

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ
ΚΑΖΕΪΝΙΚΩΝ ΜΙΚΚΥΛΙΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

Σαράντης Αθανάσιος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018

Μελέτη της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων παρουσία ασβεστίου

Σαράντης Αθανάσιος

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης

Μελέτη της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων παρουσία ασβεστίου

Σαράντης Αθανάσιος

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
& Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα
Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141

Περίληψη

Τα καζεϊνικά μικκύλια ως μια μορφή σφαιρικών συμπλεγμάτων πολυδιασποράς αποτελούνται από πρωτεΐνες καζεΐνης και κολλωειδές φωσφορικό ασβέστιο. Τα καζεϊνικά αυτά συμπλέγματα ή αλλιώς καζεϊνικά μικκύλια διασπώνται μετά την αφαίρεση του φωσφορικού ασβεστίου, παρέχοντας ένα μίγμα μεμονωμένων πρωτεϊνών καζεΐνης που ονομάζεται καζεϊνικό νάτριο. Διαθέτοντας ως πρώτη ύλη καζεϊνικό νάτριο παρασκευάστηκαν σειρές δειγμάτων με σκοπό να μελετηθούν οι δομικές μεταβολές των σχηματιζόμενων καζεϊνικών μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου. Οι σειρές των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν επτά και διέφεραν μεταξύ τους ως προς τις συγκεντρώσεις ασβεστίου (1, 2,5, 5, 6,25, 7,5, 10 και 12,5 mM) με σταθερό pH 6,7. Επίσης ένα δείγμα συγκέντρωσης σε ασβέστιο 6,25 mM μελετήθηκε σε pH. Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η δυναμική και η στατική σκέδαση φωτός. Με τη χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός μελετήθηκε το μέγεθος των σχηματιζόμενων μικκυλίων και το Z-δυναμικό. Με την χρήση της στατικής

σκέδασης φωτός και παράλληλα με τη βοήθεια των διαγραμμάτων Zimm που επιτρέπουν την κατανόηση των αποτελεσμάτων, εξετάστηκε το μοριακό βάρος, η υδροδυναμική ακτίνα και ο A_2 virial συντελεστής. Τα αποτελέσματα έδειξαν το ρόλο που διαδραματίζει το ασβέστιο στη διαμόρφωση της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων όπου κατά την προσθήκη ασβεστίου, αρχικά το μέγεθος των μικκυλίων μειώνεται και στη συνέχεια αυξάνεται λόγω των συσσωματωμάτων που δημιουργούνται. Κατά την εξέταση των αποτελεσμάτων του Z-δυναμικού των καζεϊνικών μικκυλίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ασβεστίου, παρατηρήθηκε, μια σταθερότητα στα φορτία των καζεϊνικών μικκυλίων για το εύρος των συγκεντρώσεων 1-6,25 mM Ca και στη συνέχεια μια απότομη μείωση κατά την προσθήκη 7,5 mM ασβεστίου. Το μοριακό βάρος αντίθετα με το μέγεθος συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι τα 10 mM συγκέντρωσης ασβεστίου και αυτό οφείλεται στο ότι γίνεται μείωση των κενών χώρων μεταξύ των καζεϊνών παρουσία ασβεστίου, διότι μειώνονται οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ τους. Η γυροσκοπική ακτίνα φαίνεται να έχει μια μικρή αύξηση για τις συγκεντρώσεις 1-7,5 mM ασβεστίου, ενώ παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση της με περαιτέρω προσθήκη ασβεστίου. Ταυτόχρονη αύξηση με τη γυροσκοπική ακτίνα έχει και ο A_2 virial συντελεστής, στον οποίο παρατηρείται θετικό πρόσημο λόγω της μείωσης της σχετικής υδροφοβικότητας της επιφάνειας των καζεϊνικών μικκυλίων. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του pH ως προς τη διαμόρφωση της δομής των μικκυλίων, όπου φαίνεται να μειώνει το μέγεθος τους αλλά και το μοριακό βάρος τους.

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της Πτυχιακής εργασίας έγινε υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Καραγεωργίου, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή υποστήριξη και βοήθεια που προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας, όπως επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Ριζούλη για τις πολύτιμες συμβουλές και κίνητρα που μου έδωσε αλλά και τον κ. Φιλοθέου για τη βοήθεια του στο εργαστηριακό μέρος της πτυχιακής μου.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	7
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	8
2.1. Καζεϊνικά Μικκύλια	8
2.2. Υδροφοβες αλληλεπιδράσεις	9
2.3. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	10
2.4. Μεταβολή του μοριακού βάρους και της γυροσκοπικής ακτίνας R_G κατά την προσθήκη ασβεστίου	11
2.5. Μεταβολή του A_2 virial συντελεστή κατά την προσθήκη ασβεστίου	12
2.6. Μεταβολή της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου με παράλληλη μεταβολή pH	12
2.7. Στατική σκέδαση φωτός (SLS)	14
2.8. Zimm Plot	15
2.9. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)	16
2.10. Τεχνολογικές χρήσεις των καζεϊνικών μικκυλίων	17
3. Σκοπός της εργασίας	23
4. Υλικά και Μέθοδοι	24
4.1. Υλικά – Όργανα	24
4.1.1. Πρώτη ύλη	24
4.1.2. Αντιδραστήρια	24
4.1.3. Όργανα	24
4.2. Επεξεργασία	25
4.2.1. Προετοιμασία των πρωτεϊνικών διαλυμάτων	25
4.2.2. Μέγεθος και χαρακτηριστικά των καζεϊνικών μικκυλίων	25
4.2.3. Εκτίμηση του μοριακού βάρους των καζεϊνικών μικκυλίων και των παραμέτρων αλληλεπίδρασης σε υδατικό μέσο	26
5. Αποτελέσματα- Συζήτηση	27
5.1. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων με τη χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός	27
5.2. Μεταβολή του Z-δυναμικού κατά την προσθήκη ασβεστίου	29
5.3. Μεταβολή του μοριακού βάρους (M_w), της γυροσκοπικής ακτίνας (R_G) και του A_2 virial συντελεστή με την χρήση της στατικής σκέδασης φωτός (Zimmplot)	32
5.3.1. Σταθερό pH 6,7 για συγκεντρώσεις ασβεστίου 1 mM και 7,5 mM	32
5.3.2. Σταθερή συγκέντρωση ασβεστίου 7,5 mM και μεταβολή pH από 6,7 σε 3.	34
6. Συμπεράσματα	38
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	39
8. Βιβλιογραφία	40

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια το καζεϊνικό νάτριο και το καζεϊνικό ασβέστιο χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των άριστων και θρεπτικών τους ιδιοτήτων.

Τα προϊόντα αυτά είναι αποτέλεσμα της επαναδιαλυτοποίησης της καζεΐνης: αν γίνει με προσθήκη καυστικού νατρίου τότε το προϊόν που παραλαμβάνεται είναι καζεϊνικό νάτριο, ενώ με προσθήκη υδροξειδίου του ασβεστίου παραλαμβάνεται καζεϊνικό ασβέστιο. Και τα δύο προϊόντα χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το καζεϊνικό ασβέστιο χρησιμοποιείται κυρίως σε θρεπτικά και διαιτητικά παρασκευάσματα, αλλά και για τις γαλακτοματοποιητικές του ιδιότητες. Το τελευταίο μελετήθηκε υπό την επίδραση ασβεστίου για την σταθερότητα των γαλακτωμάτων που σχηματίζονται από καζεϊνικά άλατα (Dickinson et al., 2001).

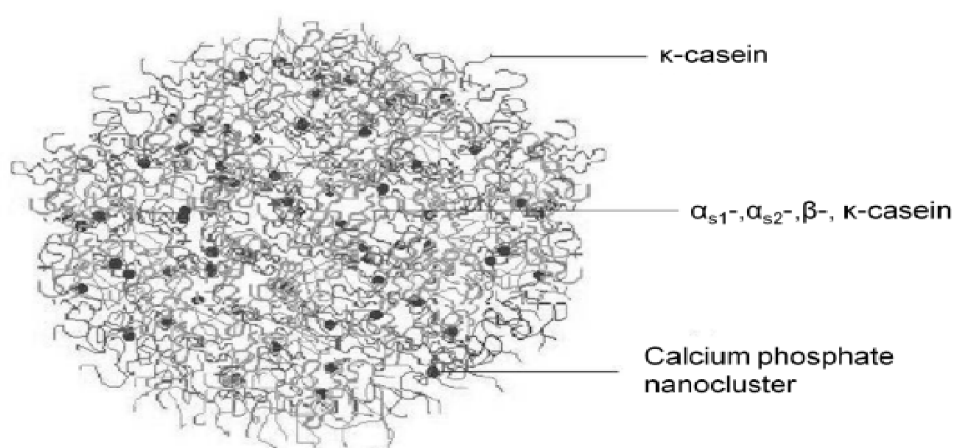
Οι καζεΐνες εμφανίζονται σε μορφή καζεϊνικών μικκυλίων ή μικρών συσσωματωμάτων. Τα καζεϊνικά μικκύλια εμφανίζονται στο γάλα σαν κολλοειδή, πολυδιάσπαρτα και σφαιρικά σωματίδια με μέση διάμετρο 200 nm. Είναι ετερογενείς, ενυδατωμένες και δυναμικές δομές με χαλαρή συσσωμάτωση και υψηλό πορώδες. Τα καζεϊνικά μικκύλια είναι μια σύνθεση από 4 διαφορετικά μόρια καζεϊνών, αs1-, αs2-, β-, και κ- καζεΐνη με μοριακή αναλογία 4:1:4:1. Αυτά τα μόρια διαφέρουν ως προς την υδροφοβικότητα, το καθαρό φορτίο, τη συγκέντρωση φωσφόρου και την ευαισθησία στο ασβέστιο. Εμφανίζονται συνδεδεμένα, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (de Kort, 2012).

Τα μικκύλια καζεΐνης (CM) είναι στην πραγματικότητα νανο-κάψουλες που δημιουργούνται από τη φύση για την παροχή θρεπτικών συστατικών, όπως ασβέστιο, φωσφορικό άλας και πρωτεΐνη. Μια νέα προσέγγιση παρουσιάζεται, για την αξιοποίηση των CM, με τη χρήση τους για τη νανο-ενθυλάκωση και τη σταθεροποίηση υδρόφοβων θρεπτικών συστατικών, ουσίες για τον εμπλουτισμό τροφίμων χωρίς λιπαρά ή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Τέτοιες νανο-κάψουλες μπορούν να ενσωματωθούν στα γαλακτοκομικά προϊόντα χωρίς τροποποίηση των αισθητικών τους ιδιοτήτων (Semo et al., 2007).

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1. Καζεϊνικά Μικκύλια

Τα καζεϊνικά μικκύλια περιέχουν περίπου 7 g ιχνοστοιχείων ανά 100 g ξηρής ουσίας, το οποία ονομάζονται κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο (CCP). Το CCP είναι κάτι περισσότερο από άμορφο φωσφορικό ασβέστιο, αφού επίσης περιέχει νάτριο, κάλιο, μαγνήσιο και κιτρικό οξύ. Η ακριβής σύνθεση του CCP εξαρτάται από το ιονικό περιβάλλον, αποδεικνύοντας ότι έχει ιδιότητες ανταλλαγής ιόντων. Τα νανο-συμπλέγματα του CCP έχουν εκτιμώμενη διάμετρο περίπου 2,5 nm. Το CCP δρα ως <<κόλλα>> στα μικκύλια: όσο περισσότερο υπάρχει στα μικκύλια, τόσο πιο άκαμπτα γίνονται. Ένα τυπικό καζεϊνικό μικκύλιο περιέχει περίπου 104 πολυπεπτιδικές αλυσίδες καζεϊνικών μορίων συνδεδεμένες με περίπου 3×10^3 νανοσυμπλέγματα CCP. Περίπου τα 2/3 της καζεΐνης είναι άμεσα συνδεδεμένη με κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο μέσω αρνητικών υπολειμματικών φορτίων φωσφοσερίνης, μειώνοντας την ηλεκτροστατική άπωση των καζεϊνικών μικκυλίων. Αυτή η ηλεκτροστατική άπωση μειώνεται ακόμα περισσότερο παρουσία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των καζεϊνών. Η φύση και η δομή των καζεϊνικών μικκυλίων έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν προταθεί διαφορετικά μοντέλα όπως στο σχήμα 1 (deKort, 2012).



Σχήμα 1. Το εσωτερικό μοντέλο δομής του καζεϊνικού μικκυλίου όπως προτάθηκε από τους Holt και Horne. Ο πυρήνας του καζεϊνικού μικκυλίου εμφανίζεται σαν ένα δίκτυο με αρκετά ανοικτή δομή πολυπεπτιδικών αλυσίδων συνδεδεμένων, με σταυροειδείς δεσμούς, με

νανοσυμπλέγματα φωσφορικού ασβεστίου. Η εξωτερική περιοχή έχει ένα χαμηλής πυκνότητας τμήμα και είναι γνωστό ως το τριχωτό στρώμα του καζεϊνικού μικκυλίου. Οι σκούρες κηλίδες αντιπροσωπεύουν τις νανοσυμπλέγματα φωσφορικού ασβεστίου (deKort, 2012).

Σε αυτό το μοντέλο οι καζεΐνες και τα νανοσυμπλεγμάτα CCP είναι σχετικά ομοιογενώς κατανεμημένα στο καζεϊνικό μικκύλιο. Οι καζεΐνες είναι κυρίως συνδεδεμένες στο μικκύλιο με ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Επίσης εμφανίζονται και αλληλεπιδράσεις, όπως οι γέφυρες ασβεστίου, ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που είναι σημαντικές για την διατήρηση των καζεϊνικών μικκυλίων, πχ κατά την ψύξη. Το σχήμα των καζεϊνικών μικκυλίων είναι σχετικά σφαιρικό και η δομή είναι ανοιχτή με ομάδες φωσφορικού ασβεστίου που είναι εν μέρει δεσμευμένες σε σταυροειδή διάταξη με τα υπολείμματα φωσφοσερίνης στα καζεϊνικά μικκύλια. Το εσωτερικό των μικκυλίων αποτελείται κυρίως από συνδεδεμένες καζεΐνες (α_{s1} -, α_{s2} - και β -καζεΐνες) και φωσφορικό ασβέστιο. Το εξωτερικό των μικκυλίων αποτελείται κυρίως από υδρόφιλη αρνητικού φορτίου κ- καζεΐνη, η οποία παρέχει τόσο ηλεκτροστατική όσο και στερική σταθερότητα στο καζεϊνικό μικκύλιο. Το αρνητικό φορτίο προκαλείται από ομάδες διασπασμένων καρβοξυλίων και φωσφορικών εστέρων, με αποτέλεσμα το Z-δυναμικό να εμφανίζει τιμές -20 mV για καζεϊνικά μικκύλια ουδέτερου pH και θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Το στρώμα κ-καζεΐνης που ονομάζεται επίσης και τριχωτό στρώμα του μικκυλίου έχει υδροδυναμικό πάχος περίπου 7nm (deKort, 2012).

2.2. Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ατομικά είναι οι πιο ασθενείς σε σχέση με άλλες αλληλεπιδράσεις στις αλυσίδες των πρωτεϊνών. Είναι όμως σημαντικές λόγω της υψηλής συχνότητάς τους σε πρωτεΐνες με μη πολικές πλευρικές αλυσίδες. Εμφανίζουν λιγότερα ειδικά χαρακτηριστικά από άλλες αλληλεπιδράσεις τόσο στις στερεοχημικές απαιτήσεις του προσανατολισμού της πλευρικής αλυσίδας, όσο και στον αριθμό και το είδος των πλευρικών αλυσίδων που μπορούν να συμμετέχουν στο σχηματισμό τους. Ούτε η γωνία αλλά ούτε και το μήκος είναι σταθερό και ο σχετικός προσανατολισμός των μη

πολικών ομάδων είναι ασήμαντος. Όταν δύο υδρόφοβες πρωτεΐνες έρχονται σε επαφή, ο συνολικός αριθμός των μορίων νερού μειώνεται, παρόλα αυτά εξακολουθούν να διατηρούν λίγο νερό. Ένας συνδυασμός υψηλής υδροφοβικότητας και μεγάλου μοριακού βάρους καζεϊνών αποτρέπει τον σχηματισμό μιας σφαιρικής δομής μέσα στην οποία οι μη πολικές ομάδες ενσωματώνονται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Μερικές καζεϊνικές πλευρικές αλυσίδες βρίσκονται παρόλα αυτά εκτεθειμένες στο νερό και οι μη πολικές περιοχές της επιφάνειας των πρωτεϊνών είναι διαθέσιμες για σχηματισμό αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια πρωτεΐνης. Αυτό προσδίδει στις καζεΐνες την έντονη τάση να συνδέονται με τη μορφή συσσωματωμάτων, ακόμη και εν απουσία των ιόντων ασβεστίου (McMachon & Brown, 1984).

2.3. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν ελάχιστα στη σταθερότητα της μονομερούς πρωτεΐνης. Είναι κρίσιμες για τη διάταξη και την κατάλληλη διαμόρφωση συγκεκριμένων συσσωματωμάτων. Όταν σχηματίζονται συγκεκριμένα ζευγάρια ιόντων όπως είναι οι γέφυρες φωσφόρου-φωσφορικού ασβεστίου στη καζεΐνη, τότε αυτές σταθεροποιούν της τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις παίζουν σπουδαίο ρόλο στην δημιουργία της καζεϊνικής δομής και η υψηλή περιεκτικότητα όξινων ομάδων αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης ασβεστίου και ενισχύει τους σταυροειδείς δεσμούς. Αλληλεπιδράσεις όπως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι γέφυρες ασβεστίου και άλλες αλληλεπιδράσεις φορτίων μεταξύ της θετικά φορτισμένης παρα-κ-καζεΐνης και των αρνητικά φορτισμένων περιοχών σε άλλα μικκύλια γίνονται κυρίαρχες. Το μέγεθος των δυνάμεων London-van der Waals, που εξαρτάται από την διαφορά πολικότητας των κολλοειδών σωματιδίων, είναι σχετικά χαμηλό λόγω του πορώδους των καζεϊνικών μικκυλίων. Μικρή ηλεκτρική άπωση μεταξύ των μικκυλίων εμφανίζεται με ηλεκτροκινητικές μετρήσεις. Τα σωματίδια καζεΐνης μπορούν να κροκιδωθούν στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, που καταδεικνύει ότι το φορτίο είναι σημαντικό για την σταθεροποίησή τους (McMachon & Brown, 1984).

2.4. Μεταβολή του μοριακού βάρους και της γυροσκοπικής ακτίνας R_G κατά την προσθήκη ασβεστίου

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν εκπονηθεί, παρατηρείται ότι σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων ασβεστίου, η προσθήκη του οδηγεί στη σύνδεση των καζεϊνικών μικκυλίων, το οποίο προκύπτει από την αύξηση του μοριακού βάρους. Αυτό οφείλεται στην ισχυρή δέσμευση του ασβεστίου με τα υπολείμματα φωσφοσερίνης της α_1 -καζεΐνης και β -καζεΐνης, τα οποία είναι τα κύρια χαρακτηριστικά των καζεϊνών. Στα 7,5 mM Ca εκτός από την αύξηση του μοριακού βάρους παρατηρείται και αύξηση της γυροσκοπικής ακτίνας αλλά και του A_2 virial συντελεστή λόγω της μοριακής αυτής σύνδεσης των καζεϊνών (Dickinson et al., 2001).

Αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι στα 6 mM Ca υπάρχει ένας ελάχιστος βαθμός καζεϊνικής ένωσης, δηλαδή σύνδεσης του ασβεστίου κυρίως στο εσωτερικό των ίδιων μορίων και όχι μεταξύ διαφορετικών με τα οποία επέρχεται συσσωμάτωση. Φαίνεται ότι η δέσμευση ασβεστίου που οδηγεί σε εγκάρσια σύνδεση της καζεΐνης τείνει να επάγει την κατάρρευση της τυχαίας διάταξης της καζεΐνης που δημιουργείται λόγω των φορτισμένων αλυσίδων. Το αποτέλεσμα αυτής της εγκάρσιας σύνδεσης είναι η μείωση του μεγέθους των πρωτεϊνών που ορίζουν αυτή την διάταξη και κατ' επέκταση των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των πρωτεϊνών διότι επέρχεται εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων λόγω της δέσμευσης ασβεστίου (Dickinson et al., 2001).

Η απομάκρυνση ασβεστίου από τα μικκύλια πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση ασβεστίου δεν προκαλεί καμία μείωση στην υδροδυναμική ακτίνα. Όσο μειώνεται η δραστηριότητα του ασβεστίου κάτω από το κρίσιμο σημείο, το μοριακό βάρος των μικκυλίων μειώνεται ως αποτέλεσμα της διάταξης των καζεϊνών κυρίως της β - και κ - καζεΐνης. Περαιτέρω απομάκρυνση του ασβεστίου προκαλεί διαχωρισμό του μικκυλίου. Η προσθήκη ασβεστίου προκαλεί αρχικά μεταφορά της διαλυτής καζεΐνης στο μικκύλιο χωρίς αλλαγή της υδροδυναμικής ακτίνας. Περαιτέρω προσθήκη προκαλεί σχηματισμό ολοένα και μεγαλύτερων μικκυλίων καζεΐνης (McMahon & Brown., 1984).

Η επίδραση του ασβεστίου στα καζεϊνικά μικκύλια πιστεύεται ότι προχωρεί σε δύο φάσεις. Πρώτα οι καζεΐνες ενσωματώνονται στο μικκύλιο της καζεΐνης. Το ασβέστιο εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία των υπολειμμάτων φωσφοσερίνης και ομάδων καρβοξυλικού οξέος και μειώνει τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των καζεϊνών. Αυτό οδηγεί σε μια αύξηση του μοριακού βάρους χωρίς αλλαγή του μεγέθους των μικκυλίων. Στη δεύτερη φάση μεγαλύτερες ποσότητες ασβεστίου αυξάνουν την ακτίνα των μικκυλίων (Gebhardt et al. 2008).

Ένα πιθανό πρώτο βήμα του σχηματισμού μικκυλίων περιλαμβάνει τετραεδρική διάταξη υπομικκυλίων. Σε ένα σύστημα που περιέχει κ -καζεΐνη λιγότερο από 15%, παρουσιάζεται μεγαλύτερη συσσωμάτωση. Αυτό που συμβαίνει είναι η δημιουργία ενός ελάχιστου μικκυλίου αποτελούμενο από 14 υπομικκύλια με μοριακό βάρος $3,5 \times 10^6$ g/mol, αν υπάρχει αρκετή κ-καζεΐνη στην επιφάνεια για να εμποδίσει την περαιτέρω ανάπτυξη. Λιγότερη κ-καζεΐνη στην επιφάνεια θα επιτρέψει την περαιτέρω ανάπτυξη μικκυλίων η οποία αποδίδει μεγάλη κατανομή μεγεθών (McMahon & Brown., 1984).

2.5. Μεταβολή του A_2 virial συντελεστή κατά την προσθήκη ασβεστίου

Η αλλαγή στο πρόσημο του A_2 virial συντελεστή των καζεϊνικών μικκυλίων σε υδατικό μέσο από αρνητική σε θετική με προσθήκη ασβεστίου δείχνει το σχηματισμό συσσωματωμάτων με επιφάνεια υψηλής υδροφιλικότητας, δηλαδή η σχετική υδροφοβικότητα της επιφάνειας των καζεϊνικών μικκυλίων μειώνεται λόγω του ότι τα υδρόφοβα τμήματα κρύβονται στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων με αποτέλεσμα την δέσμευση ασβεστίου. Έτσι η θερμοδυναμική συγγένεια των συσσωματωμάτων για το υδατικό μέσο αυξάνει (Dickinson et al., 2001).

2.6. Μεταβολή της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου με παράλληλη μεταβολή pH

Βάση ερευνών σε ένα εύρος pH 6,7 - 8 το μέγεθος των σωματιδίων αποβουτυρωμένου γάλακτος αυξήθηκε από 306 nm σε 421 nm. Αυτό είναι

αξιοσημείωτο διότι η περαιτέρω μείωση του pH στην αρχική του τιμή οδήγησε σε μείωση του πρωταρχικού μεγέθους των σωματιδίων. Στην πραγματικότητα με την αύξηση του pH, τα μόρια καζεΐνης κερδίζουν περισσότερα αρνητικά φορτία καθώς και ισχυρότερη ηλεκτροστατική άπωση που οδηγεί σε μεγαλύτερες και πιο χαλαρές δομές. Ωστόσο οι ελκτικές δυνάμεις εξακολουθούν να είναι επαρκείς τόσο ώστε να αρκούν για την διατήρηση της ακεραιότητας των καζεϊνικών μικκυλίων ακόμη και σε ισχυρά αλκαλικό pH (Ghasemi & Abbasi ,2014).

Έχει αποδειχθεί ότι η έναρξη της συσσωμάτωσης της α_1 - καζεΐνης είναι αποτέλεσμα της μείωσης της πυκνότητας του φορτίου των πρωτεϊνών κάτω από μια συγκεκριμένη τιμή που εξαρτάται από το pH και το βαθμό δέσμευσης ασβεστίου. Το ποσοστό συσσωμάτωσης αποδείχθηκε ότι ελέγχεται από την πυκνότητα του φορτίου. Πειραματικά βρέθηκε ότι η προσθήκη ασβεστίου σε καζεϊνικό νάτριο μειώνει σημαντικά το pH των διαλυμάτων υποδηλώνοντας ότι η σύνδεση του με τα μόρια καζεΐνης απελευθερώνει πρωτόνια. Τα διαλύματα έγιναν θολά όταν η συγκέντρωση του ασβεστίου ήταν υψηλότερη από 10 mmol/L. Η αύξηση της θολερότητας προκλήθηκε από το σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων καζεΐνης (Pitkowski et al., 2009).

Το καθαρό φορτίο των μικκυλίων της καζεΐνης μειώνεται με μείωση του pH από 6,7, που είναι η τιμή του γάλακτος, προς το ισοηλεκτρικό σημείο (pI 4,6). Η οξίνιση επίσης οδηγεί σε προοδευτική πρωτονίωση των οργανικών και ανόργανων φωσφορικών αλάτων και προκαλεί διάλυση του κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου (CCP) έως ότου όλα τα φωσφορικά διαλυτοποιηθούν σε pH < 5,3. Σε χαμηλότερο pH οι πρωτεΐνες συσσωματώνονται και οδηγούνται σε κατακρήμνιση ή πηκτωματοποίηση τα οποία είναι η βάση σχηματισμού της γιαούρτης. Ακόμα και τα καζεϊνικά μικκύλια παραμένουν ανέπαφα, τουλάχιστον μέχρι pH 5, όπου η εσωτερική τους δομή και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καζεϊνών αλλάζουν κατά την διάρκεια της οξίνισης όσο παράλληλα το CCP σταδιακά διαλύεται (Gonzalez-Jordan et al., 2015).

Για τα καζεϊνικά μικκύλια σε υδατικό διάλυμα σε pH γάλακτος, το 95% των ανόργανων φωσφορικών αλάτων και το 88% των οργανικών φωσφορικών

είναι ακίνητα και πιθανότατα ενσωματώνονται με νανοσυμπλέγματα φωσφορικού ασβεστίου. Το κλάσμα των κινητών οργανικών και ανόργανων φωσφορικών αλάτων αυξήθηκε ασθενώς με μείωση του pH κάτω από 5,5 και αυξήθηκε απότομα σε ποσοστό 75% σε pH 4,8. Η πρωτονίωση των οργανικών και ανόργανων φωσφορικών αλάτων μετατοπίστηκε σε χαμηλότερο pH και για τα δύο. Τα νανοσυμπλέγματα φωσφορικού ασβεστίου που διαλύθηκαν με μείωση του pH σε 4,8 επανασηματίστηκαν όταν το pH αυξήθηκε και πάλι στο 6,8 και το κλάσμα των ακίνητων φωσφορικών ήταν σχεδόν ίδιο πριν από την διαδικασία οξίνιση- αλκαλίωσης. Η οργάνωση των καζεϊνών και του φωσφορικού ασβεστίου είναι επίσης παρόμοια και πριν και μετά την τελευταία διαδικασία, αλλά ο σταθεροποιητικός ρόλος της κ- καζεΐνης που περιορίζει την ανάπτυξη κατά την διάρκεια του σχηματισμού των φυσικών καζεϊνικών μικκυλίων δεν εμφανίζεται (Gonzalez-Jordan et al., 2015).

2.7. Στατική σκέδαση φωτός (SLS)

Η στατική σκέδαση φωτός (SLS) είναι μια οπτική τεχνική που υπολογίζει την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός σε συνάρτηση με τη γωνία σκέδασης. Μία τυπική εφαρμογή είναι ο προσδιορισμός του μέσου μοριακού βάρους M_w ενός μακρομορίου όπως ένα πολυμερές ή μια πρωτεΐνη. Άλλες δημοφιλείς εφαρμογές είναι η μέτρηση της ακτίνας περιστροφής R_g . Μέσω της μέτρησης της έντασης σκέδασης για ένα μακρομόριο σε διάφορες συγκεντρώσεις, μπορεί να υπολογιστεί ο δεύτερος A_2 virial συντελεστής. Ειδικές τεχνικές ανάλυσης όπως το Zimm ή το Guinier Plot χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση των βέλτιστων αποτελεσμάτων.

Για τα πειράματα σκέδασης στατικού φωτός χρησιμοποιείται ένα λέιζερ για να φωτίζει μια κυψελίδα που περιέχει το προς ανάλυση δείγμα. Ένας ή πολλοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της έντασης σκέδασης σε συνάρτηση με τη γωνία σκέδασης θ . Αυτή η αποκαλούμενη καμπύλη σκέδασης $I_s(\theta)$ περιέχει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος του σωματιδίου σκέδασης, το σχήμα και τη μοριακή μάζα του.

Η ικανότητα ενός διαλύματος μακρομορίων να διασκορπίσει το φως χαρακτηρίζεται από την αναλογία Rayleigh (δηλαδή τη μέση ένταση

σκεδασμού ανά μονάδα στερεάς γωνίας, τον όγκο σκέδασης μονάδας και την ένταση φωτισμού μονάδας). Ο λόγος Rayleigh είναι ένα μέτρο της απόλυτης σκέδασης του δείγματος και περιλαμβάνει τις διαφορές τόσο από τον διαλύτη όσο και από τα μακρομόρια. Προκειμένου να αποκτηθούν αυτές οι διαφορές που αναφέρονται ως περίσσεια αναλογίας Rayleigh R_{ex} , είναι απαραίτητο να γίνουν επιπλέον μετρήσεις της διάχυσης του διαλύτη (R_{sol}) αποδίδοντας τον τύπο $R_{ex} = R - R_{sol}$. Η περίσσεια της αναλογίας του Rayleigh περιέχει πληροφορίες σχετικά με τη μάζα, το μέγεθος και τη δομή των μακρομορίων στο διάλυμα και είναι συνάρτηση τόσο της συγκέντρωσης w όσο και του φορέα σκέδασης q : $R_{ex}(q,w) = KwM P(q) S(q,w)$, (1)

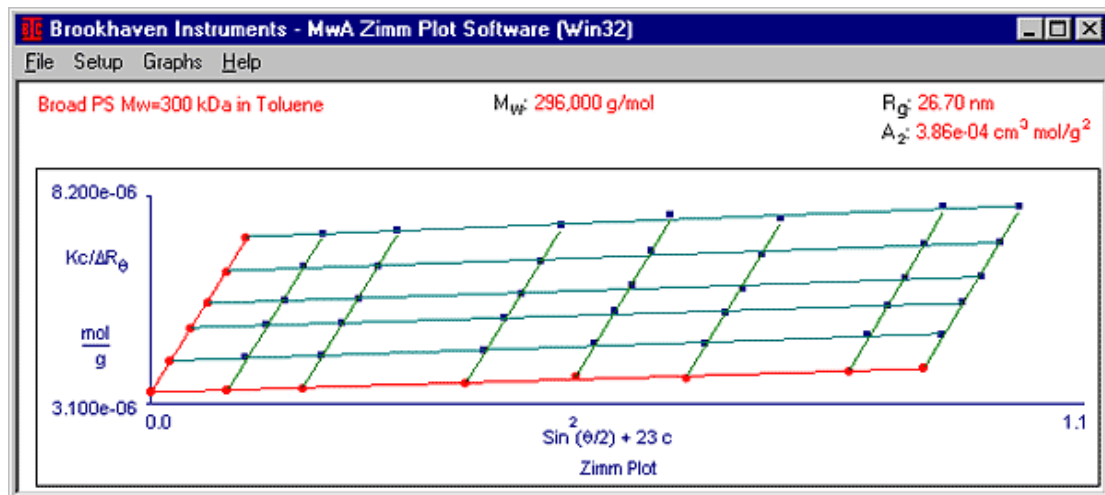
όπου M είναι η μέση μοριακή μάζα, K μια οπτική σταθερά, $P(q)$ συντελεστής μορφής του μορίου και $S(q)$ ο συντελεστής δομής. Αναλυτικές εκφράσεις για το $P(q)$ και $S(q)$ μπορούν να ληφθούν στο όριο του $qR_g \ll 1$ και σε μικρή συγκέντρωση w . Χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1) με επεκτάσεις και αναδιατάξεις μπορεί να αποδώσει την παρακάτω εξίσωση:

$$Kw/R_{ex}(q,w) = 1/M(1 + ((R_g^2/3)q^2))(1 + (2\underline{A}_2w)), \quad (2)$$

Όπου $\underline{A}_2 = A_2 N_A / M$, N_A ο αριθμός Avogadro και A_2 ο θερμοδυναμικός δεύτερος virial συντελεστής (www.lsinstruments.ch).

2.8. Zimm Plot

Κατασκευάζοντας ένα γράφημα Zimm από δεδομένα SLS είναι ένας εύκολος τρόπος να υπολογιστούν το R_g , M_w και ο A_2 από τις μετρήσεις SLS με τη χρήση της εξίσωσης (2). Είναι μια σχηματική αναπαράσταση που γραμμικοποιεί το q^2 σε συνάρτηση του R_{ex} ενώ διαχωρίζει την εξάρτηση του q και w με τη γραφική αναπαράσταση $Kw/R_{ex}(q,w)$ έναντι του $q^2 + cw$, όπου c είναι μια σταθερά που επιλέγεται αυθαίρετα (Σχήμα 2) (www.lsinstruments.ch).



Σχήμα 2. Σχέδιο Zimm δείγματος πολυστυρενίου σε τολουόλιο (Brookhaven Instruments Corporation)

2.9. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι επίσης γνωστή ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό μεγέθους των σωματιδίων. Όταν μια μονοχρωματική δέσμη φωτός, όπως ένα λέιζερ, σκεδάζεται σε ένα διάλυμα με σφαιρικά σωματίδια που βρίσκονται σε κίνηση Brown, λόγω του φαινομένου Doppler, αλλάζει το μήκος κύματος του εισερχόμενου φωτός. Αυτή η αλλαγή σχετίζεται με το μέγεθος του σωματιδίου. Είναι δυνατό να υπολογιστεί η κατανομή μεγέθους της σφαίρας και να δοθεί μια περιγραφή της κίνησης του σωματιδίου στο μέσο, υπολογίζοντας το συντελεστή διάχυσης και κάνοντας χρήση της λειτουργίας αυτοσυσχέτισης. Διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη ενός δυναμικού συστήματος με σωματίδια σε κίνηση Brown, ανάλογα με τη χρονική κλίμακα των μοριακών διακυμάνσεων (Pecora, 2000).

Ένας μονοχρωμάτορας ή φίλτρο τοποθετείται μπροστά από το φωτοπολλαπλασιαστή και χρησιμοποιείται όταν η χρονική κλίμακα των διακυμάνσεων είναι πάνω από ένα microsecond (συχνότητα άνω του 1 MHz). Η μέση παροχή του φωτοπολλαπλασιαστή είναι ανάλογη της φασματικής πυκνότητας του διάσπαρτου φωτός στη συχνότητα του φίλτρου. Στη συνέχεια, το φίλτρο σαρώνεται σε μια περιοχή συχνοτήτων. Για διεργασίες ταχύτερες από ένα picrosecond (συχνότητα άνω των 10 GHz), χρησιμοποιούνται

πλέγματα περιθλάσεως ως φίλτρο και για αργές διακυμάνσεις μεταξύ του ενός picosecond και του ενός microsecond, χρησιμοποιούνται συμβολόμετρα Fabry Perot (Pecora, 2000).

2.10. Τεχνολογικές χρήσεις των καζεϊνικών μικκυλίων

Τα καζεϊνικά μικκύλια, όπως προαναφέρθηκε είναι στη πραγματικότητα φυσικές νανο-κάψουλες που επιτρέπουν την παροχή θρεπτικών συστατικών, όπως ασβέστιο, φωσφορικό άλας και πρωτεΐνη, στο νεογνό. Γι αυτό το λόγο γίνεται η χρήση τους για τη νανοενθυλάκωση και τη σταθεροποίηση των υδρόφοβων συστατικών, όπως επίσης και για τον εμπλουτισμό μη ή χαμηλών σε λιπαρά προϊόντων διατροφής (Semo et al., 2007).

Οι νανοδομές των καζεϊνικών μικκυλίων έχει αποδειχθεί ότι έχουν προστατευτική επίδραση έναντι της υποβάθμισης κατά τη διάρκεια βιομηχανικών επεξεργασιών (αποστείρωση, παστερίωση, υψηλή υδροστατική πίεση και ψήσιμο). Σε μελέτη που έχει εκπονηθεί για το β-καροτένιο (πίνακας 1), αποδείχθηκε ότι η ενθυλάκωση του σε καζεϊνικά μικκύλια μείωσε την υποβάθμισή του κατά την διάρκεια των θερμικών επεξεργασιών.

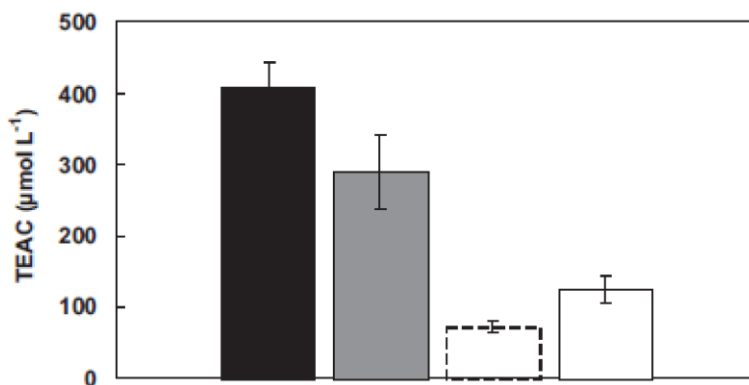
Πίνακας 1. Ποσοστό επί % της υποβάθμισης του β-καροτενίου σε κάθε δείγμα με διαφορετική επεξεργασία. Ως μάρτυρα γίνεται χρήση ελεύθερου β-καροτενίου, ενώ το r-CM αποτελεί το ενθυλακωμένο β-καροτένιο σε καζεϊνικά μικκύλια.

^{α,β} (α, υψηλό ποσοστό υποβάθμισης; β, χαμηλό ποσοστό υποβάθμισης)

0,5-8h έγινε υπολογισμός του μέσου όρου των επί % αποτελεσμάτων (Abajo et al., 2013).

Υποβάθμιση %	Μάρτυρας	r-CM
Αποστείρωση	75,9 ^α	51,0 ^β
Παστερίωση	67,9 ^α	35,7 ^β
HPP	28,1 ^α	8,6 ^β
Ψήσιμο	66,7 ^α	41,5 ^β
0,5-8h στους 80°C	63,8 ^α	19,6 ^β

Στα είδη θερμικής επεξεργασίας που έχουν χρησιμοποιηθεί παρατηρείται μείωση της υποβάθμισης του β-καροτενίου όταν αυτό είναι εγλεισμένο σε καζεϊνικά μικκύλια (Abajo et al., 2013).



Σχήμα 3. Αντιοξειδωτική δράση των καζεϊνικών μικκυλίων (20 μmol/L) (λευκή μπάρα), κουρκουμίνη (120 μmol/L) σε 100 ml/L αιθανόλη (διακεκομμένη γραμμή), κουρκουμίνη (120 μmol/L) σε 96% αιθανόλη (γκρι μπάρα), κουρκουμίνη (120 μmol/L σε 100 ml/L αιθανόλη) σε διάλυμα καζεϊνικών μικκυλίων (20 μmol/L) (μαύρη μπάρα) στους 25°C (Esmaili et al., 2011).

Τα καζεϊνικά μικκύλια αποτελούν επίσης προστατευτικό μέσο έναντι της οξείδωσης των ουσιών που έχουν εγκλειστεί σε αυτές. Σε αναλύσεις που έγιναν, η αντιοξειδωτική δράση 20 μmol/L καζεϊνικών μικκυλίων είναι συγκριτικά μεγαλύτερη από τη διάλυση κουρκουμίνης σε 10% αιθανόλης. Η αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών οφείλεται κυρίως στη παρουσία ορισμένων αμινοξέων συμπεριλαμβανομένων των τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη, τα οποία έχουν μια ομάδα δότη υδρογόνου, όπως ινδόλη, φαινύλιο και ιμιδαζόλιο ή άλλα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, προλίνη, που εξετάζονται ως ενδογενή πρωτεϊνικά αντιοξειδωτικά (Levine, Mosoni, Berlett, & Stadtman, 1996; Zhang, Wang, & Xu, 2008). Η αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης (120 μmol/L) διαλυμένη σε 96% αιθανόλη παρατηρείται υψηλότερη από εκείνη της ίδιας συγκέντρωσης κουρκουμίνης σε 100 ml/L υδρο-αιθανολικού διαλύματος. Ωστόσο το μείγμα καζεϊνικών μικκυλίων (20 μmol/L) και κουρκουμίνη (120 μmol/L σε 100 ml/L αιθανόλη) δείχνει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Esmaili et al., 2011).

Στο παρακάτω πίνακα δίνονται οι ουσίες που έχουν εγκλειστεί στα καζεϊνικά μικκύλια, όπως επίσης και για ποιο λόγο εφαρμόστηκε.

Πίνακας 2. Εφαρμογές των εγκλεισμένων ουσιών σε καζεϊνικά μικκύλια.

Ουσίες που έχουν εγκλειστεί σε καζεϊνικά μικκύλια	Εφαρμογή των εγκλεισμένων ουσιών	Παραπομπές
Βιταμίνη Α και D ₃	Αξιολόγηση της σταθερότητας των ξηρών σκευασμάτων βιταμίνης D κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή της επιταχυνόμενης αποθήκευσης, όπως επίσης και της αποθήκευσης ενισχυμένου υγρού αποβουτυρωμένου γάλακτος υπό ψύξη.	Loewen et al., 2018
Celecoxib (αντιφλεγμονώδες υδρόφοβο φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της οστεοαρθρίτιδας)	Χορήγηση της ουσίας από το στόμα με φορτίο εγκλεισμού 100 φορές μεγαλύτερο από άλλα σκευάσματα β-καζεΐνης/ φαρμάκων.	Bachar et al., 2012
Epigallocatechin gallate (EGCG)	Εξέταση της ικανότητας των καζεϊνικών μικκυλίων να απελευθερώνουν βιολογικά δραστικές συγκεντρώσεις πολυφαινολών σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου	Haratifar et al., 2014

	HT-29.	
Αλφουζονίνη	Βελτιώνει τις παραμέτρους κένωσης, μειώνοντας τον ουρηθρικό μυϊκό τόνο με μείωση της αντίστασης στην εκροή από την ουροδόχο κύστη διευκολύνοντας την κένωση της ουροδόχου κύστης. Ανάπτυξη μικκυλίων καζεΐνης με διασταυρωτούς δεσμούς γενιπίνης ως νέα πλατφόρμα χορήγησης για παρατεταμένη απελευθέρωση υδροχλωρικής αλφουζοσίνης.	Elzoghby et al., 2013

<p>Βιταμίνη D₂</p>	<p>Διευκολύνει την απορρόφηση του ασβεστίου στο έντερο, τη μεταφορά του ασβεστίου και του φωσφόρου στα οστά, την επανα-απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου στα νεφρά.</p> <p>Η βιταμίνη D συμμετέχει επίσης στο σχηματισμό οστεοβλαστών, στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην κανονική λειτουργία του νευρικού συστήματος, το πάγκρεας και το ανοσοποιητικό σύστημα.</p>	<p>Semo et al., 2007</p>
<p>Κουρκουμίνη</p>	<p>Είναι μια φυσική πολυφαινόλη με αντιπολλαπλασιαστικές, αντι-αγγειογενετικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και έχει ιδιαίτερη σημασία σαν συστατικό-στόχος στις χημειοθεραπείες κατά του καρκίνου.</p>	<p>Esmaili et al., 2011</p>

<p>Ω-3 λιπαρά οξέα</p>	<p>Μειώνουν το κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και μεταβολικών συνδρόμων. Πιο συγκεκριμένα τα αποδιδόμενα αποτελέσματα περιλαμβάνουν αντιθρομβωτικές, αντι-αθηρογενετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Μειώνουν επίσης τη πίεση του αίματος, της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.</p>	<p>Zimet et al., 2011</p>
------------------------	--	---------------------------

3. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν:

Η μελέτη των διαφορετικών συγκεντρώσεων ασβεστίου στη διαμόρφωση του μεγέθους και του Z-δυναμικού των καζεϊνικών μικκυλίων (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 6,25 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM) σε pH 6,7.

Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων ασβεστίου στη διαμόρφωση του μοριακού βάρους, της γυροσκοπικής ακτίνας και του A_2 virial συντελεστή των καζεϊνικών μικκυλίων (1 mM, 7,5 mM) σε pH 6,7.

Η επίδραση της μεταβολής του pH (από 6,7 σε 3) στη διαμόρφωση του μοριακού βάρους, της γυροσκοπικής ακτίνας και του A_2 virial συντελεστή των καζεϊνικών μικκυλίων με προσθήκη συγκέντρωσης 7,5 mM ασβεστίου.

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1. Υλικά – Όργανα

4.1.1. Πρώτη ύλη

Η προμήθεια του καζεϊνικού νατρίου έγινε από την εταιρία Sigma- Aldrich

4.1.2. Αντιδραστήρια

Φωσφορικό δισθενές κάλιο (K_2HPO_4)

Χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$)

Κιτρικό τρινάτριο ($Na_3C_6H_5O_7$)

Υδροχλωρικό οξύ (HCl)

Υδροξείδιο του νατρίου(NaOH)

4.1.3. Όργανα

Θερμοστατούμενος αναδευτήρας

Στατό

Αναλυτικός ζυγός

Αντλία πίεσης

Σύριγγα χωρητικότητας 5ml

Πεχάμετρο

Φυγόκεντρος

Λυωφιλιωτής

Συσκευή δυναμικής σκέδασης φωτός zetaserNano-ZS της εταιρίας Brookhaven, ΗΠΑ

Συσκευή στατικής σκέδασης φωτός BI-ZPMwA της εταιρίας Brookhaven, ΗΠΑ

4.2. Επεξεργασία

4.2.1. Προετοιμασία των πρωτεϊνικών διαλυμάτων

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε επαναευνδατωμένη σκόνη καζεϊνικού νατρίου. Σε 50 ml νερό προστέθηκε 5% w/w καζεϊνικό νάτριο το οποίο αφέθηκε για ανάδευση 24 ωρών σε χαμηλές στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 24 ωρών στο υπό ανάδευση διάλυμα πραγματοποιήθηκε εκ νέου ανάδευση σε σταθερή θερμοκρασία 37°C σε υψηλότερες στροφές για τη προσθήκη των συστατικών (κιτρικό τρινάτριο, φωσφορικό κάλιο και χλωριούχο ασβέστιο) . Σε 22ml απεσταγμένο νερό διαλύθηκαν 0,2941 g (1M) κιτρικού τρινατρίου $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ και 0,209 g (0,2 M) φωσφορικού καλίου K_2HPO_4 τα οποία και προστέθηκαν με αντλία σύριγγας σταδιακά στο διάλυμα καζεϊνικού νατρίου. Επίσης διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου ασβεστίου CaCl_2 (1, 2,5, 5, 6,25, 7,5, 10 και 12,5 mM) διαλύθηκαν σε 20 ml απεσταγμένο νερό αντίστοιχα και προστέθηκαν ταυτόχρονα με το παραπάνω διάλυμα κιτρικού τρινατρίου- φωσφορικού καλίου με άλλη σύριγγα με την χρήση αντλίας σύριγγας. Το pH διατηρείται σταθερό στο 6,7 ή 3,0 χρησιμοποιώντας 0,1 N HCl ή 1 N NaOH. Με το τέλος της προσθήκης των παραπάνω αντιδραστηρίων γίνεται επίσης προσθήκη επιπλέον απεσταγμένου νερού έως τα 100 ml, και το pH επαναρυθμίζεται στο 6,7 ή 3 και τα διαλύματα αναδεύονται για επιπλέον μία ώρα σε χαμηλές στροφές.

Με το πέραςμα της μίας ώρας τα διαλύματα οδηγούνται προς φυγοκέντριση στους 20 °C και 25000 x g για 1 ώρα και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό.

4.2.2. Μέγεθος και χαρακτηριστικά των καζεϊνικών μικκυλίων

Μετά την φυγοκέντριση το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε εξετάστηκε με την χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός για να προσδιοριστεί η κατανομή μεγέθους των καζεϊνικών μικκυλίων, όπως επίσης και το Z- δυναμικό που προσδιορίζει το φορτίο των σωματιδίων. (Malvern zetasizer Nano-ZS).

Στη συνέχεια το υπόλοιπο υπερκείμενο υγρό λυοφιλοποιείται για 24 ώρες και το στερεό δείγμα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους,

της γυροσκοπικής ακτίνας και του A_2 virial συντελεστή των καζεϊνικών μικκυλίων με τη χρήση της στατικής σκέδασης φωτός (BI-ZPMwA Zimplot).

4.2.3. Εκτίμηση του μοριακού βάρους των καζεϊνικών μικκυλίων και των παραμέτρων αλληλεπίδρασης σε υδατικό μέσο.

Το μοριακό βάρος, η γυροσκοπική ακτίνα και ο A_2 συντελεστής των καζεϊνικών μικκυλίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου υπολογίστηκαν με τη χρήση στατικής σκέδασης φωτός σε αραιωμένο υδατικό διάλυμα (5×10^{-2} – 35×10^{-2} g/ml). Η αναλογία R_θ του Rayleigh υπολογίστηκε με την χρήση κάθετου πολωμένου φωτός (637 nm) και ακτίνας $35^\circ \leq \theta \leq 145^\circ$ βαθμονομημένο με τολουόλιο ($R_{90}=1,363 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$). Τα διαλύματα φιλτραρίστηκαν κατευθείαν στην στήλη σκέδασης φωτός μέσω μεμβράνης με μέγεθος πόρων 0,2 μm και οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών ελέχθηκαν μετά από κάθε φιλτράρισμα ως προς τα δεδομένα που απεικονίζονται, τα οποία σχετίζονται με την καθαρότητα του διαλύματος και την ομοιογένεια των συστατικών του. Οι δύο παραπάνω παράγοντες επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα των αποτελεσμάτων και του γραφήματος Zimm. Τα πρώτα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για να σχεδιαστούν οι εξαρτήσεις γωνίας και συγκέντρωσης με την αναλογία $HC/\Delta R_\theta$ σύμφωνα με τη μέθοδο Zimm. Το C είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (g/ml). Το ΔR_θ είναι η περίσσεια σκέδαση φωτός του καθαρού διαλύτη σε γωνία θ και η H είναι μια οπτική σταθερά της συσκευής ίσο με $4\pi^2 n^2 v^2 / N_A \lambda^4$, όπου N_A είναι ο αριθμός Avogadro, λ είναι το μήκος του προσπίπτοντος φωτός σε κενό, n είναι ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη και v ο προσαυζούμενος δείκτης διάθλασης της πρωτεΐνης. Οι τιμές μέσου μοριακού βάρους εκτιμήθηκαν ως μέση όροι από τις παρακολουθήσεις τόσο στη εξάρτηση της συγκέντρωσης του $HC/\Delta R_\theta$ σε $\theta \rightarrow 0$, όσο και στην εξάρτηση της γωνίας του $HC/\Delta R_\theta$ σε $C \rightarrow 0$. Οι τιμές του A_2 virial συντελεστή υπολογίστηκαν από την κλίση της εξάρτησης της συγκέντρωσης του $HC/\Delta R_\theta$ σε $\theta \rightarrow 0$.

5. Αποτελέσματα- Συζήτηση

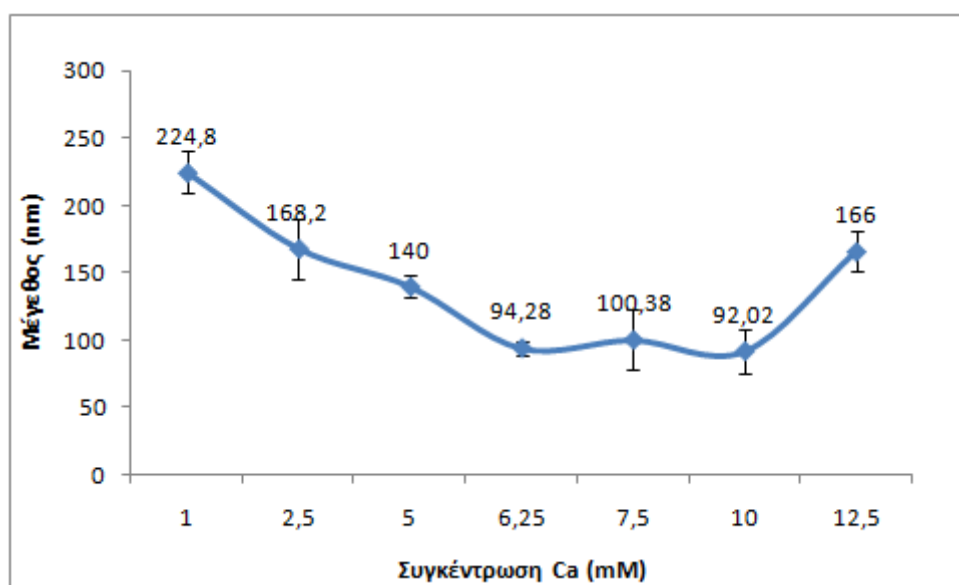
5.1. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων με τη χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός

Στον πίνακα 3 και στο σχήμα 4 απεικονίζονται οι τιμές μεγέθους των καζεϊνικών μικκυλίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ασβεστίου στο διάλυμα.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα της κατανομής μεγέθους των καζεϊνικών μικκυλίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ασβεστίου με σταθερό pH 6,7 με την χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός

Συγκέντρωση ασβεστίου στα καζεϊνικά μικύλλια (mM)	Μέγεθος καζεϊνικών μικυλίων (nm)
1	224,8 ± 15,21
2,5	168,2 ± 22,52
5	140 ± 7,71
6,25	94 ± 5,12
7,5	100 ± 22,46
10	92 ± 16,02
12,5	166 ± 15,3

*CI ± 95%



Σχήμα 4. Κατανομή σωματιδίων των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου και σταθερό pH 6,7 με τη χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δυναμικής σκέδασης φωτός παρατηρείται ότι κατά την προσθήκη ασβεστίου σε σταθερό pH 6,7, το μέγεθος των καζεϊνικών μικκυλίων μειώνεται σταδιακά μέχρι την συγκέντρωση των 6,25 mM Ca. Το μέγεθος των μικκυλίων έχει υποχωρήσει στα 94 nm σε σχέση με την προσθήκη 1 mM Ca όπου τα σωματίδια είχαν μια τάξη μεγέθους περίπου στα 225 nm (Σχήμα 4 και Πίνακας 3). Σαν πρώτο βήμα αυτή η μείωση του μεγέθους οφείλεται αρχικά στη μείωση του pH λόγω της προσθήκης ασβεστίου που απελευθερώνει κυρίως πρωτόνια, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των αρνητικά φορτισμένων υπολειμμάτων φωσφοσερίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την σύνδεση της καζεΐνης με το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο και κατ' επέκταση υπεύθυνη για την τυχαία διάταξη των καζεϊνικών μικκυλίων με χαλαρούς δεσμούς λόγω της ηλεκτροστατικής άπωσης. Το κυρίως αποτέλεσμα είναι η διάσπαση των μεγάλων χαλαρών δομών των καζεϊνών και η μείωση μεγέθους χωρίς παράλληλη μείωση του μοριακού βάρους (Dickinson et al., 2001)

Στη συνέχεια ένα δεύτερο βήμα είναι η επιπλέον σύνδεση των ιόντων προστιθέμενου ασβεστίου με τα υπολείμματα φωσφοσερίνης της α_1 -καζεΐνης και β -καζεΐνης, που είναι τα κύρια μονομερή συστατικά των καζεϊνών. Το αρνητικό φορτίο, που είναι υπεύθυνο για την σταθερότητα των μικκυλίων και την αποτροπή της δημιουργίας συσσωματωμάτων, με περαιτέρω αύξηση της προσθήκης ασβεστίου τείνει να καταρρεύσει και περισσότερο ασβέστιο συνδέεται με το εσωτερικό των καζεϊνικών μικκυλίων με αποτέλεσμα την κατάληψη θέσεων των υπολειμμάτων φωσφοσερίνης και συνεπώς την ανάγκη για σύνδεση με επιπλέον φωσφοσερίνη. Αποτέλεσμα της ανάγκης αυτής είναι η δημιουργία ελκτικών δυνάμεων μεταξύ διαφορετικών μικκυλίων με ελεύθερες θέσεις φωσφοσερίνης που επιφέρουν τελικά επιπλέον συσσωμάτωση. Η διαδικασία του δεύτερου βήματος λαμβάνει χώρα κυρίως με προσθήκη ασβεστίου >10 mM όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4 (Dickinson et al., 2001).

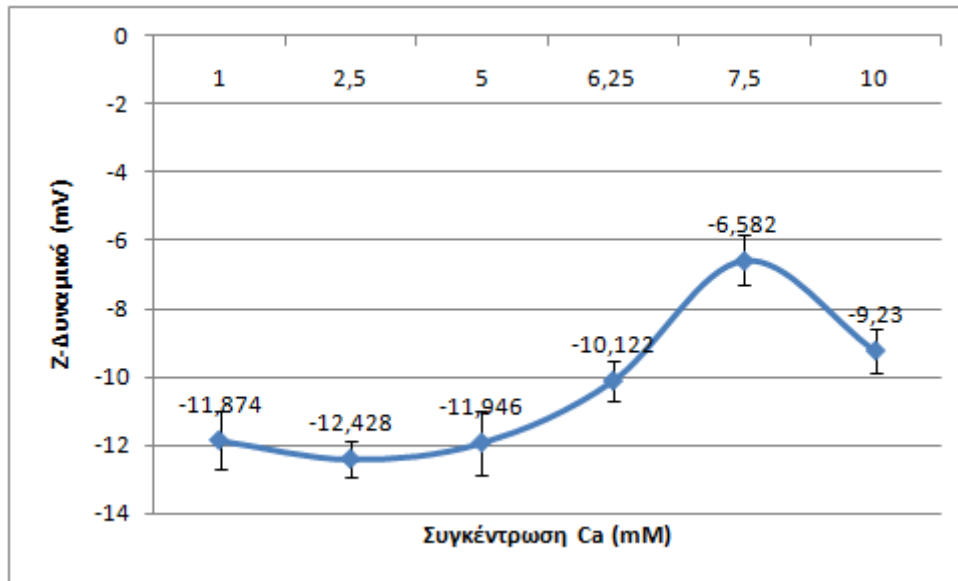
Ανάμεσα στο πρώτο και το δεύτερο βήμα υπάρχει ένα σημαντικό κομμάτι που πρέπει να σημειωθεί. Κατά την προσθήκη 6,25 mM έως 10 mM Ca παρατηρείται ότι το μέγεθος των καζεϊνικών μικκυλίων παραμένει σταθερό με διάμετρο που κυμαίνεται από 90-100 nm, όπως φαίνεται στο πίνακα 2. Σύμφωνα με τους Dickinson et al. (2001) στα 6 mM Ca υπάρχει ένας ελάχιστος βαθμός καζεϊνικής σύνδεσης, δηλαδή είναι σαν να συμβαίνει κάποια σύνδεση ασβεστίου κυρίως στο εσωτερικό των ίδιων μορίων και όχι μεταξύ διαφορετικών με την οποία διαφορετικά επέρχεται η συσσωμάτωση. Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί στο ότι υπάρχει ένα ευαίσθητο στο ασβέστιο καζεϊνικό στρώμα στην επιφάνεια των μικκυλίων και κατά συνέπεια στη τοποθέτηση της α_{s1} - και β - καζεΐνης στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων. Αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης φαίνεται να επιφέρει την μείωση του μεγέθους των μικκυλίων καζεΐνης (Dickinson et al., 2001).

5.2. Μεταβολή του Z-δυναμικού κατά την προσθήκη ασβεστίου

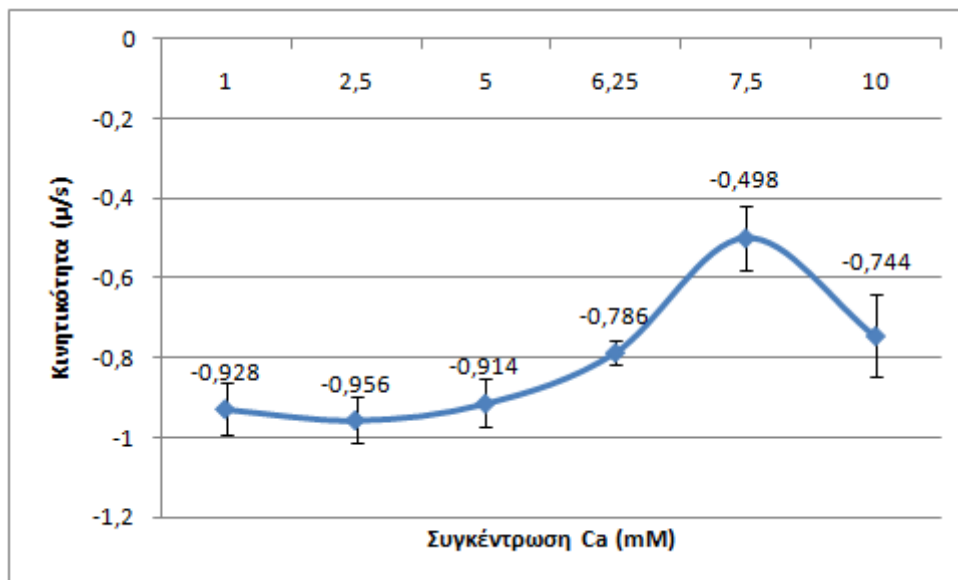
Στον πίνακα 4 και στο σχήμα 5 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της δυναμικής σκέδασης φωτός.

Πίνακα 4. Η επίδραση του ασβεστίου στο Z-δυναμικό (mV) και στην κινητικότητα (μ /s) των μικκυλίων (pH 6,7).

Συγκέντρωση ασβεστίου στα καζεϊνικά μικκύλια (mM)	Z-δυναμικό (mV)	Κινητικότητα (μ /s)
1	-11,87 \pm 0,84	-0,92 \pm 0,06
2,5	-12,42 \pm 0,52	-0,95 \pm 0,05
5	-11,94 \pm 0,92	-0,91 \pm 0,06
6,25	-10,12 \pm 0,57	-0,78 \pm 0,03
7,5	-6,58 \pm 0,73	-0,49 \pm 0,07
10	-9,23 \pm 0,65	-0,74 \pm 0,10



Σχήμα 5. Η επίδραση του ασβεστίου στο Z-δυναμικό των καζεϊνικών μικκυλίων (pH 6,7).



Σχήμα 6. Η επίδραση του ασβεστίου στη κινητικότητα των μικκυλίων (pH 6,7).

Κατά την εξέταση των τιμών του Z-δυναμικού των καζεϊνικών μικκυλίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ασβεστίου, παρατηρήθηκε μια σταθερότητα στα φορτία των καζεϊνικών μικκυλίων για το εύρος των συγκεντρώσεων 1-6,25 mM Ca και στη συνέχεια μια απότομη αύξηση κατά την προσθήκη 7,5 mM ασβεστίου. Η σταθερότητα στα φορτία για τις συγκεντρώσεις 1-6,25 mM Ca οφείλεται, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, στο ότι αρχικά με την προσθήκη ασβεστίου αρχίζει η κατάρρευση των απωστικών δυνάμεων με επερχόμενη κατάρρευση των χαλαρών συσσωματωμάτων. Παράλληλα παρατηρείται

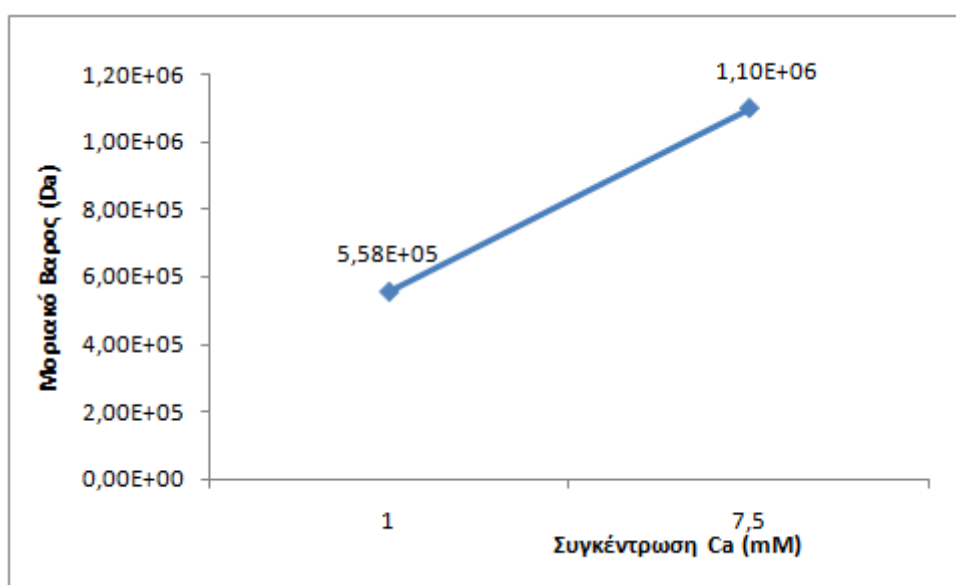
μείωση του μεγέθους χωρίς να επηρεάζονται σημαντικά τα φορτία της επιφάνειας των μικκυλίων σε μεγάλο βαθμό. Για το λόγο αυτό δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στο Z-δυναμικό. Στη συνέχεια στη συγκέντρωση 7,5 mM Ca η αύξηση του Z-δυναμικού ή η μερική εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου οφείλεται στην επιφάνεια των συσσωματωμάτων των καζεϊνικών μικκυλίων λόγω των ιόντων ασβεστίου. Επιπλέον προσθήκη ασβεστίου μέχρι τα 10 mM εμφανίζει μικρή μείωση του Z-δυναμικού και αυτό εξηγείται από την μεγάλη έκταση της περαιτέρω σύνδεσης των μερικώς εξουδετερωμένων καζεϊνικών μικκυλίων, ως αποτέλεσμα των ιόντων ασβεστίου το οποίο έρχεται σε αντίθεση με σχετική έρευνα όπου στην ίδια συγκέντρωση παρατηρείται αύξηση του Z-δυναμικού. Πιθανότατα το ασβέστιο δεν επηρεάζει τόσο την επιφάνεια των μικκυλίων όσο την έκταση της συσσωμάτωσης αυτών στις συγκεντρώσεις που αναπτύχθηκαν παραπάνω. Επίσης εκτιμάται ότι υπάρχει μια κρίσιμη συγκέντρωση ασβεστίου όπου επέρχεται κορεσμός και το ασβέστιο τελικώς εξουδετερώνει πλήρως την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των καζεϊνικών μικκυλίων με αποτέλεσμα την αύξηση του Z-δυναμικού.

Όσον αφορά την κινητικότητα των μικκυλίων και των συσσωματωμάτων μεταξύ τους, η κινητικότητα παραμένει σταθερή στις συγκεντρώσεις ασβεστίου 1-5 mM ασβεστίου, ενώ σε μεγαλύτερη προσθήκη ασβεστίου παρατηρείται μείωση της κινητικότητας (7,5 mM) όπως φαίνεται και στον πίνακα 4 και στο σχήμα 6. Αυτή η μείωση της κινητικότητας των καζεϊνικών μικκυλίων συμβαίνει, λόγω του κολλοειδούς ασβεστίου και της περαιτέρω προσθήκης ασβεστίου, που είναι η αιτία για την εξουδετέρωση των φορτίων.

5.3. Μεταβολή του μοριακού βάρους (Mw), της γυροσκοπικής ακτίνας (R_G) και του A_2 virial συντελεστή με την χρήση της στατικής σκέδασης φωτός (Zimmpplot)

5.3.1. Σταθερό pH 6,7 για συγκεντρώσεις ασβεστίου 1 mM και 7,5 mM.

Στο σχήμα 7 απεικονίζονται οι τιμές μοριακού βάρους των σωματιδίων ως προς τη συγκέντρωση ασβεστίου.

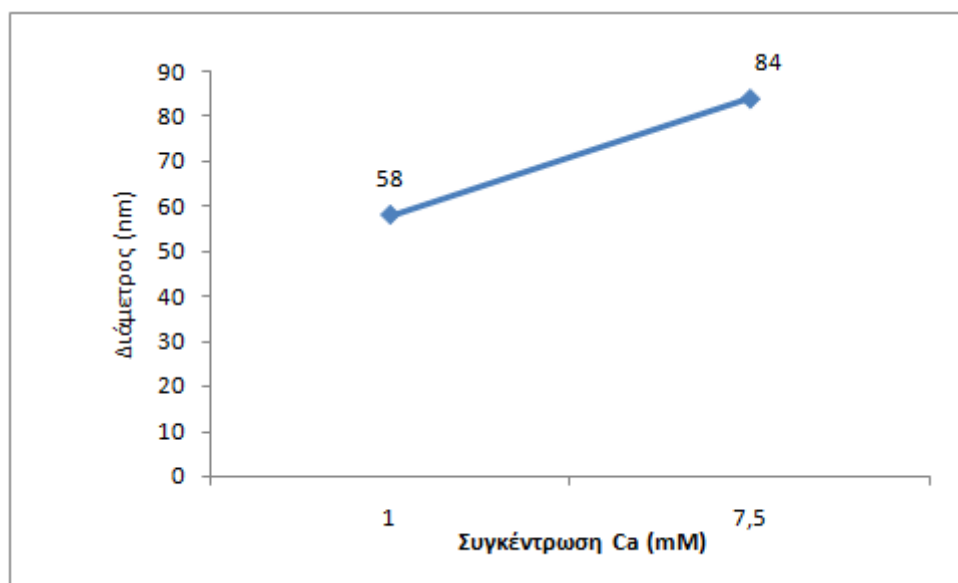


Σχήμα 7. Μεταβολή του μοριακού βάρους των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου στο 1 mM σε σχέση με τα 7,5 mM, σε σταθερό pH 6,7.

Αυτό που παρατηρείται σύμφωνα με το διάγραμμα Zimm, είναι ότι κατά την προσθήκη ασβεστίου προκαλείται ισχυρή σύνδεση με τα καζεϊνικά μικκύλια με αποτέλεσμα να αυξάνεται το Mw. Όπως αναπτύχθηκε παραπάνω στα αποτελέσματα του DLS, αυτό οφείλεται στην ισχυρή σύνδεση του ασβεστίου με τα υπολείμματα φωσφοσερίνης των α_1 - και β - καζεϊνών. Η αντίθεση όμως που παρατηρείται είναι ότι ενώ υπάρχει αύξηση του μοριακού βάρους, διαπιστώνεται ταυτόχρονη μείωση του μεγέθους των καζεϊνικών μικκυλίων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι υπάρχει μια <<χαλαρότητα>> μεταξύ των καζεϊνικών μικκυλίων λόγω των απωστικών δυνάμεων που εμφανίζονται μεταξύ των καζεϊνών σε μικρές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Αντίθετα με περαιτέρω αύξηση της προσθήκης ασβεστίου καταρρέουν, όπως εξηγήθηκε

παραπάνω, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μεγαλύτερη συγκρότηση μεταξύ των καζεϊνών και του ασβεστίου που μειώνει τις αποστάσεις ή τους κενούς χώρους που δημιουργούσαν οι απωστικές δυνάμεις. Αυτή η διαδικασία μείωσης του μεγέθους των μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου και ταυτόχρονης αύξησης του μοριακού βάρους εμφανίζεται κυρίως μέχρι την συγκέντρωση των 10 mM Ca. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση Ca παρατηρείται αύξηση του μεγέθους με παράλληλη αύξηση του μοριακού βάρους. Αυτό συμβαίνει λόγω της κατάρρευσης των απωστικών δυνάμεων, συνέπεια της εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων των καζεϊνών και κατ'επέκταση την δημιουργία νέων συσσωματωμάτων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το μοριακό βάρος με αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου από 1 mM σε 7,5 mM αυξήθηκε από $5,58E+06$ g/mol σε $1,10E+07$ g/mol όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.

Στο σχήμα 8 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της στατικής σκέδασης φωτός ως προς την γυροσκοπική ακτίνα.

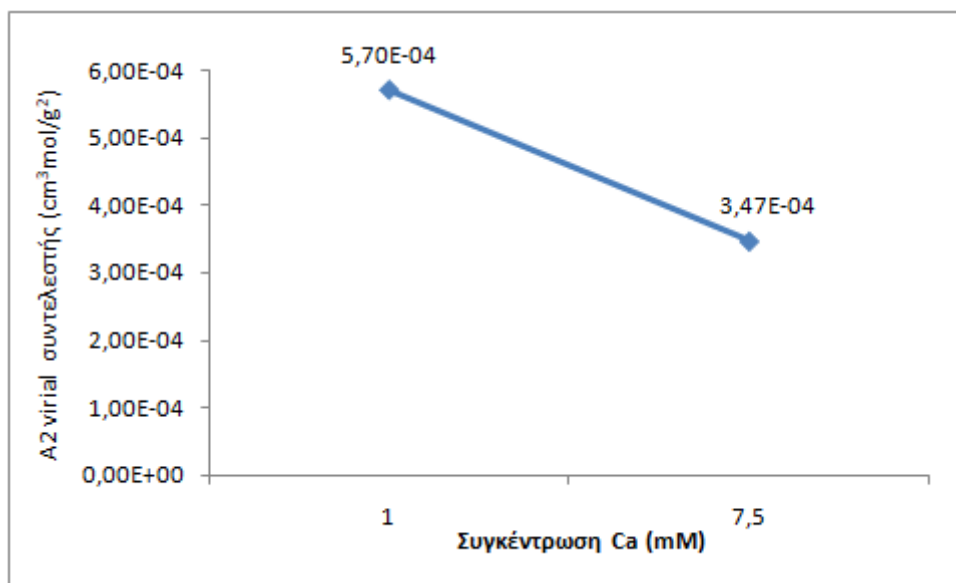


Σχήμα 8. Μεταβολή της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g) των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου στο 1 mM σε σχέση με τα 7,5 mM, σε σταθερό pH 6,7.

Η γυροσκοπική ακτίνα φαίνεται να έχει μια μικρή αύξηση από τα 57nm με προσθήκη ασβεστίου 1 mM στα 85 nm με προσθήκη 7,5 mM Ca (Σχήμα 8). Αντιθέτως η γυροσκοπική ακτίνα φαίνεται να είναι σταθερή στις χαμηλές

συγκεντρώσεις ασβεστίου και αυξάνεται με αύξηση του μοριακού βάρους κυρίως μετά τα 8 mM όπως αναπτύχθηκε από τους Dickinson et al.

Στο σχήμα 9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του A_2 virial συντελεστή μέσω της χρήσης της στατικής σκέδασης φωτός.

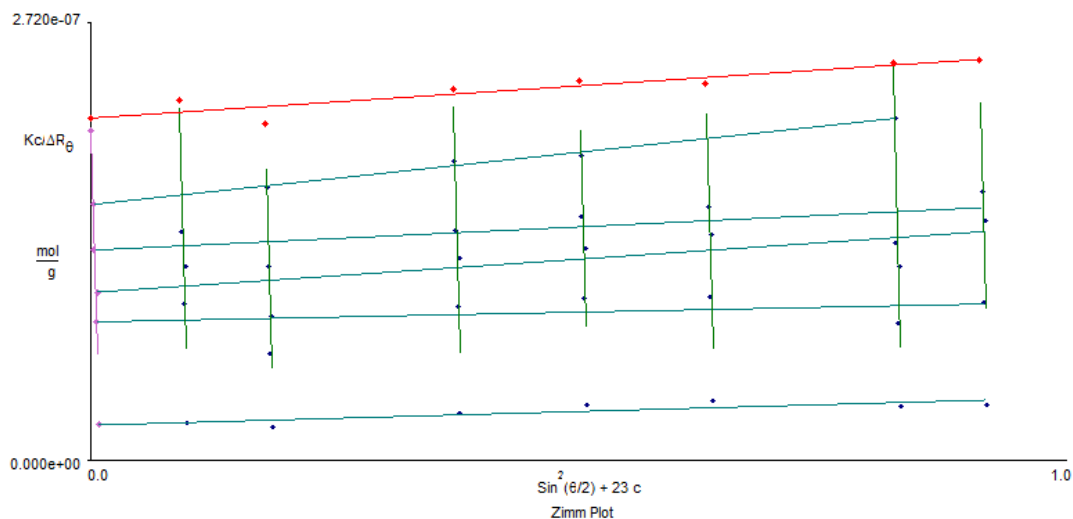


Σχήμα 9. Μεταβολή του A_2 virial συντελεστή των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την προσθήκη ασβεστίου στο 1 mM σε σχέση με τα 7,5 mM, σε σταθερό pH 6,7.

Ταυτόχρονη αύξηση με την γυροσκοπική ακτίνα παρατηρείται και στο A_2 virial συντελεστή (Σχήμα 9) όπου στις παραπάνω συγκεντρώσεις ασβεστίου που αναφέρθηκαν, αυξήθηκε από $3,47\text{E}-04 \text{ cm}^3\text{mol/g}^2$ σε $5,7\text{E}-04 \text{ cm}^3\text{mol/g}^2$. Το θετικό πρόσημο δείχνει ότι η σχετική υδροφοβικότητα της επιφάνειας των καζεϊνικών μικκυλίων μειώνεται ακόμα περισσότερο, λόγω του ότι τα υδρόφοβα τμήματα κρύβονται στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων, με αποτέλεσμα την δέσμευση ασβεστίου. Τέλος, η θερμοδυναμική συγγένεια των συσσωματωμάτων για το υδατικό μέσο αυξάνεται.

5.3.2. Σταθερή συγκέντρωση ασβεστίου 7,5 mM και μεταβολή pH από 6,7 σε 3.

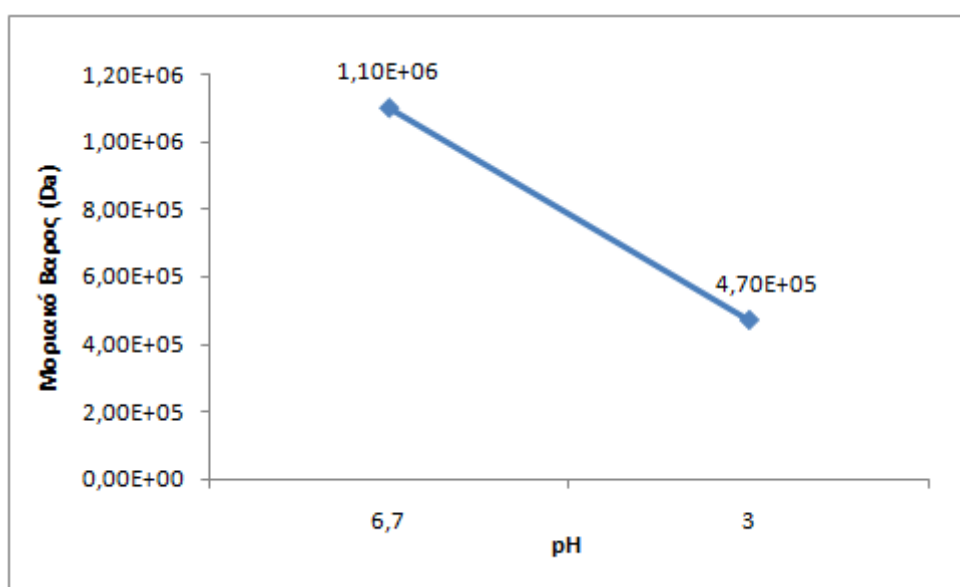
Στο σχήμα 10 απεικονίζεται ένα γράφημα Zimm που σχηματίζεται από τα αποτελέσματα της στατικής σκέδασης φωτός.



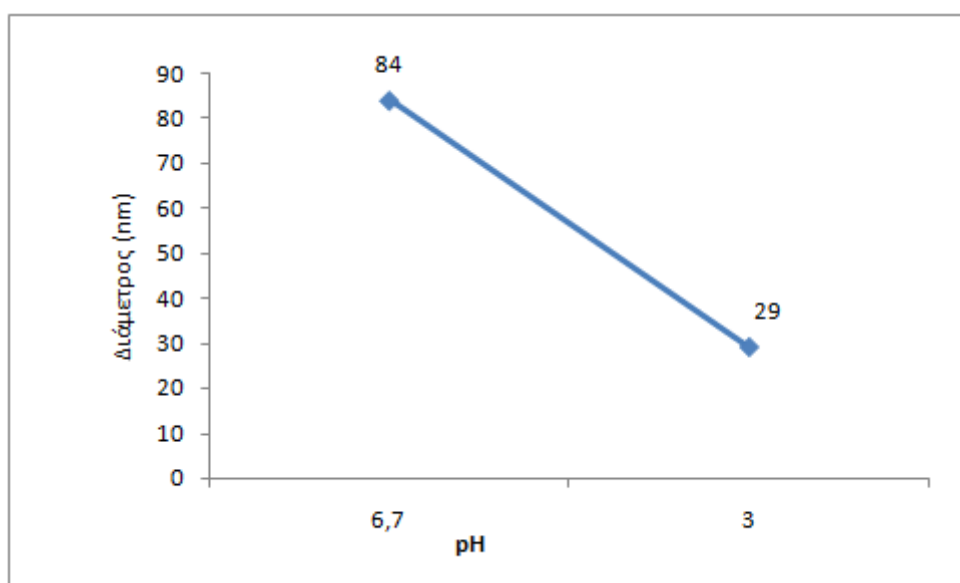
Σχήμα 10. Στατικό γράφημα Zimm των μετρήσεων σκέδασης φωτός για το καζεϊνικό νάτριο με προσθήκη ασβεστίου συγκέντρωσης 7,5 mM σε υδατικό μέσο(pH 3.0, 22°C). $C_1= 9,99 \times 10^{-2}$, $C_2=14,99 \times 10^{-2}$, $C_3=19,99 \times 10^{-2}$, $C_4=24,99 \times 10^{-2}$, $C_5=34,98 \times 10^{-2}$ g/ml.

Σύμφωνα με τη στατική σκέδαση φωτός (Zimmplot) παρατηρείται ότι κατά την μεταβολή του pH προκύπτει μείωση του μοριακού βάρους της γυροσκοπικής ακτίνας αλλά και του A_2 συντελεστή που αλλάζει πρόσημο από θετικό σε αρνητικό. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι η οξίνιση οδηγεί σε προοδευτική πρωτονίωση των οργανικών και ανόργανων φωσφορικών αλάτων και προκαλεί διάλυση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου (CCP) έως ότου όλα τα φωσφορικά διαλυτοποιηθούν σε $\text{pH} < 5,3$. Έτσι ο ρόλος του CCP, που είναι να συγκρατεί τα μικκύλια με το να συνδέεται με καζεΐνες μέσω των αρνητικών φορτίων των υπολειμμάτων της φωσφοσερίνης και να τα μετατρέψει σε άκαμπτες μορφές, χάνεται. Το αποτέλεσμα είναι να διαλύονται τα συσσωματώματα των καζεϊνικών μικκυλίων αφού δεν υποστηρίζονται πλέον από το CCP και να δημιουργούν μικρότερες μορφές που λόγω της οξίνισης κατακρημνίζονται, συνέπεια της μετουσίωσης των πρωτεϊνών με το pH να έχει μειωθεί κάτω από το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Αυτό θα μπορούσε να είναι μια καλή εξήγηση αλλά και προσομοίωση στο τι ακολουθεί κατά την άφιξη των πρωτεϊνών στο στομάχο του ανθρώπινου οργανισμού και τι μεταβολές επιφέρει το υδροχλωρικό οξύ στις πρωτεΐνες. Το σχήμα 10 δείχνει ένα γράφημα Zimm για το καζεϊνικό νάτριο σε συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου 7,5 mM.

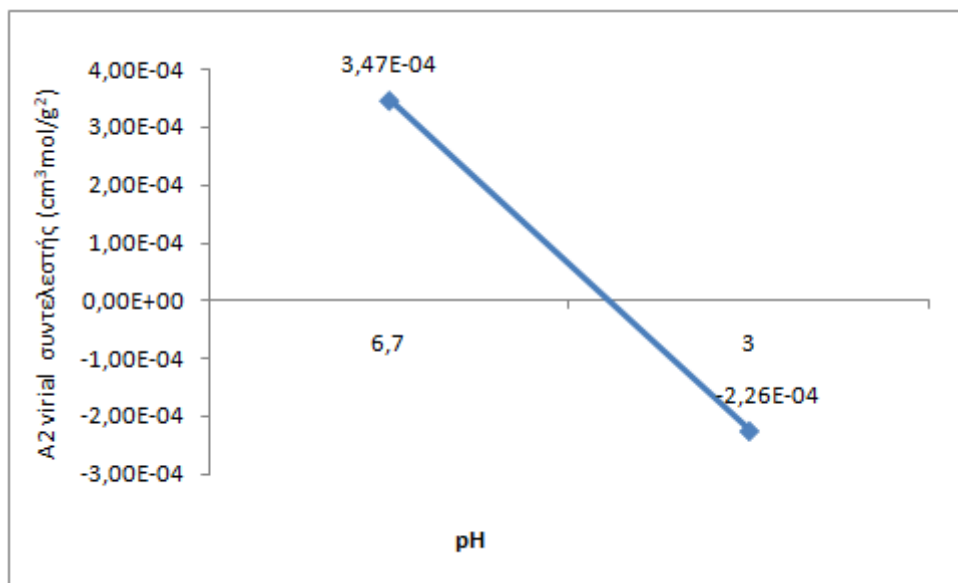
Ο A_2 virial συντελεστής αλλάζει πρόσημο λόγω της αύξησης των πρωτονίων από θετικό σε αρνητικό. Αυτό εξηγείται πιθανότατα λόγω της κατάρρευσης των συσσωματωμάτων των μικκυλίων με αποτέλεσμα την επανατοποθέτηση των υδρόφοβων τμημάτων των μικκυλίων στο εξωτερικό τους στρώμα και των υδρόφιλων στο εσωτερικό στρώμα απόρροια της κροκίδωσης των πρωτεϊνών. Στη παρούσα εργασία οι τιμή του A_2 virial συντελεστή μειώθηκε από $5,7E-04 \text{ cm}^3\text{mol/g}^2$ σε $-2,26E-04 \text{ cm}^3\text{mol/g}^2$, το μοριακό βάρος από $1,1E+07 \text{ g/mol}$ σε $4,7E+06 \text{ g/mol}$ και η γυροσκοπική ακτίνα από 85 nm σε $28,6 \text{ nm}$, όπως παρατηρείται και στα σχήματα 11, 12 και 13.



Σχήμα 11. Μεταβολή του μοριακού βάρους των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την μεταβολή του pH από 6,7 σε pH 3, σε σταθερή συγκέντρωση ασβεστίου (7,5 mM).



Σχήμα 12. Μεταβολή της γυροσκοπικής ακτίνας (R_G) των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την μεταβολή του pH από 6,7 σε pH 3, σε σταθερή συγκέντρωση ασβεστίου (7,5 mM).



Σχήμα 13. Μεταβολή του A_2 virial συντελεστή των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την μεταβολή του pH από 6,7 σε pH 3, σε σταθερή συγκέντρωση ασβεστίου (7,5 mM).

6. Συμπεράσματα

- Αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου σε καζεϊνικό διάλυμα μετά από 10 mM Ca προκαλεί αύξηση του αριθμού των συσσωματωμάτων των καζεϊνών με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους τους, ενώ κάτω από 10mM ασβεστίου παρατηρείται μικρό αριθμός συσσωματωμάτων και μειωμένο μέγεθος.
- Αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε καζεϊνικό διάλυμα προκαλεί αύξηση του μοριακού βάρους των καζεϊνικών μικκυλίων και της υδροδυναμικής ακτίνας.
- Η αύξηση της συσσωμάτωσης είναι αποτέλεσμα της εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων στην επιφάνεια των μικκυλίων και παρατηρείται με αύξηση του A_2 virial συντελεστή με θετικό πρόσημο.
- Η μεταβολή του pH από 6,7 σε 3 προκαλεί διάσπαση των δομών των καζεϊνικών μικκυλίων σε μικρότερες δομές με παράλληλη μείωση του μοριακού βάρους αλλά και αλλαγή του πρόσημου του A_2 virial συντελεστή από θετικό σε αρνητικό.

7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

1. Χρήση των καζεϊνικών μικκυλίων ως μέσο εγκλεισμού:
 - για περισσότερα υδρόφοβα και ευαίσθητα στην οξειδωση συστατικά με σκοπό την αύξηση της διατροφικής αξίας των προϊόντων
 - με σκοπό την αύξηση της περιεκτικότητας και της απόδοσης της δραστηριότητας ενός ή περισσότερων συστατικών σε φαρμακευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και την καταπολέμηση ασθενειών
 - με σκοπό την αύξηση του χρόνου ζωής των συστατικών που είναι ευαίσθητα στην οξειδωση από διάφορους παράγοντες
2. Εύρεση τεχνικών για τη παραγωγή καζεϊνικών μικκυλίων αλλά και της διαδικασίας εγκλεισμού ουσιών, με σκοπό τη μείωση του κόστους τους και την ένταξη τους στη βιομηχανική κλίμακα

8. Βιβλιογραφία

1. Abajo M., Gonzalez-Ferrero C., Moreno-Ruiz A., Romo-Hualde A., Gonzalez-Navarro C. (2013). Thermal protection of b-carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. *Food Chemistry* 138, 1581–1587
2. De Kort E. (2012). Influence of Calcium Chelators on Concentrated Micellar Casein Solutions: From Micellar Structure to Viscosity and Heat Stability. Wageningen University 152 pages.
3. Dickinson E., Semenova M.G., Belyakova L.E., Antipova A.S., Il'in M.M., Tsapkina E.N., & Ritzoulis C. (2001). Analysis of Light Scattering Data on the Calcium Ion Sensitivity of Caseinate Solution Thermodynamics: Relationship to Emulsion Flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science* 239, 87–97
4. Esmaili M., Ghaffari M. S., Moosavi-Movahedi Z., Atri M. S., Sharifzadeh A., Farhadi M., Yousefi R., Chobert J. M., Haertle T., Moosavi-Movahedi A. A. (2011). Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. *LWT - Food Science and Technology* 44, 2166-2172
5. Gebhardt R., Burghammer M., Riekkel C., Volkher Roth S., Muller-Buschbaum P. (2008). Structural Changes of Casein Micelles in a Calcium Gradient Film. *Macromol. Biosci.*, 347–354
6. Ghasemi S. & Abbasi S. (2014). Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound. *Food Hydrocolloids* 42, 42-47
7. Gonzalez-Jordan A., Thomar P., Nicolai T., Dittmer J. (2015). The effect of pH on the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution. *Food Hydrocolloids* 51, 88-94

8. Levine R., Mosoni L., Berlett B., & Stadtman E. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 93 (26), 15036
9. Loewen A., Chan B., Li- Chan E. C. Y. (2018). Optimization of vitamins A and D₃ loading in re-assembled casein micelles and effect of loading on stability of vitamin D₃ during storage. *Food chemistry* 240, 472-481
10. McMahon D. & Brown R. (1984). Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review. *J. Dairy Sci.* 67, 499-512
11. Pecora R. (2000). Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research* 2, 123-131
12. Pitkowski A., Nicolai T., Durand D. (2009). Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids* 23, 1164–1168
13. Semo E., Kesselman E., Danino D., Livney Y. (2007). Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids* 21, 936–942
14. Zhang S., Wang Z., & Xu S. (2008). Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(6), 521-527
15. Bachar M., Manderbaum A., Portnaya I., Perlstein H., Even- Chen S., Barenholz Y., Danino D. (2012). Development and characterization of a novel drug nanocarrier for oral delivery, based on self-assembled β -casein micelles. *Journal of Controlled Release* 160, 164–171
16. Haratifar S., Meckling K. A., Corredig M. (2014). Antiproliferative activity of tea catechins associated with casein micelles, using HT29 colon cancer cells. *Journal of dairy science* 97 (2), 672-678

17. Elzoghby A. O., Samy W. M., Elgindy N. A. (2013). Novel Spray-Dried Genipin-Crosslinked Casein Nanoparticles for Prolonged Release of Alfuzosin Hydrochloride. *Pharmaceutical research* 30 (2), 512-522
18. Zimet P., Rosenberg D., Livney Y. D. (2011). Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids* 25, 1270-1276