



## ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



### Μεταπτυχιακή Εργασία

*Θέμα :*

***In vitro μελέτη μερικών πτυχών της χώνευσης του άρτου***

Επιμέλεια

Μαργέλου Ιωάννα

Εισηγητής

Ριτζούλης Χρήστος

## Περίληψη

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της μεταφοράς των μακρομορίων του ψωμιού στα γαστρικά υγρά αλλά και τη μετέπειτα διάσπαση τους στην γαστρεντερική οδό (GI). Τα δείγματα του ψωμιού υποβλήθηκαν σε μια αλληλουχία μηχανικής επεξεργασίας σε προσομοιωμένο γαστρεντερικό περιβάλλον, δηλαδή σε προσομοιωμένο στοματικό υγρό, σε στομαχικό υγρό και σε υγρά του λεπτού εντέρου. Απουσία ενζύμων, παρακολουθείται η μεταφορά του αμύλου από την τροφή που έχει διασπαστεί κατά την «μάσηση» στην συνέχεια στο «στομάχι» και στο «λεπτό έντερο», χωρίς να σημειωθεί κάποια σημαντική υδρόλυση. Η ενσωμάτωση της α-αμυλάσης στο τεχνητό σάλιο οδήγησε στην υδρόλυση στο λεπτό έντερο, υποδηλώνοντας μια εξαρτώμενη σχέση από το pH και το ένζυμο με την απενεργοποίηση του στο στομάχι και την επανενεργοποίηση του στο λεπτό έντερο. Η παρουσία της πεψίνης στο στομαχικό υγρό επηρεάζει την απελευθέρωση της πρωτεΐνης στο περιβάλλον του στομάχου.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	- 1 -
2. Θεωρητικό μέρος .....	- 3 -
2.1 Πεπτικό σύστημα.....	- 3 -
2.2 Διέλευση της τροφής μέσω της γαστρεντερικής οδού.....	- 3 -
2.2.1 Στόμα .....	- 3 -
2.2.2 Στομάχι.....	- 4 -
2.2.3 Λεπτό έντερο.....	- 6 -
2.3 In vitro μοντέλα πέψης εφαρμοσμένα σε τρόφιμα.....	- 8 -
2.3.1 In vitro μοντέλα πέψης και προσθήκη ένζυμων.....	- 8 -
2.3.2 Επίδραση των in vitro μοντέλων πέψης στα διαφορετικά είδη τροφών .....	- 9 -
2.3.3 In vitro μοντέλο πέψης της πρωτεΐνης του γάλακτος .....	- 10 -
2.3.4 Επίδραση του γαλακτωματοποιητή στην δομή γαλακτωματοποιημένων λιπιδίων κατά τη διάρκεια της in vitro πέψης .....	- 11 -
2.4 Αρτοποιήση.....	- 12 -
2.4.1 Διαδικασία αρτοποιήσης.....	- 12 -
2.4.2 Άμυλο και αρτοσκευάσματα.....	- 12 -
2.5 Τεχνικές μέθοδοι.....	- 13 -
2.5.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθους (SEC, size-exclusion-chromatography).....	- 13 -
2.5.2 Ανιχνευτές.....	- 16 -
3. Σκοπός της πτυχιακής.....	- 18 -
4. Υλικά και μέθοδοι.....	- 18 -
4.1.1 Υλικά.....	- 18 -
4.1.2 Όργανα.....	- 19 -

4.1.3 Μεταχείριση δειγμάτων .....	- 19 -
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	- 23 -
5.1 Απλή προσομοίωση του γαστρεντερικού μοντέλου .....	- 24 -
5.2 Επίδραση της μυξίνης στο γαστρεντερικό μοντέλο.....	- 26 -
5.3 Επίδραση της μυξίνης και της α-αμυλάσης στο γαστρεντερικό μοντέλο .....	- 28 -
5.4 Επίδραση της μυξίνης, της α-αμυλάσης και της πεψίνης στο γαστρεντερικό μοντέλο. ....	- 30 -
6. Συμπεράσματα .....	- 33 -
7. Βιβλιογραφία .....	- 35 -

## 1. Εισαγωγή

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη μοντελοποίηση της γαστρεντερικής οδού του ανθρώπου. Τα περισσότερα εργαστηριακά μοντέλα περιλαμβάνουν ένα περιορισμένο αριθμό παραμέτρων και αφορούν συγκεκριμένες εφαρμογές. Ωστόσο, για να προσομοιωθεί η σύνθεση των φυσιολογικών και φυσικοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν εντός του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος, είναι σημαντικό να εκτεθεί ένα γεύμα σε όλα τα στάδια της πέψης δηλαδή στον χρόνο διέλευσης, στο pH, και στις ενζυματικές συνθήκες. Τα γαστρεντερικά μοντέλα που περιγράφηκαν μέχρι τώρα παραμένουν απλοποιημένα σε σύγκριση με την *in vivo* κατάσταση.

Η παρούσα μελέτη, εκτός του ενδιαφέροντος της προσομοίωσης του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος σε ένα εργαστηριακό μοντέλο αφορά και την μελέτη της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών από αυτό κατά την πέψη τους. Ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το ψωμί.

Το ψωμί είναι ένα δημοφιλές είδος διατροφής σε όλο τον κόσμο. Το άσπρο ψωμί είναι μια εξαιρετική πηγή υδατανθράκων, κυρίως αμύλου, και πρωτεΐνης (γλουτένη). Κατά το ψήσιμο της ζύμης λαμβάνουν χώρα μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών μεταξύ των οποίων είναι και η εξάτμιση του νερού, ο σχηματισμός μιας πορώδους δομής, η επέκταση του όγκου, η μετουσίωση της πρωτεΐνης, η ζελατινοποίηση του αμύλου και η ανάπτυξη της γεύσης, είναι τα πιο επιφανή. Έχει προσδιοριστεί πως το ψωμί πέπτεται και απορροφάται πιο γρήγορα σε σχέση με άλλα τρόφιμα, και τα δυο αυτά φαινόμενα οφείλονται είτε στο υψηλό ποσοστό πέψης του αμύλου είτε στην ταχεία γαστρική κένωση (Snow et al., 1981).

Η κατανόηση της διαδικασίας της πέψης στερεών τροφών όπως το ψωμί είναι μια απαραίτητη προϋπόθεση αν λάβει κανείς υπόψη τον κρίσιμο ρόλο του ψωμιού και των συναφών προϊόντων στην διατροφή. Πρόσφατες μελέτες τονίζουν τις άμεσες επιπτώσεις που έχουν κατά την πέψη τα προϊόντα των

δημητριακών στους φυσιολογικούς δείκτες. Μια σειρά από εργαστηριακές δοκιμές που καλύπτουν διάφορες πτυχές της πέψης παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την πέψη των δημητριακών και την πέψη του άμυλου.

Η μελέτη της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών κατά την πέψη τους βασίζεται σε πρωτόκολλα που έχουν καθοριστεί για υγρά τρόφιμα, για να μελετηθούν τα μακρομοριακά φαινόμενα μεταφοράς από ένα στερεό τρόφιμο στην υδατική φάση που καταλαμβάνει το στόμα και τον γαστρεντερικό σωλήνα (Rousi et al., 2014).

## **2. Θεωρητικό μέρος**

### **2.1 Πεπτικό σύστημα**

Η ανθρώπινη πέψη είναι μια πολύπλοκη και απαραίτητη διαδικασία. Τα θρεπτικά συστατικά που προκύπτουν από την διάσπαση της τροφής μπορούν να καταναλωθούν και να χρησιμοποιηθούν από το σώμα για την ανάπτυξη του, τη συντήρηση των κυττάρων αλλά και ως καύσιμα. Κατά την διάρκεια της πέψης δύο διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα: α) ο μηχανικός μετασχηματισμός που μπορεί να μειώσει το μέγεθος των σωματιδίων των τροφών και β) ο ενζυματικός μετασχηματισμός όπου τα μακρομόρια υδρολύονται σε μικρότερα συστατικά και απορροφώνται από την κυκλοφορία του αίματος. Η διάσπαση της τροφής συμβαίνει κυρίως στο στόμα και στο στομάχι, ενώ η ενζυματική πέψη λαμβάνει χώρα κυρίως στο παχύ και στο λεπτό έντερο (Guerra et al., 2012).

### **2.2 Διέλευση της τροφής μέσω της γαστρεντερικής οδού**

#### **2.2.1 Στόμα**

Η κύρια λειτουργία του στόματος είναι να λαμβάνει τις τροφές, και να τις μετατρέπει σε μια μορφή κατάλληλη για κατάποση. Η σύνθεση, η δομή και οι ιδιότητες των σωματιδίων αλλάζουν σημαντικά κατά την διάρκεια μάσησης εξαιτίας μιας πολύπλοκης διαδικασίας που συμβαίνει εντός του ανθρώπινου στόματος. Κατά την πρόσληψη των τροφών ή των ποτών υφίσταται ένας αριθμός διεργασιών: η τροφή αρχικά αναμιγνύεται με το σάλιο, όπου μπορεί να υπάρξει αλλαγή στο pH, στην ιοντική δύναμη, στην θερμοκρασία και επίσης μπορεί να ενεργοποιηθούν διάφορα πεπτικά ένζυμα (π.χ., η λιπάση της γλώσσας, η αμυλάση, η πρωτεάση κ.τ.λ). Ακόμα μπορεί να αλληλεπιδράσει με βιοπολυμερή στο σάλιο (π.χ., τη μυξίνη) ή να αλληλεπιδράσει με την επιφάνεια της γλώσσας και του στόματος, και κατά την μάσηση να καταταμηθούν σε

μικρότερα κομμάτια. Όλοι αυτοί οι παράγοντες προσομοιώνονται σε ένα εργαστηριακό μοντέλο πέψης (McClements et al., 2010).

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες είναι η αλληλεπίδρασή με το σάλιο. Το ανθρώπινο σάλιο έχει συνήθως γύρω pH 5.5 - 6.1 όταν ο οργανισμός είναι νηστικός ενώ το pH είναι από 7 έως 8 μετά την κατάποση του φαγητού. Το σάλιο τυπικά εκκρίνεται σε ένα ρυθμό από περίπου 0,2 έως 4 ml ανά λεπτό, με συνολική παραγωγή σάλιου από 500 έως 1500 ml ανά ημέρα. Το σάλιο περιέχει νερό (~ 99%), ιχνοστοιχεία (<1%) και πρωτεΐνες (0,1-0,2%). Τα πρωτεϊνικά κλάσματα έχουν πολύπλοκη σύνθεση με πολλά διαφορετικά μοριακά είδη, που συμπεριλαμβάνουν τα ένζυμα, τις ανοσοσφαιρίνες, τις αντιβακτηριδιακές πρωτεΐνες, ενώ είναι πλούσια σε προλινική πρωτεΐνη και γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες (μυξίνη). Η συμπεριφορά της μυξίνης είναι δύσκολο να προσομοιωθεί με ακρίβεια στα εργαστηριακά μοντέλα πέψης, επειδή υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στην ποσότητα, τη σύνθεση και τις ιδιότητες του σάλιου για ένα δεδομένο άτομο σε διαφορετικούς χρόνους, καθώς και σαν μεμονωμένα άτομα (McClements et al., 2010).

Ένα τρόφιμο ή ένα ποτό δαπανά συνήθως ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα στο στόμα, πριν την κατάποση, ανάλογα με την φύση του υλικού. Τα υγρά χρειάζονται πολύ λιγότερο χρόνο στο στόμα σε σχέση με τα στερεά που χρειάζονται την μάσηση για να σπάσουν σε μικρότερα κομμάτια. Συνήθως, η κατάποση διαρκεί μόνο λίγα δευτερόλεπτα για να ολοκληρωθεί, και περιλαμβάνει ολοκληρωμένες κινήσεις από τα τμήματα της γλώσσας, του φάρυγγα, του οισοφάγου και του στομάχου (McClements et al., 2010).

### **2.2.2 Στομάχι**

Η δομή του στομάχου μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας σάκος, όπου οι τροφές υφίστανται κάποια επεξεργασία και στην συνέχεια αποθηκεύονται εκεί μέχρι να μεταφερθούν στο λεπτό έντερο. Το ποσοστό με το οποίο το στομάχι αδειάζει μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό, την έκταση της πέψης και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών στο λεπτό έντερο, αλλά και την αίσθηση του κορεσμού. Το στομάχι αποτελείται από τις παρακάτω περιοχές: τον οισοφάγο όπου συγκοινωνεί στο άνω τμήμα του στομάχου με ένα στόμιό που ονομάζεται



καρδιακό στόμιο και προς τα κάτω συγκοινωνεί με το λεπτό έντερο, το πυλωρικό στόμιο. Το πάνω μέρος του στομαχιού ονομάζεται θόλος και περιέχει συνήθως αέρια. Η περιοχή που βρίσκεται κάτω από το θόλο, λέγεται σώμα του στομάχου, ενώ η περιοχή που βρίσκεται προς τον πυλωρό λέγεται πυλωρικό άντρο (κάτω τμήμα). Η κύρια λειτουργία του θόλου είναι να εκκρίνει το γαστρικό υγρό που περιέχει τα οξέα και τα πεπτικά ένζυμα, ενώ η κύρια λειτουργία του πυλωρικού άντρου είναι να δημιουργήσει μηχανικές δυνάμεις που ανακατεύουν, αποδιοργανώνουν και μεταφέρουν το περιεχόμενο του στομάχου στο λεπτό έντερο (McClements et al., 2010).

Μετά την κατάποση της τροφής, αυτή διέρχεται ταχέως μέσω του οισοφάγου στο στομάχι και αναμιγνύεται με τα όξινα πεπτικά υγρά που περιέχουν γαστρικά ένζυμα, ανόργανα άλατα, επιφανειακά ενεργά υλικά, και διάφορα άλλα βιολογικά συστατικά, και υποβάλλεται σε μηχανική ανάδευση, εξαιτίας της κινητικότητας του στομάχου. Το pH του ανθρώπινου στομάχου κυμαίνεται μεταξύ 1 και 5 υπό συνθήκες πείνας, αλλά αλλάζει σημαντικά όταν οι τροφές εισέρχονται σε αυτό. Συνήθως, υπάρχει μία σημαντική αύξηση του pH του στομάχου μετά την πρόσληψη των τροφών, ακολουθούμενη από μια βαθμιαία μείωση κατά την επόμενη ώρα έως ότου επιτευχθεί μια τιμή pH γύρω 2. Η εξάρτηση του χρόνου με την πτώση του pH εξαρτάται από το αρχικό pH, την ρυθμιστική ικανότητα, την σύνθεση και την ποσότητα των τροφών που λαμβάνεται. Η υψηλή οξύτητα του στομάχου παίζει έναν σημαντικό αριθμό φυσιολογικών ρόλων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των ενζύμων, της υδρόλυσης των συστατικών των τροφών και της αδρανοποίηση των μικροοργανισμών. Ενώ μετά την κατάποση των τροφών υπάρχει συνήθως μια αισθητή αύξηση της ιοντικής ισχύος του στομάχου λόγω των πρόσθετων ιόντων που προκύπτουν από την τροφή (McClements et al. 2010).

Μέσα στο στομάχι υπάρχει μια ποικιλία από συσταλτικές κινήσεις όπου τα πεπτικά υγρά ανακατεύονται με την τροφή. Εκεί κάθε μεγάλο τμήμα του τροφίμου διασπάται σε μικρότερα, και μεταφέρεται στο λεπτό έντερο υπό ελεγχόμενο ποσοστό. Το εύρος των συσπάσεων ποικίλλει σε συχνότητα και διάρκεια ανάλογα με το εάν το στομάχι περιέχει τροφή ή όχι. Κατά την κατάποση τα συστατικά των τροφών μπορούν να παραμείνουν στο στομάχι για μία χρονική περίοδο που κυμαίνεται από λίγα λεπτά έως μερικές ώρες, ανάλογα με την ποσότητα, τη φυσική κατάσταση, τις διαστάσεις, τη δομή και την τοποθεσία. Τυπικά, η ποσότητα της τροφής που παραμένει εντός του στομάχου μετά την κατάποση μειώνεται κατά περίπου 50% σε 30 έως 90 λεπτά, με τα συστατικά που βρίσκονται σε ρευστή μορφή να αδειάζουν πιο γρήγορα από τα στερεά συστατικά. Το μικρότερο μέγεθος των σωματιδίων που μπορεί να περάσει από το στομάχι στο λεπτό έντερο μέσω του πυλωρού είναι περίπου από 1 έως 2 mm. Σωματίδια με μεγαλύτερες διαστάσεις παραμένουν στο στομάχι μέχρι να διασπαστούν περαιτέρω. Τα σωματίδια μπορεί να είναι θραύσματα ενός στερεού ή πηκτώματος ή μπορούν να σχηματίζονται εντός του στομάχου, π.χ., εξαιτίας του σχηματισμού ενός πηκτώματος βιοπολυμερούς κάτω από όξινες συνθήκες. Έτσι, οι ιδιότητες θραύσης του υλικού του τροφίμου που καταναλώνεται και ο βαθμός της μάσησης μέσα από το στόμα μπορεί έχουν μεγάλη επίδραση στη μετέπειτα πέψη (McClements et al. 2010).

### **2.2.3 Λεπτό έντερο**

Το λεπτό έντερο είναι η περιοχή της γαστρεντερικής οδού όπου γίνεται το μεγαλύτερο μέρος της πέψης και της απορρόφησης. Η δομή μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας σωλήνας (με διάμετρο περίπου 2,5 έως 3 cm) που αποτελείται από τρεις μεγάλες περιοχές: τον δωδεκαδάκτυλο (μήκους περίπου 26 cm), την νήστιδα (περίπου 2500 εκατοστά μήκος) και τον ειλεό (περίπου 3500 cm μήκος). Η πραγματική επιφάνεια του λεπτού εντέρου είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη που υπολογίζεται για έναν απλό σωλήνα λόγω της πολύπλοκης τοπολογίας της εσωτερικής επένδυσης, π.χ., λάχνες και δομές κρύπτης (Guerra et al. 2012).

Η μορφολογία του λεπτού εντέρου είναι εξαιρετικά προσαρμοσμένη σε δύο κύριους ρόλους α) στην πέψη, η οποία αποτελεί, την διάσπαση των μακρομορίων και β) στην απορρόφηση του νερού και των θρεπτικών συστατικών. Μετά την είσοδο τους στο δωδεκαδάκτυλο, τα όξινα υγρά εξουδετερώνονται με το διττανθρακικό νάτριο ( $\text{NaHCO}_3$ ) για να δώσουν ένα κατάλληλο pH για την δραστηριότητα του ενζύμου. Τα παγκρεατικά ένζυμα (ένα σύμπλοκο μίγμα από πρωτεάσες, αμυλάσες, και λιπάσες) και τα άλλα πεπτικά ένζυμα που παράγονται από το εσωτερικό του τοιχώματος του λεπτού εντέρου δρουν μαζί στην διάσπαση των συστατικών των τροφών. Η χολή (που παράγεται από το ήπαρ) παίζει ένα συγκεκριμένο ρόλο στην πέψη προωθώντας την δράση της παγκρεατικής λιπάσης. Τα περισσότερα χολικά άλατα απορροφούνται ξανά, ενεργά στον ειλέο και επαναχρησιμοποιούνται στη χολή μέσω του εντεροηπατικού κύκλου. Η πολύπλοκη τοπολογία του εσωτερικού της επένδυσης του λεπτού εντέρου δίνει μια τεράστια επιφάνεια απορρόφησης. Το νερό και τα θρεπτικά συστατικά απορροφώνται από τις λάχνες των εντερικών κύτταρων μέσω μιας απλής διάχυσης ή μέσω της ενεργού μεταφοράς. Αυτό αποτρέπει τη συσσώρευση των προϊόντων πέψης στον αυλό του λεπτού εντέρου, η οποία θα μπορούσε να αναστείλει τις ενζυμικές δραστηριότητες. Η μηχανική πέψη περιλαμβάνει μια τμηματοποίηση στις κινήσεις, επιτρέποντας τα όξινα υγρά του στομάχου να αναμειγνύονται με τα πεπτικά ένζυμα, ενώ η δράση του περισταλτισμού, ωθεί την πέψη διαμέσου του λεπτού εντέρου. Οι περιοχές του λεπτού εντέρου τρέφουν διακριτούς μικροβιακούς πληθυσμούς που μπορούν να παίξουν ρόλο στην ανθρώπινη υγεία. Οι γνώσεις σχετικά με την μικροβιακή χλωρίδα του ειλεού έχει αυξηθεί σημαντικά κατά την τελευταία δεκαετία με την εμφάνιση των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης. Οι τροφές που δεν έχουν απορροφηθεί οδεύουν προς το παχύ έντερο (Guerra et al. 2012).

### **2.3 In vitro μοντέλα πέψης εφαρμοσμένα σε τρόφιμα**

Σε μια in vivo μέθοδο χρησιμοποιούνται είτε οι άνθρωποι είτε τα ζώα όπου παρέχονται πιο ακριβή αποτελέσματα, αλλά είναι πιο δαπανηρή και πιο χρονοβόρα για αυτό και έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια για την ανάπτυξη των in vitro μοντέλων, ωστόσο αυτά διαφέρουν μεταξύ τους. Αυτό οφείλεται είτε στα διαφορετικά είδη τροφών που χρησιμοποιούνται στις εργασίες είτε στην πολυπλοκότητα του γαστρεντερικού μοντέλου πέψης. Τα in vitro μοντέλα πέψης διαφέρουν ως προς την λειτουργία τους δηλαδή :

- Τον αριθμό και τα βήματα που περιλαμβάνονται στην αλληλουχία της πέψης π.χ. το στόμα, το στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο.
- Την σύνθεση των πεπτικών υγρών που χρησιμοποιούνται σε κάθε στάδιο π.χ. τα ένζυμα, τα άλατα, το ρυθμιστικό διάλυμα, τα πολυμερή και τα επιφανειοδραστικά συστατικά.
- Στις μηχανικές καταπονήσεις και τη ροή των ρευστών που χρησιμοποιούνται σε κάθε στάδιο κατά την πέψη (Hur et al. 2011).

Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο είδος των παραμέτρων που μετρούνται στα διάφορα μοντέλα πέψης. Αυτές περιλαμβάνουν χημικές αλλαγές (όπως υδρόλυση των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών), αλλαγές θέσης (όπως απελευθέρωση έγκλειστων συστατικών και ανταγωνιστικές διαδικασίες προσρόφησης), και διαρθρωτικές αλλαγές (όπως κατανομή των δομών, συσσωμάτωση) (Hur et al. 2011).

#### **2.3.1 In vitro μοντέλα πέψης και προσθήκη ενζύμων**

Διάφοροι παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά του δείγματος, η δραστηριότητα του ενζύμου, η ιοντική σύνθεση, η μηχανική καταπόνηση που εφαρμόζεται και ο χρόνος πέψης, έχουν σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα ενός εργαστηριακού μοντέλου πέψης. Συνεπώς, οι in vivo συνθήκες δεν μπορούν ποτέ να προσομοιωθούν πλήρως στις in vitro συνθήκες. Οι Boisen και Eggum αναφέρουν ότι μια in vitro τεχνική μπορεί να σχεδιαστεί έτσι ώστε να γίνετε

χρήση των κατάλληλων ενζύμων για να δοθούν είτε οι μέγιστες τιμές της πέψης είτε του ρυθμού υδρόλυσης. Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες σε μια *in vitro* πέψη είναι τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Διάφοροι παράγοντες, όπως η συγκέντρωση, η θερμοκρασία, το pH, η σταθερότητα και ο χρόνος επώασης, επηρεάζουν την δραστικότητα του ενζύμου. Η επιλογή των ενζύμων, οι συνθήκες επώασης και ο εξοπλισμός επίσης εξαρτώνται από τους στόχους της μελέτης. Η χρήση μεμονωμένων ενζύμων μπορεί να είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη της πεπτικότητας μεμονωμένων συστατικών π.χ. η πρωτεΐνη με τη χρήση πεψίνης, το άμυλο με τη χρήση της αμυλάσης και τα λίπη με την χρήση της λιπάσης. Η θερμοκρασία επώασης είναι συνήθως στους 37°C παρά της διακυμάνσεις στην ποσότητα των ενζύμων. (Hur et al. 2011).

### **2.3.2 Επίδραση των *in vitro* μοντέλων πέψης στα διαφορετικά είδη τροφών**

Τα χαρακτηριστικά των τροφών, ο τύπος του ενζύμου, και η συγκέντρωση του ενζύμου αποτελούν τους βασικούς παράγοντες που ελέγχουν την πέψη των τροφών. Ο Abdel-Aal ανέφερε ότι οι διαφορές στην πεπτικότητα επηρεάζουν τα πρωτεολυτικά ενζυμα, τις συνθήκες πέψης, καθώς και την πηγή των πρωτεϊνών. Η αύξηση των διατροφικών πρωτεϊνών προκαλεί αυξημένη έκκριση των παγκρεατικών πρωτεολυτικών ενζύμων, ενώ μια αύξηση στην πρόσληψη του άμυλου ή των λιπιδίων επάγει αυξημένες εκκρίσεις της αμυλάσης και λιπάσης, αντίστοιχα. Έτσι, τα χαρακτηριστικά μιας *in vitro* πέψης όπως είναι ο χρόνος της πέψης, η περιεκτικότητα σε ένζυμα ή η σύνθεση των ενζύμων πρέπει να ρυθμίζεται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του δείγματος. Για παράδειγμα, εάν η συγκέντρωση μιας ουσίας- (πρωτεΐνη, λιπίδιο, ή υδατάνθρακας) αυξάνεται, τότε ή η συγκέντρωση των ενζύμων ή ο χρόνος της πέψης πρέπει να αυξηθεί, ακόμη και αν τα υπόλοιπα συστατικά παραμένουν τα ίδια. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι σε ένα δείγμα όπως το πράσινο τσάι η προσθήκη των πεπτικών ενζύμων δεν μεταβάλλει σημαντικά το ποσό της κατεχίνης που ανακτάται όταν χρησιμοποιείται σε ένα εργαστηριακό μοντέλο πέψης. Βρέθηκε επίσης ότι το ποσό της κατεχίνης που ανακτήθηκε ήταν το ίδιο είτε χρησιμοποιώντας πεπτικά ένζυμα είτε όχι. Αυτό μπορεί πιθανόν να συμβαίνει επειδή το άνθρωπο στομάχι

δεν μπορεί να χωνέψει καλά τα φυτικά τρόφιμα και έτσι η παρουσία ή η απουσία των ενζύμων έχουν μικρό αντίκτυπο στη απελευθέρωση της κατεχίνης. Επιπλέον η φύση του δείγματος επηρεάζει το χρόνο πέψης, έτσι τα μεγάλα σωματίδια των τροφών κινούνται πιο αργά από ότι τα μικρά. (Hur et al. 2011).

### **2.3.3 In vitro μοντέλο πέψης της πρωτεΐνης του γάλακτος**

Διάφορες μελέτες έχουν προσκομίσει αποδεικτικά στοιχεία ότι το μητρικό γάλα έχει μεγαλύτερα πλεονεκτήματα στην υγεία του ανθρώπου. Μία από αυτές τις μελέτες έδειξαν μείωση στην συχνότητα των λοιμωδών επεισοδίων κατά τη διάρκεια του θηλασμού. Όπως επίσης μια μεταγενέστερη μελέτη, έδειξε ότι η μέση αρτηριακή πίεση του αίματος σε παιδιά από 13 έως 16 ετών ήταν χαμηλότερη σε αυτά που στην βρεφική τους ηλικία θήλαζαν (Chatterton et al. 2004).

Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των εργαστηριακών μοντέλων πέψης πάνω στην πρωτεΐνη του γάλακτος και ο προσδιορισμός της σταθερότητας τους. Για να μπορέσει να γίνει αυτός ο προσδιορισμός, χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο γάλα, συμπύκνωμα από πρωτεΐνη ορού γάλακτος και βρεφικό γάλα εμπορίου και για την πέψη είτε προστέθηκε πεψίνη χοίρου είτε βρεφικά γαστρικά υγρά σε ένα εύρος τιμών pH με τα αντίστοιχα του στομάχου των βρεφών. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Chatterton et al. 2004).

Η διαδικασία της πέψης αξιολογείται αφού πρώτα εξεταστούν κάποιοι φυσιολογικοί παράγοντες. Αρχικά εξετάστηκαν τα ποσοστά της γαστρικής εκκένωσης των νεογνών. Σε αυτά που θήλαζαν η εκκένωση διήρκησε 48 λεπτά ενώ αυτά που έπιναν γάλα του εμπορίου η εκκένωση διήρκησε 65-78 λεπτά. Στην συνέχεια εξετάστηκε η πέψη των πρωτεϊνών του γάλακτος που χρησιμοποιούνται στο βρεφικό γάλα και αυτό γιατί η πέψη είναι πολύπλοκη αφού το pH αλλάζει όσο μεγαλώνει το μωρό. Το γαστρικό pH ενός μωρού στις πρώτες ώρες της ζωής του είναι περίπου 6 ενώ μετά από 24 ώρες μειώνεται. Το μέσο γαστρικό pH μετά το τάισμα των μωρών φτάνει στο 6,5 μέσα σε 30 λεπτά και στην συνέχεια μειώνεται. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το γαστρικό pH των νεογνών δεν συμβαδίζει με αυτό της πεψίνης, έτσι κάτω από αυτές τις

συνθήκες είναι δύσκολο να αντιληφθεί κανείς πως γίνεται η πέψη των πρωτεϊνών. Για να γίνει κατανοητή η πέψη των πρωτεϊνών συλλέχθηκε γαστρικό υγρό από μωρά 8 και 28 ημερών σε 1 και 3 ώρες μετά το φαγητό τους. Το pH τους ρυθμίστηκε να είναι 6.5, 5.0, 4.0, 3.5, 3.0 και 2.0 και τα δείγματα επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37° C (Chatterton et al. 2004).

#### **2.3.4 Επίδραση του γαλακτωματοποιήτη στην δομή γαλακτωματοποιημένων λιπιδίων κατά τη διάρκεια της in vitro πέψης.**

Σε αυτή την εργασία εξετάζεται η επίδραση του γαλακτωματοποιητή στις μικρό-διαρθρωτικές αλλαγές που συμβαίνουν στα γαλακτωματοποιημένα λιπίδια καθώς περνούν μέσα από το γαστρεντερικό μοντέλο πέψης. Τα σταγονίδια των λιπιδίων αρχικά είναι επικαλυμμένα με διάφορα είδη γαλακτωματοποιητών (λεκιθίνη, Tween 20, πρωτεΐνη ορού γάλακτος και καζεϊνικό νάτριο) που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας έναν ανάμικτη υψηλής ταχύτητας. Τα γαλακτωματοποιημένα λιπίδια στη συνέχεια διέρχονται από το εργαστηριακό μοντέλο πέψης όπου έχει γίνει η προσομοίωση της σύνθεσης των υγρών (pH, ανόργανα άλατα, επιφανειακά ενεργών συστατικά, και ένζυμα) του στόματος, του στομάχου και του λεπτού εντέρου. Το pH του στόματος κυμαινόταν στο 6.8 και η προσομοίωση της μάσησης έγινε με την μορφή της ανάδευσης για 5 λεπτά στους 37°C, ενώ το pH του στομάχου ήταν 2 όπου η τροφή παρέμεινε για 2 ώρες στους 37°C και τέλος για το λεπτό έντερο η τιμή του pH ήταν 6.5-7 και εκεί παρέμεινε για 2 ώρες στους 37°C. Αυτό υποδηλώνει ότι ένα τουλάχιστον μέρος της σφαιρικής πρωτεΐνης παρέμεινε συνδεδεμένο με την επιφάνεια των σταγονιδίων. Η αλλαγή στη δομή και στις ιδιότητες των σταγονιδίων παρακολούθηθηκαν με συνεστιακό λέιζερ φθορισμού, με οπτική μικροσκοπία, με σκέδαση φωτός, και με μικρό-ηλεκτροφόρηση. Σε γενικές γραμμές, υπήρξε μια μείωση στην μέση διαμέτρου του σταγονιδίου, καθώς τα σταγονίδια μετακινούνται από το στόμα στο στομάχι και το λεπτό έντερο. Το ηλεκτρικό φορτίο, των σταγονιδίων σταθεροποιείται με λεκιθίνη, Tween 20 και καζεϊνικό νάτριο, ήταν αρνητικά φορτισμένο σε όλο το γαστρεντερικό σύστημα, ενώ τα σταγονίδια που σταθεροποιούνται με πρωτεΐνη ορού γάλακτος ήταν θετικά φορτισμένα στο στομάχι. Τα αποτελέσματα μας βοηθούν στην κατανόηση των φυσικοχημικών και δομικών αλλαγών που μπορεί να προκύψουν σε γαλακτωματοποιημένα λιπίδια εντός της γαστρεντερικής οδού, η οποία μπορεί

να έχει σημαντικές συνέπειες στο σχεδιασμό των λειτουργικών τροφίμων που μεταβάλλουν τη βιοδιαθεσιμότητα των λιπιδίων (Hur et al. 2009).

## **2.4 Αρτοποιία**

Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ) άρτος είναι ένα προϊόν που παρασκευάζεται με ψήσιμο μέσα σε ειδικούς φούρνους κάτω από ορισμένες συνθήκες. Είναι μια μάζα που αποτελείται από αλεύρι σίτου, νερού, ζύμης (δηλ. μαγιά) και μικρής ποσότητας άλατος. Για να γίνει η αρτοποιία είναι απαραίτητα τουλάχιστον τα παραπάνω υλικά (Κεφαλάς Π., 2009).

### **2.4.1 Διαδικασία αρτοποιίας**

Η διαδικασία αρτοποιίας χωρίζεται στα παρακάτω στάδια:

- Ανάμειξη των συστατικών
- Ανάπαυση του ζυμαριού και μορφοποίηση
- Ωρίμανση
- Ψήσιμό

Οι συνταγές των διαφόρων αρτοσκευασμάτων περιέχουν μερικά επιπλέον συστατικά που ο κύριος ρόλος τους είναι να δώσουν γεύση και άρωμα στο τελικό προϊόν. Τα συστατικά αυτά επιδρούν και στην υφή των προϊόντων με διάφορους τρόπους, συνήθως επηρεάζοντας την γλουτένη (Κεφαλάς Π., 2009)..

Επίσης σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών επιτρέπεται η προσθήκη βελτιωτικών και ενζύμων π.χ. ασκορβικό οξύ, πρωτεάση, αμυλάσες, γλουτένη, λεκιθίνη, μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια, τρυγικό, κιτρικό οξύ, όξινο ανθρακικό νάτριο και αμμώνιο, μαγιά, φωσφορικά άλατα του ασβεστίου και του νατρίου (Κεφαλάς Π., 2009).

### **2.4.2 Άμυλο και αρτοσκευάσματα**

Το άμυλο των αλεύρων που προορίζονται για την παρασκευή αρτοσκευασμάτων δεν είναι ένα αδρανές συστατικό, αλλά αλληλεπιδρά με άλλες ενώσεις και επηρεάζει τα ρεολογικά χαρακτηριστικά της ζύμης και των τελικών προϊόντων



Τέτοιες ενώσεις είναι το νερό, η ζάχαρη, τα λιπίδια και τα υδρόφιλα μακρομόρια (Κυρανάς Ε., 2011).

Οι μεταβολές που υφίσταται το άμυλο στα διάφορα στάδια της αρτοποιίας και συνεπώς οι μορφές υπό τις οποίες απαντάται στο ψωμί ποικίλουν σημαντικά από προϊόν σε προϊόν (Κυρανάς Ε., 2011).

## **2.5 Τεχνικές μέθοδοι**

### **2.5.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθους (SEC, size-exclusion-chromatography)**

Η Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ονομάζεται και χρωματογραφία διήθησης με πηκτή, είναι μια πανίσχυρη τεχνική ιδιαίτερα εφαρμόσιμη σε ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (Skoog et al., 2005). Διαχωρίζει πολύπλοκα διακλαδισμένα πολυμερή με βάση τον υδροδυναμικό όγκο και όχι το μοριακό βάρος ή τα χαρακτηριστικά της διακλάδωσης. Εξισώσεις που αφορούν την απόκριση των διαφόρων τύπων από τους ανιχνευτές προέρχονται, από μια ζώνη διεύρυνσης. Ορίζοντας μια συνάρτηση κατανομής  $N^0(M, V_h)$ , με μοριακό βάρος  $M$  και υδροδυναμικό όγκο  $V_h$ . Η πραγματική κατανομή του μοριακού βάρους του πολυμερούς δεν μπορεί να προσδιοριστεί με την SEC, ανεξαρτήτως του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται, ο φορμαλισμός επιτρέπει την πολλαπλή ανίχνευση των δεδομένων της SEC να υποστούν επεξεργασία τόσο για την ανάλυση του δείγματος του πολυμερούς όσο και για την αποκάλυψη πληροφοριών σχετικά με την σύνθεση του πολυμερούς. Ο φορμαλισμός δείχνει επίσης πώς το αληθινό βάρος και το μέσο αριθμητικό μοριακό βάρος,  $M_w$  και  $M_n$  αντίστοιχα, μπορούν να ληφθούν από την ορθή επεξεργασία της κατανομής του υδροδυναμικού όγκου (Gaborieau, 2011).

Τα πολύπλοκα διακλαδισμένα πολυμερή δεν έχουν μόνο μια διανομή των μοριακών βαρών τους αλλά και μια κατανομή των μηκών αλυσίδας και τοπολογίες. Είναι παρόν σε αρκετές σημαντικές οικογένειες : (i) τα δενδριτικά πολυμερή, τα βιοπολυμερή (π.χ., αμυλοπηκτίνη, και τα συνθετικά πολυμερή και (ii) στατιστικώς (ή τυχαία) διακλαδισμένα πολυμερή, όπως το πολυαιθυλένιο, το πολύ οξικό βινύλιο, και τα πολυακρυλικά (μερικά βιοπολυμερή όπως η αμυλόζη έχει παρόμοια δομή και περιέχει μερικές μακράς αλύσου διακλαδώσεις (Skoog et al., 2005).

Τα υλικά πλήρωσης, για την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους αποτελούνται από μικρά ( $\approx 10\text{-}\mu\text{m}$ ) σωματίδια πυρίτιας ή πολυμερούς, που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων, μέσα από τους οποίους μπορούν να διέρχονται τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων. Όσο βρίσκονται στους πόρους, τα μόρια είναι πρακτικώς παγιδευμένα και απομακρύνονται με το ρεύμα ροής της κινητής φάσης. Ο μέσος χρόνος παραμονής στους πόρους εξαρτάται από το πραγματικό μέγεθος των μορίων του αναλύτη. Μόρια, τα οποία είναι μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης, αποβάλλονται και δεν υφίστανται καμία κατακράτηση. Τα μόρια αυτά εκλούνται πρώτα από την στήλη. Μόρια με διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους μπορούν να διεισδύσουν ή να διαπεράσουν το λαβυρινθώδες περιβάλλον τους και έτσι παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλούνται τελευταία από την στήλη. Μεταξύ αυτών των δυο περιπτώσεων υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από την διάμετρο τους. Η ομάδα των μορίων αυτών υφίσταται κλασμάτωση, η οποία σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων εν μέρει με το σχήμα τους. Στην τεχνική αυτή δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και στατικής φάσης, ενώ υπάρχει ένα ανώτατο όριο χρόνου κατακράτησης, επειδή καμία ουσία δεν παραμένει περισσότερο από αυτές, που διαπερνούν πλήρως τους πόρους της στατικής φάσης (Skoog et al., 2005). Ο συνολικός όγκος μιας στήλης με υλικό πλήρωσης πορώδες πολυμερές ή πυριτία δίνεται από την σχέση:

$$V_t = V_g + V_i + V_0 \quad (1)$$

Όπου:  $V_g$  όγκος που καταλαμβάνει το στερεό υλικό της πηκτής,

$V_i$  όγκος του διαλύτη που κατακρατείται μέσα στους πόρους της και

$V_0$  ο ελεύθερος όγκος γύρω και μεταξύ των σωματιδίων της πηκτής.

Υποθέτοντας ότι δεν υπάρχει ανάμιξη ή διάχυση, το  $V_0$  παριστάνει επίσης τον θεωρητικό όγκο του διαλύτη, που απαιτείται για μεταφορά μέσω της στήλης όλων των μεγάλων μορίων των συστατικών του δείγματος, που δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους της πηκτής. Ωστόσο στην πραγματικότητα

πραγματοποιείται σε κάποιο βαθμό και ανάμιξη και διάχυση, με αποτέλεσμα τα μη κατακρατούμενα συστατικά να εμφανιστούν στην έξοδο της στήλης σε μια Γκαουσιανή (Gaussian) ζώνη κατανομής με μέγιστο συγκέντρωσης σε όγκο εκλούσματος ίσο με  $V_0$ . Για τα συστατικά μικρού μεγέθους, που εισέρχονται ελεύθερα στους πόρους της πηκτής, τα μέγιστα των κορυφών στο άκρο της στήλης θα εμφανιστούν σε όγκο του υγρού εκλούσματος ίσο με  $(V_i + V_0)$ . Γενικά τα  $V_g, V_i$  και  $V_0$  βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους και έτσι, με την στήλη πηκτής πραγματοποιείται διαχωρισμός των μεγάλων μορίων ενός δείγματος από τα πολύ μικρά με ένα ελάχιστο όγκο του υγρού έκλουσης (Skoog et al., 2005).

Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους είναι ικανά να μεταφέρουν ένα κλάσμα  $K$  του διαλύτη, που κατακρατείται στους πόρους. Ο όγκος εκλούσματος  $V_e$  των κατακρατούμενων μορίων είναι:

$$V_e = V_0 + KV_i \quad (2)$$

Η εξίσωση (2) εφαρμόζεται για κάθε διαλυμένη στο δείγμα ουσία, που βρίσκεται στην στήλη. Για πάρα πολύ μεγάλα μόρια, που δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους της πηκτής, θα είναι  $K = 0$  και επομένως  $V_e = V_0$ , ενώ για μόρια που μπορούν να εισέλθουν ανεμπόδιστα,  $K = 1$  και  $V_e = (V_0 + V_i)$ . Για την παραγωγή της εξίσωσης (2), υποτίθεται ότι δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση, όπως προσρόφηση των μορίων του δείγματος πάνω στην επιφάνεια των υλικών πλήρωσης. Όταν υπάρχει προσρόφηση αυξάνει η ποσότητα της διαλυμένης ουσίας, που ακινητοποιείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης. Για τα μικρά μόρια το  $K$  γίνεται μεγαλύτερο της μονάδας.

Η εξίσωση (2) μετασχηματίζεται στην:

$$K = (V_e - V_0) / V_i = C_S / C_M \quad (3)$$

Όπου  $K$  είναι ο συντελεστής κατανομής της διαλυμένης ουσίας. Οι τιμές του  $K$  κυμαίνονται από μηδέν, για ολικώς αποκλειόμενα μεγάλα μόρια, μέχρι την μονάδα για τα μικρά μόρια. Ο συντελεστής αυτός είναι χρήσιμη παράμετρος για την σύγκριση πειραματικών δεδομένων με διαφορετικά υλικά πλήρωσης στήλης.

Η χρήσιμη περιοχή μοριακών βαρών για υλικά πλήρωσης στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών περιγράφεται εύκολα με μια καμπύλη βαθμονόμησης, (Skoog et al., 2005).

## **2.5.2 Ανιχνευτές**

### **2.5.2.1 UV ανιχνευτής υπεριώδους 190-400 nm**

Η ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία είναι η πιο συνηθισμένη και ευρέως διαδεδομένη μέθοδος στην υγρή χρωματογραφία. Το μήκος κύματος μπορεί πολύ εύκολα να επεκταθεί στην περιοχή του ορατού φωτός. Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής είναι ένα φασματοφωτόμετρο στο τέλος της στήλης της χρωματογραφικής διάταξης. Το υγρό έκλουσης διαβιβάζεται μέσα από μια μικροκυψελίδα ροής όγκου 5-10  $\mu\text{l}$  (Bruno et al., 2005).

Η απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή UV αντιστοιχεί στη διέγερση χαμηλών ενεργειακά ηλεκτρονίων όπως  $\pi$  ηλεκτρόνια ή μη συζευγμένα ηλεκτρόνια ορισμένων ομάδων. Έτσι τα κανονικά αλκάνια απορροφούν σε περιοχή UV κάτω από τα 180nm, καθώς τα  $\sigma$  ηλεκτρόνια απαιτούν υψηλότερης ενέργεια ακτινοβολία για να διεγερθούν και να εμφανίσουν απορρόφηση ακτινοβολίας. Ενώ οι αρωματικές ενώσεις εμφανίζουν απορρόφηση του βενζολικού δακτυλίου στα 205-225 nm. Η τελευταία αντιστοιχεί στη διέγερση των συζευγμένων  $\pi$  ηλεκτρονίων του βενζολικού δακτυλίου (Παπαδογιάνης Ι.,2001).

Η ανίχνευση πραγματοποιείται στο μέγιστο συνήθως της απορρόφησης μιας ένωσης, ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη ευαισθησία και μέγιστος λόγος σήματος προς θόρυβο. Επειδή η μέγιστη ευαισθησία των περισσότερων οργανικών ενώσεων παρατηρείται σε χαμηλές περιοχές του υπεριώδους (200-280 nm), όπου απορροφά η πλειοψηφία των οργανικών διαλυτών, πολλές φορές παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου (Παπαδογιάνης Ι.,2001).

Η ανίχνευση στο υπεριώδες παρουσιάζει κάποια προβλήματα όπως:

- το γεγονός ότι τα φάσματα στο UV δεν χαρακτηρίζονται από κορυφές, με αποτέλεσμα να δίνουν περιορισμένες πληροφορίες
- η μεταβολή του φάσματος με μεταβολές της κινητής φάσης

- το γεγονός ότι το φάσμα της αναλυόμενης ένωσης πολλές φορές επικαλύπτεται από το φάσμα παρεμποδιζουσών ουσιών (Παπαδογιάνης, 2001).

#### **2.5.2.2 SLS (static light scattering) ανιχνευτής**

Η στατική σκέδαση φωτός (SLS) είναι μια οπτική τεχνική που μετρά την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός σε εξάρτηση με την γωνία σκέδασης για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την πηγή σκέδασης. Το εύρος της γωνίας σκέδασης είναι συνήθως από 30° έως 150°. Μία τυπική εφαρμογή είναι ο προσδιορισμός του μέσου όρου του βάρους από το  $M_w$  ενός μακρομορίου, όπως από ένα πολυμερές ή μία πρωτεΐνη. Η μέτρηση της έντασης της σκέδασης σε διαφορετικές γωνίες επιτρέπει τον υπολογισμό της μέσης τετραγωνικής ρίζας της ακτίνας, που ονομάζεται επίσης ακτίνα περιστροφής  $R_g$ . Μετρώντας την ένταση της σκέδασης ενός μακρομορίου σε διάφορες συγκεντρώσεις αυτή μπορεί να υπολογιστεί (Skoog et al., 2005).

Για τα πειράματα της στατικής σκέδασης φωτός χρησιμοποιείται ένα υψηλής έντασης μονοχρωματικό φως, συνήθως ένα λέιζερ, κατευθύνεται προς την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί, εδώ το σκεδαζόμενο φως διαθλάται σε αρκετά σημεία. Ένας ή πολλοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της έντασης της σκέδασης σε μια ή πολλές γωνίες. Η γωνιακή εξάρτηση καλείται να λάβει ακριβείς μετρήσεις τόσο για την μοριακή μάζα όσο και για το μέγεθος των μακρομορίων του δείγματος (Skoog et al., 2005).

### **3. Σκοπός της πτυχιακής**

Σκοπός της εργασίας είναι :

- ❖ Η μελέτη της λήψης προκαταρκτικών αποτελεσμάτων σχετικά με την ικανότητα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους να ενεργεί ως ανιχνευτής σε ένα εργαστηριακό μοντέλο πέψης των πραγματικών τροφών. Το ψωμί έχει επιλεγεί ως τροφή, καθώς είναι ένα τρόφιμο το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά τη σύνθεση και τις ιδιότητες του λόγω της ευρείας διαθεσιμότητας και της κατανάλωσής του.

### **4. Υλικά και μέθοδοι**

#### **4.1.1 Υλικά**

Υπερκάθαρο νερό παράγεται από την ELGA Purelab Flex apparatus (Veolia Water Technologies, High Wycombe, United Kingdom). Υδροχλωρικό οξύ (37% AR grade) και υδροξείδιο του νατρίου αγοράστηκαν από την Carlo Erba (Rodano, Italy). Μυξίνη, από στομάχι χοίρου (Type II, δεσμευμένο σιαλικό οξύ 0.5–1.5%) αγοράστηκε από την Sigma–Aldrich (St Louis, MO). Tris (υδροξιλίου – αμινομεθάνιο) (“Trizma”) αγοράστηκε από την Merck (Darmstadt, Germany), αζίδιο του νατρίου (99%) αγοράστηκε από την Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Το χλωριούχο νάτριο το φωσφορικό μονονάτριο, το θειοκυανιούχο κάλιο, το χλωριούχο ασβέστιο, η ουρία (urea), το χλωριούχο αμμώνιο και η γλυκόζη (D glucose) αγοράστηκαν από την Merck (Darmstadt, Germany). Όξινο θειικό νάτριο αγοράστηκε από την Sigma – Aldrich (Schnelldorf , Germany). Το γλυκουρονικό οξύ αγοράστηκε από την Alfa Aesar (Karlsruhe ,Germany). Το χλωριούχο μαγνήσιο αγοράστηκε από την Fluka (Buchs,Switzerland). Το ταυροχολικό οξύ αγοράστηκε από την Sigma – Aldrich (Buchs, Switzerland).

#### **4.1.2 Όργανα**

- TA-XT αναλυτής υφής – προσομοίωση της μάσησης
- Stomacher προσομοίωση του ανθρώπινου στομάχου
- SEC χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους

#### **4.1.3 Μεταχείριση δειγμάτων**

##### **4.1.3.1 Παρασκευή ψωμιού**

Η βασική συνταγή για την παραγωγή ψωμιού αποτελείται από αλεύρι σίτου, αλάτι και φρέσκια μαγιά σε σταθερές ποσότητες. Το νερό σε κάθε σκεύασμα ήταν το 58% με βάση το αλεύρι σίτου. Τα δείγματα της ζύμης παρασκευάστηκαν σε ένα δοχείο αναμειγνύοντας όλα τα συστατικά για 10 λεπτά. Μετά το ζύμωμα το ζυμάρι αφήνεται για 30 λεπτά στους 32 °C σε σχετική υγρασία 60-70%. Στην συνέχεια το ζυμάρι ζυμώνεται με τα χέρια και μορφοποιείται σε φραντζολάκια στους 32 °C για άλλα 45 λεπτά σε σχετική υγρασία 60-70% και στη συνέχεια ψήνεται στους 220 °C για 40 λεπτά. Όλα τα ψωμιά αφήθηκαν να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τις περαιτέρω δοκιμές. Αφού ψύχθηκαν τα ψωμιά σφραγίστηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου και αποθηκεύθηκαν στους - 18 °C.

##### **4.1.3.2 Παρασκευή γαστρεντερικού μοντέλου**

Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε νατραζίδιο 10 mM και Tris 25 Mm σε pH= 7, όπου η ρύθμιση του pH έγινε με διάλυμα HCL 0.1 M.

Η προσομοίωση του εργαστηριακού γαστρεντερικού μοντέλου βασίστηκε σε προγενέστερα καθιερωμένα πρωτόκολλα. Για την παρασκευή του στοματικού υγρού (simulated oral fluid, SOF), του στομαχικού υγρού (simulated gastric fluid, SGF) και των υγρών του λεπτού εντέρου (simulated intestine juice, SIJ), δηλαδή

της χολής (simulated bile fluid) και του δωδεκαδάκτυλου (simulated duodenal fluid), χρησιμοποιήθηκαν τα χημικά αντιδραστήρια που βρίσκονται στον πίνακα 1 (Hur et al., 2009, Rousi et al., 2014).

**Πίνακας 1 : Σύνθεση του στοματικού υγρού , στομαχικού υγρού και των υγρών του λεπτού εντέρου (Hur et al., 2009, Rousi et al., 2014).**

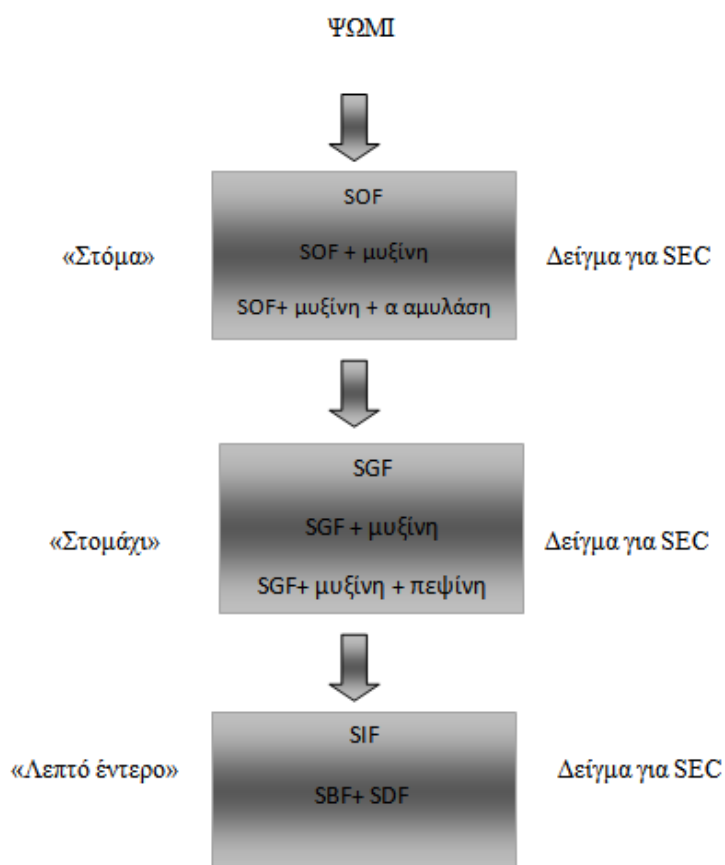
“Σάλιο” Simulated oral fluid (SOF)	“Στομαχικό υγρό” Simulated gastric fluid (SGF)	“Υγρά του δωδεκαδάκτυλου” Simulated duodenal fluid (SDF)	“Χολικά οξέα” Simulated bile fluid (SBF)
10 mL KCl 89.6 g L <sup>-1</sup> 10mL KSCN 20 g L <sup>-1</sup> 10mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88.8 g L <sup>-1</sup> 10mL NaSO <sub>4</sub> 57 g L <sup>-1</sup> 1.7mL NaCl 175.3 g L <sup>-1</sup> 8mL urea 25 g L <sup>-1</sup> 0.1 g L <sup>-1</sup> αμυλάση (όπου προστίθεται) 0.2 1.2 g L <sup>-1</sup> μυξίνη (όπου προστίθεται)	15.7 mL NaCl 175.3 g L <sup>-1</sup> 3.0 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88.8 g L <sup>-1</sup> 9.2 mL KCl 89.6 g L <sup>-1</sup> 18.0 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22.2 g L <sup>-1</sup> 10.0 mL NH <sub>4</sub> Cl 30.6 g L <sup>-1</sup> 3.4 mL urea 25 g L <sup>-1</sup>  10.0 mL γλυκόζη 65 g L <sup>-1</sup> 10.0 ml γλυκουρονικό οξύ 2 g L <sup>-1</sup> 0.3 3 g L <sup>-1</sup> μυξίνη (όπου προστίθεται) 0.4 2 g L <sup>-1</sup> πεψίνη (όπου προστίθεται)	40 ml NaCl 175.3 g L <sup>-1</sup> 40 ml NaHCO <sub>3</sub> 84.7 g L <sup>-1</sup> 10 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g L <sup>-1</sup> 6.3 ml KCl 89.6 g L <sup>-1</sup> 10 ml MgCl <sub>2</sub> 5 g L <sup>-1</sup> 180 μl HCl 37% 4 ml urea 25 g L <sup>-1</sup>  9 ml CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22.2 g L <sup>-1</sup>	30 ml NaCl 175.3 g L <sup>-1</sup> 68.3 ml NaHCO <sub>3</sub> 84.7 g L <sup>-1</sup> 4.2 ml KCl 89.6 g L <sup>-1</sup> 150 μl HCl 37% 10 ml urea 25 g L <sup>-1</sup> 10 ml CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22.2 g L <sup>-1</sup>  30 g L <sup>-1</sup> ταυροχολικό οξύ

Οι τιμές pH του στόματος, του στομάχου και των υγρών του λεπτού παρουσιάζουν διακυμάνσεις, σε αυτή την περίπτωση έχουν επιλεγεί αντιπροσωπευτικές τιμές. Το pH του ανθρώπινου στομάχου μπορεί να κυμανθεί μεταξύ ενός εύρους τιμών (1-3) και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η διατομική διακύμανση ή αν βρίσκεται σε κατάσταση πείνας ο οργανισμός (Lindahl et al., 1997, Gardner et al., 2006). Στην παρούσα εργασία, η τιμή του pH στο στομάχι είναι 3 (SGF).

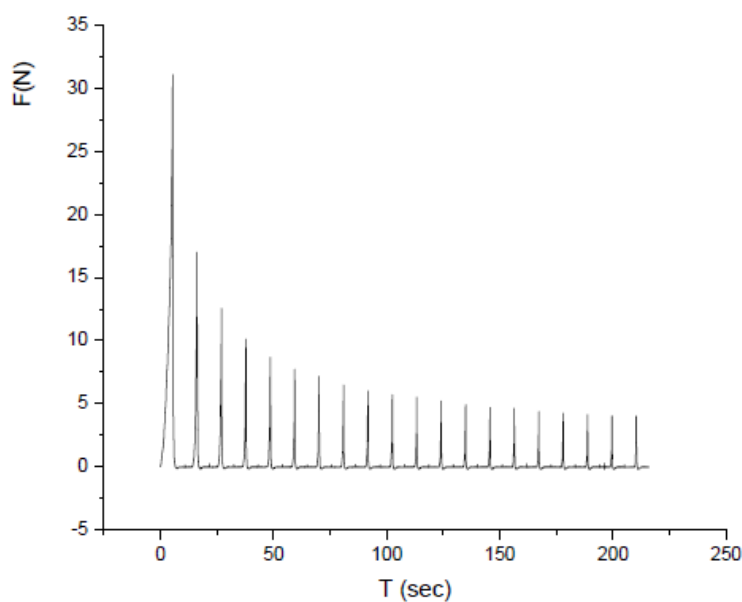
Παρακάτω το Σχήμα 1 δείχνει ένα διάγραμμα το οποίο απεικονίζει την συνολική διαδικασία που ακολουθείται για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας: όπου σε 5 g ψωμιού προστίθενται 20 mL διαλύματος SOF, και συμπιέζεται τόσο ώστε η παραμόρφωση του να είναι στο 90% με ρυθμό 1Hz για είκοσι φορές. Για αυτή την διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ένας TA-XT αναλυτής υφής (Stable Microsystems, Godalming, UK) (Σχήμα 2). Στη συνέχεια η «μασημένη» τροφή μεταφέρεται αμέσως σε μια πλαστική σακούλα μαζί με 50



ml SGF, και υποβάλλεται σε κατεργασία συμπίεσης στο stomacher (Stomacher 400, Seward, Worthing, UK) για 30 λεπτά. Το προκύπτον μίγμα στη συνέχεια μεταφέρεται σε ένα ποτήρι, όπου προστέθηκαν 20ml SDF και 20 ml SBF, και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση για 20 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία. Από τα τρία στάδια ελήφθησαν δείγματα (1<sup>ο</sup> Texture Analyzer για το στόμα, 2<sup>ο</sup> Stomacher για το στομάχι και 3<sup>ο</sup> ποτήρι ζέσεως για το λεπτό έντερο). Τα δείγματα αμέσως διηθήθηκαν χρησιμοποιώντας φίλτρο σύριγγας με πόρο 1 μm, και εγχύθηκαν εντός της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC).



Σχήμα 1 : Περιγραφή της πειραματικής διάταξης.



Σχήμα 2 : Διάγραμμα τάσης - χρόνου για την διαδικασία της τεχνητής μάσησης.

#### 4.1.3.3 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC):

Τα δείγματα εκλούσθηκαν με υπερκαθαρό νερό που περιέχει 0.1% αζίδιο του νατρίου σε ρυθμό ροής  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ . Το σύστημα SEC αποτελείται από (i) ένα SpectraSystem SCM 1000 : απαερωτής (Thermo Separation Products, San Jose, CA) (ii) ένα SpectraSystem P2000: αντλία χρωματογραφίας (Thermo Separation Products, San Jose, CA) (iii) από μια στήλη με  $2 \mu\text{m}$  πορώδες (Idex, Oak Harbor, Ουάσιγκτον), μια προστήλη GPC/SEC PL-Aquagel-OH  $50 \times 7.5 \text{ mm}$  ( $8 \mu\text{m}$ ) (Varian Inc, Palo Alto, CA), (iv) δύο παράλληλες στήλες GPC/SEC PL-Aquagel-OH  $300 \times 7,5 \text{ mm}$  (Varian Inc, Palo Alto, CA), όλες οι στήλες περιβάλλονται από ένα φούρνο στήλης Model 605 (Scientific Systems Incorporated, State College, PA) με θερμοστάτη στους  $30^\circ\text{C}$  (v) ένα UV ανιχνευτή ρυθμισμένο στα  $280 \text{ nm}$  και (vi) ένα BI-MwA πολυγωνικό ανιχνευτή σκέδασης φωτός με λέιζερ (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY). Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας ένα ειδικό πακέτο λογισμικού το ParSEC (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY).

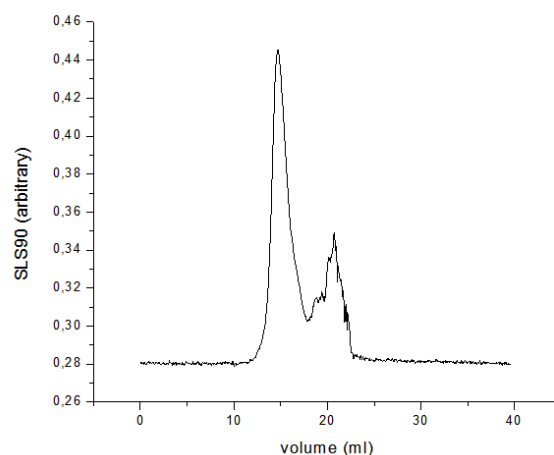
## 5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Προκειμένου να ληφθούν κάποια στοιχεία επί της σχετικής συνεισφοράς της μυξίνης, της α-αμυλάσης και της πεψίνης, δημιουργήθηκαν τέσσερα πειράματα. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού ο γαστρεντερικός σωλήνας γίνεται πιο πολύπλοκος προσθέτοντας κάθε φορά ένα επιπλέον συστατικό. Το πρώτο πείραμα στηρίχθηκε στην προσομοίωση των ρευστών σύμφωνα με τον πίνακα 1 (χωρίς την προσθήκη μυξίνης, α-αμυλάσης, ή πεψίνης, είναι το πείραμα E1). Στο επόμενο πείραμα (E2), έχει γίνει προσθήκη μυξίνης στο SOF και στο SGF (Πίνακας 1). Η τρίτη πειραματική διαδικασία (E3) περιείχε μυξίνη και α-αμυλάση στο SOF και μυξίνη στο SGF. Στο τελευταίο πείραμα (E4) έχει γίνει προσθήκη α-αμυλάσης και μυξίνης στο SOF ενώ στο SGF προστίθεται πεψίνη και μυξίνη. Το Σχήμα 1 δείχνει μια σχηματική απεικόνιση της συνολικής πειραματικής διάταξης. Ωστόσο ένα πραγματικό γαστρεντερικό σύστημα περιλαμβάνει πολύ περισσότερα στοιχεία. Στην παρούσα εργασία έχει γίνει μια προσέγγιση για να αναδεχθεί η δράση των πιο σημαντικών συστατικών του γαστρεντερικού σωλήνα. Μια πιο ρεαλιστική προσέγγιση που να περιέχει περισσότερα συστατικά του γαστρεντερικού συστήματος, είναι να συνεχιστεί στο άμεσο μέλλον, αλλά αφού οι σχετικές συνεισφορές των συστατικών του παρόντος συστήματος γίνουν κατανοητές ως προς την αρχή τους.

		μυξίνη	α αμυλάση	πεψίνη
E1	SOF	-	-	-
	SGF	-	-	-
	SIF	-	-	-
E2	SOF	+	-	-
	SGF	+	-	-
	SIF	-	-	-
E3	SOF	+	+	-
	SGF	+	-	-
	SIF	-	-	-
E4	SOF	+	+	-
	SGF	+	-	+
	SIF	-	-	-

Πίνακας 2: Διάταξη πειραματικών δεδομένων

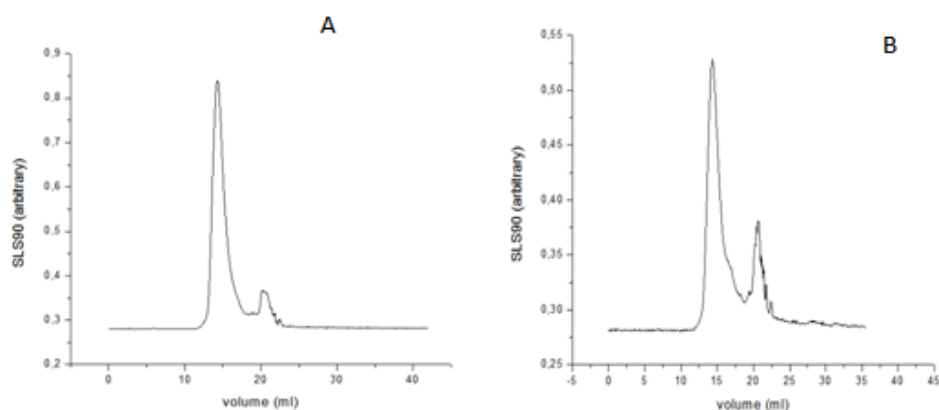
## 5.1 Απλή προσομοίωση του γαστρεντερικού μοντέλου



**Σχήμα 3:** Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή SLS (static light scattering – στατική σκέδαση φωτός) στις 90° για το ψωμί που λαμβάνεται μετά το στάδιο της μάσησης (SOF)

Στο Σχήμα 3 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC), τα οποία συλλέγονται από έναν ανιχνευτή MALLS στις 90° και αφορούν το πείραμα E1 (δεν υπάρχει προσθήκη ένζυμων η μυξίνης). Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να υπενθυμιστεί ότι (i) στη SEC τα μεγαλύτερα μόρια εκλύονται πρώτα (ii) και ο όγκος έκλυσης του διαλύτη μπορεί να μεταφραστεί απευθείας σε χρόνο, δεδομένου ότι αυτό γίνεται με σταθερή ροή. Στο πρώτο στάδιο (SOF, "στόμα"), παρατηρείται ότι στα 15 mL εκλύεται ένας πληθυσμός από μεγάλα πολυμερή και ακολουθεί μια σειρά μικρότερων μοριακών πληθυσμών από τα 18 mL έως τα 22 mL. Για να εκτιμηθεί το μέγεθος των πληθυσμών που εκλύονται πρέπει να γίνει σύγκριση μεταξύ των κορυφών των όγκων έκλυσης των πρότυπων καμπύλων της δεξτράνης με αυτές του πειράματος (Gaborieau et al, 2011). Στην περίπτωση αυτή, οι χρόνοι έκλυσης στα 15 ml αντιστοιχούν στον χρόνο έκλυσης της γραμμικής δεξτράνης MW > 1,6 MDa. Επιπρόσθετα παρατηρείται μια μικρή απορρόφηση στα 280 nm για τα κατώτερα τμήματα της κορυφής των 15 mL (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται). Ο ανιχνευτής UV που λειτουργεί στα 280 nm χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, λόγω του γεγονότος ότι η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη, και σε μικρότερο βαθμό η φαινυλανανίνη καθώς και οι δισουλφιδικοί δεσμοί προσροφούν σε αυτό το μήκος κύματος (Aitken et al.,

2009). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η κορυφή στα 15 ml οφείλεται στην παρουσία του αμύλου, και σε μικρότερο βαθμό στην γλουτένη, που πιθανόν να έχουν μεταφερθεί από την στερεή (ψωμί) στην υδατική φάση («σάλιο») κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της τεχνητής μάσησης.

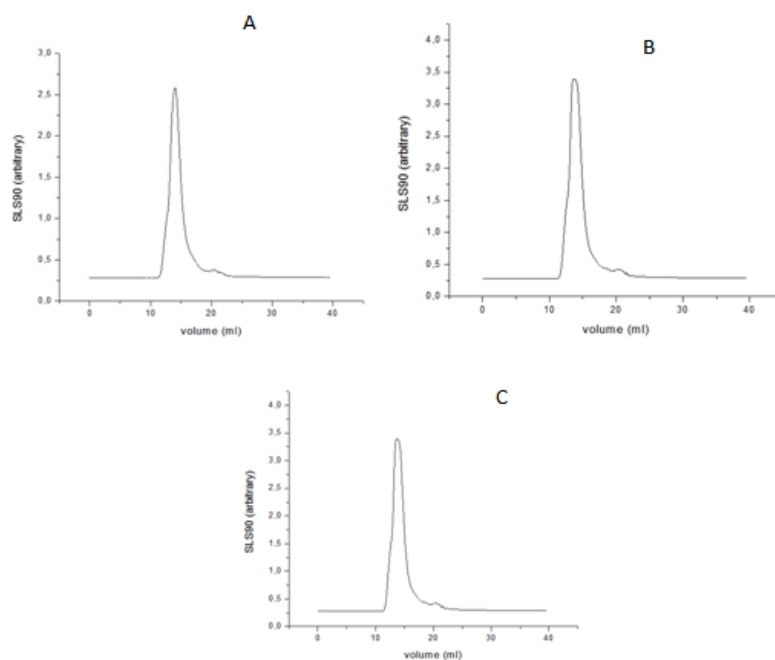


**Σχήμα 4:** Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή SLS (static light scattering – στατική σκέδαση φωτός) στις 90° για το ψωμί που λαμβάνεται μετά το στάδιο της επεξεργασίας στο «στομάχι» 4a, (SGF) και μετά το στάδιο επεξεργασίας στο λεπτό έντερο 4b, (SIF).

Στο Σχήμα 4a φαίνεται το χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγέθους του ίδιου δείγματος μετά τη μεταφορά του από το «στόμα» στο «στομάχι» (SGF). Τα χρωματογραφικά προφίλ ουσιαστικά είναι ίδια όσον αφορά τη μεγαλύτερη κορυφή. Η καταμέτρηση φωτονίων στις 90° αυξάνεται, παρά την αραίωση του δείγματος. Αυτό πιθανόν αποδίδεται στην αυξημένη μεταφορά των μακρομορίων από τον όγκο του ψωμιού στην υδατική φάση (SGF). Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν υπάρχει μετατόπιση προς μεγαλύτερους όγκους - χρόνους έκλουσης, υποδεικνύοντας ότι δεν αφορά μικρότερους μακρομοριακούς πληθυσμούς που δημιουργήθηκαν με την όξινη υδρόλυση του αμύλου κατά τη διάρκεια των 30 λεπτών, δηλαδή όσο κρατάει η διαδικασία στο τεχνητό στομάχι. Το Σχήμα 4b δείχνει τα δεδομένα μετά τη μεταφορά του δείγματος και την έγχυση των υγρών του λεπτού έντερου (SIF). Μετά από 30 λεπτά που διαρκεί το τρίτο στάδιο το προφίλ του χρωματογραφήματος είναι ουσιαστικά το ίδιο, με την πιθανή εξαίρεση μιας μικρής κορυφής στα 16,5 mL. Καθώς η απορρόφηση στα

280 nm δεν φαίνεται να είναι σημαντική (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται), η κορυφή θα πρέπει να αποδοθεί στα προϊόντα της περιορισμένης υδρόλυσης του αμύλου.

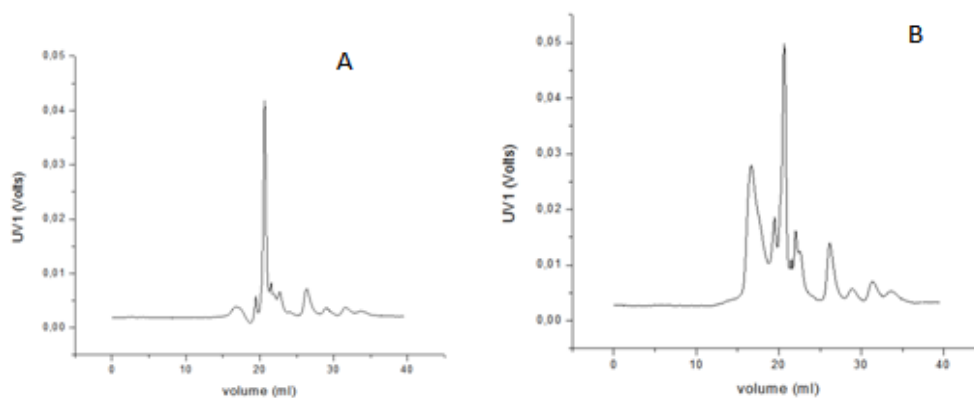
## 5.2 Επίδραση της μυζίνης στο γαστρεντερικό μοντέλο



**Σχήμα 5 :** Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή SLS (static light scattering – στατική σκέδαση φωτός) στις 90° για το ψωμί που λαμβάνεται μετά το στάδιο της επεξεργασίας (a) στο στόμα προσθέτοντας μυζίνη (SOF) (b) στο στομάχι προσθέτοντας μυζίνη (SGF) και (c) στο λεπτό έντερο (SIJ).

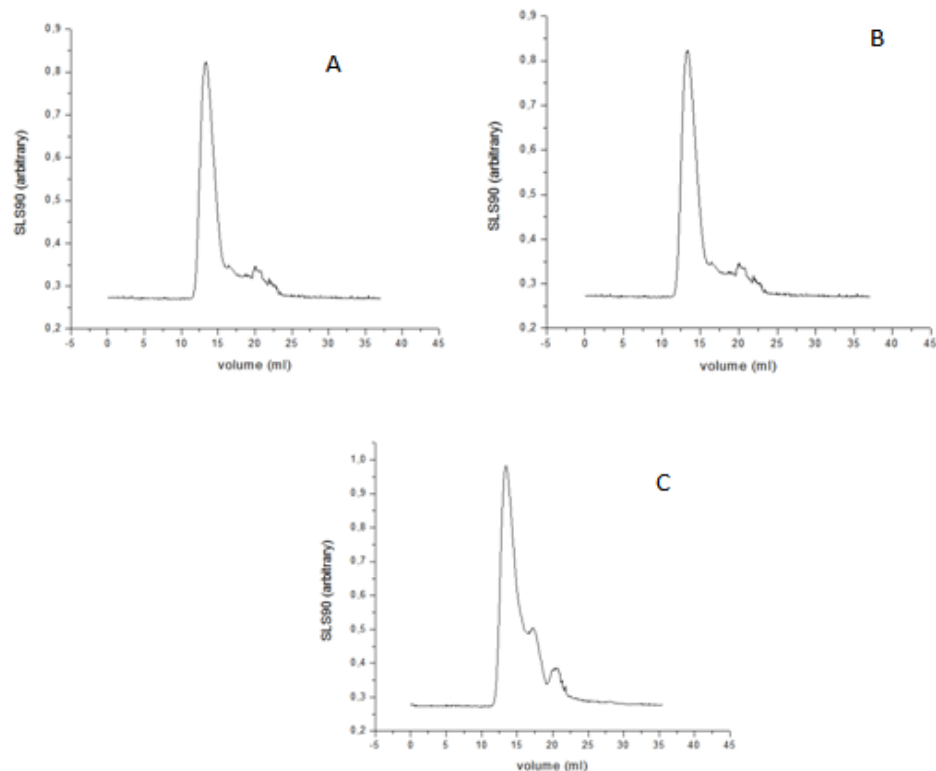
Στο Σχήμα 5 φαίνονται τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από το πείραμα E2. Είναι παρόμοια με αυτά του πειράματος E1 όμως αυτή τη φορά προστίθεται η μυζίνη στο SOF και στο SGF. Στο Σχήμα 5a παραθέτονται τα δεδομένα που επίσης συλλέγονται από έναν ανιχνευτή MALLS στις 90° μετά το τέλος του πρώτου σταδίου δηλαδή το «στόμα». Μια εξέχουσα κορυφή παρατηρείται στα 15mL, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτές που συλλέγονται από το E1. Η κορυφή αυτή παραμένει σχεδόν αμετάβλητη σε όλη σχεδόν την πορεία της πειραματικής διαδικασίας (Σχήματα 5b και 5c). Με το Σχήμα 6 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται με τη χρήση του ανιχνευτή UV (280 nm) των δύο παραπάνω πειραμάτων (E1 και E2), μετά το

στάδιο της μάσησης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μόνο μια μικρή κορυφή διακρίνεται που αντιστοιχεί στο τέλος της κορυφής MALLS (Σχήμα 6a) αυτό ταυτοποιείται ως διαλυμένη πρωτεΐνη της γλουτένης. Μια επιφανής κορυφή στα 15-16 mL του σχήματος 6b μπορεί να αποδοθεί στην μυξίνη που υπάρχει σε αυτό το δείγμα E2.



**Σχήμα 6:** Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή UV (υπεριώδες) στα 280 nm για το ψωμί στο «στόμα» a) απουσία μυξίνης (SOF) b) και στο παρουσία μυξίνης.

### 5.3 Επίδραση της μυξίνης και της $\alpha$ -αμυλάσης στο γαστρεντερικό μοντέλο



Σχήμα 7: Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή SLS (static light scattering – στατική σκέδαση φωτός) στις 90° για το ψωμί που λαμβάνεται μετά το στάδιο της επεξεργασίας (a) στο στόμα προσθέτοντας μυξίνη και  $\alpha$  αμυλάσης (SOF) (b) στο στομάχι προσθέτοντας μυξίνη (SGF) και (c) στο λεπτό έντερο (SIJ).

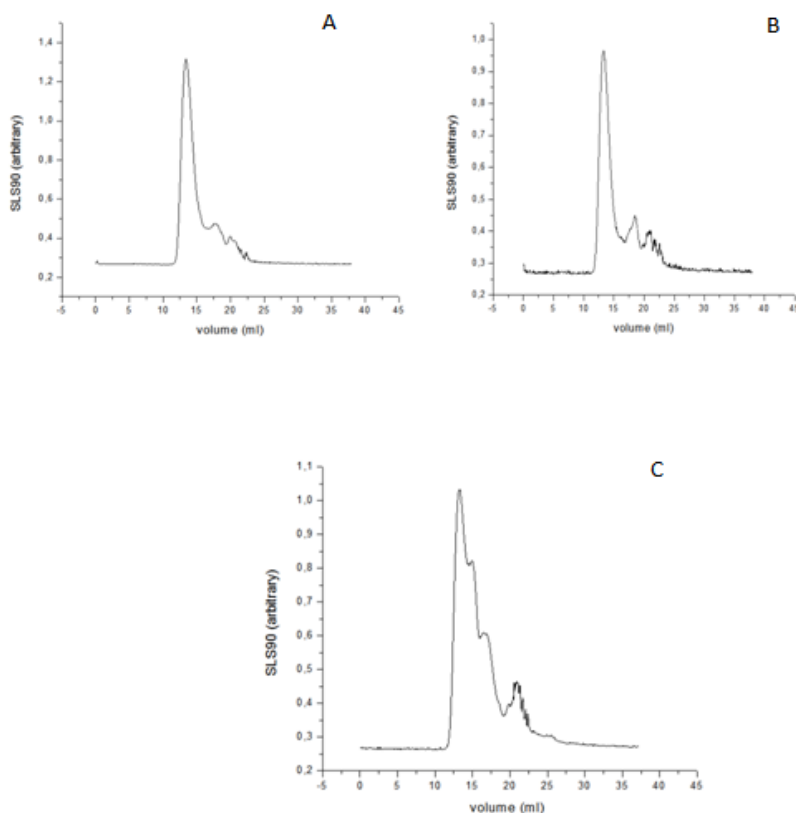
Για το πείραμα E3 τα χρωματογραφήματα φαίνονται στο Σχήμα 7, που στο SOF συμπεριλαμβάνεται η μυξίνη αλλά και η  $\alpha$ -αμυλάση. Σε αντίθεση με την μυξίνη, τα ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, οπότε δεν μπορούν να ανιχνευθούν στην παρούσα πειραματική διάταξη. Το Σχήμα 7a αφορά τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά την διαδικασία της μάζησης. Η κορυφή στα 15 ml είναι πάλι εμφανής, αν και αυτή τη φορά υπάρχει και μια σαφής κορυφή στα 16-17 mL. Αυτή η κορυφή αποδίδεται στα υδρολυμένα μακρομόρια λόγω της παρουσίας της  $\alpha$ -αμυλάσης. Οι κορυφές παραμένουν αμετάβλητες μετά από 30 λεπτά επεξεργασίας σε χαμηλό pH στο στομάχι (SGF, Σχήμα 7b). Ενώ η  $\alpha$ -αμυλάση και το άμυλο συνυπάρχουν για 30 λεπτά, οι ήδη υπάρχοντες πληθυσμοί από τα πολυμερή δεν φαίνεται να αναπτύσσονται. Στα αποτελέσματα από την μεταχείριση του τρίτου σταδίου



αυτής της πειραματικής διαδικασίας (SIF, Σχήμα 7c) εμφανίζεται μια σημαντική κορυφή στα 16 ml. Αυτό αντιστοιχεί στην αισθητή αύξηση της συγκέντρωσης ενός σημαντικού πληθυσμού μακρομορίων μικρότερου μεγέθους από τα αρχικά πολυμερή αμύλου. Αυτό το επαναλαμβανόμενο πρότυπο δεν παρατηρήθηκε στο τρίτο στάδιο (Σχήματα 4b, 5c) για τις πειραματικές διαδικασίες E1 και E2 όπου δεν υπάρχει η προσθήκη της  $\alpha$ -αμυλάσης στο τεχνητό σάλιο.

Θεωρώντας ότι η μόνη διαφορά μεταξύ αυτού του πειράματος και του E2 είναι η προσθήκη της  $\alpha$ -αμυλάσης στο SOF, γίνεται αντιληπτό πως η  $\alpha$ -αμυλάση μεταφέρεται μαζί με την τροφή μέσω της γαστρεντερικής οδού, υδρολύοντας το άμυλο στο λεπτό έντερο. Έτσι αναπτύσσεται μια συνολική εικόνα για την περιορισμένη υδρόλυση των μακρομορίων του αμύλου με την  $\alpha$ -αμυλάση στο στάδιο της «μάσησης» προφανώς λόγω του μικρού χρόνου διάρκειας του σταδίου. Στην συνέχεια όπως έχει αναφερθεί η τροφή μεταφέρεται στο «στομάχι» (SGF) και για 30 λεπτά, με την όποια διαδικασία να λαμβάνει χώρα σε αυτό το στάδιο να σταματάει και να συνεχίζει το καινούργιο μίγμα την μεταφορά του προς το λεπτό έντερο. Εκεί επανεμφανίζεται η ενζυμική δραστηριότητα με το άμυλο να υδρολύεται σε μικρότερους μοριακούς πληθυσμούς, όπου και καταγράφεται με μια ευδιάκριτη κορυφή. Είναι ευρέως αποδεκτό (Nielsen et al., 2001, Tizon et al., 2012) ότι η  $\alpha$ -αμυλάση χάνει ένα σημαντικό μέρος της δραστηριότητάς της σε τιμές pH μεταξύ 3 και 4. Αυτό σημαίνει ότι μια αναστρέψιμη αδρανοποίηση του ενζύμου αυτού θα μπορούσε να συμβεί στο χαμηλό pH του προσομοιωμένου γαστρικού υγρού, με την ενεργοποίηση της δραστηριότητάς του να εμφανίζεται πάλι στο τεχνητό περιβάλλον του λεπτού εντέρου (Γαλανοπούλου.N., 2007). Η εξάρτηση του pH με αναστρέψιμα σύμπλοκα έχει αναφερθεί για ένα *in vitro* γαστρεντερικό περιβάλλον (Ritzoulis et al., 2012). Παρά το γεγονός ότι η παρούσα εργασία είναι ένα απλοποιημένο πρότυπο σύστημα, θα μπορούσε να επιστήσει την προσοχή μας η δυνατότητα ότι τα ένζυμα του στόματος παίζουν κάποιο βιολογικό ρόλο ακόμη και σε μεταγενέστερα στάδια της επεξεργασίας των τροφών στη γαστρεντερική οδό.

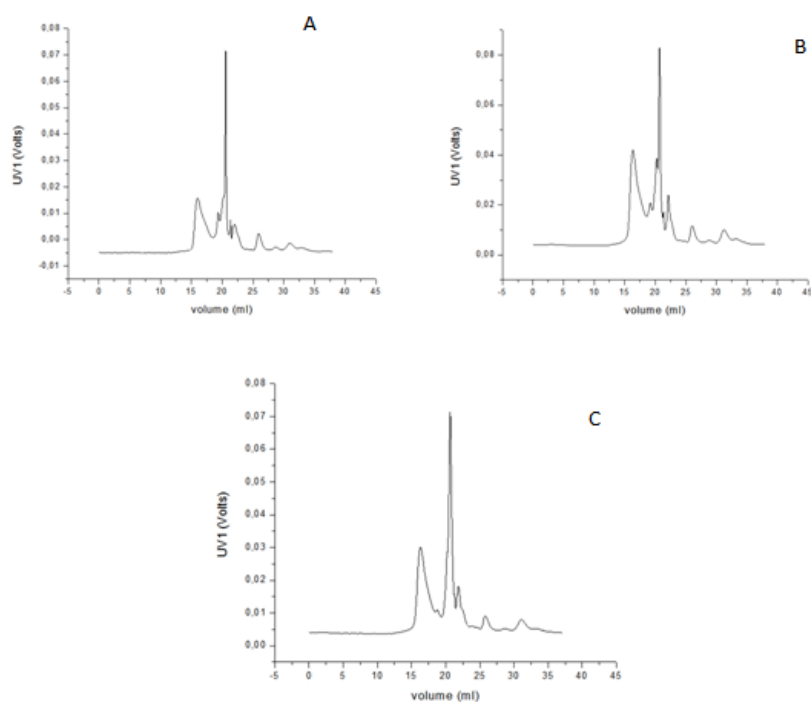
#### 5.4 Επίδρασή της μυξίνης, της α-αμυλάσης και της πεψίνης στο γαστρεντερικό μοντέλο.



**Σχήμα 8:** Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή SLS (static light scattering – στατική σκέδαση φωτός) στις 90° για το ψωμί που λαμβάνεται μετά το στάδιο της επεξεργασίας (a) στο στόμα προσθέτοντας μυξίνη και α αμυλάσης (SOF) (b) στο στομάχι προσθέτοντας μυξίνη και πεψίνη (SGF) και (c) στο λεπτό έντερο (SIJ).

Στο τέταρτο πείραμα (E4), έχει προστεθεί πεψίνη στο δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας (SGF). Στην προκειμένη περίπτωση, υπάρχουν σημαντικές αλλαγές μετά το στάδιο της επεξεργασίας στο «στομάχι». Η πεψίνη οδηγεί στην εμφάνιση μιας κορυφής στα 17-18 ml (Σχήμα 8b) η οποία αυξάνεται στο περιβάλλον του λεπτού εντέρου (Σχήμα 8c). Η αρχική κορυφή μπορεί να αποδοθεί στα διαλυμένα μόρια του αμύλου, ενώ η δεύτερη κορυφή στα 17 ml θα μπορούσε να αποδοθεί στη μυξίνη, η οποία δεν εμπλέκεται στην κορυφή του αμύλου αφού στην συνέχεια μειώνεται και η μείωση της οφείλεται στην αποσύνθεσή της, τέλος μια τρίτη φαίνεται στα 17-18 mL. Η εμφάνιση της τρίτης κορυφής στα 17-18 ml γίνεται εμφανής και στο UV κατά την σύγκριση των δεδομένων (Σχήμα 9b και 9c) υποδεικνύοντας την αύξηση της συγκέντρωσης

ενός πρωτεϊνικού πληθυσμού στο γαστρικό υγρό. Αυτή η κορυφή αποδίδεται στην παρουσία της πεψίνης, όπως είναι γνωστό η πεψίνη ενεργοποιείται μόνο σε χαμηλές τιμές pH και παραμένει ανενεργή σε ουδέτερο pH ( Piper et al., 1965). Αυτό συμβαδίζει με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ή των πρωτεϊνικών προϊόντων μετά από τη διαμονή της τροφής στο «στομάχι» (SGF). Η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης μετά την παραμονή στο «λεπτό έντερο» (SIF) (Σχήμα 8c) θα πρέπει να αποδοθεί στο σπάσιμο της δομής της γλουτένης κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης στο στομάχι. Αυτή η διαδικασία αναμένεται να διευκολύνει τη μεταφορά του πρωτεϊνικού υλικού στην υδατική φάση, όπως συμβαίνει και στο λεπτό έντερο.



**Σχήμα 9 :** Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή UV (υπεριώδες) στα 280 nm για το ψωμί (a) στο στόμα προσθέτοντας μυζήνη και α αμυλάσης (SOF) (b) στο στομάχι προσθέτοντας μυζήνη και πεψίνη (SGF) και (c) στο λεπτό έντερο (SIF).

Η εργασία αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση της σύζευξης ενός εργαστηριακού συστήματος πέψης που χρησιμοποιείται η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, ως ανιχνευτής για τη μελέτη της μεταφοράς μακρομοριακών μαζών από στερεές τροφές στο υδατικό περιβάλλον της γαστρεντερικής οδού. Υπό αυτή την ιδιότητα η SEC φαίνεται να είναι ένας αποτελεσματικός ανιχνευτής για αυτό. Ενώ η ολοκλήρωση του ενδιαφέροντος είναι η απόδειξη ότι, τουλάχιστον

στην προσομοίωση των συστημάτων, τα ένζυμα μπορούν να απενεργοποιούνται και να εκπληρώνουν το κύριο μέρος του έργου τους κατά την επανενεργοποίησή τους σε ένα διαφορετικό περιβάλλον. Μια σειρά από ερωτήματα, ως επί το πλείστον σχετίζονται με την συγκεκριμένη αναγνώριση των μεμονωμένων πληθυσμών, και την ενδεδειγμένη μελέτη από ενζυμική άποψη, όπως αν τα ένζυμα μεταφέρονται από το ένα στάδιο στο άλλο. Οι ερωτήσεις αυτές αναμένεται να σχηματίσουν ένα σημείο εστίασης για τη μελέτη νέων έργων.

## 6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους που στήθηκε για την *in vitro* μελέτη της κινητικής των μακρομορίων ψωμιού δίνει θετικά αποτελέσματα σχετικά με την επιλογή της. Και αυτό γιατί η μεταφορά του πολυμερούς από το στερεό τρόφιμο στο τεχνητό σάλιο παρακολούθηθηκε επιτυχώς για το άμυλο και σε κάποιο βαθμό και για την γλουτένη. Επίσης παρατηρείται πως η διάσπαση των μακρομορίων από το «στόμα» στο «λεπτό έντερο» βρέθηκε να είναι ελάχιστη απουσία ενζύμων. Η α-αμυλάση, όταν ενσωματώθηκε στο προσομοιωμένο περιβάλλον του στόματος, παρατηρήθηκε πως είναι ελάχιστα ενεργή λόγω του περιορισμένου χρόνου της επεξεργασίας. Ένζυμα όπως η α αμυλάση απενεργοποιούνται στο χαμηλό pH του «στομάχου» και ενεργοποιούνται ξανά στο «λεπτό έντερο» όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στην διάσπαση του αμύλου. Επισημαίνεται έτσι η δυνατότητα των ενζύμων του «στόματος» ότι μπορούν να παίζουν κάποιο βιολογικό ρόλο ακόμη και στα μεταγενέστερα στάδια της πέψης των τροφίμων στην γαστρεντερική οδό. Επιπλέον η χρήση της πεψίνης ενισχύει την μεταφορά του πρωτεϊνικού υλικού στην υδατική φάση. Όπως επίσης η πεψίνη φαίνεται να εξασθενεί τη γλουτένη στο μοντέλο του στομάχου μέχρι ένα βαθμό όπου κάνει την απελευθέρωση του πεπτιδίου να είναι αυθόρμητη κατά τη διάρκεια της παραμονής της στο «λεπτό έντερο».

Αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τα εργαστηριακά μοντέλα πέψης για την ανάλυση αλλαγών στην δομή, στην βιοδιαθεσιμότητα και στην πεπτικότητα των τροφών δείχνοντας ότι είναι χρήσιμα τόσο για την ανάλυση των τροφών όσο και των φαρμάκων. Όμως υπάρχουν αρκετές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των *in vivo* και των *in vitro* μοντέλων. Ένα άλλο εργαστηριακό μοντέλο πέψης που είχε επιτυχία στην διεξαγωγή των αποτελεσμάτων ήταν αυτό της πέψης των πρωτεϊνών του γάλακτος για την χρήση σε βρεφικές τροφές. Τα αποτελέσματα της μελέτης σχετικά με την πέψη των πρωτεϊνών του γάλακτος για την χρήση σε βρεφικά προϊόντα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες δρουν ως βιοδραστικές ουσίες και έχουν ενεργό ρόλο στο λεπτό έντερο. Επίσης

αναφέρεται πως μερικές από τις πρωτεΐνες δρουν ως πιθανές βιολογικές δραστικές ουσίες σε επίπεδο πεπτιδίων μετά την πέψη χρησιμοποιώντας πρωτεάσες. Λόγω της περιορισμένης μελέτης σχετικά με την σταθερότητα των πρωτεϊνών του γάλακτος το εργαστηριακό μοντέλο πέψης λειτουργεί θετικά στην κατανόηση της χρήσης των πρωτεϊνών. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι προσφέρει μια εικόνα σχετικά με τον μηχανισμό δράσης της πρωτεΐνης, δηλαδή αν δρα εξ ολοκλήρου η ίδια ή μέσω των πεπτιδίων της. Επιπλέον δείχνει το καλύτερο pH που γίνεται η υδρόλυση των πρωτεϊνών σε ποσοστό και μας πληροφορεί για το χρονικό διάστημα της πέψης των πρωτεϊνών. Τέλος η εργασία των Chatterto et al, δείχνει ότι τα αποτελέσματα του εργαστηριακού μοντέλου πέψης είναι όμοια με αυτά την in vivo πέψης. Από την άλλη υπάρχουν και μελέτες όπου τα εργαστηριακά μοντέλα πέψης δεν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Μια τέτοια μελέτη αφορά την σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την διάρκεια της πέψης όπου τα αποτελέσματα έδειξαν περιορισμένες αλλαγές στην μικροδομή των λιπιδίων. Το μοντέλο πέψης που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία ήταν αρκετά πολύπλοκο, παρόλα αυτά οι in vivo μελέτες δείχνουν αντίθετα αποτελέσματα. Δηλαδή υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην μικροδομή των γαλακτωμάτων ανάλογα με τον γαλακτωματοποιητή καθώς διαπερνούν την γαστρεντερική οδό.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι παρά το γεγονός όπως στην περίπτωση της συγκεκριμένης μελέτης που το μοντέλο πέψης δίνει τις απαραίτητες απαντήσεις σχετικά με την κίνηση των μακρομορίων . Ωστόσο υπάρχει η ανάγκη για περισσότερη έρευνα στην συσχέτιση των in vitro με τα in vivo μοντέλα πέψης.

## 7. Βιβλιογραφία

### Ξένη βιβλιογραφία

- Aitken A., Learmonth P. (2009) Protein determination by UV absorption in Walker J.W. (ed) *The Protein Protocols Handbook* (3<sup>rd</sup> ed) Humana Press, NY.
- Chatterton D.E.W., Rasmussen J.T., Heegaard C.W., Sorensen E.S., Petersen T.E. (2004). In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends in Food Science & Technology* 15 373–383
- Gaborieau M., & Castignolles P. (2011) Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 1413–1423.
- Gardner JD, Ciociola AA, Robinson M (2002) Measurement of meal-stimulated gastric acid secretion by in vivo gastric autotitration. *Journal of Applied Physiology* 92:427–434.
- Hur S.J., Beong O.L., Eric A. D., McClements D.J., (2011) In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12
- Hur S.J., Decker E.A., McClements D.J., (2009) Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry* 114:253-262
- Lindahl A., Ungell A.-L., Knutson L., Lennernäs H.(1997) Characterization of Fluids from the Stomach and Proximal Jejunum in Men and Women. *Pharmaceutical Research* 14:497–502
- McClements DJ, Li Y. (2010) Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*. 1:32–59.
- Nielsen J.E., Bochart T.B., Vriend G. (2001) The determinants of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering Design and Selection* 14: 505–512.
- Piper D.W., Fenton B.H. (1965) pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*. 6 506–508.
- Ritzoulis C, Siasios S, Melikidou K.D, Koukiotis C, Vasiliadou C, Lolakos S. (2012) Interactions between pig gastric mucin and sodium caseinate in solutions and in emulsions. *Food Hydrocolloids* 29:382–388.
- Rousi Z, Ritzoulis C, Karayannakidis P.D (2014) Emulsion Flocculation and Stability in a Simple in Vitro Gastrointestinal Model. *Food Digestion*, in press, DOI: 10.1007/s13228-013-0034-4 (2014)

- Tizon R.U., Serrano Jr A.E., Traifalgar R.F. (2012) Effects of pH on amylase, cellulose and protease of the Angelwing clam, *Pholas orientalis*. *European Journal of Experimental Biology*

#### *Ελληνική βιβλιογραφία*

- Γαλανοπούλου Ν., Ζαμπετάκης Γ., Μαυρή Μ., Σιαφάκα Α.(2007). Διατροφή και Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης
- Κεφαλάς Π. (2009). Τρόφιμα από σιτηρά. Χημεία – Βιοχημεία – Τεχνολογία. Εκδόσεις Γαρταγάνης.
- Κυρανάς Ε. (2011). Λειτουργικές ιδιότητες νερού, πρωτεϊνών σακχάρων, λιπιδίων και φυσικών χρωστικών. Εκδόσεις Τζιόλα.
- Παπαδογάννης Ι., Σαμανίδου Β., (2001). Ενόργανη χημική ανάλυση. Εκδόσεις Πήγασος.
- Skoog D., Holler F., Nieman T., (2005). Αρχές ενόργανης ανάλυσης. Πέμπτη έκδοση. Έκδοσης Κωσταράκη..



