύπτουν είναι σταθερά και οπτικά διαυγή. Παρασκευάστηκαν μικρογαλακτώματα, οι αλλαγές φάσης των οποίων αναπαρίστανται σε ψευδο-τριγωνικό (4 συστατικά) διάγραμμα φάσεων. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας για τα τριγωνικά διαγράμματα φάσης αναλύθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ProSim Ternary Diagram software.



Εικόνα 6. Μικρογαλακτώματα σε αναλογίες ελαιώδους φάσης/διαλύματος επιφανειοενεργού από 9:1 ως 1:9 κ.β. μετά από προσθήκη 5μL υδατικής φάσης.

4.2.2 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων

Το μικρογαλακτώμα που αναπτύχθηκε στη συγκεκριμένη εργασία αποτελείται από τριγλυκερίδια μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας (Miglyol 818) που χρησιμοποιήθηκαν ως ελαιώδης φάση, ενώ ως επιφανειοενεργό και συνεπιφανειοενεργό χρησιμοποιήθηκαν λεκιθίνη σόγιας και προπυλενογλυκόλη αντίστοιχα. Η λεκιθίνη σόγιας διαλυτοποιήθηκε σε ποσότητα του ελαίου σε αναλογία 1:4 κατά βάρος (κ.β.) και το διάλυμα που προέκυψε προστέθηκε στο έλαιο σε συγκεκριμένη αναλογία. Η προπυλενογλυκόλη αναμίχθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0.1M με pH 8.5 σε αναλογία 1:1 κ.β. και το μίγμα αυτό αποτέλεσε την υδατική φάση. Το μικρογαλακτώμα σχηματίστηκε με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας υδατικής φάσης σε 1g συνολικού μίγματος επιφανειοενεργών-ελαίων. Η παρασκευή έγινε υπό σταθερή θερμοκρασία (25°C).

Η βιοδραστική ουσία που εγκλωβίστηκε στα μικρογαλακτώματα ήταν η θρυψίνη. Αρχικά παρασκευάστηκε πυκνό υδατικό διάλυμα θρυψίνης σε pH 3 με ήπια

ανάδευση και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη. Για την παρασκευή της υδατικής φάσης χρησιμοποιήθηκε ποσότητα αυτού, αραιωμένη σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0.1M με pH 8.5 και προτυλενογλυκόλης σε αναλογία 1:1 κ.β. Για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων, με ενθυλακωμένο το ένζυμο, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτήν που περιγράφηκε παραπάνω. Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου στο μικρογαλάκτωμα ήταν 22μg/mL.

4.2.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Η μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών έγινε με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός, (Dynamic Light Scattering, DLS) η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους (διαμέτρου, d) των αντίστροφων μικκυλίων, αλλά και για τον προσδιορισμό της ομοιογένειας των μικρογαλακτωμάτων (Δείκτης πολυδιασποράς, Pdl). Οι μετρήσεις DLS πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή Zetasizer NanoZS (ZEN3600) από την Malvern Instruments(UK) εφοδιασμένη με λέιζερ He-Ne(632,8 nm), και χρησιμοποιώντας τεχνολογία (NIBS). Οι μετρήσεις έγιναν κατά τη γωνία σκέδασης των 173° (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Συσκευή Zetasizer NanoZS (ZEN3600) από την Malvern Instruments (UK)

Η μέση διάμετρος των διεσπαρμένων νανοσταγονιδίων υπολογίστηκε από το νόμο Stokes-Einstein: $R_H = k_B T / (6\pi\eta D)$ όπου R_H , k_B , T , και D είναι η υδροδυναμική ακτίνα του σταγονιδίου, η σταθερά του Boltzmann, η θερμοκρασία σε Kelvin, το ιξώδες του μικρογαλακτώματος και η σταθερά διάχυσης, αντίστοιχα. Όλα τα συστατικά των μικρογαλακτωμάτων διηθήθηκαν μέσω υδρόφιλων ή λιπόφιλων φίλτρων με πόρο μεγέθους 0.45 μm, ανάλογα με την σύστασή τους. Μετά την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων τοποθετήθηκαν σε κατάλληλη κυψελίδα

χαλαζία. Η κυψελίδα χρησιμοποιήθηκε ούσα απαλλαγμένη από σκόνη με χρήση αζώτου. Τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας την έκδοση 6.32 του λογισμικού Malvern Zetasizer Nano που ταιριάζει σε ένα σφαιρικό μοντέλο διάχυσης σωματιδίων με πολυδιασπορά κάτω από μια τιμή 0.1.

Οι μετρήσεις έγιναν σε επιλεγμένα μικρογαλακτώματα νερού-σε-έλαιο απουσία της θρυψίνης (empty) και σε μικρογαλακτώματα με θρυψίνη ενθυλακωμένηστην υδατική φάση (loaded). Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων ήταν σταθερή 25 °C.

4.2.4 Ενζυμική υδρόλυση σε μικρογαλακτώματα

Η φασματοσκοπία απορρόφησης βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης Ατων δειγμάτων που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής b. Η συγκέντρωση c ενός αναλύτη που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με τον νόμο του Beer:

$$A = \log P_0/P = \epsilon bc$$

όπου P_0 η ακτινοβολούμενη ισχύς, P η διορθωμένη ακτινοβολούμενη ισχύς, A η μοριακή απορρόφηση, ϵ η γραμμομοριακή απορροφητικότητα, b το μήκος της οπτικής διαδρομής σε cm και c η συγκέντρωση του αναλύτη (Skoog, 2007).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία, οπτικής διαδρομής μήκους 1cm και η απορρόφηση του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης (p-νιτροανιλίνης) μετρήθηκε σε μήκος κύματος 381nm. Η συγκέντρωση της παραγόμενης p-νιτροανιλίνης υπολογίζεται με τη βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε με χρήση πρότυπης p-νιτροανιλίνης. Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν θερμοστατούμενο φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης U-2000, Hitachi, Japan (Εικόνα 8).

Η υδρόλυση του LNA από θρυψίνη σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, ακολουθεί κινητική κατά Michaelis – Menten. Η κινητική σταθερά της ενζυμικής αντίδρασης K_m (σταθερά Michaelis – Menten) και η μέγιστη ταχύτητα V_{max} υπολογίστηκαν μέσω

του GraphPad Prism 5 Software. Με το ίδιο πρόγραμμα σχεδιάστηκαν και τα διαγράμματα $V_0=f([LNA])$ και Lineweaver-Burk.



Εικόνα 8. Θερμοστατούμενο φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης U-2000, Hitachi, Japan.

Για τη μελέτη της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης στα μικρογαλακτώματα εργαστήκαμε ως εξής:

Αρχικά ζυγίζεται ποσότητα 1g μίγματος Miglyol818/Miglyol 818-Λεκιθίνης αναλογίας 1:1 σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος υποστρώματος. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη διαλύματος θρυψίνης και ελαφρά ανάδευση. Η συνολική περιεχόμενη ποσότητα σε υδατική φάση (0,1M Tris-HCl pH 8.5 – προπυλενογλυκόλη σε αναλογία 1:1) είναι 0.5% κ.β. Κάθε δείγμα μεταφέρεται άμεσα σε κυψελίδα χαλαζία και μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης. Το δείγμα αναφοράς παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο και περιέχει τις ίδιες ποσότητες ουσιών, με τη διαφορά ότι αντί για την ποσότητα ενζύμου, περιέχει ίσο όγκο 0,1M Tris HCl pH 8.5 – προπυλενογλυκόλη σε αναλογία 1:1. Η μεταβολή της απορρόφησης σχετίζεται με τον σχηματισμό του παραγόμενου προϊόντος και μετράται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στα 381 nm. Για την κινητική μελέτη της υδρόλυσης του L-lysine-p-nitroanilide (LNA) από θρυψίνη στο περιβάλλον του μικρογαλακτώματος χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ενζύμου 22μg/mL και ένα εύρος συγκεντρώσεων του υποστρώματος 2μM – 0.2mM.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Δομική μελέτη μικρογαλακτώματος

5.1.1 Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσης

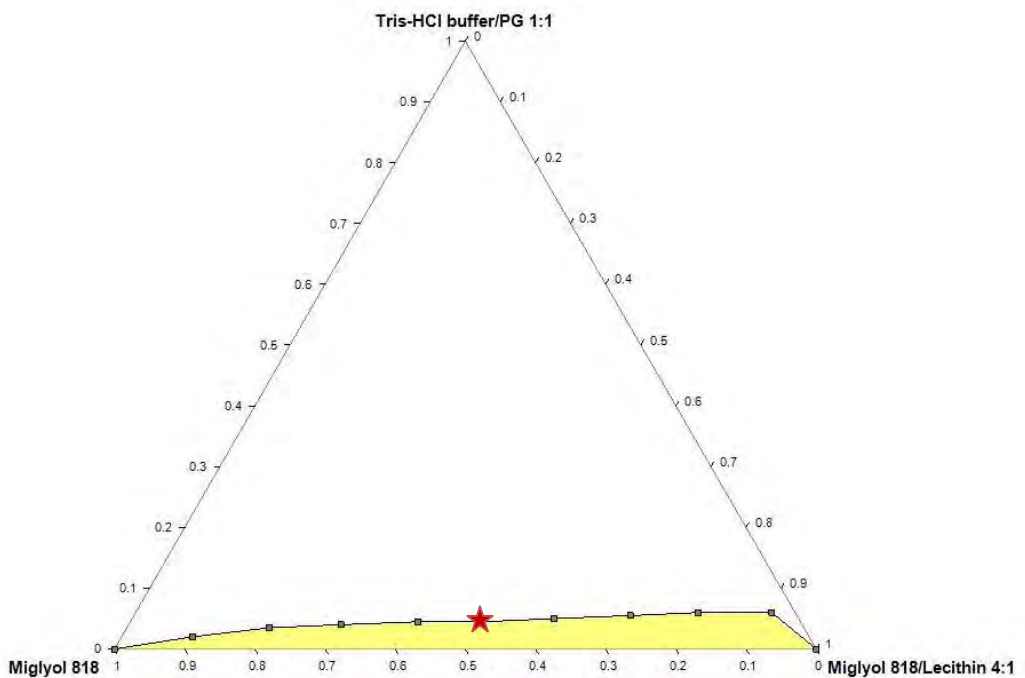
Τα συστατικά του επιλεγμένου προς μελέτη συστήματος αναφέρονται παρακάτω:

- **Έλαιο (Oil):** Τριγλυκερίδια μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας (Miglyol 818)
- **Επιφανειοενεργό (Surfactant):** Λεκιθίνη σόγιας διαλυτοποιημένη σε Miglyol 818 με αναλογία 1:4 κ.β.
- **Υδατική φάση (Aqueous Phase):** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0.1M με pH 8.5 με προπυλενογλυκόλη σε αναλογία 1:1 κ.β.

Το τριγωνικό διάγραμμα φάσεων που προκύπτει από την τιτλοδότηση του μίγματος Miglyol818/λεκιθίνης με την υδατική φάση φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 12).

Πίνακας 2. Ποσότητες (g) και ποσοστό επί του συνόλου των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του τριγωνικού διαγράμματος φάσεων

Oil (g)	Surfac. (g)	Aq. Ph. (g)	Sum (g)	% Oil	%Surfac.	%Aq. Ph.
0,9046	0,1008	0,0200	1,0254	88,2	9,8	2,0
0,8059	0,2026	0,0350	1,0435	77,2	19,4	3,4
0,7015	0,3024	0,0400	1,0439	67,2	29,0	3,8
0,6069	0,4098	0,0450	1,0617	57,2	38,6	4,2
0,5051	0,5019	0,0450	1,052	48,0	48,0	4,0
0,4008	0,6019	0,0500	1,0527	38,1	57,2	4,8
0,3001	0,7073	0,0550	1,0624	28,3	66,6	5,1
0,2078	0,8018	0,0600	1,0696	19,4	75,0	5,6
0,1023	0,9067	0,0600	1,069	9,6	84,8	5,6



Σχήμα 12. Τριγωνικό διάγραμμα φάσεων του συστήματος που περιέχει Miglyol818/Λεκιθίνη σόγιας/Προπυλενογλυκόλη/Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0.1M με pH 8.5. Με αστερίσκο σημειώνεται στο διάγραμμα η σύσταση που επιλέχθηκε για την ενθυλάκωση της θρυψίνης και τη δομική μελέτη.

Η χρωματισμένη περιοχή αντιστοιχεί στη μονοφασική περιοχή όπου ορίζονται τα μικρογαλακτώματα ενώ η μη χρωματισμένη περιοχή είναι η περιοχή όπου παρατηρούνται διφασικά και πολυφασικά συστήματα. Για περαιτέρω δομική μελέτη καθώς και για την ενθυλάκωση της θρυψίνης επιλέχθηκε μικρογαλάκτωμα αποτελούμενο από 48% κ.β Miglyol818, 48% κ.β μίγμα λεκιθίνης/Miglyol 818 (1:4) και 4% κ.β υδατική φάση (Σχήμα 12) ή 84% κ.β Miglyol 818, 12% κ.β λεκιθίνη και 4% κ.β. υδατική φάση.

Η πιο πάνω αναλογία ελαίου, επιφανειοενεργού επιλέχθηκε λόγω της ικανότητας ενσωμάτωσης ικανοποιητικής ποσότητας υδατικής φάσης αναγκαίας για την ενθυλάκωση του πρωτεϊνικού μορίου και την υδρόλυση του υποστρώματος. Η μονοφασική περιοχή που προβλέπεται από το διάγραμμα φάσης μίγματος νερού-ελαίου-επιφανειοενεργού συχνά διαφοροποιείται με την προσθήκη βιοδραστικών μορίων στην υδατική φάση του μικρογαλακτώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιεκτικότητα των μικρογαλακτωμάτων σε υδατική φάση περιορίστηκε μετά την ενθυλάκωση της θρυψίνης, πιθανότατα λόγω αλληλεπιδράσεων του ενζύμου με τα

μόρια του επιφανειοενεργού μέσα στους υδάτινους πυρήνες. Στην περίπτωση μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, το όριο της μονοφασικής περιοχής μετατοπίζεται συχνά προς μικρότερες περιεκτικότητες ως προς την υδατική φάση, λόγω αλληλεπίδρασης τους με τα μόρια του επιφανειοενεργού (Orlich et al., 2002). Πράγματι, στην παρούσα μελέτη, η περιεκτικότητα των μικρογαλακτωμάτων σε υδατική φάση περιορίστηκε μετά την ενθυλάκωση της θρυψίνης. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του επιλεγμένου μικρογαλακτώματος σε υδατική φάση μειώθηκε στο 1% κ.β αντί του 4% κ.β.

Από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε δεν υπάρχει μέχρι τώρα στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορά σε κάποιο μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο που να σχηματίζεται με λεκιθίνη και Miglyol 818 απουσία αλκοολών (αιθανόλη, προπανάλη, βουτανόλη, εξανόλη) ως συνεπιφανειοενεργό. Παρόλα αυτά, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες για την συμπεριφορά μικρογαλακτωμάτων που περιέχουν λεκιθίνη και τριγλυκερίδια παρουσία αλκοολών (Chatzidaki et al, 2015). Η λεκιθίνη έχει την τάση να σχηματίζει υγρές κρυσταλλικές δομές, ιδιαίτερα όταν έρχεται σε επαφή με την υδατική φάση. Για να αποφευχθεί η δημιουργία των κρυστάλλων και να είναι εφικτή η δημιουργία αντίστροφων μικκυλίων, είναι απαραίτητη η χρήση συνεπιφανειοενεργών ουσιών (Aboofazeli et al., 1993). Στην παρούσα μελέτη προκειμένου να διασφαλιστεί η βιοσυμβατότητα του σκευάσματος, αποφεύχθηκε η χρήση αλκοολών ως συνεπιφανειοενεργών ουσιών και έναντι αυτών χρησιμοποιήθηκε προπυλενογλυκόλη.

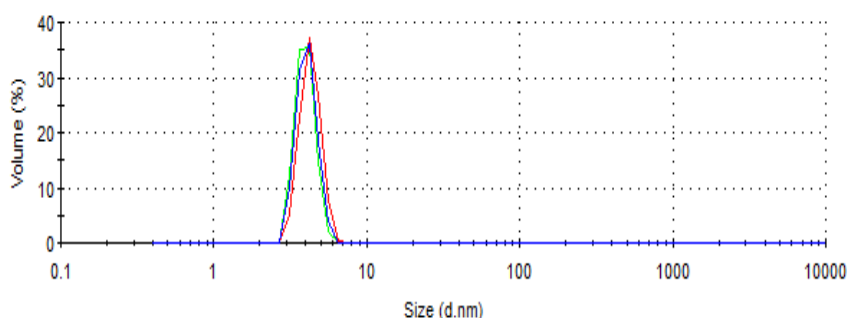
5.1.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της υδροδυναμικής διαμέτρου των αντίστροφων μικκυλίων σε επιλεγμένο σύστημα απουσία και παρουσίας ενζύμου. Η σύσταση του μικρογαλακτώματος που επιλέχθηκε ήταν 84% κ.β Miglyol 818, 12% κ.β λεκιθίνη και 4% κ.β. προπυλενογλυκόλη/ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0.1M με pH 8.5.

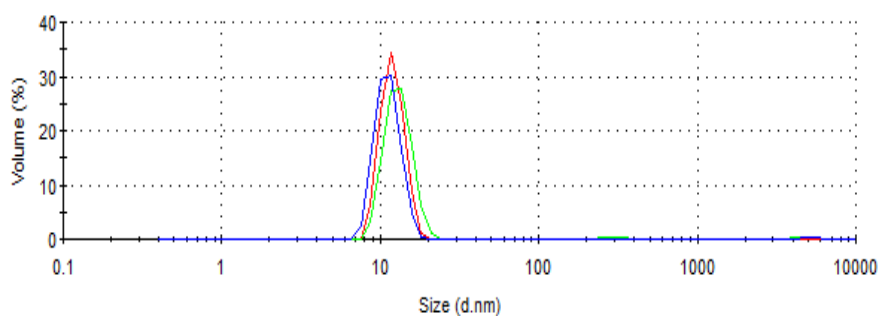
Το μέγεθος των νανοσταγόνων, μετά τον εγκλωβισμό, μεταβλήθηκε σημαντικά με την προσθήκη της θρυψίνης, λόγω του μεγέθους της σε σχέση με την υδροδυναμική ακτίνα του αντίστροφου μικκυλίου. Το μέγεθος του ενζύμου προσδιορίζεται βάση βιβλιογραφίας στα 4nm (3.8nm x 3.8nm x 3.8nm) όσο δηλαδή και η διάμετρος του μικκυλίου πριν την ενθυλάκωση της θρυψίνης (Guerreiro et al, 2014). Πιο συγκεκριμένα, η διάμετρος αυξήθηκε κατά 8nm μετά τον εγκλωβισμό της

θρυψίνης. Στο μικρογαλάκτωμα απουσία θρυψίνης η μέση υδροδυναμική διάμετρος προσδιορίστηκε στα $4\text{nm}\pm 0.5$. Παρουσία θρυψίνης, η μέση υδροδυναμική διάμετρος προσδιορίστηκε στα $12\text{nm}\pm 0.7$. Ο Δείκτης Πολυδιασποράς (Pdl) δεν διαφοροποιήθηκε μετά τον εγκλωβισμό της θρυψίνης και παρατηρείται ότι διατηρήθηκε σε σχετικά υψηλές τιμές ($\text{Pdl}>0,3$). Είναι ένα γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις διαμορφώσεις της λεκιθίνης που πιθανόν να αποκλείουν από το σφαιρικό σχήμα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις των δειγμάτων έγιναν με προσθήκη 5μL υδατικής, καθώς αυτό είναι το ποσό της υδατικής φάσης που ενθυλακώθηκε για την κινητική μελέτη του συστήματος. Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί στο 0.5% κ.β στο επιλεγμένο μικρογαλάκτωμα. Η συγκέντρωση του εγκλωβισμένου ενζύμου στο μικρογαλάκτωμα ήταν $22\ \mu\text{g}/\text{mL}$. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δυο ανεξάρτητες εργαστηριακές μέρες. Κάθε εργαστηριακή μέρα έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Παρατίθενται τα διαγράμματα κατανομής μεγεθών για το μικρογαλάκτωμα απουσία (α) και παρουσία (β) του ενζύμου.



Σχήμα 13(α). Καμπύλη κατανομής μεγεθών των αντίστροφων μικυλλίων απουσία θρυψίνης

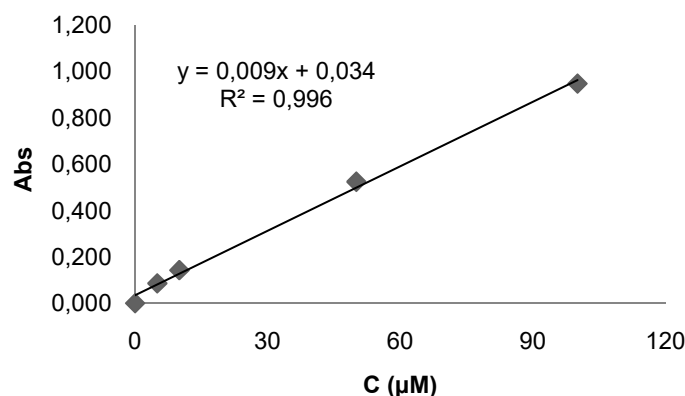


Σχήμα 13(β). Καμπύλη κατανομής μεγεθών των αντίστροφων μικυλλίων παρουσία θρυψίνης, με συγκέντρωση $22\ \mu\text{g}/\text{mL}$.

5.2 Κινητική μελέτη ενζυμικής αντίδρασης

Για την έναρξη της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης στο μικρογαλάκτωμα νερού-σε-έλαιο πραγματοποιήθηκε προσθήκη πυκνού υδατικού διαλύματος ενζύμου σε μίγμα ελαίου-επιφανειοενεργού στο οποίο έχει διαλυτοποιηθεί το υποστρώμα. Οι συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων ενζύμου και υποστρώματος είναι τέτοιες ώστε να επιτυγχάνονται οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις στο μικρογαλάκτωμα. Μετά την προσθήκη του υποστρώματος αλλά και την ενθυλάκωση του ενζύμου, το μικρογαλάκτωμα παραμένει οπτικά διαυγές, γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης μέσω φωτομετρίας. Το προϊόν της αντίδρασης (p-νιτροανιλίνη) απορροφά στο ορατό και συγκεκριμένα στα 381 nm. Η μεταβολή της μετρούμενης απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο είναι ανάλογη της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

Οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις στο περιβάλλον των αντίστροφων μικκυλίων ακολουθούν κυρίως, κινητική Michaelis–Menten. Παρόλα αυτά λόγω του διαφορετικού περιβάλλοντος στα συστήματα και λόγω της διαφορετικής κατανομής του υποστρώματος στη μεσεπιφάνεια και στην ελαιώδη φάση, πιθανόν να παρατηρούνται μικρές διαφοροποιήσεις (Martinek et al, 1981). Για την κινητική μελέτη της υδρόλυσης του L-lysine-p-nitroanilide (LNA) από θρυψίνη στο περιβάλλον του μικρογαλακτώματος χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ενζύμου 22 μg/mL και ένα εύρος συγκεντρώσεων του υποστρώματος 2μM – 0.2mM. Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος προσδιορίστηκε η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης. Στόχος ήταν η μελέτη εξάρτησης της ταχύτητας της αντίδρασης από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος, μέσω της μετρούμενης απορρόφησης, κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης.

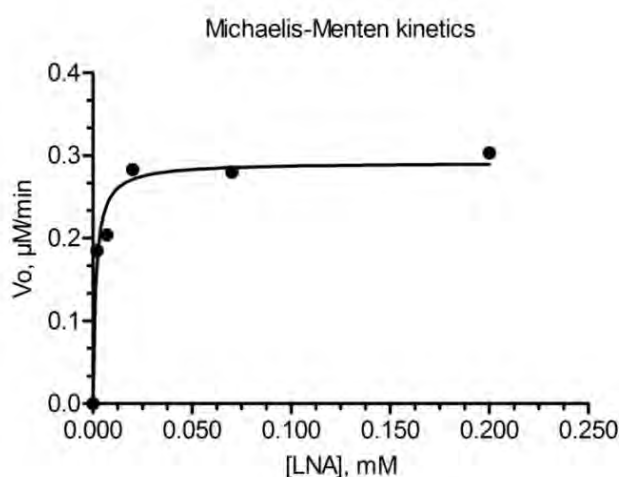


Σχήμα 14. Καμπύλη βαθμονόμησης για την p-νιτροανιλίνη

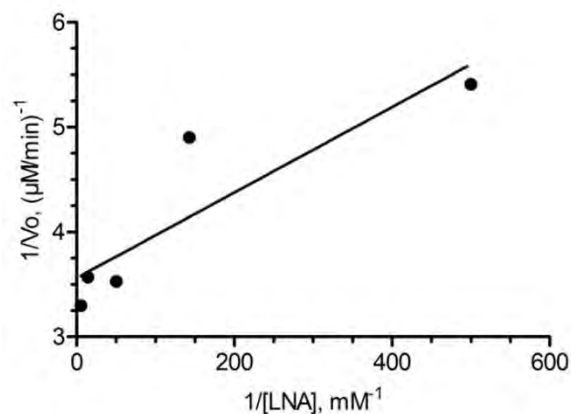
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 15, η κινητική υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης είναι κατά Michaelis – Menten. Οι κινητικές σταθερές της ενζυμικής αντίδρασης K_m (σταθερά Michaelis – Menten) και μέγιστη ταχύτητα V_{max} υπολογίστηκαν $K_m=0.015\pm 0.005\text{mM}$ και $V_{max}=0.291\pm 0.014\mu\text{M}/\text{min}$. Συγκεντρωτικά, στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες που προσδιορίστηκαν από την κλίση της γραφικής παράστασης $A=f(t)$.

Πίνακας 3. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα υπολογισμού αρχικής ταχύτητας υδρόλυσης LNA από θρυψίνη σε περιβάλλον μικρογαλακτώματος λεκιθίνης.

Συγκέντρωση LNA (mM)	Αρχική Ταχύτητα ($\mu\text{M}/\text{min}$)
0.002	0.185
0.007	0.204
0.02	0.283
0.07	0.280
0.2	0.303
$K_m \pm SD$	0.015 ± 0.005
$V_{max} \pm SD$	0.291 ± 0.014

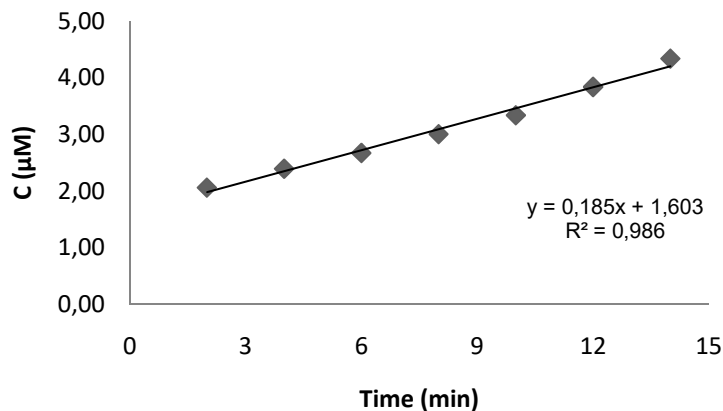


Σχήμα 15. Κινητική της υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη στο περιβάλλον του μικρογαλακτώματος, με συγκέντρωση θρυψίνης $22 \mu\text{g}/\text{mL}$, $\text{pH } 8.5$, $\theta=25^\circ\text{C}$.

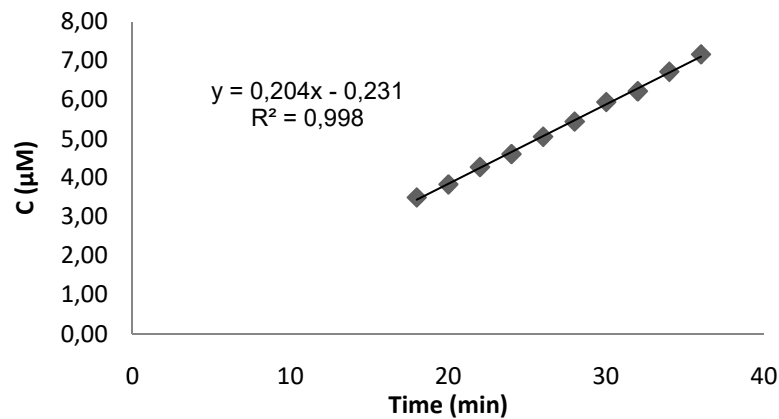


Σχήμα 16. Διάγραμμα Lineweaver – Burk, με συγκέντρωση θρυψίνης 22 μg/mL, pH 8.5, θ=25°C.

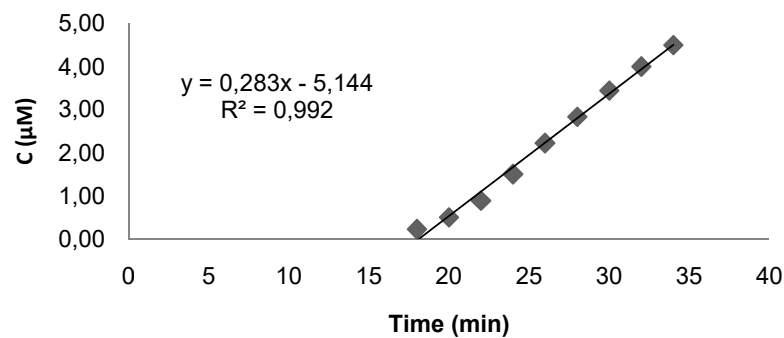
Τα διαγράμματα μεταβολής της συγκέντρωσης του σχηματιζόμενου προϊόντος σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε παρατίθενται παρακάτω (Σχήματα 17-21). Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις:



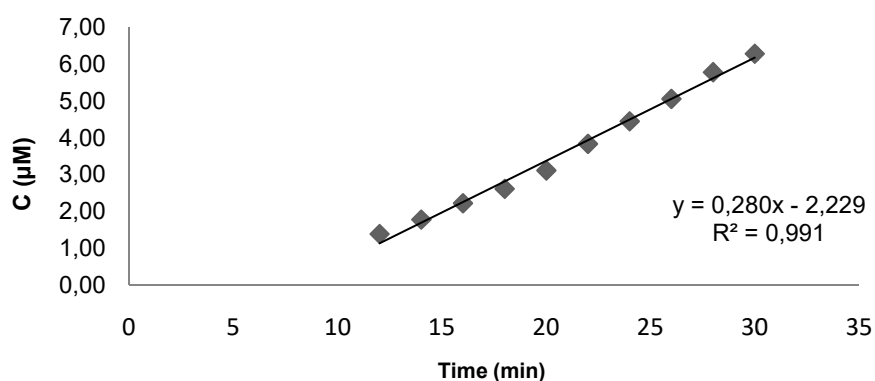
Σχήμα 17. Κινητική της σχηματιζόμενης p-νιτροανιλίνης κατά την αντίδραση υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης με συγκέντρωση ενζύμου 22 μg/mL και υποστρώματος 2μM (pH 8.5, 25°C).



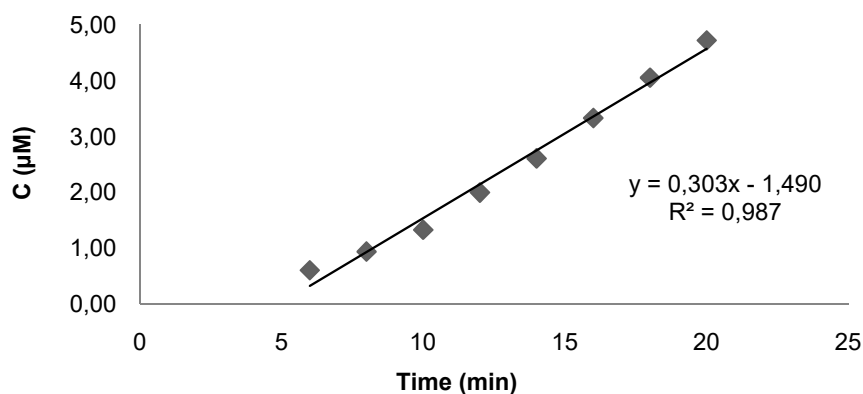
Σχήμα 18. Κινητική της σχηματιζόμενης *p*-νιτροανιλίνης κατά την αντίδραση υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης με συγκέντρωση ενζύμου 22 μg/mL και υποστρώματος 7μM (pH 8.5, 25°C).



Σχήμα 19. Κινητική της σχηματιζόμενης *p*-νιτροανιλίνης κατά την αντίδραση υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης με συγκέντρωση ενζύμου 22 μg/mL και υποστρώματος 20μM (pH 8.5, 25°C).



Σχήμα 20. Κινητική της σχηματιζόμενης *p*-νιτροανιλίνης κατά την αντίδραση υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης με συγκέντρωση ενζύμου 22 μg/mL και υποστρώματος 70μM (pH 8.5, 25°C).



Σχήμα 21. Κινητική της σχηματιζόμενης *p*-νιτροανιλίνης κατά την αντίδραση υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης με συγκέντρωση ενζύμου 22μg/mL και υποστρώματος 200μM (pH 8.5, 25°C).

6. ΧΡΗΜΑΤΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟ ΠΛΑΝΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Το προαναφερθέν μικρογαλάκτωμα, με σύσταση , 84% κ.β Miglyol 818, 12% κ.β λεκιθίνη σόγιας και 4% κ.β υδατική φάση, μπορεί να αναπτυχθεί ως νέο προϊόν το οποίο έχει τη δυνατότητα να ενσωματωθεί στην παραγωγική διαδικασία μιας ήδη υπάρχουσας εταιρείας παραγωγής ιχθυοτροφών. Το μικρογαλάκτωμα αποτελείται από μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας τριγλυκερίδια και λεκιθίνη σόγιας, συστατικά ιδιαίτερα σημαντικά για τη διατροφή των ιχθυδίων.

Η μελέτη σκοπιμότητας πραγματοποιείται στα αρχικά μελέτης οποιουδήποτε επιχειρηματικού έργου ή επένδυσης. Περιλαμβάνει εκτίμηση της τεχνολογίας που απαιτείται, το είδος και το ποσό των απαιτούμενων πόρων, ένα γενικό χρονοδιάγραμμα λειτουργίας και εκτίμηση του κόστους επένδυσης έτσι ώστε να ελεγχθεί αν το έργο/επένδυση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί. Η προμελέτη σκοπιμότητας είναι η περιγραφή της επιχειρηματικής ιδέας με στοιχεία που αφορούν τις παραμέτρους που πρέπει να ληφθούν υπόψη στη μελέτη σκοπιμότητας που θα ακολουθήσει (Καρβούνης, 2006).

Για τους υπολογισμούς που ακολουθούν έχει ληφθεί υπόψη η παραδοχή ότι το μικρογαλάκτωμα με την ενθυλακωμένη θρυψίνη θα ενσωματωθεί σε τεχνητές ιχθυοτροφές που προορίζονται για το στάδιο της πάχυνσης σε ιχθυοκαλλιέργειες με εκτρεφόμενα είδη την τσιπούρα και το λαβράκι. Το μικρογαλάκτωμα θα αναπτυχθεί σε ήδη υπάρχουσα εταιρεία παραγωγής τεχνητών ιχθυοτροφών. Η εταιρεία θα αναλάβει την παραγωγή του μικρογαλακτώματος, την ενθυλάκωση της θρυψίνης και την ενσωμάτωση του μικρογαλακτώματος στην τεχνητή ιχθυοτροφή σε ποσοστό 2% κ.β. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται συνοπτικά το κόστος επένδυσης, λαμβάνοντας υπόψη τους παράγοντες που αναλύονται στις παρακάτω παραγράφους. Στα δεδομένα τα οποία προέκυψαν, έγινε επεξεργασία σε μοντέλο χρηματοοικονομικού πλάνου. (Γιούλη Σαπουνά, www.moneypedia.gr/Images/BUSINESS_PLAN_Tool.aspx).

Πίνακας 4. Ανάλυση κόστους επένδυσης

Είδος	Κόστος
Διαμόρφωση χώρου	10.000 €
Μηχανήματα	100.000 €
Πρώτες ύλες	90.000 €
Έπιπλα και λοιπός εξοπλισμός	10.000 €
Έκτακτες δαπάνες	5.000 €
ΣΥΝΟΛΟ	215.000 €

6.1 Εξοπλισμός

Δεδομένου ότι η εταιρεία που θα αναπτύξει το νέο προϊόν διαθέτει τα κατάλληλα μέσα για την παραγωγή, συσκευασία, αποθήκευση και διανομή των τεχνητών ιχθυοτροφών, οι εγκαταστάσεις είναι άμεσα διαθέσιμες και ο απαιτούμενος εξοπλισμός αφορά στην διαδικασία παραγωγής του σκευάσματος. Η παραγωγή του σκευάσματος θα πραγματοποιείται παράλληλα με τις ώρες και την διαδικασία παραγωγής της ιχθυοτροφής. Απαιτείται η αγορά συσκευή ανάδευσης (μίξερ) βιομηχανικής κλίμακας (>100L) και η συνεχής παρακολούθηση της θερμοκρασίας του αναδευόμενου μείγματος μέσω συστήματος θερμοστάτησης. Επιπλέον, απαιτούνται χώροι ψύξης για την φύλαξη των πρώτων υλών και χώροι αποθήκευσης του παραγόμενου σκευάσματος. Η εγκατάσταση είναι απαραίτητο να γίνει σε σημείο όπου θα είναι εύκολα προσβάσιμες οι πρώτες ύλες και θα είναι δυνατή η αποθήκευση του παραγόμενου προϊόντος σε θερμοκρασία δωματίου σε δοχεία μεγάλου όγκου (βλ Ενότητα «Κόστη Εξοπλισμού –Λειτουργικά Έξοδα», Παράρτημα Ι). Η απόσβεση του κόστους εξοπλισμού, βάσει του παρόντος σχεδίου, επιτυγχάνεται στα πέντε έτη λειτουργίας.

6.2 Πρώτες ύλες

Για την παρασκευή του νέου προϊόντος απαιτούνται ως πρώτες ύλες μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας τριγλυκερίδια φυτικής προέλευσης, λεκιθίνη σόγιας καθαρότητας κατάλληλης για ζωοτροφές (feed grade) και το ένζυμο θρυψίνη σε καθαρή μορφή, με προέλευση από σολωμό (Gudmundsdóttir et al, 2005). Βάση νομοθεσίας, απαγορεύεται η χρήση πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης ως συστατικά των ιχθυοτροφών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σύμφωνα με τον κανονισμό

No 999/2001 (Αντωνοπούλου, 2015). Τα τριγλυκερίδια φυλάσσονται σε συνθήκες ψύξης ($\theta < 8^{\circ}\text{C}$) και η λεκιθινή και το ένζυμο σε συνθήκες κατάψυξης ($\theta < 0^{\circ}\text{C}$). Το παραγόμενο προϊόν φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όλες οι πρώτες ύλες έχουν χρόνο ζωής περίπου 12 μήνες, στις προαναφερθείσες συνθήκες φύλαξης.

6.3 Ανθρώπινο δυναμικό

Η παραγωγική διαδικασία λαμβάνει χώρα συγκεκριμένη χρονική περίοδο η οποία χωρίζεται σε πέντε οκτάωρες βάρδιες ανά εβδομάδα. Για την κάλυψη αυτών των αναγκών, η εταιρεία θα προβεί στην πρόσληψη ενός ατόμων έναντι μηνιαίου μισθού 900€. Στο κόστος προσωπικού έχει προβλεφθεί ότι στην διάρκεια του μήνα ο εργαζόμενος θα εργασθεί για είκοσι μέρες με προσαύξηση του ημερομισθίου κατά 75% για κάθε επίσημη αργία. Υπολογίζονται οι νόμιμες εισφορές του εργοδότη και προβλέπεται αύξηση του μισθολογίου κατά 4% μετά τον τρίτο χρόνο εργασίας (βλ Ενότητα «Κόστη Εξοπλισμού – Λειτουργικά Έξοδα», Παράρτημα Ι).

6.4 Λειτουργικά κόστη

Τα λειτουργικά κόστη αφορούν έξοδα τα οποία θα πραγματοποιηθούν ανά έτος, με πρόβλεψη πενταετίας για τη συντήρηση μηχανημάτων, τη θέρμανση του χώρου στον οποίο θα γίνεται η παραγωγή, την ηλεκτρική ενέργεια που απαιτείται, τον καθαρισμό του χώρου παραγωγής και άλλα τυχόν έκτακτα έξοδα – λοιπές δαπάνες ανά έτος λειτουργίας (βλ. Ενότητα «Κόστη Εξοπλισμού – Λειτουργικά Έξοδα», Παράρτημα Ι). Τα λειτουργικά κόστη ανέρχονται στο 5.3% του συνολικού κόστους παραγωγής για το πρώτο έτος λειτουργίας και τα επόμενα τέσσερα έτη λειτουργίας κυμαίνονται στο 5.3-5.9% του συνολικού κόστους παραγωγής.

6.5 Κεφάλαιο Κίνησης

Για τον υπολογισμό του ύψους του αναγκαίου κεφαλαίου κίνησης έγινε προσδιορισμός παραμέτρων που σχετίζονται με τη διαχείριση και αποθήκευση των πρώτων υλών και παραγόμενου προϊόντος, το περιθώριο πίστωσης της εταιρείας σε πελάτες και το περιθώριο πίστωσης από προμηθευτές στην εταιρεία για την αγορά πρώτων υλών. Τέλος, λήφθηκε υπόψη ο χρόνος ζωής του παραγόμενου προϊόντος για τη δημιουργία αποθεματικού (βλ. Ενότητα «Κεφάλαιο κίνησης και Έσοδα»,

Παράρτημα III). Μέσω δανειοδότησης καλύπτεται η αγορά των πρώτων υλών για τους δυο πρώτους μήνες λειτουργίας και μέσω της εισροής των προβλεπόμενων εσόδων και της δημιουργίας χρηματικού αποθεματικού, επανατροφοδοτείται η οικονομική απαίτηση για περαιτέρω αγορά πρώτων υλών (βλ Ενότητες «Κεφάλαιο κίνησης και Έσοδα» και «Λογαριασμοί Εκμετάλευσης», Παράρτημα III, V).

6.6 Τιμολόγηση

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το κόστος των πρώτων υλών και του προϊόντος, όπως διαμορφώθηκαν από τον μέσο όρο των τιμών από έρευνα που διενεργήθηκε για πιθανούς προμηθευτές. Είναι σαφές ότι οι τιμές είναι απόλυτα ενδεικτικές, εφόσον η αναζήτηση προμηθευτών θα γίνει με συγκεκριμένα κριτήρια και η συμφωνία που θα επιτευχθεί θα διαμορφωθεί με βάση τις ανάγκες και τις απαιτήσεις της εταιρείας που θα παράγει το σκεύασμα. Έχει γίνει η παραδοχή ότι το μικρογαλάκτωμα θα ενσωματωθεί σε ποσοστό 2% κ.β στην ιχθυοτροφή μετά τη θερμική επεξεργασία της, μέσω συστήματος ψεκασμού, πριν την διαδικασία της συσκευασίας.

Πίνακας 5. Κόστος ανά κιλό πρώτων υλών και προϊόντος που ενσωματώνεται ανά κιλό ιχθυοτροφής.

Είδος	Κόστος/kg πρώτης ύλης	Κόστος/kg ιχθυοτροφής
Μεσαίου μήκους Τριγλυκερίδια	1,60 €	0,028 €
Λεκιθίνη	1,30 €	0,002 €
Προπυλενογλυκόλη	3,75 €	0,008 €
Θρυψίνη	70,00 €	0,014 €
ΣΥΝΟΛΟ	76,65 €	0,052 €

Η μέση τιμή πώλησης της ιχθυοτροφής το 2016 διαμορφώθηκε στα 1.050 €/τόνο ή στα 1,05€/kg (βλ. Ενότητα 2.3). Μετά την ενσωμάτωση του μικρογαλακτώματος, η τιμή ανέρχεται στα 1,14€/kg. Το ποσό προκύπτει από τον συνυπολογισμό κόστους πρώτων υλών (0,052€), κόστους λειτουργίας (0,008€) και κέρδους 37% (0,03€) ανά κιλό εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής (βλ Ενότητα «Κόστη Εξοπλισμού –Λειτουργικά Έξοδα», Παράρτημα I).

6.7 Προβλεπόμενα έσοδα

Με βάση τα στατιστικά στοιχεία του ΣΕΘ, οι πωλήσεις ιχθυοτροφών το 2016 εκτιμήθηκαν στις 251.000 τόνους και παρασκευάστηκαν από 8 βιομηχανίες. Κάθε βιομηχανία παράγει κατά μέσο όρο 31.375 τόνους/έτος. Λαμβάνουμε ως δεδομένο ότι το μικρογαλάκτωμα θα ενσωματωθεί στο 40% των παραγόμενων ιχθυοτροφών σε μια από τις εταιρείες ιχθυοτροφών, δηλαδή σε 12.550 τόνους/έτος. Με την παραπάνω παραδοχή το μικρογαλάκτωμα θα έχει ενσωματωθεί συνολικά στο 5% των παραγόμενων ιχθυοτροφών στην Ελλάδα. Τα προβλεπόμενα έσοδα από το νέο προϊόν εκτιμώνται στα 1.129.500€ με τιμή πώλησης 1,14€/kg και με ρυθμό αύξησης εσόδων 2% το πρώτο έτος, επιπλέον 2% το δεύτερο έτος και 2% κάθε επόμενο έτος με πρόβλεψη πενταετίας (βλ Ενότητα «Κόστη Εξοπλισμού – Λειτουργικά Έξοδα» και «Λογαριασμοί Εκμετάλλευσης» - Παράρτημα Ι, V).

6.8 Σύγκριση τεχνητής ιχθυοτροφής με νέα εμπλουτισμένη τεχνητή ιχθυοτροφή

Για να πραγματοποιηθεί η σύγκριση της υπάρχουσας τεχνητής ιχθυοτροφής με τα οφέλη που δύναται να προσφέρει η νέα, εμπλουτισμένη σε μικρογαλάκτωμα, τροφή έχει γίνει η παραδοχή ότι το νέο προϊόν θα ενσωματωθεί σε ιχθυοτροφές που προορίζονται για το στάδιο της πάχυνσης. Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αναγκαίοι υπολογισμοί έχει ακολουθηθεί το παρακάτω μοντέλο:

- Μέσο βάρος εμπορεύσιμου ιχθύος θεωρούνται τα 400g.
- Θεωρούμε ότι το ποσοστό επιβίωσης των ιχθύων στους κλωβούς μετά το στάδιο της πάχυνσης είναι 85%.
- Ο μέσος συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής σε σωματικό βάρος είναι στα 1,8 kg ιχθυοτροφή ανά kg λαβρακίου και στα 2kg ιχθυοτροφή ανά kg τσιπούρας. Με βάση αυτά τα στοιχεία έχουμε θεωρήσει ότι για τα δύο είδη ο μέσος συντελεστής μετατρεψιμότητας είναι 1,9 kg ανά kg παραγόμενου ιχθύος (Κλαουδάτος, 2012).

Η ετήσια παραγωγή τριπούρας και λαβρακίου στην Ελλάδα ανέρχεται στους 358.000 τόνους όπως προέκυψε από στατιστικά στοιχεία του έτους 2015 (Πηγή: ΣΕΘ). Για κάθε εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας η παραγωγή ανέρχεται στους 3.250 τόνους λαβρακίου και τσιπούρας η οποία αντιστοιχεί σε 8.125.000 ιχθύα. Για την

παραγωγή αυτή απαιτούνται 6.175.000 kg τεχνητής ιχθυοτροφής της οποίας το κόστος ανέρχεται στα 6.484.000€ λαμβάνοντας υπόψη ως δεδομένο ότι η μέση τιμή ιχθυοτροφής ανέρχεται στα 1,05 €/kg. Κατά αντιστοιχία, η νέα εμπλουτισμένη ιχθυοτροφή για να είναι συγκρίσιμη και συμφέρουσα για την εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας θα πρέπει να βελτιστοποιεί την πέψη, ώστε να απαιτείται η πρόσληψη μικρότερης ποσότητας ιχθυοτροφής ανά kg ιχθύος. Βάση αυτών των παραμέτρων, υπολογίζεται ότι η εμπλουτισμένη ιχθυοτροφή θα αποτελεί συμφέρουσα λύση για τις εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας, αν η πρόσληψη εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής είναι μειωμένη κατά τουλάχιστον 7.7% σε σχέση με τη συμβατική ιχθυοτροφή. Τα παραπάνω συμπεράσματα προήλθαν μέσω θεωρητικού υπολογισμού όλων των ποσών και μεγεθών και για την επιβεβαίωσή τους απαιτούνται περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη βιοσυμβατού μικρογαλακτώματος, με εφαρμογή στην ιχθυοκαλλιέργεια εφόσον ενσωματωθεί στην ιχθυοτροφή στο στάδιο πάχυνσης των ιχθύων. Το μικρογαλάκτωμα αποτελείται από λεκιθίνη σόγιας, μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας τριγλυκερίδια και περιέχει ως υδατική φάση ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0.1M με pH 8.5 με προπυλενογλυκόλη σε αναλογία 1:1 κ.β. Στο μικρογαλάκτωμα, επιτυγχάνεται ενθυλάκωση θρυψίνης σε συγκέντρωση 22μg/mL. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύστημα που αναπτύχθηκε δεν περιέχει αλκοόλες, γεγονός το οποίο το καθιστά κατάλληλο για χρήση στη βιομηχανία ιχθυοτροφών και τροφίμων γενικότερα.

Κατά την κατασκευή του ψευδο-τριγωνικού διαγράμματος φάσης παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητα των μικρογαλακτωμάτων σε υδατική φάση μεταβλήθηκε σημαντικά μετά την ενθυλάκωση της θρυψίνης, λόγω του μεγάλου μεγέθους του ενζύμου συγκριτικά με την υδροδυναμική ακτίνα του ανάστροφου μικκυλίου. Το μέγεθος του ενζύμου υπολογίζεται βάση βιβλιογραφίας στα 4nm, όσο δηλαδή και η διάμετρος του αντίστροφου μικκυλίου πριν την ενθυλάκωση της θρυψίνης (Guerreiro et al, 2014). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην παραδοχή ότι κατά τον εγκλωβισμό του ενζύμου, το μέγεθος των αντίστροφων μικκυλίων αυξάνεται σημαντικά. Η παραπάνω παραδοχή επιβεβαιώνεται κατά την δομική μελέτη με τη χρήση της τεχνικής της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός. Η αύξηση του μεγέθους του αντίστροφου μικκυλίου μετά τον εγκλωβισμό ενζύμων έχει παρατηρηθεί και μελετηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες στο παρελθόν. Οι Luisi et al (1986) πρότειναν το μοντέλο «water-shell» για την εξήγηση του φαινομένου, σύμφωνα με το οποίο ο όγκος του μικκυλίου που περιέχει το εγκλωβισμένο ένζυμο ισούται το άθροισμα του όγκου του ενζύμου και του όγκου του «άδειου» μικκυλίου. Κατά μέσο όρο, το μέγεθος των πρωτεϊνών σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος είναι μικρότερο σε σχέση με το μέγεθος του μικκυλίου που διαμορφώνεται μετά την ενθυλάκωση. Η διαφορά μεγέθους μεταξύ των «γεμάτων» και των «άδειων» σταγονιδίων ποικίλλει ανάλογα με την πρωτεΐνη που ενθυλακώνεται, συνήθως όμως είναι της τάξεως του 2:1 (Moulik et al, 1998).

Η διάμετρος των νανοσταγόνων, μετά τον εγκλωβισμό, μεταβλήθηκε σημαντικά με την προσθήκη της θρυψίνης. Πιο συγκεκριμένα, αυξήθηκε κατά 8nm μετά τον εγκλωβισμό του ενζύμου. Ο Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI) δεν διαφοροποιήθηκε μετά τον εγκλωβισμό της θρυψίνης και παρατηρείται ότι

διατηρήθηκε σε σχετικά υψηλές τιμές ($PdI > 0,3$) πιθανότατα λόγω των διαμορφώσεων της λεκιθίνης στο σύστημα. Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, η λεκιθίνη έχει την τάση να σχηματίζει επιμήκη, ραβδόμορφα αντίστροφα μικκύλια τα οποία μπορεί να αποκλίνουν από το σφαιρικό μοντέλο βάσει του οποίου έγινε ο υπολογισμός του δείκτη πολυδιασποράς στο προτεινόμενο σύστημα (Papadimitriou et al. 2008 - Schurtenberger et al, 1994).

Το L-lysine-p-nitroanilide (LNA) επιλέχθηκε ως πρότυπο υπόστρωμα για την θρυψίνη, ώστε να μελετηθεί η ενζυμική δραστηριότητα στο περιβάλλον των μικρογαλακτωμάτων. Η κινητική της υδρόλυσης του LNA από θρυψίνη στο μικρογαλάκτωμα είναι κατά Michaelis – Menten. Οι κινητικές σταθερές της ενζυμικής αντίδρασης, σταθερά Michaelis-Menten, K_m και μέγιστη ταχύτητα V_{max} υπολογίστηκαν $K_m = 0.015 \pm 0.005 \text{ mM}$ και $V_{max} = 0.291 \pm 0.014 \mu\text{M}/\text{min}$. Παρόλο που η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της θρυψίνης είναι στους 37°C , η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν 25°C ώστε να προσομοιώνει τις συνθήκες περιβάλλοντος όπου αναπτύσσονται οι ιχθύες.

Στη βιβλιογραφία, η κινητική σταθερά K_m της ίδιας ενζυμικής αντίδρασης έχει προσδιοριστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα $0.1 \text{ M Tris-HCl pH } 8.5$ και έχει βρεθεί $K_m = 0.63 \text{ mM}$ (Papadimitriou et al, 1993). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το εύρος της περιοχής των συγκεντρώσεων του υποστρώματος που επιλέχθηκε για την κινητική μελέτη ήταν σχετικά μικρό λόγω περιορισμένης διαλυτότητας του LNA στους υδατίνους πυρήνες. Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης σε συγκεντρώσεις υποστρώματος μεγαλύτερες από 0.2 mM πιθανώς λόγω της παρεμπόδισης που προκαλείται από το παραγόμενο προϊόν. Γενικά, η υδρόλυση διάφορων υποστρωμάτων από θρυψίνη στο περιβάλλον των μικρογαλακτωμάτων W/O έχει μελετηθεί στο παρελθόν και από άλλες ερευνητικές ομάδες και έχουν προσδιοριστεί οι κινητικές σταθερές. Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα σχετίζονται με τη σύσταση των μικτογαλακτωμάτων, τον τρόπο παρασκευής τους καθώς και το είδος του υποστρώματος (Martinek et al, 1981 – Avramiotis et al, 1997 – Papadimitriou et al., 1993).

Παράλληλα με την ανάπτυξη του μικρογαλακτώματος, τη δομική και κινητική μελέτη, πραγματοποιήθηκε και προμελέτη σκοπιμότητας για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος με προοπτική ενσωμάτωσης του στις τεχνητές ιχθυοτροφές. Βασικός στόχος του εγχειρήματος αποτέλεσε το γεγονός ότι περίπου το 59% του κόστους

παραγωγής τσιπούρας και λαβρακίου αποτελεί η αγορά ζωντανών και τεχνητών ιχθυοτροφών (Πηγή: ΣΕΘ).

Στα συστατικά του μικρογαλακτώματος περιλαμβάνονται ουσίες που παίζουν βασικό ρόλο στην διατροφή των ιχθύων όπως τα τριγλυκερίδια, η λεκιθίνη και η θρυψίνη. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν πηγή λιπαρών, απαραίτητων για την ανάπτυξη των ιχθυδίων. Τα οφέλη της λεκιθίνης είναι ιδιαίτερα έντονα στη διατροφή νεαρών ειδών. Η πεπτική τους οδός είναι σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης με αποτέλεσμα να μην συνθέτουν επαρκείς ποσότητες φωσφολιπιδίων (Poston et al, 1991). Τέλος, η θρυψίνη παίζει βασικό ρόλο στην διαδικασία της πέψης. Η παραγωγή θρυψίνης, έχει συσχετιστεί σε πολλές μελέτες με αποτελεσματικότερη πλήρωση στομάχου και καλύτερη πέψη. Αντίθετα σε καταστάσεις ασιτίας ή πρόσληψης μειωμένης ποσότητας τροφής, η παραγωγή θρυψίνης μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η πέψη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αρχικά τη μείωση του ρυθμού αύξησης του ιχθύος και τελικά επηρεάζονται τα ποσοστά επιβίωσης (Pedersen et al, 1987). Βάση νομοθεσίας πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης (συμπεριλαμβανομένης της θρυψίνης με προέλευση από βοδινό) απαγορεύεται να χρησιμοποιούνται ως συστατικά των ιχθυοτροφών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σύμφωνα με τον κανονισμό Νο 999/2001 (Αντωνοπούλου, 2015). Σε αυτήν την περίπτωση, κατά την ανάπτυξη του νέου προϊόντος θα χρησιμοποιηθεί θρυψίνη από σολωμό (Gudmundsdóttir et al, 2005).

Λαμβάνοντας υπόψη τα στατιστικά στοιχεία των τελευταίων πέντε ετών, ιδιαίτερα όσον αφορά στην εξέλιξη της ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελλάδα καθώς και τα ποσοστά πωλήσεων ιχθύων και ιχθυοτροφών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια είναι ένας τομέας βιοοικονομίας με πολλές προοπτικές. Παρά την οικονομική ύφεση, η τάση των αγορών είναι σταθερά αυξητική και τα παραγόμενα προϊόντα απορροφώνται σε μεγάλο ποσοστό από την εγχώρια αγορά. Στον τομέα των ιχθυοτροφών, οι εταιρείες παραγωγής καλύπτουν τις ανάγκες τεχνητής τροφής των εταιρειών παραγωγής ιχθύων και πραγματοποιούνται μικρά ποσοστά εισαγωγών από εταιρείες του εξωτερικού. Τόσο τα στατιστικά δεδομένα σχετικά με τις πωλήσεις ιχθυοτροφών όσο και με την παραγωγή αποδεικνύουν ότι οι πωλήσεις ιχθυοτροφών αυξάνονται την τελευταία πενταετία, ωστόσο η μέση τιμή ανά τόννο δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες μεταβολές και κυμαίνεται στα 1050€ (Πηγή: ΣΕΘ).

Το μικρογαλάκτωμα μπορεί να αναπτυχθεί ως νέο προϊόν το οποίο μπορεί να ενσωματωθεί στην παραγωγική διαδικασία σε μια εταιρεία παραγωγής

ιχθυοτροφών.. Ενδεικτικά μετά τον υπολογισμό του κόστους παραγωγής του προϊόντος στο οποίο έχουν συμπεριληφθεί: το κόστος προσωπικού, τα λειτουργικά κόστη, τα κόστη πρώτων υλών, καθώς και οι αποσβέσεις εξοπλισμού, ίδιας συμμετοχής και η αποπληρωμή των δανείων που θα καλύψουν το κόστος επένδυσης. Το μικρογαλάκτωμα θα ενσωματωθεί σε ποσοστό 2% επί του συνολικού βάρους της τεχνητής ιχθυοτροφής μετά το στάδιο της θερμικής επεξεργασίας. Η τελική τιμή ανά κιλό ιχθυοτροφής στην οποία θα έχει ενσωματωθεί το μικρογαλάκτωμα είναι εκτιμάται στα 1,14€ έναντι των 1,05€ που είναι η μέση τιμή πώλησης ανά κιλό ιχθυοτροφής.

Η αύξηση τιμής που επιφέρει η ενσωμάτωση του μικρογαλακτώματος είναι της τάξης του 7,9%. Παρόλα αυτά, το κόστος ιχθυοτροφής για την επιχείρηση-καταναλωτή δύναται να ισοσταθμιστεί εάν λάβουμε υπόψη ότι μετά την ενσωμάτωση του μικρογαλακτώματος, η ιχθυοτροφή εμπλουτίζεται σε θρυψίνη. Το γεγονός αυτό, δύναται να μειώσει την ποσότητα τεχνητής ιχθυοτροφής των ιχθύων στο στάδιο της πάχυνσης. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι ένα μέρος της απαίτησης σε πεπτικά ένζυμα καλύπτεται από την εμπλουτισμένη ιχθυοτροφή και η διαδικασία της πέψης πραγματοποιείται αποτελεσματικότερα. Συμπερασματικά, είναι εφικτό να μειωθεί το συνολικό κόστος ιχθυοτροφής για την εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας εφόσον η εμπλουτισμένη σε μικρογαλάκτωμα ιχθυοτροφή μειώνει κατά τουλάχιστον 7,7% την πρόσληψη τεχνητής ιχθυοτροφής, σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aboofazeli R., Lawrence M. J, (1993), Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate. *International Journal of Pharmaceutics*, 93(1-3), 161-175.

Aboofazeli R., Lawrence C.B., Wicks S.R, (1994), Investigations into the formation and characterization of microemulsions. IV. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol and oil. The influence of oil, *International Journal of Pharmaceutics*, 125, 1, 107-116.

Avramiotis S., Lianos P., Xenakis A., (1996), Trypsin in Lecithin Based w/o Microemulsions. Fluorescence and Enzyme Activity Studies, *Biocatalysis and Biotransformation*, 14, 4, 299-316.

Avramiotis S., Bekiari V., Lianos P., Xenakis A., (1997), Structural and Dynamic Properties of Lecithin–Alcohol Based w/o Microemulsions: A Luminescence Quenching Study. *Journal of colloid and interface science*, 194(2), 326-331.

Bengtson D.A., (2003), Status of marine aquaculture in relation to live prey, past, present and future. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture*, 1–16. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Boonme P., (2007), Applications of microemulsions in cosmetics, *Journal of cosmetic dermatology*, 6(4), 223-228.

Buskey E.J., (2005), Behavioral characteristics of copepods that affect their suitability as food for larval fishes. In: *Copepods in Aquaculture*, 91–105, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

Chatzidaki M.D., Mitsou E., Yaghmur A., Xenakis A., Papadimitriou, V., (2015), Formulation and characterization of food-grade microemulsions as carriers of natural phenolic antioxidants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 483, pp.130-136.

Cornel B.A, Middlehurst J., Separovic F., (1986), Small unilammellar phospholipid vesicles and the theories of membrane formation, *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 81,163-178.

Dabrowski, K., Glogowski, J., (1977a), Studies on the proteolytic enzymes of invertebrates constituting fish food. *Hydrobiologia*, 52: 171-174.

Dabrowski K., Glogowski J., (1977b), Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia*, 54, 129-134.

Deutch-Kolvzon R., Aserin A.,Garti G.,(2011),Synergistic cosolubilization of omega-3 fatty acid esters and CoQ10 in dilutable microemulsions, *Chemistry and Physics of Lipids* , 164(7), 654-663.

Dhert P., Rombaut G., Suantika G., Sorgeloos P, (2001), Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe, *Aquaculture*, 200, 129–146.

Flanagan J., Singh H., (2006), Microemulsions: A Potential Delivery System for Bioactives in Food, *Critical Review, Food Science & Nutrition*, 46, 221-237.

Gudmundsdóttir Á., Pálsdóttir H. M., (2005), Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. *Marine Biotechnology*, 7(2), 77-88.

Guerreiro, A., Poma, A., Karim K., Moczko E., Takarada J., De Vargas-Sansalvador, I.P., Turner N., Piletska E., De Magalhães C.S., Glazova N., Serkova A., (2014), Influence of Surface-Imprinted Nanoparticles on Trypsin Activity, *Advanced healthcare materials*, 3(9), 1426-1429.

Gutiérrez J.M., González C., Maestro A., Sole I., Pey C.M., Nolla, J., (2008), Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13 (4), 245-251.

Hines J.D., Thomas R.K., Garrett P.R., Rennie G.K., Penfold, J., (1997), Investigation of mixing in binary surfactant solutions by surface tension and neutron reflection: anionic/nonionic and zwitterionic/nonionic mixtures. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(45), 9215-9223.

Hu L., Yang J., Liu W., Li L. (2011), Preparation and evaluation of ibuprofen-loaded microemulsion for improvement of oral bioavailability. *Drug Delivery*, 18 (1), 90-95.

Introduction to Aquaculture, United Nations development programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Nigerian Institute for Oceanography and marine research project RAF/82/009, <http://www.fao.org/docrep/field/003/ac169e/ac169e00.htm#ch1>.

Kahlweit M., Busse G., Faulhaber B., Eibl H., (1995), Preparing nontoxic microemulsions. *Langmuir*, 11 (11), 4185-4187.

Kalaitzaki A., Emo M., Stébé M.J., Xenakis A., Papadimitriou V., (2013), Biocompatible nanodispersions as delivery systems of food additives: a structural study, *Food Res. Intern.*, 54, 1448.

Koroleva M. Y., Yurtov E. V. E., (2012), Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, 81(1), 21-43.

Koven W., Kolkovski S., Hadas E., Gamsiz K., Tandler A., (2001), Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture*, 194 (1), 107-121.

Kyriazi A., Papadimitriou V., Sotiroudis T. G., Xenakis A., (2013), Development and characterization of a digestion model based on olive oil microemulsions, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(6), 601-611.

Lauff M, Hofer R.,(1984), Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37(4):335-46.

Lavens P., Sorgeloos P., (1996), Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Lawrence M.J., (1994), Surfactant systems: Microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery, *European Journal of Drug Metabolism-Pharmacokinetics*, 19:257.

Luisi P. L., Zampieri G. G., Jäckle H., (1986), Determination of the structural parameters of reverse micelles after uptake of proteins. *The Journal of Physical Chemistry*, 90(9), 1849-1853.

Mahjoub M., Schmoker C., Drillet G., (2013), Live feeds in larval fish rearing: production, use and the future. In: Edition (2005): *Larval Fish Aquaculture* , 41–71. Nova Publishers, New York, USA.

Malam Y., Loizidou M., Seifalian A.M., (2009), Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in pharmacological Science*, 30(11):592-9.

Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N. L., Pantin V. I., Berezin I. V., (1981), The principles of enzymes stabilization: VI. Catalysis by water-soluble enzymes entrapped into reversed micelles of surfactants in organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 657 (1), 277-294.

Mc Clements D.J., (2012), Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities, *Soft matter*, 8 (6), 1719-1729.

Mc Clements D.J., Rao J., (2011), Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate and Potential toxicity, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (4), 285-330.

Mitsou E., Tavantzis G., Sotiroidis G., Ladikos D., Xenakis A., Papadimitriou V., (2016), Food grade water-in-oil microemulsions as replacement of oil phase to help process and stabilization of whipped cream, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 510, 69-76.

Moulik S. P., Paul B. K., (1998), Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface science*, 78 (2), 99-195.

Narang A.S., Delmarre D., Gao D., (2007), Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions, *International journal of pharmaceutics*, 345, 9-25.

Nazzaro F., Orlando P., Fratianni F., Coppola R., (2012), Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (2), 182-186.

Orlich B., Schomäcker R., (2002), Enzyme catalysis in reverse micelles. In *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation (185-208)*. Springer Berlin Heidelberg.

Papadimitriou V., Xenakis A., Evangelopoulos A.E., (1993), Proteolytic Activity of various w/o Microemulsions as related to the Polarity of the reaction medium, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 1, 295-303.

Papadimitriou V., Pispas S., Syriou S., Pournara A., Zoumpanioti M., Sotiroudis T.G., Xenakis A., (2008), Biocompatible Microemulsions based on Limonene: Formulation, Structure and Applications, *Langmuir*, 24, 3380-3386.

Patel N., Schmid U., Lawrence M.J., (2006), Phospholipid-based microemulsions suitable for use in foods, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7817-7824.

Pedersen B. H., Nilssen E. M., Hjelmeland K., (1987), Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Marine Biology* 94, 171–181.

Peltola S., Saarinen-Savolainen P., Kiesvaara J., Suhonen T.M., Urtti A., (2002), Microemulsions for topical delivery of estradiol, *International journal of pharmaceutics*, 254 (2),99-107.

Poston H.A., (1991), Response of Atlantic salmon fry to feed-grade lecithin and choline. *The Progressive Fish-Culturist*, 53, 224-228.

Rashidi L., Khosravi-Darani K., (2011), The applications of nanotechnology in food industry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51 (8), 723-730.

Robb I.D., (1982), *Microemulsions*, Plenum Press, New York.

Schurtenberger P., Cavaco C., (1994), Polymer-like lecithin reverse micelles. 1. A light scattering study. *Langmuir*, 10 (1), 100-108.

Sedef E.M., Özhan G., MatM.C., (2016), Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: characterization studies and in vitro and in vivo evaluations, *International Journal of Nanomedicine*, 11: 1027–1037.

Shinoda K., Lindman B., (1987), Organized surfactant systems: microemulsions. *Langmuir*, 3(2), 135-149.

Shinoda K., Shibata Y., Lindman B., (1993), Interfacial tensions for lecithin microemulsions including the effect of surfactant and polymer addition, *Langmuir*, 9 (5), 1254-1257.

Stoeckenius W., Schulman J.H., Prince L.M. (1960), The structure of Myelin Figures and Microemulsions as Observed with the Electron microscope, *Colloid and Polymer Science*, 169, 1-2, 170-180.

Stroband H., Dabrowski K., (1979), Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. In: M. Fontaine (Editor), *Nutrition des Poissons. Actes du Colloque CNERNA, Paris*, 355-374.

The state of Mediterranean and Black Sea fisheries, 2016, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Theochari I., Goulielmaki M., Danino D., Papadimitriou V., Pintzas A., Xenakis A., (2017), Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: the case of Vemurafenib analog PLX4720. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 350-356.

Turinga R.G., Beck J.L., Krebs J.M., Licamele J.D., (2005), Development of feeding mechanics in marine fish larvae and the swimming behavior of zooplankton prey: implications for rearing marine fishes. In: *Copepods in Aquaculture*, 119–132. Blackwell Publishing Ltd., Ames, IA, USA.

Von Rybinski W., Guckenbiehl B., Tesmann H., (1998), Influence of co-surfactants on microemulsions with alkyl polyglycosides, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 142, 2-3, 333-342.

Wang L., Li X., Zhang G, Dong J., Eastoe, J. (2007), Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations, *Journal of colloid and interface science*, 314 (1), 230-235.

Yallapu M. M., Jaggi M., Chauhan S. C., (2012), Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer, *Drug discovery today*, 17 (1), 71-80.

Αντωνοπούλου Ε., (2015), Καλλιέργεια ιχθύων – διατροφή και θρέψη., Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Θ., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., Τριανταφυλλίδης, Α. 2015. Υδατοκαλλιέργειες., Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 3., <http://hdl.handle.net/11419/5086>.

Βένου Β., (2003), Πειραματικές μελέτες στη διατροφή της τσιπούρας *Sparus Aurata L.*, Επιδράσεις της τεχνολογίας της εξώθησης τροφών και πρώτων υλών στην ανάπτυξη, στη φυσιολογία και στο μεταβολισμό του οργανισμού, Αθήνα

Γιούλη Σαπουνά, www.moneypedia.gr/Images/BUSINESS_PLAN_Tool.aspx

Καρβούνης Σ., (2006), Μεθοδολογία, Τεχνικές και Θεωρία για Οικονομοτεχνικές Μελέτες, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

Κατσάνος Α. Ν., (1999), Φυσικοχημεία – Βασική Θεώρηση, Εκδόσεις Παπαζήση.

Κλαουδάτος Σ., Κλαουδάτος Δ., (2008), Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών, Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα.

Παπουτσόγλου Σ., (2008), Διατροφή ιχθύων, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 151-187.

Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, ΣΕΘ, Ετήσιες αναφορές του κλάδου για τα έτη 2014, 2015, 2016.

Υπουργείο Εξωτερικών, Πλαίσιο Συνεργασίας της ΓΓ ΔΟΣ & ΑΣ και του ΣΕΘ, μελέτη Γραφείων ΟΕΥ: «Η ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια και τα προϊόντα της στην παγκόσμια αγορά».

<https://en.wikipedia.org/wiki/Aquaculture>

https://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish, Στοιχεία για την αλιεία, Ευρωπαϊκή Επιτροπή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΚΟΣΤΗ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΕΞΟΔΑ

Έξοδα εγκατάστασης και εξοπλισμού	Κόστος (σε €)	Διάρκεια απόσβεσης (σε έτη)
Διαμόρφωση περιβάλλοντος χώρου	10.000	
Μηχανήματα	100.000	5
Έπιπλα και λοιπός εξοπλισμός	10.000	5
Λοιπές δαπάνες	5.000	5
Σύνολο	125.000	

Ετήσια Έξοδα	Κόστος (σε €)				
	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Έξοδα προσωπικού	15.750	15.750	16.380	16.380	16.380
Κόστος προσωπικού	15.750	15.750	16.380	16.380	16.380
Έξοδα λειτουργίας	21.200	21.200	23.200	21.200	21.200
Συντήρηση κτιρίων και μηχανημάτων	3.000	3.000	5.000	3.000	3.000
Θέρμανση	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000
ΔΕΗ	12.000	12.000	12.000	12.000	12.000
Καθαρισμός κτιρίων	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200
Πρώτες ύλες	652.600	652.600	652.600	652.600	652.600
ΣΥΝΟΛΟ	689.550	689.550	692.180	690.180	690.180

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ – ΔΑΝΕΙΑ

Έξοδα εγκατάστασης και εξοπλισμού (σε €)		125.000
Ίδια συμμετοχή (%)	35%	43.750
Δάνεια (σε €)	65%	81.250
Αρχικά Δεδομένα	Δανειο 1	Δάνειο 2
Ύψος νέου δανείου (σε €)	81.250	100.000
Ετήσιο επιτόκιο δανεισμού (%)	10%	10%
Διάρκεια αποπληρωμής	5	5
Έτος Έναρξης	0	0
Τοκοχρεωλύσιο (σε €)	21434	26380

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΠΛΗΡΩΜΗΣ ΔΑΝΕΙΟΥ 1	Έτος 0	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Τοκοχρεολύσιο (Δόση)(σε €)		21.434	21.434	21.434	21.434	21.434
Χρεολύσιο(σε €)		13.309	14.639	16.103	17.714	19.485
Τόκοι (σε €)		8.125	6.794	5.330	3.720	1.949
Υπόλοιπο Δανείου(σε €)	81.250	67.941	53.302	37.199	19.485	0

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΠΛΗΡΩΜΗΣ ΔΑΝΕΙΟΥ 1	Έτος 0	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Τοκοχρεολύσιο (Δόση)(σε €)		26.380	26.380	26.380	26.380	26.380
Χρεολύσιο(σε €)		16.380	18.018	19.819	21.801	23.982
Τόκοι(σε €)		10.000	8.362	6.560	4.578	2.398
Υπόλοιπο Δανείου(σε €)	100.000	83.620	65.603	45.783	23.982	0

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ – ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΚΙΝΗΣΗΣ & ΕΣΟΔΑ

	Μέρες
Αποθήκευση Α' Υλών	45
Αποθήκευση Προϊόντος	30
Κάλυψη Ρευστότητας	365
Πίστωση σε πελάτες	120
Πίστωση από προμηθευτές	120

(σε €)	ΕΤΟΣ				
	1	2	3	4	5
Αποθέματα α' υλών	80.458	80.458	80.458	80.458	80.458
Αποθέματα προϊόντων	53.638	53.638	53.638	53.638	53.638
Αναγκαία διαθέσιμα	36.950	689.550	692.180	690.180	690.180
Πιστώσεις προς πελατεία	371.342	0	0	0	0
Σύνολο	542.388	823.646	826.276	824.276	824.276
Μείον πιστώσεις προμηθευτών	214.553	214.553	214.553	214.553	214.553
Αναγκαίο Κεφάλαιο Κίνησης	327.835	609.092	611.722	609.722	609.722

	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
	Έσοδα (σε €)	Ρυθμός αύξησης εσόδων %			
Προϊόν	1.129.500	2,00%	4,00%	6,00%	8,00%

	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Προϊόν	1.129.500	1.152.090	1.198.174	1.270.064	1.371.669
ΣΥΝΟΛΟ	1.129.500	1.152.090	1.198.174	1.270.064	1.371.669

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV – ΤΑΜΕΙΑΚΕΣ ΡΟΕΣ

A. Εισροές	Έναρξη	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Υπόλοιπο ταμείου		100.000	85.593	733.525	1.021.637	1.336.193
Αποτελέσματα προ αποσβέσεων και φόρων		421.825	447.384	494.103	571.586	677.142
Μείον πιστώσεις προς πελάτες		371.342	0	0	0	0
Πλέον πιστώσεις από προμηθευτές		214.553	214.553	214.553	214.553	214.553
Ίδια συμμετοχή	43.750					
Δάνεια	181.250	0	0	0	0	0
Εισπράξεις χρεών προηγούμενης χρήσης		0	371.342	0	0	0
Σύνολο A	225.000	365.036	1.118.872	1.442.181	1.807.776	2.227.889

B. Εκροές	Έναρξη	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Δαπάνες επένδυσης	125.000					
Δαπάνες για αποθέματα		134.096	134.096	134.096	134.096	134.096
Μείον αποθέματα προηγούμενης χρήσης		0	134.096	134.096	134.096	134.096
Χρεολύσια δανείων		29.688	32.657	35.923	39.515	43.467
Φόροι εισοδήματος		115.659	123.071	136.620	159.090	189.701
Μερίσματα		0	15.066	33.448	58.424	92.888
Πληρωμές χρεών προηγούμενης χρήσης		0	214.553	214.553	214.553	214.553
Σύνολο B	125.000	279.443	385.347	420.544	471.583	540.610
Σωρευμένο ταμειακό υπόλοιπο	100.000	85.593	733.525	1.021.637	1.336.193	1.687.280

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V – ΛΟΓΑΡΙΑΣΜΟΙ ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗΣ

	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Σύνολο κύκλου εργασιών	1.129.500	1.152.090	1.198.174	1.270.064	1.371.669
Μείον : Κόστος πωληθέντων	652.600	652.600	652.600	652.600	652.600
Μικτό κέρδος εκμετάλλευσης	476.900	499.490	545.574	617.464	719.069
Μείον : Έξοδα προσωπικού	15.750	15.750	16.380	16.380	16.380
Μείον : Έξοδα λειτουργίας	21.200	21.200	23.200	21.200	21.200
Αποτέλεσμα προ τόκων, αποσβέσεων και φόρων	439.950	462.540	505.994	579.884	681.489
Μείον : τόκοι δανείων	18.125	15.156	11.890	8.298	4.347
Μείον : αποσβέσεις	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000
Αποτέλεσμα προ φόρων	398.825	424.384	471.103	548.586	654.142
Μείον: Φόρος εισοδήματος	115.659	123.071	136.620	159.090	189.701
Καθαρό αποτέλεσμα (κέρδη)	283.166	301.313	334.483	389.496	464.441
Μέρισμα	0	15.066	33.448	58.424	92.888
Αποθεματικό	283.166	286.247	301.035	331.072	371.553

Συντελεστής φορολόγησης κερδών	29%	29%	29%	29%	29%
Ποσοστό κερδών που διανέμεται ως μέρισμα	0%	5%	10%	15%	20%