



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«In vitro χώνευση γαλακτωμάτων σταθεροποιημένα με καζεϊνικό νάτριο και
Tween 20»**

«In vitro Digestion of caseinate and Tween 20 Emulsions»

ΚΟΥΚΟΥΡΑ ΕΙΡΗΝΗ
ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΘΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019

«In vitro χώνευση γαλακτωμάτων σταθεροποιημένα με καζεϊνικό νάτριο και Tween 20»

«In vitro Digestion of caseinate and Tween 20 Emulsions»

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

Επιμέλεια:

Κούκουρα Ειρήνη

Παναγιωτοπούλου Μάρθα

Εισηγητής:

Ριτζούλης Χρήστος

Ευχαριστίες:

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον εισηγητή μας κ. Ριζούλη Χρήστο για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μας εργασίας. Επίσης, ευχαριστούμε για την πολύτιμη βοήθεια την κυρία Βασιλιάδου Χρυσή και τους κυρίους Πάυλου Αλέξανδρος, Καραγεωργίου Βασίλη και Φατούρος Δημήτριος που συνέβαλαν στην δημοσίευση της παρούσας πτυχιακής εργασίας σε επιστημονικό περιοδικό (Food Biophysics-2019).

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση των συνθηκών που επικρατούν σε ένα in-vitro ανθρώπινο πεπτικό σύστημα, στη σταθερότητα ενός γαλακτώματος ελαίου-σε-νερό το οποίο είναι σταθεροποιημένο με γαλακτωματοποιητή Tween 20 ή καζεϊνικό νάτριο σε pH 7. Κύριος σκοπός της μελέτης αυτής, ήταν η έρευνα της διεργασία χώνευσης ενός γαλακτώματος σε συνθήκες που προσομοιώνουν το στόματο-γαστρικό περιβάλλον. Έτσι λοιπόν δημιουργήθηκε ένα μοντέλο που προσομοιώνει τη διαδρομή που ακολουθεί ένα γαλάκτωμα μετά την είσοδο του στο στόμα έως την πέψη του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γαλακτώματα, σταθεροποιημένα με καζεϊνικό νάτριο, κροκιδώνονται και τελικά συγχωνεύονται. Τα αίτια της κροκίδωσης διαφέρουν από της συγχώνευσης: η κροκίδωση οφείλεται σε ηλεκτροστατικά φαινόμενα λόγω της μεταβολής του pH ενώ η συσσωμάτωση στην δράση της πεψίνης. Τέλος, σημειώθηκε ότι τα γαλακτώματα, σταθεροποιημένα με Tween 20, παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία στην δράση του pH και της πεψίνης.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	2
2.1.1 ΤΥΠΟΙ ΚΟΛΛΟΕΙΔΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ:	2
2.2 ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ:	2
2.2.2 ΑΠΟΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ:	4
2.2.2.1 Ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald Ripening)	5
2.2.2.2 Κρεμοποίηση / Αποκορύφωση (Creaming)	5
2.2.2.3 Συσσωμάτωση / Κροκίδωση (Flocculation)	6
2.2.2.4 Συγχώνευση (Coalescence)	6
2.2.2.5 Αναστροφή Φάσεων (Phase Inversion)	6
2.3 ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ	7
2.3.1 ΚΑΖΕΪΝΕΣ	8
2.3.2 ΤWEEEN 20	10
2.4 ΙN VITRO ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	11
2.4.1 ΣΤΟΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	11
2.4.2 ΣΤΟΜΑΧΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	13
2.4.3 ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	14
2.5 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΟΡΓΑΝΩΝ	16
2.5.1 ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (LIGHT SCATTERING)	16
2.5.1.1 Mastersizer 2000	16
2.5.1.2 Μέθοδος Bradford	17
2.5.1.3 Ζ δυναμικό	18
2.5.2 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	19
2.5.2.1 Συνεστιακό Μικροσκόπιο σάρωσης	20
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	21
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
4.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
4.1.1 ΥΛΙΚΑ	21
4.1.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	22
4.1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ	22
4.1.3.1 Παρασκευή γαλακτωμάτων	22
4.1.3.2 Παρασκευή γαστρικού μοντέλου	22
4.1.3.3 Προσομοίωση της χώνευσης	23
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	25
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	32
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	34

1. Εισαγωγή

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη μοντελοποίηση της γαστρεντερικής οδού του ανθρώπου. Η δομή ενός τροφίμου και η διάσπασή του είναι ένας από τους κύριους καθοριστικούς παράγοντες της βιοδιαθεσιμότητας των συστατικών των τροφίμων. Η απελευθέρωση των θρεπτικών ουσιών στην γαστρεντερική οδό, και επομένως η λειτουργικότητα των τροφίμων, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα δομικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, αν και υπάρχουν κενά στην κατανόηση των ακριβή μηχανισμών με τους οποίους αυτές επηρεάζουν τη λειτουργία του. Η πέψη λιπιδίων, διαλυτών σε λιπίδια θρεπτικών ουσιών και η βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών ενός γαλακτώματος συνδέονται στενά με τη δομή και τη σταθερότητα των καταναλωθέντων τροφίμων. Κατά συνέπεια, οι λειτουργικές ιδιότητες της πέψης λιπιδίων απαιτούν την κατανόηση της συμπεριφοράς των γαλακτωμάτων μέσω της γαστρεντερικής οδού.

Η πέψη ενός γαλακτώματος αρχίζει φυσικά με την εισαγωγή του στο στόμα και την ανάμειξή του με το σάλιο. Κατά κανόνα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός γαλακτώματος τροφής και του σάλιου σχετίζονται με την επαγωγή της κροκίδωσης, η οποία σχετίζεται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γλυκοπρωτεϊνών του σάλιου και των συστατικών των τροφίμων. Ανάλογα με το pH και το φορτίο του γαλακτωματοποιητή, η κροκίδωση μπορεί να προκληθεί είτε από ηλεκτροστατικά φαινόμενα είτε από φαινόμενα εξάντλησης. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να σχετίζονται με τα υγρά του στόματος. Δομές που δημιουργούνται με συσσωμάτωση διαφορετικά φορτισμένων πρωτεϊνών μπορούν να επηρεάσουν την *in vitro* πέψη γαλακτωμάτων. Η εξαρτώμενη από pH αλληλεπίδραση μεταξύ του φορτίου της γαλακτωματοποιητικής πρωτεΐνης και της μυξίνης σε όλες τις διαφορετικές τιμές του pH της γαστρεντερικής οδού μπορεί επίσης, να επηρεάσει τη σταθερότητα / αστάθεια των σταθεροποιημένων με πρωτεΐνη γαλακτωμάτων.

Σε συνέχεια των ανωτέρω, η εργασία αυτή αποσκοπεί στην απόκτηση πληροφοριών σχετικά με την εξάρτηση του φορτίου του γαλακτωματοποιητή και την εξέλιξη της κροκίδωσης και της συγχώνευσης στην παραμονή των γαλακτωμάτων σε όλα τα μέρη του γαστρεντερικού συστήματος. Πειράματα πέψης *in vitro* ρυθμίζονται με γαλακτώματα σταθεροποιημένα είτε με καζεϊνικό νάτριο είτε με Tween 20 παρουσία μυξίνης στα προσομοιωμένα γαστρεντερικά υγρά. Η πρόοδος των μεταβολών των φορτίων, της κροκίδωσης και της συγχώνευσης παρακολουθούνται συνεχώς κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των γαλακτωμάτων στα διάφορα στάδια του μοντέλου στόματος - στομάχου - εντέρου. Ο πρωταρχικός στόχος των πειραμάτων είναι να διερευνηθούν την εξάρτηση του γαλακτώματος και τις δομικές μεταβολές σε σχέση με τη δομή του φορτίου και του διεπιφανειακού στρώματος, καθώς επηρεάζονται από τις μεταβολές στο pH και το ιοντικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια του μοντέλου. Για να βοηθηθεί η τυποποίηση και η αναπαραγωγή των μετρήσεων, χρησιμοποιείται ως πειραματική πλατφόρμα πέψης ένα από τα πιο συνηθισμένα *in vitro* γαστρεντερικά μοντέλα, το μοντέλο πέψης InfoGest.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Κολλοειδή συστήματα:

Υπάρχουν τρεις μορφές μειγμάτων: τα διαλύματα, τα αιωρήματα και τα κολλοειδή. Το 1845 ο Francesco Selmi περιέγραψε για πρώτη φορά ως «ψευδοδιαλύματα» τα συστήματα διασποράς τα οποία δεν είναι αρκετά διαυγή, ώστε να θεωρηθούν ομογενή διαλύματα. Σήμερα, ως κολλοειδή ορίζονται τα συστήματα διασποράς στα οποία τα διεσπαρμένα σωματίδια είναι της τάξης των nm ή των λίπων μm. Τα σωματίδια αυτά παραμένουν διεσπαρμένα στον διαλύτη και δεν καταβυθίζονται. Κολλοειδή μπορούν να σχηματίσουν όλες οι καταστάσεις της ύλης εκτός από τον συνδυασμό αερίου – αερίου.

2.1.1 Τύποι κολλοειδών συστημάτων:

Η ταξινόμηση των κολλοειδών συστημάτων επιτυγχάνεται με την περιγραφή της συνεχούς φάσης (η φάση μέσα στην οποία διασπείρονται τα κολλοειδών διαστάσεων σωματίδια) και της διεσπαρμένης φάσης (η φάση η οποία είναι σε διασπορά, ως σωματίδια). Η περιγραφή της συνεχούς φάσης εμπεριέχει την φυσική της κατάσταση ενώ, της διεσπαρμένης φάσης την αντίστοιχη φυσική της κατάσταση, το σχήμα, το μέγεθος και τη διασπορά των σωματιδίων (φυσαλίδες, σταγονίδια, στερεά σωματίδια) καθώς και την πιθανή συσσωμάτωση τους.

Πίνακας 1: Κατηγορίες κολλοειδών συστημάτων με χαρακτηριστικά παραδείγματα (Ριτζούλης, 2015).

ΦΑΣΗ		Συνεχής		
		Στερεή:	Υγρή:	Αέρια:
Διεσπαρμένη	Στερεή:	Σαλάμια	Πηκτή	Καπνός
	Υγρή:	Βούτυρο	Γαλακτώματα	Ομίχλη
	Αέρια:	Ψωμί	Αφροί	

Κοινό χαρακτηριστικό των κολλοειδών συστημάτων είναι η πολύ μεγάλη επιφάνεια της διεσπαρμένης φάσης καθώς και η κίνηση Brown, μια συνεχής κίνηση των σωματιδίων οφειλόμενη στην ανισοτροπία της πίεσης στα τοιχώματά τους. Μικρές διακυμάνσεις στην θερμοκρασία περιμετρικά ενός σωματιδίου, οδηγούν στην εφαρμογή διαφορετικής πίεσης σε κάθε σημείο της επιφάνειάς του και κατ' επέκταση στην χαρακτηριστική άτακτη κίνηση του (Ριτζούλης, 2015).

2.2 Γαλακτώματα:

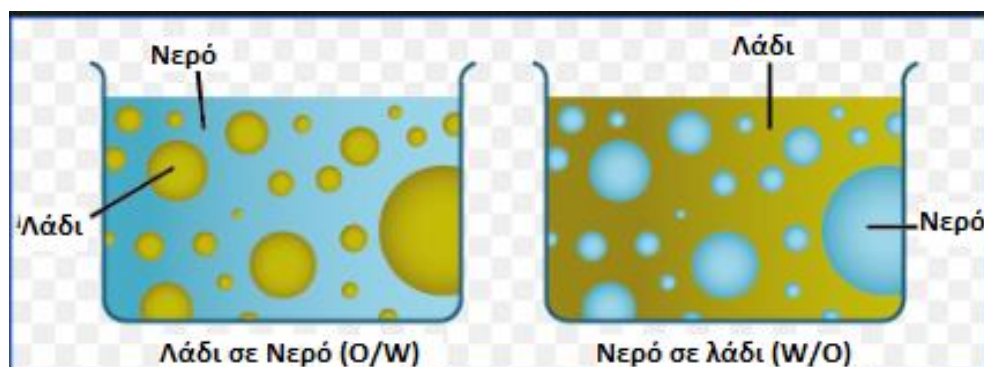
Ως γαλακτώμα, ορίζεται ένα κολλοειδές σύστημα το οποίο αποτελείται από δυο μη αναμίξιμα υγρά (συνήθως λάδι και νερό) με ένα από τα υγρά να διασπείρεται στο άλλο υπό

τη μορφή μικρών σφαιρικών σταγονιδίων. Η φυσική δομή ενός γαλακτώματος βασίζεται στο μέγεθος των σταγονιδίων. τα περισσότερα γαλακτώματα περιέχουν σταγονίδια με μέση διάμετρο μεγαλύτερη από περίπου 1 μm . Εν τούτοις, μπορούν να σχηματιστούν μικροσυστοιχίες και νανογαλακτώματα με μεγέθη σταγονιδίων στην περιοχή των 100-500 nm. Στα περισσότερα τρόφιμα, οι διάμετροι των σταγονιδίων βρίσκονται συνήθως μεταξύ 0,1- 100 μm (Dickinson, 1989; Spreight, 2017; Ριτζούλης, 2015).

2.2.1 Τύποι γαλακτωμάτων:

Τα γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες ανάλογα με τη σχετική κατανομή της λιπαρής και της υδατικής φάσης στο χώρο. Ένα σύστημα που αποτελείται από σταγονίδια ελαίου τα οποία διασπείρονται σε μια υδατική φάση ονομάζεται γαλάκτωμα ελαίου σε νερό (O/W), όπως είναι οι σάλτσες, η μαγιονέζα, τα ποτά και οι σουπές. Ενώ, ένα σύστημα που αποτελείται από σταγονίδια νερού, τα οποία είναι διεσπαρμένα σε μια ελαιώδη φάση ονομάζεται γαλάκτωμα νερού σε λάδι (W/O), όπως η μαργαρίνη και το βούτυρο. Η ουσία που αποτελεί τα σταγονίδια του γαλακτώματος αναφέρεται ως διασπορά, ασυνεχής ή εσωτερική φάση, ενώ η ουσία που αποτελεί το περιβάλλον υγρό ονομάζεται συνεχής ή εξωτερική φάση.

Εκτός από τα συμβατικά γαλακτώματα ελαίου σε νερό ή νερού σε λάδι που περιγράφονται παραπάνω, είναι επίσης δυνατόν να παρασκευαστούν διάφοροι τύποι πολλαπλών γαλακτωμάτων όπως λάδι-σε νερό – σε λάδι (O/W/O) ή νερό – σε λάδι – σε νερό (W/O/W). Για παράδειγμα, ένα γαλάκτωμα W/O/W αποτελείται από σταγονίδια νερού διεσπαρμένα εντός μεγαλύτερων σταγονιδίων λαδιού, τα οποία είναι διεσπαρμένα σε μια συνεχή υδατική φάση. Τέτοιου είδους γαλακτώματα βρίσκουν αυξανόμενη χρήση στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των πλεονεκτημάτων τους έναντι των συμβατικών γαλακτωμάτων (Benichou et al., 2004; Spreight 2017).

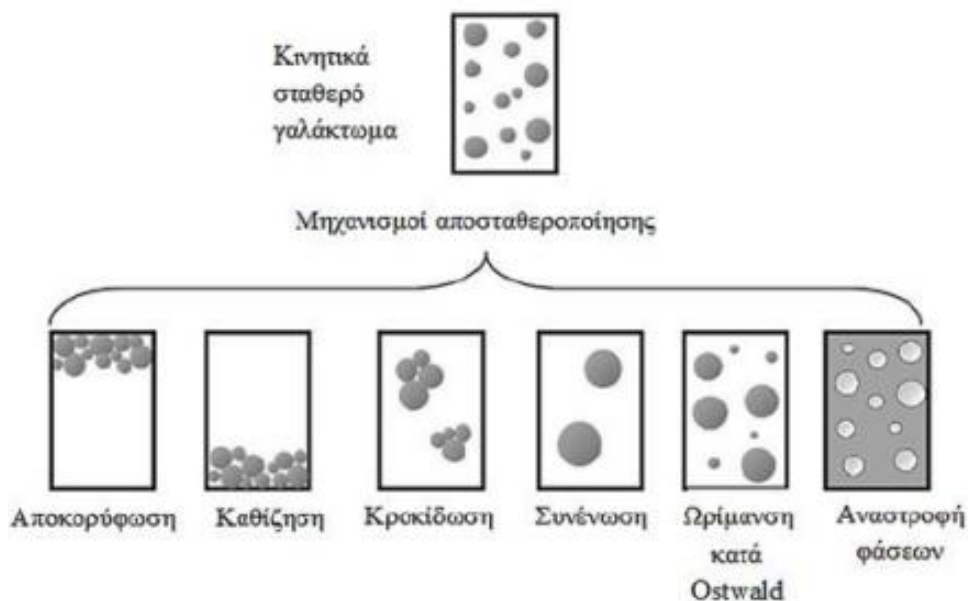


Σχήμα 1: Τύποι γαλακτωμάτων (<http://altus.mx/metadatos.html>).

Για τον σχηματισμό ενός γαλακτώματος σημαντική επίδραση έχει η διεπιφάνεια, δηλαδή η επιφάνεια που διαχωρίζει την υδατική φάση από τη φάση του ελαίου. Στα συστήματα ελαίου σε νερό, τα μη-πολικά μόρια του ελαίου δεν μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού, λόγω του υψηλού υδρόφοβου χαρακτήρα τους, με αποτέλεσμα τα δυο υγρά να μην μπορούν να αναμιχθούν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων του ελαίου, που είναι διασκορπισμένα στο νερό, με σκοπό να ελαττωθεί η επιφάνεια επαφής τους με το νερό, δηλαδή η διεπιφάνεια, και επομένως ο αριθμός των ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων των δύο φάσεων. Όσο λιγότερο αναμίξιμα είναι τα δυο υγρά τόσο πιο μεγάλη είναι η διεπιφανειακή τάση και άρα τόσο πιο μεγάλη είναι η απαιτούμενη ποσότητα ενέργειας για την επίτευξη της κατάστασης ισορροπίας στο γαλάκτωμα. Η ενέργεια που απαιτείται ώστε τα σωματίδια της ασυνεχούς φάσης να διατμηθούν σε μικρότερα σωματίδια, προκαλώντας έτσι αύξηση του εμβαδού της διεπιφάνειας ανάμεσα στα δυο μη αναμίξιμα υγρά, παρέχεται κατά την έντονη ανάδευση του συστήματος με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων συσκευών, όπως είναι οι ομογενοποιητές με πίεση ή υπερήχους κ.α. Η μείωση της απαιτούμενης ποσότητας ενέργειας επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο σύστημα κατάλληλων ουσιών, των γαλακτωματοποιητών, οι οποίοι προκαλούν μείωση της διεπιφανειακής τάσης.

2.2.2 Αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων:

Ο όρος «σταθερότητα γαλακτωμάτων» αναφέρεται στην ικανότητα που έχουν αυτά να αντιστέκονται στις αλλαγές των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, οι οποίες προκαλούνται με την πάροδο του χρόνου. Οι ιδιότητες των πιο σταθερών γαλακτωμάτων αλλάζουν με πιο αργούς ρυθμούς. Διάφοροι τύποι φυσικών και χημικών αιτιών μπορούν να καταστήσουν ασταθές ένα γαλάκτωμα. Στη φυσική αστάθεια μεταβάλλεται η κατανομή του χώρου ή η οργάνωση της δομής των μορίων, ενώ στη χημική αστάθεια λαμβάνει χώρα μετατροπή της χημικής δομής των μορίων. Παραδείγματα φυσικής αστάθειας είναι η κρεμοποίηση, η κροκίδωση, η συνένωση, ενώ η οξειδωση και η υδρόλυση είναι κοινά παραδείγματα χημικής αστάθειας. Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα, δεδομένου ότι η ανάμιξη νερού και ελαίου δεν ευνοείται ενεργειακά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο συνολικός αριθμός, τα μεγέθη και η διευθέτηση στο χώρο των σταγονιδίων να μεταβάλλονται, έστω και ανεπαίσθητα, με την πάροδο του χρόνου (McClements, 2005; Ribons, 1998).



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων (McClements, 2005).

2.2.2.1 Ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald Ripening)

Το φαινόμενο παρατηρείται λόγω διαφοράς στη διεπιφανειακή ελεύθερη ενέργεια μεταξύ ενός μικρού κι ενός μεγαλύτερου λιποσφαιρίου. Συγκεκριμένα, μόρια των μικρότερων λιποσφαιρίων διαχέονται στη συνεχή φάση του γαλακτώματος και συνενώνονται με μεγαλύτερα λιποσφαίρια, τα οποία είναι ενεργειακά σταθερότερα λόγω μικρότερου λόγου επιφάνειας προς όγκο. Για να λάβει χώρα το φαινόμενο αυτό, θα πρέπει το έλαιο να είναι σε σημαντικό βαθμό διαλυτό στη συνεχή φάση γι αυτό είναι σπάνιο σε γαλακτώματα τύπου ο/w (McClements, 2005).

2.2.2.2 Κρεμοποίηση / Αποκορύφωση (Creaming)

Τα λιποσφαιρίδια του γαλακτώματος έχουν μικρότερη πυκνότητα από αυτή της υδατικής φάσης και έτσι έχουν την τάση να κινούνται ανοδικά χωρίς να παρατηρείται κάποια μεταβολή στο μέγεθός τους. Στα γαλακτώματα ελαίου σε νερό με την πάροδο του χρόνου διακρίνονται δύο ξεχωριστές στοιβάδες, μια υδατική και μια εμπλουτισμένη με σταγονίδια ελαίου. Το φαινόμενο αυτό είναι αντιστρεπτό, καθώς με απλή ανάδευση επιτυγχάνεται ομοιόμορφη ανακατανομή των λιποσφαιριδίων σε όλο τον όγκο του γαλακτώματος.

Ο βαθμός συσσωμάτωσης και η πολυδιασπορά του μεγέθους των λιποσφαιριδίων επιδρούν σημαντικά στην ταχύτητα της κρεμοποίησης του γαλακτώματος. Τα συσσωματώματα είναι μη ομοιογενή σφαιρίδια που συμπεριφέρονται ως σωματίδια μεγάλης διαμέτρου και κινούνται ταχύτερα από τα μεμονωμένα λιποσφαιρίδια μικρότερου

μεγέθους συμπαρασύροντάς τα προς τα πάνω. Έτσι επιταχύνεται το φαινόμενο της κρεμοποίησης (McClements, 2005).

2.2.2.3 Συσσωμάτωση / Κροκίδωση (Flocculation)

Η κροκίδωση είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια ενώνονται χωρίς όμως να χάνουν το σχήμα και το μέγεθός τους. Κροκίδωση παρατηρείται σε ένα γαλάκτωμα όταν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των λιποσφαιρίων (δυνάμεις Van der Waal's, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις εξασθένησης, βαρύτητα, κίνηση Brown) υπερिशύουν των απωστικών (ηλεκτροστατικές, πολυμερικές δυνάμεις). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός αποσταθεροποίησης είναι αρκετά συχνός στα γαλακτώματα τύπου ο/ω. Επιδρά εμφανώς στη δομή του γαλακτώματος, ευνοεί φαινόμενα αποκορύφωσης και συνένωσης και παράλληλα είναι δύσκολο να ελεγχθεί. Κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την έκταση της συσσωμάτωσης είναι: το κλάσμα όγκου του ελαίου, ο λόγος πρωτεΐνη/έλαιο (για γαλακτώματα στα οποία χρησιμοποιείται πρωτεΐνη ως γαλακτωματοποιητής), η μέση διάμετρος των λιποσφαιρίων, η θερμοκρασία, το pH, η ιονική ισχύς και η συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (McClements, 2005).

2.2.2.4 Συγχώνευση (Coalescence)

Η συγχώνευση περιλαμβάνει τη διάσπαση του διεπιφανειακού υμενίου και τη συνένωση στη συνέχεια δύο ή περισσότερων λιποσφαιριδίων προς λιποσφαιρίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία η οποία οδηγεί τελικά σε ολική κατάρρευση του γαλακτώματος και διαχωρισμό των δύο φάσεων, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μακροσκοπικά η δημιουργία ελαιώδους στοιβάδας στο πάνω μέρος του γαλακτώματος. Το φαινόμενο της συγχώνευσης εμφανίζεται κυρίως σε γαλακτώματα με λιποσφαιρίδια που έχουν παραμείνει συσσωματωμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Robins, 1998).

2.2.2.5 Αναστροφή Φάσεων (Phase Inversion)

Η αναστροφή φάσεων είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα σύστημα μετατρέπεται από γαλάκτωμα τύπου έλαιο-σε-νερό σε γαλάκτωμα τύπου νερό-σε-έλαιο, ή αντίστροφα. Η μετατροπή της διεσπαρμένης φάσης στη συνεχή (και αντίστροφα) είναι επιθυμητή διαδικασία στην παραγωγή τροφίμων όπως το βούτυρο και η μαργαρίνη, αλλά είναι ανεπιθύμητη σε άλλα προϊόντα όταν επηρεάζει τη σταθερότητα, την υφή και την εμφάνισή τους. Η αναστροφή φάσεων προκαλείται συνήθως από κάποια μεταβολή στη σύνθεση του γαλακτώματος ή στις συνθήκες του συστήματος διασποράς, όπως για παράδειγμα στο κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης, τον τύπο και τη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή, τη θερμοκρασία ή μετά από μηχανική ανάδευση (McClements, 2005).

2.3 Γαλακτωματοποιητές

Ο όρος γαλακτωματοποιητής αναφέρεται σε οποιαδήποτε επιφανειοδραστική ουσία η οποία μπορεί να προσροφηθεί στη διεπιφάνεια ελαίου-ύδατος και να αναστείλει την αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος. Συγκεκριμένα, ως γαλακτωματοποιητής ορίζεται μία οργανική ουσία η οποία έχει την ιδιότητα να μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ ελαίου-νερού, διευκολύνοντας έτσι τη γαλακτωματοποίηση και παράλληλα να αυξάνει τη σταθερότητα του γαλακτώματος.

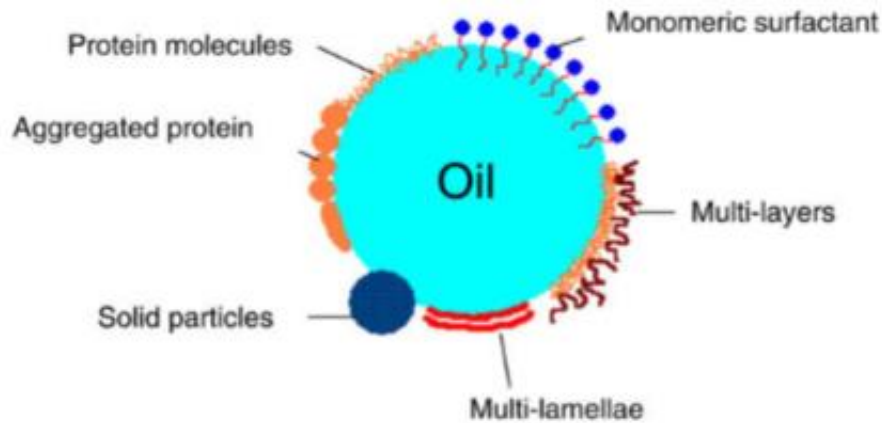
Οι γαλακτωματοποιητές είναι αμφίφιλα μόρια, αποτελούνται δηλαδή από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα και για το λόγο αυτό δεν είναι απόλυτα διαλυτά ούτε στη λιπαρή ούτε στην υδατική φάση. Σε ένα γαλάκτωμα, το λιπόφιλο (υδρόφοβο) τμήμα του μορίου στρέφεται προς το λιπιδικό (μη πολικό) περιβάλλον, ενώ το υδρόφιλο προς το υδατικό (πολικό). Το λιπόφιλο τμήμα είναι συνήθως μια επιμήκης αλυσίδα λιπαρών οξέων, ενώ το υδρόφιλο μπορεί να είναι ανιονικού, αμφοτερικού (π.χ. λεκιθίνη), κατιονικού ή μη ιονικού χαρακτήρα. Στη βιομηχανία τροφίμων, οι πιο κοινοί γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται είναι αμφίφιλες πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Τα συστατικά αυτά χρησιμοποιούνται για να αυξήσουν το ιξώδες της συνεχούς φάσης των γαλακτωμάτων και ενισχύουν τη σταθερότητά τους με επιβράδυνση της κίνησης των σταγονιδίων. Για την αύξηση του ιξώδους της σταθερής φάσης των γαλακτωμάτων χρησιμοποιούνται πολυσακχαρίτες ως γαλακτωματοποιητές (Χαμαλάκη, 2016).

Ο βαθμός προσρόφησης ενός γαλακτωματοποιητή στη διεπιφάνεια είναι καθοριστικής σημασίας για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση ενός γαλακτώματος. Υπάρχουν πολλοί γαλακτωματοποιητές οι οποίοι κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες: α) τους συνθετικούς γαλακτωματοποιητές (ή surfactants), και β) τις πρωτεΐνες. Ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τη μοριακή δομή τους, εμφανίζουν διαφορετικό μηχανισμό προσρόφησης (Κέντα, 2011).

Τα λιποσφαίρια μέσα σε ένα γαλάκτωμα βρίσκονται σε διαρκή κίνηση, κάτω από την επίδραση της βαρύτητας, της θερμικής ενέργειας ή της μηχανικής δύναμης, με αποτέλεσμα να έρχονται συνεχώς σε επαφή με τα γειτονικά τους. Η σταθερότητα και η διάρκεια ζωής (shelf life) του γαλακτώματος καθορίζεται από την ανθεκτικότητα του υμενίου του γαλακτωματοποιητή. Τα μεγάλα μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, σχηματίζουν ανθεκτικότερα υμένια και αλληλεπιδρούν με άλλες ομάδες στο ίδιο μόριο ή σε άλλα. Αντίθετα, οι μικρού μοριακού βάρους γαλακτωματοποιητές συνήθως δε σχηματίζουν σταθερά διεπιφανειακά υμένια και η χρηστική του αξία περιορίζεται στη μείωση της διεπιφανειακής τάσης. Συνοψίζοντας, ένας αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής θα πρέπει να πληρεί τις εξής προϋποθέσεις:

1. Να προσροφάται στη διεπιφάνεια νερού/ελαίου και να προκαλεί ταχεία μείωση της διεπιφανειακής τάσης, ώστε να διευκολύνεται ο σχηματισμός του γαλακτώματος.

2. Να σχηματίζει ένα προστατευτικό υμένιο γύρω από τα λιποσφαίρια και να αποτρέπει ή να καθυστερεί την εμφάνιση φαινομένων κροκίδωσης και συνένωσης (Χαμαλάκη, 2016).



Σχήμα 3: Συστατικά τροφίμων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να σταθεροποιήσουν τα γαλακτώματα μέσω δημιουργίας προσροφημένης επιφάνειας (Singh et al., 2008).

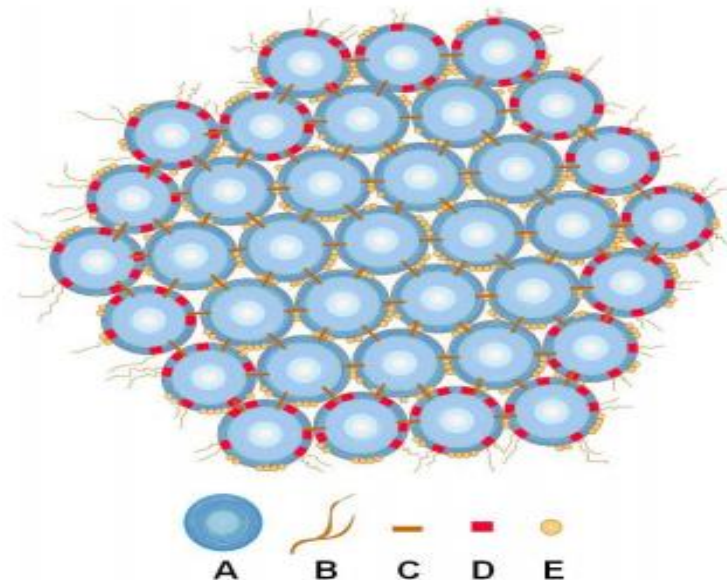
Στα περισσότερα γαλακτώματα τροφίμων, τα σταγονίδια επικαλύπτονται από ένα στρώμα προσροφημένων υλικών, κυρίως πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων και γαλακτωματοποιητών χαμηλού μοριακού βάρους, όπως μονοακυλογλυκερόλες και διάφορα είδη εστέρων λιπαρών οξέων. Οι φυσικές ιδιότητες των προσροφημένων στρωμάτων εξαρτώνται από τους τύπους, τις ποσότητες, τις δομές και τις αλληλεπιδράσεις των προσροφημένων υλικών. Σχετικά απλές προσροφημένες στρώσεις μπορούν να σχηματιστούν με γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους, όπου αυτά τα μόρια, που περιέχουν τόσο πολικές όσο και μη πολικές περιοχές, προσανατολίζονται στη διεπαφή με τέτοιο τρόπο ώστε οι μη πολικές ουρές να παραμένουν σε επαφή με την ελαιώδη φάση και οι πολικές κεφαλές έρχονται σε επαφή με την υδατική φάση. Με προσρόφηση στη διεπιφάνεια, οι γαλακτωματοποιητές μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος και συνεπώς την διεπιφανειακή τάση. Η κύρια θερμοδυναμική κινητήρια δύναμη είναι η αφαίρεση των υδρόφοβων ομάδων από το δυσμενές περιβάλλον της μαζικής υδατικής φάσης με την μετατόπιση των δομημένων μορίων ύδατος από την κοντινή γειτονία της διεπαφής (Singh et al., 2011).

2.3.1 Καζεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα αμφίφιλα βιομόρια που αποτελούνται από επιμήκεις αλυσίδες αμινοξέων τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς. Κατά το σχηματισμό ενός πολυπεπτιδίου (πρωτεΐνης), η αλυσίδα των αμινοξέων περιελίσσεται στο χώρο με τέτοιο τρόπο ώστε οι υδρόφοβες πλευρικές ομάδες να είναι προσανατολισμένες προς το εσωτερικό του μορίου, ενώ οι υδρόφιλες προς το εξωτερικό. Πολλές πρωτεΐνες είναι

επιφανειοδραστικά μόρια που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές εξαιτίας της ιδιότητάς τους να διευκολύνουν τη γαλακτωματοποίηση, να βελτιώνουν τη σταθερότητα και να προσδίδουν επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες σε γαλακτώματα τύπου έλαιο σε νερό. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες προσροφώνται στις επιφάνειες των λιποσφαιρίων που έχουν προκύψει από την ομογενοποίηση του μίγματος έλαιο-νερό-πρωτεΐνη και συμβάλλουν στην περαιτέρω διάσπαση των λιποσφαιρίων με μείωση της διεπιφανειακής τάσης. Παράλληλα, καθυστερούν τη συνένωσή τους σχηματίζοντας προστατευτικές μεμβράνες που περιβάλλουν τα λιποσφαίρια (Lam et al., 2013).

Οι καζεΐνες (όπως το καζεϊνικό νάτριο ή οι καθαρές πρωτεΐνες) έχουν εύκαμπτες δομές, δηλ. Δεν περιέχουν πολύ άκαμπτη δομή α -έλικας και β -πτυχωτού φύλλου. Ως αποτέλεσμα, προσροφούνται γρήγορα στη διεπιφάνεια, σχηματίζοντας εκτεταμένες προσροφημένες στρώσεις μέχρι πάχους περίπου 10 nm. Οι καζεΐνες, λόγω της φωσφορυλιωμένης και αμφιφιλικής τους δομής, εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν σε υδατικά διαλύματα, παρουσία Ca^{2+} , σχηματίζοντας ενυδατωμένα σφαιρικά συστήματα, γνωστά ως μικκύλια. Οι δυνάμεις που συγκρατούν τα διάφορα είδη καζεϊνών ενωμένα σε αυτή τη δομή είναι κυρίως υδρόφοβες. Στο γεγονός, όμως, ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες η δομή των μικκυλίων δεν καταστρέφεται είναι ενδεικτικό ότι και άλλα είδη δεσμών συμμετέχουν στο σχηματισμό τους. Η παρουσία, στην επιφάνεια των σχηματιζόμενων μικκυλίων, της κ-καζεΐνης εμποδίζει τη συσσωμάτωσή τους λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Επιπλέον, οι καζεΐνες που βρίσκονται με τη μορφή μικκυλίων εμφανίζουν μεγάλη θερμική σταθερότητα σε σύγκριση με την πλειοψηφία των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα (Singh et al., 2011; Κέντα, 2011).

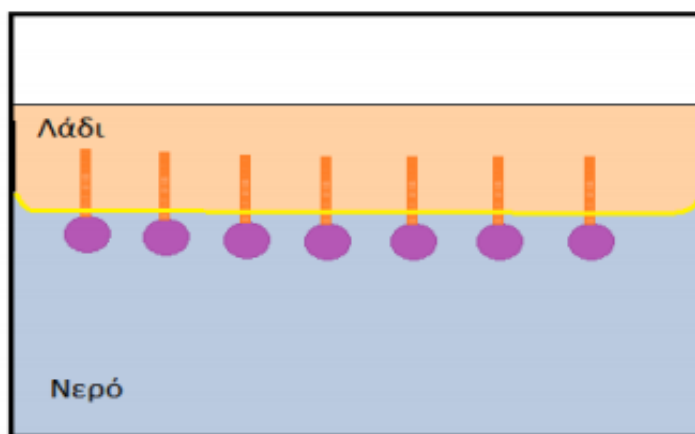


Σχήμα 4: Μικκύλιο καζεϊνης. A: υπομικκύλιο, B: προεξοχές αλυσίδας, C: φωσφορικό ασβέστιο, D: κ-καζεΐνη, E: φωσφορικές ομάδες (Κέντα, 2011).

2.3.2 Tween 20

Το Tween 20 (ή πολυσορβικό 20) ανήκει στην κατηγορία των συνθετικών γαλακτωματοποιητών. Οι συνθετικοί γαλακτωματοποιητές είναι επιφανειοδραστικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα είναι μικρά αμφίφιλα μόρια τα οποία φέρουν μια υδρόφιλη ομάδα στο ένα άκρο («κεφαλή») και μια υδρόφοβη ομάδα στο άλλο άκρο («ουρά»). Στο υδρόφοβο τμήμα τους αποτελείται συνήθως από μια ή περισσότερες ανθρακικές αλυσίδες 10 έως 20 ατόμων άνθρακα. Οι αλυσίδες αυτές μπορεί να είναι είτε κορεσμένες είτε ακόρεστες, ενώ συνήθως είναι αλειφατικές. Στο υδρόφιλο τμήμα τους διαφοροποιείται και, ανάλογα με τη φύση του, οι γαλακτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους διακρίνονται σε ανιονικούς, κατιονικούς και ουδέτερους. Οι κατιονικοί έχουν συνήθως βακτηριοκτόνο, τοξική δράση και δεν ενδείκνυνται ως πρόσθετα τροφίμων. Οι μη ιονικοί είναι ανθεκτικοί σε μεταβολές του pH και τη συγκέντρωση αλάτων στην υδατική φάση, ενώ η λειτουργικότητα των ιονικών επηρεάζεται από το pH και την ιονική ισχύ.

Η γαλακτωματοποιητική ικανότητα των μορίων αυτών οφείλεται, όπως και στην περίπτωση των πρωτεϊνών, στην αμφιφιλική τους δομή. Παρόλα αυτά, όμως, ο μηχανισμός προσρόφησης των γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους στη διεπιφάνεια, είναι διαφορετικός από αυτόν των πρωτεϊνών. Τα πολυσορβικά και οι εστέρες σακχαρόζης είναι και οι μη ιονικοί γαλακτωματοποιητές που παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα προϊόντα διατροφής. Τα πολυσορβικά παράγονται με αντίδραση περίπου 20 moles αιθυλενοξειδίου με ένα ισοδύναμο μοριακού βάρους εστέρα σορβιτάνης. Λόγω της παρουσίας της προκύπτουσας μακράς αλυσίδας πολυοξαιθυλενίου, είναι οι πιο υδρόφιλοι γαλακτωματοποιητές μεταξύ των μη ιονικών τύπων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, στην περίπτωση των γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους, οι υδρόφιλες και υδρόφοβες ομάδες βρίσκονται στα άκρα των μορίων σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε όλο το μόριο. Για το λόγο αυτό δεν υφίστανται παρεμποδίσεις στην προσρόφηση με αποτέλεσμα να προσροφώνται με τη μορφή ενός μονομοριακού στρώματος στο οποίο η υδρόφιλη «ουρά» εκτείνεται προς την υδατική φάση ενώ το υδρόφοβο τμήμα προς τη φάση του ελαίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων, καθώς και τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης, γεγονός που διευκολύνει το σχηματισμό του γαλακτώματος. Μετά την προσρόφηση στη διεπιφάνεια, ο γαλακτωματοποιητής πρέπει να σταθεροποιήσει το σύστημα εμποδίζοντας τη συσσωμάτωση των λιποσφαιριδίων. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό διαφοροποιείται ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκει ο γαλακτωματοποιητής. Έτσι, μπορεί να σταθεροποιεί το γαλάκτωμα είτε με το να παρέχει σε όλα τα λιποσφαιρίδια το ίδιο ηλεκτρικό φορτίο (ανιονικός), είτε με το σχηματισμό ενός πολυστρωματικού διεπιφανειακού υμενίου (αντί ενός μονοστρωματικού), είτε λόγω στερεοχημικών αλληλεπιδράσεων και άλλων απωστικών δυνάμεων (ουδέτερος) (Anarjan et al., 2013; Κέντα 2011).



Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση της προσρόφησης του γαλακτωματοποιητή στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού (Κέντα, 2011).

2.4 In vitro προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος

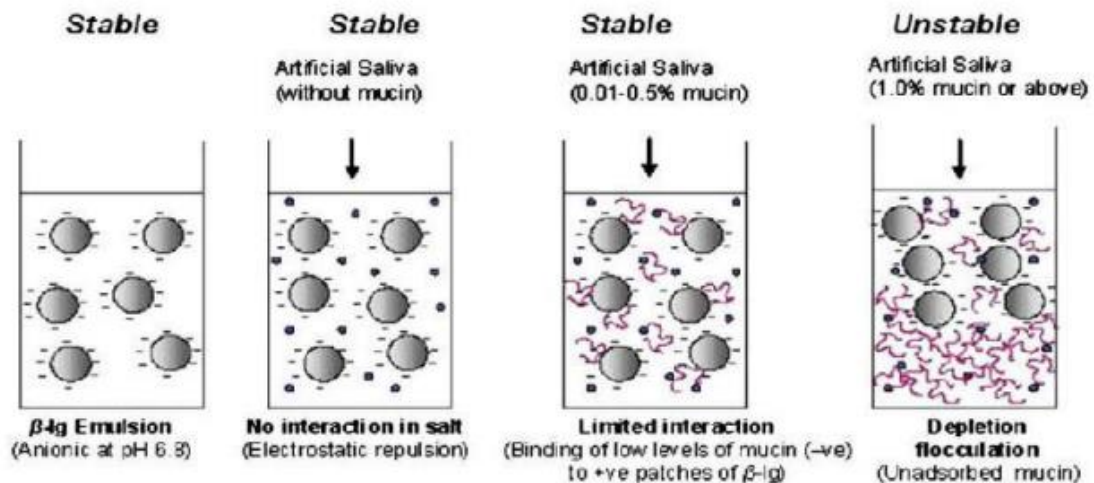
2.4.1 Στοματικές συνθήκες

Η διαδικασία κατάποσης ενός υγρού τροφίμου όπως τα γαλακτώματα αποτελείται από δύο διακριτά στάδια: Αρχικά το υγρό συσσωρεύεται στο στοματικό πρόσθιο και έπειτα η άκρη της γλώσσας αγγίζει τον ουρανίσκο, προκαλώντας μια παλμική κίνηση που είναι υπεύθυνη για την κατάποση της τροφής. Κατά τη διάρκεια αυτού του μηχανισμού, η υγρή τροφή αλληλεπιδρά με το σάλιο της στοματικής κοιλότητας και αποδίδει την αίσθηση της γεύσης, που τυπικά αποτελείται από χημικά και μηχανικά ερεθίσματα. Το σάλιο αποτελείται από 99,5% νερό, γλυκοπρωτεΐνες κυρίως βλέννα, ανόργανα συστατικά και ένζυμα ενώ, το pH του κυμαίνεται μεταξύ 5,6 -7,6.

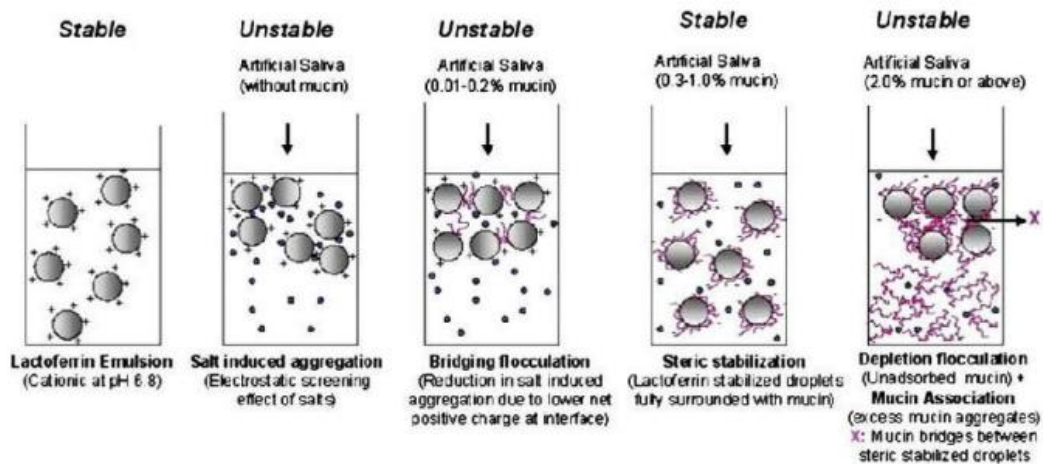
Κατά την κατάποση, τα γαλακτώματα εκτίθενται σε μια σειρά από μεταβολές, που οφείλονται στην ανάμειξη τους με το σάλιο και στην αλληλεπίδραση τους με σιαλικά ένζυμα όπως οι αμυλάσες, διάφορα βιοπολυμερή όπως η μυξίνη, οι πρωτεΐνες της βλεννογόνου και τα άλατα διαφορετικής ιοντικής ισχύος. Οι αντιδράσεις ενός γαλακτώματος με το σάλιο έχουν συσχετιστεί με την επαγωγή της κροκίδωσης, η οποία σχετίζεται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βλεννικών γλυκοπρωτεϊνών του σάλιου (μυξίνη) και των συστατικών των τροφίμων. Η μυξίνη φαίνεται να είναι ύψιστης σημασίας λόγω του αρνητικού φορτίου της σε ουδέτερο περιβάλλον. Ανάλογα με το pH και το φορτίο του γαλακτωματοποιητή, η κροκίδωση μπορεί να προκληθεί είτε από ηλεκτροστατικά φαινόμενα (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του διεπιφανειακού στρώματος των σταγονιδίων και των πρωτεϊνών του σιέλου) είτε από φαινόμενα εξάντλησης (δυνάμεις van der Waals).

Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την ανάμειξη τους με το σάλιο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το φορτίο που φέρουν τα σταγονίδια του γαλακτώματος. Τα γαλακτώματα που έχουν υψηλή τιμή αρνητικού φορτίου δεν παρουσιάζουν κροκίδωση

επειδή οι ηλεκτροστατικές απώσεις παρεμποδίζουν τα σταγονίδια να πλησιάσουν μεταξύ τους. Γαλακτώματα με ελαφρώς αρνητικό ή ουδέτερο φορτίο υπόκεινται σε αντιστρεπτή οσμωτική κροκίδωση, λόγω της παρουσίας της μυξίνης και της συγκέντρωσης στην οποία βρίσκεται αυτή στο σύστημα ή των συμπλόκων που σχηματίζονται στο σάλιο. Τέλος, στα θετικά φορτισμένα γαλακτώματα συμβαίνει κροκίδωση γεφύρωσης, μέσω της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ των πρωτεϊνών του σιέλου και των φορτισμένων σταγονιδίων του γαλακτώματος. Έτσι, η κροκίδωση των γαλακτωμάτων στο στόμα επηρεάζει την υφή, τις ρεολογικές και τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Παρακάτω, στα σχήματα 6 και 7, παρουσιάζονται οι μεταβολές που υφίσταται ένα κατιονικό και ένα ανιονικό γαλακτώμα όταν βρίσκονται υπό στοματικές συνθήκες (Lykouroulou et al., 2017; Serkar et al., 2009; Singht et al., 2011).



Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολών που υφίσταται ένα ανιονικό γαλακτώμα, που είναι σταθεροποιημένο με β-λακτογλοβουλίνη, το οποίο εκτίθεται σε στοματικό περιβάλλον απουσία και παρουσία μυξίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (Sarkar et al., 2009).



Σχήμα 7: Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολών που υφίσταται ένα ανιονικό γαλάκτωμα, που είναι σταθεροποιημένο με λακτοφερίνη, το οποίο εκτίθεται σε στοματικό περιβάλλον απουσία και παρουσία μυξίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (Sarkar et al., 2009).

2.4.2 Στομαχικές συνθήκες

Ο βώλος των τροφίμων περνάει μόνο λίγο χρόνο στο στόμα πριν ξεπεράσει τον οισοφάγο και εισέλθει στο στομάχι. Η έκθεση του γαλακτώματος στους όξινους γαστρικούς χυμούς μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της κολλοειδούς σταθερότητας μέσω ηλεκτροστατικής άπωσης και καθώς οι πρωτεΐνες προσεγγίζουν το ισοηλεκτρικό σημείο τους. Το pH του στομάχου κυμαίνεται στο 1,9-2 και η οσμωτικότητα και η ιοντική ισχύ κυμαίνονται από 100 έως 200 mOsm / kg και 150 mM αντίστοιχα, με τη συντριπτική πλειοψηφία των ιόντων να είναι μονοσθενή (Na⁺, K⁺ και Cl⁻). Υψηλές ιονικές αντοχές θα προκαλούσαν θωράκιση των ηλεκτρικών φορτίων στα απορροφημένα μόρια πρωτεΐνης, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν στη συσσώρευση σταγονιδίων γαλακτώματος. Ένας τυπικός όγκος του γαστρικού χυμού στο στομάχι είναι χαμηλός, περίπου 25-50 ml, συνεπώς τα περιεχόμενα υποβάλλονται σε μεταβολική μετατόπιση του pH ανάλογα με τη χωρητικότητα αποθήκευσης του γεύματος.

Οι βιοχημικοί παράγοντες που υπάρχουν στο γαστρικό περιβάλλον περιλαμβάνουν πεψίνη, γαστρική λιπάση, γαστρικές βλεννίνες και φωσφολιπίδια. Οι αλληλεπιδράσεις αυτών των παραγόντων με γαλακτώματα μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τροποποίηση των προσροφημένων σιβάδων πρωτεΐνης και των χαρακτηριστικών των σταγονιδίων, επηρεάζοντας τη σταθερότητα του γαλακτώματος και την πεπτικότητα των συστατικών του.

Όπως έχει παρατηρηθεί, η φύση του προσροφημένου στρώματος θα καθορίσει τη συμπεριφορά σταθερότητας σταγονιδίων γαλακτώματος κατά την έκθεση στο περιβάλλον του στομάχου, με τα πρωτεολυτικά ένζυμα να συμπληρώνουν το χαμηλό του pH. Περνώντας την περιοχή του pH από το ουδέτερο, ένα γαλακτωματοποιημένο με πρωτεΐνη γαλάκτωμα θα μετασχηματίζεται σε κατιονική μορφή μαζί με αλλαγές στη διαμόρφωση των

προσοφημένων πρωτεϊνών. Για τα γαλακτώματα που βασίζονται σε πρωτεΐνες καζεΐνης ή ορού γάλακτος, υπάρχει η πιθανότητα να συμβεί κάποια συσσωμάτωση γύρω από τα ισοηλεκτρικά τους σημεία (pH 4.5-5.2) και ατελή αναστροφή της συσσωμάτωσης σε χαμηλότερες τιμές pH. Περαιτέρω, η πρωτεολυτική δράση της πεψίνης επί της προσοφημένης πρωτεΐνης θα μειώνει το φορτίο σταγονιδίων (λιγότερο θετικό) και θα απομάκρυνε τις στερεοχημικές απωστικές δυνάμεις, οδηγώντας σε περαιτέρω συσσωμάτωση και ενδεχομένως σε κάποια συσσωμάτωση των σταγονιδίων του γαλακτώματος.

Αρκετές μελέτες σε πρότυπα γαλακτώματα έδειξαν ότι το καθαρό επιφανειακό φορτίο στα σταθεροποιημένα με πρωτεΐνη σταγονίδια του γαλακτώματος μειώνεται κατά την έκθεση σε γαστρικές καταστάσεις λόγω της υδρόλυσης της διεπιφανειακής πρωτεΐνης από την πεψίνη. Στα γαλακτώματα που σταθεροποιούνται από μία ποικιλία πρωτεϊνών των τροφίμων, όπως πρωτεΐνη ορού γάλακτος, καζεϊνικό νάτριο, β-λακτοσφαιρίνη ή β-καζεΐνη, αυτή η υδρόλυση μπορεί να οδηγήσει σε κροκίδωση και συσσωμάτωση των σταγονιδίων, που προκύπτουν από ανεπαρκή ηλεκτροστατική άπωση. Στα σταθεροποιημένα γαλακτώματα γαλακτώματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος, η σταθερότητα των σταγονιδίων εξαρτάται από την ποσότητα της μη προσοφημένης πρωτεΐνης που υπάρχει στο σύστημα. Παρουσία περίσσειας μη προσοφημένης πρωτεΐνης ορού γάλακτος, η σταθερότητα των σταγονιδίων ελαίου κατά τη γαστρική πέψη βελτιώνεται σημαντικά.

Αντιθέτως, τα γαλακτώματα που αποτελούνται από προσοφημένα στρώματα που αποτελούνται από γαλακτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους, όπως φωσφολιπίδια ή μόνο-άκυλογλυκερόλες, θα είναι σταθερά σε όξινες συνθήκες και δεν επηρεάζονται πολύ στο περιβάλλον του στομάχου (Golding et al., 2009; Singh et al., 2008; Singh et al., 2013).

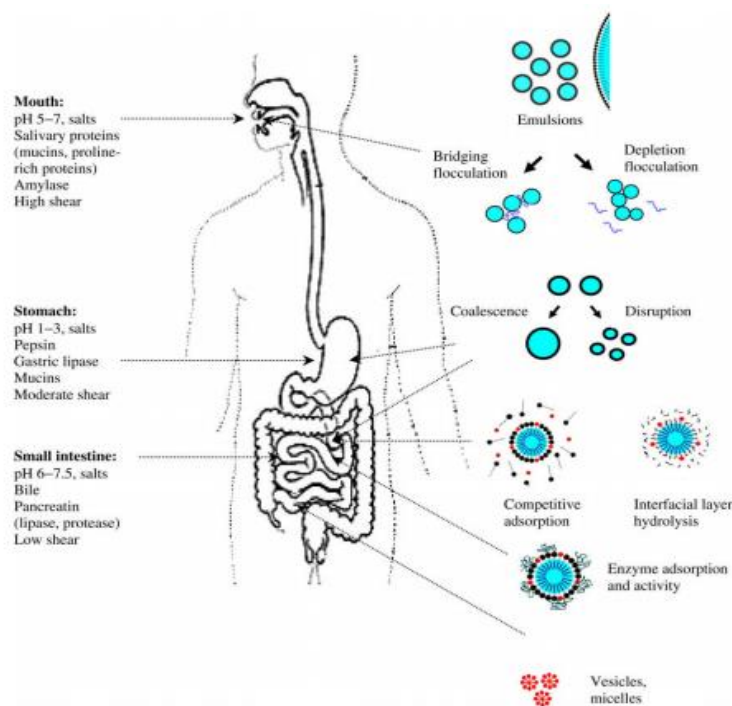
2.4.3 Εντερικές συνθήκες

Η ανθρώπινη εντερική οδός είναι ένα πολύ περίπλοκο εσωτερικό περιβάλλον, καθώς περιέχει διάφορα άλατα, παγκρεατικά ένζυμα, συνένζυμα, χολικά άλατα, φωσφολιπίδια και διάφορα είδη βακτηρίων και ζυμών. Το λεπτό έντερο είναι ο κύριος χώρος για την πέψη και την απορρόφηση. Εδώ, τα τρόφιμα διασπώνται σε απορροφήσιμη μονομερή μορφή. Ένα μερικώς χωνευμένο / τροποποιημένο γαλάκτωμα που διέρχεται από το λεπτό έντερο παρουσιάζει σταδιακή αύξηση του pH (μεταξύ 6 και 7, λόγω της έκκρισης διττανθρακικού νατρίου), που επιτρέπει στα παγκρεατικά ένζυμα να δρουν αποτελεσματικά. Η αύξηση του pH προκαλεί αντιστροφή του φορτίου πρωτεΐνης, δηλ. Στην ανιονική μορφή τους στις περισσότερες περιπτώσεις, με κάποια συσσωμάτωση ενώ διέρχεται μέσω της ισοηλεκτρικής τους ζώνης. Υπάρχει επίσης αύξηση της ιοντικής ισχύος. Η ιοντική ισχύς του δωδεκαδάκτυλου με νηστεία είναι περίπου 140 mM. Τόσο το pH όσο και η ιοντική ισχύς είναι ιδιαίτερος σημαντικός παράμετροι καθώς επηρεάζουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των σταγονιδίων ελαίου που έχουν σταθεροποιηθεί με πρωτεΐνη.

Το λεπτό έντερο φιλοξενεί πολλά ένζυμα, όπως πρωτεάσες και πεπτιδάσες (θρυψίνη, χυμοτρυψίνη, καρβοξυπεπτιδάσες κ.λπ.), λιπάσες και εστεράσες (παγκρεατική λιπάση,

εστεράση χοληστερόλης, φωσφολιπάση A2 κλπ.) Και παγκρεατικές αμυλάσες. Οι κύριες πρωτεάσες (θρυψίνη και χυμοθρυψίνη) καταλύουν τη θραύση ειδικών πεπτιδικών δεσμών. Για παράδειγμα, η θρυψίνη καταλύει κατά κύριο λόγο τις πεπτιδικές αλυσίδες στο Ο-τερματικό άκρο των αλειφατικών αμινοξέων, κυρίως της λυσίνης και της αργινίνης, ενώ η χυμοθρυψίνη ευνοεί τα μεγάλα αρωματικά υπολείμματα, όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη. Σε σταθεροποιημένα με πρωτεΐνη γαλακτώματα, λόγω των δράσεων αυτών των πρωτεασών, τόσο οι προσροφημένες πρωτεΐνες / πεπτίδια όσο και οι μη προσροφημένες πρωτεΐνες / πεπτίδια υδρολύονται περαιτέρω σε αμινοξέα και μικρότερα πεπτίδια. Αυτά τα πεπτίδια μετακινούνται στο στρώμα βλέννας πριν υποβληθούν σε επακόλουθη διάσπαση σε αμινοξέα με πεπτιδάσες περιγράμματος με βούρτσα.

Επιπρόσθετες επιφανειοδραστικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των διακυγλυκερινών, μονοακυλογλυκερολών και ελεύθερων λιπαρών οξέων, παράγονται κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του πυρήνα των σταγονιδίων από τις παγκρεατικές λιπάσες. Επομένως, οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός σταγονιδίου γαλακτώματος και άλλων συστατικών στο έντερο μπορεί να είναι πολύ σύνθετες. Η τελική κατάσταση ενός γαλακτώματος όσον αφορά τη σύνθεση της προσροφημένης στιβάδας θα εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις και τις επιφανειακές δραστηριότητες άλλων συστατικών σε δεδομένη χρονική στιγμή. Έχουμε λίγη γνώση των διαφόρων ειδών των επιφανειοδραστικών μορίων, της κινητικής ανταλλαγής του διεπιφανειακού υλικού και του τρόπου με τον οποίο οι ανταλλαγές αυτές επηρεάζουν τη σταθερότητα του γαλακτώματος. (Golding et al., 2009; Singh et al., 2008).



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών που συμβαίνουν στα γαλακτώματα κατά το πέρασμά τους στο γαστρεντερικό σύστημα (Singht et al., 2009).

2.5 Αρχή λειτουργίας οργάνων

2.5.1 Σκέδαση φωτός (Light Scattering)

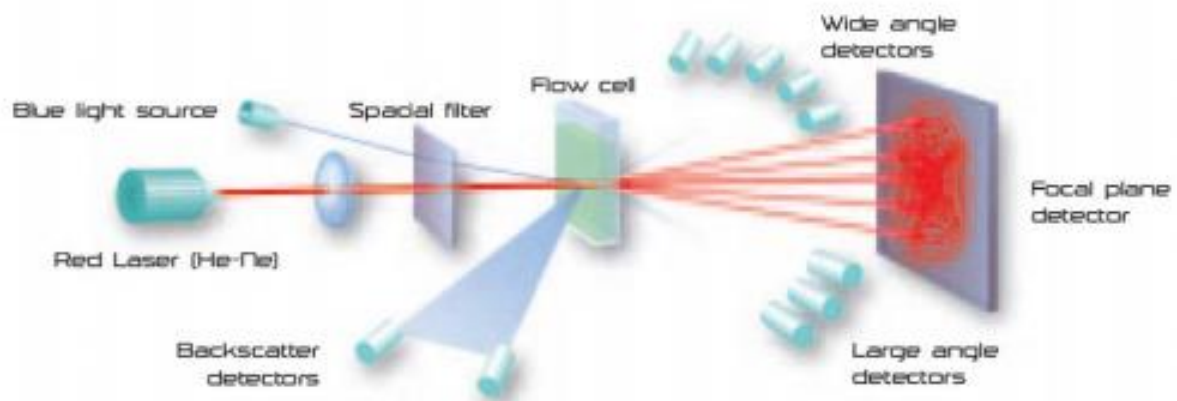
Όταν μια δέσμη φωτός προσπίπτει σε ένα υλικό, τα ηλεκτρόνια του υλικού αλληλεπιδρούν με το φως, διεγείρονται και επανεκπέμπουν την απορροφούμενη ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις με το ίδιο μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σκέδαση του φωτός αποτελεί το διασκορπισμό των φωτεινών ακτινών που λαμβάνει χώρα όταν αυτές προσπέσουν σε μικροσκοπικά σωματίδια, με αποτέλεσμα τη διάχυσή τους στο χώρο. Η τεχνική της σκέδασης του φωτός χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους σωματιδίων σε κolloειδή συστήματα, εναιωρήματα, κτλ και διακρίνεται στη:

- Στατική σκέδαση φωτός (Static light scattering)
- Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic light scattering)

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός είναι μια μέθοδος που εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα καθώς είναι γρήγορη, μη καταστρεπτική για το δείγμα, δεν απαιτεί βαθμονόμηση και μπορεί να εφαρμοστεί σε συστήματα αποτελούμενα από μεγάλο αριθμό σωματιδίων. Παρ' όλα αυτά, εμφανίζει δύο μειονεκτήματα: το δείγμα δεν πρέπει να είναι πολύ πυκνό ώστε να αποφευχθεί πολλαπλή σκέδαση και το σύστημα πρέπει να είναι πολύ υψηλής καθαρότητας καθώς αν υπάρξουν σωματίδια σκόνης θα αποτελέσουν κι αυτά κέντρα σκέδασης. Η σκέδαση του φωτός χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το μέγεθος σωματιδίων μεταξύ 0.01 έως 1000μm κι έτσι καθίσταται επαρκής μέθοδος για τον χαρακτηρισμό των περισσότερων σταγονιδίων που βρίσκονται στα γαλακτώματα των τροφίμων. (Γκοτζαμάνης, 2007).

2.5.1.1 Mastersizer 2000

Η αρχή λειτουργίας του οργάνου, σύμφωνα με τον κατασκευαστή, παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα. Το υπό μελέτη υλικό τοποθετείται σε ειδική κυψελίδα (flow cell) και ακτινοβολείται από διπλή δέσμη φωτός. Μια δέσμη laser χαμηλής συχνότητας («κόκκινη δέσμη») και μία υψηλότερης συχνότητας («μπλε δέσμη») χρησιμοποιούνται, ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια. Οι δέσμες φωτός, εστιάζονται, φιλτράρονται και στη συνέχεια προσπίπτουν πάνω στα σωματίδια του υλικού και σκεδάζονται (ή ακόμα και οπισθοσκεδάζονται) σε γωνίες αντιστρόφως ανάλογες του μεγέθους των σωματιδίων. Οι σκεδαζόμενες δέσμες ανιχνεύονται με κατάλληλα γωνιακά τοποθετημένους φωτοευαίσθητους ανιχνευτές προκειμένου να επιτυγχάνεται βέλτιστη ανάλυση σε μεγάλο εύρος μεγεθών. Η πληροφορία της γωνιακής κατανομής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι η κύρια πηγή για τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων. Το μοντέλο που προβλέπει με ακρίβεια τη σκέδαση σε συνάρτηση με το μέγεθος σφαιρικών σωματιδίων, χρησιμοποιείται από το συνοδευμένο λογισμικό προκειμένου το Mastersizer να εξάγει ακριβή αποτελέσματα στο μεγαλύτερο δυνατό εύρος (Malvern, 2019).



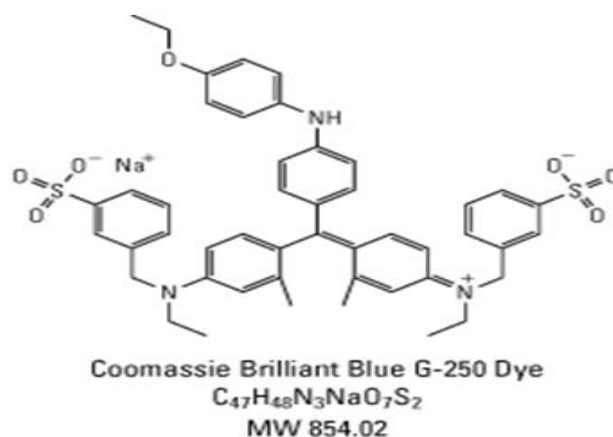
Σχήμα 9: Αρχή λειτουργίας Mastersizer 2000 (Malvern, 2019).

2.5.1.2 Μέθοδος Bradford

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στον «ορό» των γαλακτωμάτων έγινε με την μέθοδο Bradford. Η μέθοδος βασίζεται στη χρωστική κυανό του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250) η οποία ανήκει στην κατηγορία όξινων χρωμάτων (Σχ. 10). Η χρωστική αυτή περιέχει μια σουλφομάδα που στην ανιοντική μορφή της δεσμεύει τα αμινοξέα αργινίνη, θρυπτοφάνη, τυροσίνη, ιστιδίνη και φαινυλαλανίνη.

Η χρωστική σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν είναι προσδεσμένη σε κάποια πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595 nm. Σε αυτή την μορφή η χρωστική έχει χρώμα μπλε ενώ όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή έχει καφεκόκκινο χρώμα. Από την απορροφητικότητα των γνωστών διαλυμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη και έτσι, προσδιορίζεται η συγκέντρωση ενός άγνωστου διαλύματος.

Η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω της απλότητας της και χρήσιμη διότι ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλέγματος πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερός σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων (Bradford, 1976).

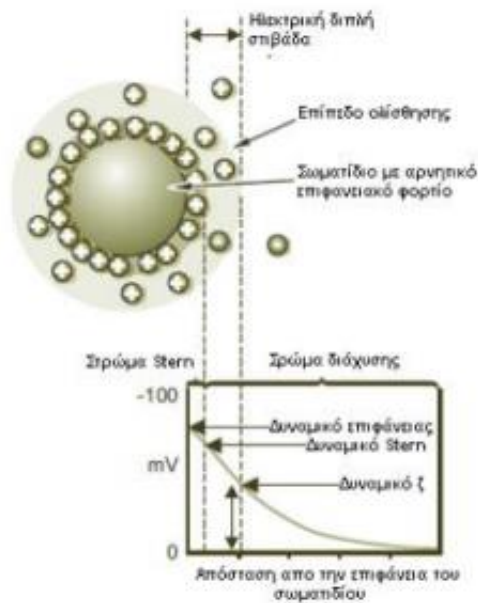


Σχήμα 10: Χημική μορφή της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (www.thermofisher.com).

2.5.1.3 Ζ δυναμικό

Όταν σωματίδια διασπείρονται σε ένα υδατικό σύστημα συχνά εμφανίζουν επιφανειακό φορτίο, το οποίο οφείλεται στον ιονισμό των επιφανειακών χημικών ομάδων τους ή στην προσρόφηση φορτισμένων μορίων ή ιόντων. Η ανάπτυξη τέτοιων φορτίων έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων του διαλύματος κοντά στην επιφάνεια των σωματιδίων, δημιουργώντας ένα στρώμα γύρω από αυτά, με διαφορετική κατανομή ιόντων από εκείνη του κυρίου όγκου του διαλύματος. Το στρώμα αυτό αποτελείται από δύο μέρη (Σχ. 11). Το εσωτερικό μέρος λέγεται στρώμα Stern (Stern layer) και απαρτίζεται από ιόντα ισχυρά συνδεδεμένα με τα σωματίδια, λόγω των αντίθετων φορτίων τους, ενώ το εξωτερικό μέρος δημιουργείται από διάχυση ασθενέστερα συνδεδεμένων ιόντων του μίγματος. Στο διάχυτο στρώμα υπάρχει ένα νοητό όριο μέσα στο οποίο τα ιόντα και τα μόρια του διαλύτη αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη φορτισμένη επιφάνεια του σωματιδίου, σχηματίζοντας μια σταθερή οντότητα με αυτό. Το όριο αυτό ονομάζεται επίπεδο ολίσθησης. Όταν ένα σωματίδιο κινείται, τα ιόντα που βρίσκονται μέσα σε αυτό το όριο κινούνται μαζί του. Το ηλεκτρικό δυναμικό το οποίο υπάρχει στο εξωτερικό μέρος αυτού του ορίου (επίπεδο ολίσθησης) λέγεται δυναμικό ζ (z potential) και αποτελεί ένδειξη του επιφανειακού φορτίου του σωματιδίου. Έτσι απαντάται με τον όρο «φαινόμενο επιφανειακό φορτίο». Το μέγεθος του δυναμικού ζ αποτελεί ένδειξη της δυναμικής σταθερότητας του κolloειδούς συστήματος. Αν όλα τα σωματίδια στο γαλάκτωμα είχαν πολύ μεγάλη απόλυτη τιμή ζ (πολύ θετικό ή πολύ αρνητικό δυναμικό), θα είχαν την τάση να απομακρύνονται το ένα από το άλλο με αποτέλεσμα να μη δημιουργούταν κolloειδές σύστημα. Ωστόσο, αν τα σωματίδια έχουν τιμή δυναμικού ζ κοντά στο μηδέν, τότε δεν υπάρχει καμία δύναμη να τα αποτρέψει από το να έρθουν κοντά και να συσσωματωθούν. Για το λόγο αυτό σωματίδια με δυναμικό ζ πιο θετικό από +30 mV ή πιο αρνητικό από -30 mV θεωρούνται σταθερά. Η μέτρηση και η γνώση του ζ δυναμικού είναι κρίσιμη για την

πρόβλεψη της σταθερότητας της παρασκευής του γαλακτώματος και των αλληλεπιδράσεων των σωματιδίων (Malvern, 2019; Χαμαλάκη, 2016).



Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση της διασποράς των ιόντων του διαλύματος γύρω από ένα φορτισμένο σωματίδιο (Χαμαλάκη, 2016).

2.5.2 Συνεστιακή Μικροσκοπία

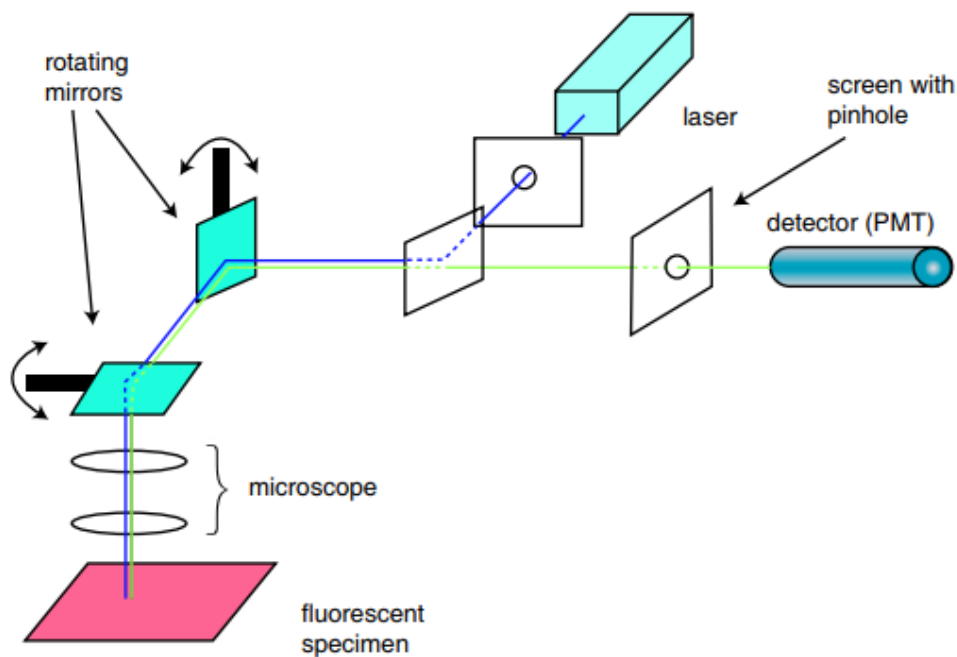
Ένα συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ (LSCM) ενσωματώνει δύο βασικές ιδέες: φωτισμός σημείο προς σημείο του δείγματος και απόρριψη φωτός χωρίς εστίαση. Το φως λέιζερ (μπλε γραμμή) κατευθύνεται από έναν διχρωμικό καθρέφτη προς ένα ζευγάρι καθρεφτών που σαρώνουν το φως στον x και y . Το φως περνά από τον μικροσκοπικό φακό και διεγείρει το φθορίζον δείγμα. Το φθορισμένο (ανοιχτό πράσινο) φως από το δείγμα περνάει πίσω από τον αντικειμενικό φακό και αναπαράγεται από τους ίδιους καθρέφτες που χρησιμοποιούνται για τη σάρωση του δείγματος. Στη συνέχεια, το φως διέρχεται από το διχρωματικό κάτοπτρο μέσα από μια οπή που τοποθετείται στο επίπεδο συζευγμένου εστιακού (επομένως και ομογενοποιητικού) ύψους του δείγματος. η οπή απορρίπτει έτσι όλα τα φώτα εκτός εστίασης που φθάνουν από το δείγμα. Το φως που αναδύεται από την οπή μετρίεται τελικά από έναν ανιχνευτή, δηλαδή έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Σε κάθε συγκεκριμένη στιγμή παρατηρείται μόνο ένα σημείο του δείγματος. ένας υπολογιστής ανασυνθέτει το επίπεδο 2D εικόνας ένα ρικελ τη φορά. Μια 3D ανακατασκευή του δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί συνδυάζοντας μια σειρά από τέτοιες εικόνες σε διαφορετικά βάρη.

Αυτή η δυνατότητα 3D είναι ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Ένα άλλο, σχετικό, πλεονέκτημα είναι ότι η οπή φιλτράρει τον φθορισμό στο υπόβαθρο που κανονικά θα παρεμπόδιζε τη σαφή απεικόνιση ενός δείγματος μεγάλου κλάσματος όγκου.

Είναι ακριβώς αυτή η ικανότητα "διατομής" που επιτρέπει μια έγκυρη εικόνα σε ένα δεδομένο βάθος μέσα στο δείγμα που με τη σειρά του επιτρέπει την απεικόνιση 3D (Prasad et al., 2007).

2.5.2.1 Συνεστιακό Μικροσκόπιο σάρωσης

Ίσως η απλούστερη σύνθεση χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ για φασματική απεικόνιση ενώνει την κλιμάκωση της διάθλασης με μια ρυθμιζόμενη σχισμή που μπορεί να μετατοπιστεί μηχανικά κατά μήκος του παραθύρου εισόδου του ανιχνευτή φωτοπολλαπλασιαστή. Η εκπομπή φθορισμού που διέρχεται από την οπή απεικονίζεται στην επιφάνεια της σχάρας διάθλασης χρησιμοποιώντας ένα διχρωματικό κάτοπτρο. Το φασματικά διαχωρισμένο φως προβάλλεται έπειτα διαμέσου της σχισμής και μέσα στο φωτοπολλαπλασιαστή. Το φασματικό εύρος ζώνης μπορεί να ρυθμιστεί αυξάνοντας ή μειώνοντας το μέγεθος της σχισμής και η περιοχή μήκους κύματος που παρουσιάζεται στον φωτοπολλαπλασιαστή καθορίζεται από τη θέση της σχισμής σε σχέση με το διασκορπισμένο φως από το πλέγμα (www.zeiss.com).



Σχήμα 12: Βασική διαμόρφωση ενός συνεστιακού μικροσκοπίου. Το φως από το λέιζερ σαρώνεται στο δείγμα από τους καθρέφτες σάρωσης. Η οπτική τμηματοποίηση λαμβάνει χώρα καθώς το φως περνά μέσα από μια οπή προς τον ανιχνευτή (Semwogerere et al., 2005).

3. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι :

- ⇒ Η μελέτη της συμπεριφοράς ενός γαλακτώματος λάδι-σε-νερό το οποίο σταθεροποιήθηκε με Tween 20 σε pH 7 κατά την έκθεση του σε στοματικές και γαστρικές συνθήκες.
- ⇒ Η μελέτη της συμπεριφοράς ενός γαλακτώματος λάδι-σε-νερό το οποίο σταθεροποιήθηκε με καζεϊνικό νάτριο σε pH 7 κατά την έκθεση του σε στοματικές και γαστρικές συνθήκες.
- ⇒ Η μελέτη της λήψης προκαταρκτικών αποτελεσμάτων σχετικά με την ικανότητα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους, του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με laser και της Zetarals συσκευής, να ενεργούν ως ανιχνευτές των λειτουργικών αλλαγών των γαλακτωμάτων σε ένα εργαστηριακό μοντέλο πέψης.

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Υλικά και μέθοδοι

4.1.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της πειραματικής διεργασίας είναι τα εξής: υπερκάθαρο νερό παράγεται από την ELGA Purelab Flex apparatus (Veolia Water Technologies, High Wycombe, United Kingdom). Μυξίνη από στομάχι χοίρου (τύπος II), πολυσορβιτόλη 20 (Tween 20- υγρής μορφής) και χολικά άλατα από βοοειδή (μη κλασματοποιημένα σε ξηρή μορφή) αγοράστηκαν από την Sigma – Aldrich (St. Louis, MO). Χλωριούχο νάτριο (NaCl), δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) και χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) προμηθεύτηκαν από την Merck (Darmstadt, Germany). Όξινο ανθρακικό νάτριο ή διαπτανθρακικό νάτριο (NaHCO_3) και χλωριούχο κάλιο (KCl) αγοράστηκαν από την Mallinkrodt (St. Louis, MO) ενώ, πειψίνη από στομάχι χοίρου (activity: $0.7 \text{ FIP-U mg}^{-1}$) και ανθρακικά άλατα αμμωνίου από την AppliChem (Darmstadt, Germany). Ένυδρο (6) χλωριούχο μαγνήσιο $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ προμηθεύτηκε από την ChemLab (Zedelgem, Belgium). Nile red και Nile blue αγοράστηκαν από TCI (Tokyo Chemical Industry, UK) και Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) αντίστοιχα. Καζεϊνή ή καζεϊνικό νάτριο (sodium caseinate) δωρίθηκε από την ΜΒΓΑΛ Α.Ε. Το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε ως λιπαρή φάση για την παραγωγή των γαλακτωμάτων ήταν μιγλύλη (812 N (F)) (Cremer Oleo GmbH & Co., Witten, Germany). Το καθιερωμένο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των προσομοιωμένων υγρών πέψης (στοματικής, γαστρικής και εντερικής φάσης) και για τους δυο τύπους των γαλακτωμάτων, βασίστηκε σε αυτό που αναφέρεται από τη μέθοδο Consensus InfoGest ενώ λεπτομερής ανάλυση αυτού παρατίθεται παρακάτω.

4.1.2 Οργανολογία

Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση της πειραματικής διαδικασίας ήταν οι εξής:

- Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire UK) χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής των σωματιδίων στα γαλακτώματα.
- Ομογενοποιητής υπερήχων (Hielscher UP-100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany).
- Φυγόκεντρος, Sorvall superspeed centrifuge (Evolution RC, Thermo Scientific, MA).
- Carl Zeiss model LSM 700 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Germany) χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση και την φωτογράφιση των σωματιδίων καθόλη την διεργασία.
- ZetaPALS apparatus (Brookhaven Instruments Corporation, NY) χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του ζήτα δυναμικού των μειγμάτων.
- Thermo Scientific Orion 3-Star Benchtop pH Meter (Thermo Fischer Scientific, MA) χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH.

4.1.3 Μεθόδοι

4.1.3.1 Παρασκευή γαλακτωμάτων

Διαλύματα καζεΐνης και Tween 20 (συγκέντρωσης 2% β/ο) παρασκευάστηκαν με την προσθήκη υπερκάθαρου νερού σε ποτήρι ζέσεως. Ποσότητα μιγλιόλης προστέθηκε στα διαλύματα ως η λιπαρή φάση των γαλακτωμάτων, έτσι ώστε το κλάσμα όγκου του ελαίου στο μίγμα να είναι $\phi = 0,4$. Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια για λίγα λεπτά σε μαγνητικό αναδευτήρα και στην συνέχεια ομογενοποιήθηκε σε ομογενοποιητή υπερήχων (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany). Ο ομογενοποιητής ρυθμίστηκε σε συνεχόμενη λειτουργία 100 κύκλων για 180 s και μέγιστο εύρος 1. Η παρασκευή των γαλακτωμάτων ολοκληρώθηκε με την μέτρηση της θερμοκρασίας τους για την αποφυγή υπερθέρμανσης και την εξασφάλιση των σωστών συνθηκών.

4.1.3.2 Παρασκευή γαστρικού μοντέλου

Για τη παρασκευή του στοματικού υγρού (SOF), του στομαχικού υγρού (SGF) και το υγρό του λεπτού εντέρου (SiF) χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που παραθέτονται στον πίνακα 1 (σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου InfoGest). Ο τελικός όγκος κάθε διαλύματος ήταν 500 mL.

Πίνακας 2: Σύνθεση των προσομοιωμένων στοματικού και γαστρικών υγρών.

ΆΛΑΤΑ	SOF		SGF		SIF	
	Συγκέντρωση (g L ⁻¹)	Περιεκτικότητα (mL)	Περιεκτικότητα (mL)	Περιεκτικότητα (mL)		
KCl	37.3	15.1	6.9	6.8		
KH ₂ PO ₄	68	3.7	0.9	0.8		
NaHCO ₃	84	6.8	12.5	42.5		
NaCl	117	–	11.8	9.6		
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.5	0.4	1.1		
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.06	0.5	–		
CaCl ₂	33.3	0.1	0.015	0.04		
Μυξίνη	5	2	–	–		
Πεψίνη	1	–	4.8	–		
Χολικά άλατα	5	–	–	2.5		

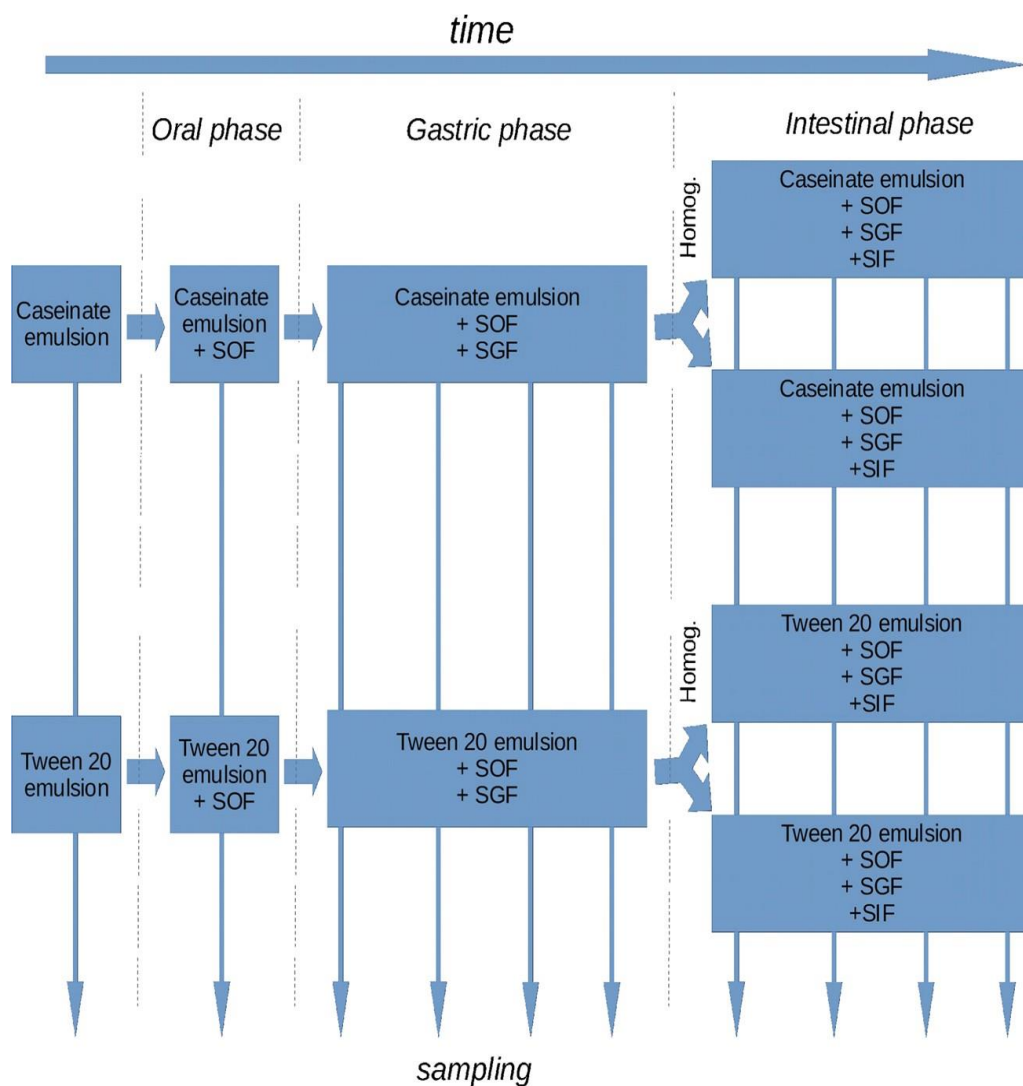
Οι τιμές pH του στόματος, του στομάχου και των υγρών του εντέρου παρουσιάζουν διακυμάνσεις και γι αυτό σε αυτή την περίπτωση έχουν επιλεγθεί αντιπροσωπευτικές τιμές. Το pH του ανθρώπινου στομάχου μπορεί να κυμανθεί μεταξύ ενός εύρους τιμών (1-3) και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η διατομική διακύμανση ή αν βρίσκεται σε κατάσταση πείνας ο οργανισμός (Gardner et al.,2006; Lindahl et al.,1997). Στην παρούσα εργασία, η τιμή του pH στο στόμα είναι 7 (SOF), στο στομάχι 3 (SGF) και στο έντερο 7 (SGF). Η ρύθμιση του pH έγινε με προσθήκη σταγόνων 20% HCl και NaOH για κάθε περίπτωση.

4.1.3.3 Προσομοίωση της χώνευσης

Η in-vitro προσομοίωση της χώνευσης παρουσιάζεται στο σχήμα 13.

Αρχικά, γαλακτώματα (emulsions) συνολικού όγκου 20 ml έκαστος, παρασκευάστηκαν με τη προσθήκη διαλυμάτων 2% ο/ο Tween 20 και 2% β/ο καζεϊνικό νάτριο αντίστοιχα, που λειτουργούν ως γαλακτωματοποιητές. Τα γαλακτώματα αναμίχθηκαν με 20 mL στοματικού υγρού (SOF) για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να προσομοιωθούν οι συνθήκες μάσησης της τροφής. Το προκείμενο μίγμα αναμίχθηκε έπειτα, με ισόποση ποσότητα στοματικού υγρού (SGF) και επωάστηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 2 ώρες ώστε να εξασφαλιστούν οι συνθήκες χώνευσης στο στομάχι. Παράλληλα, ίση ποσότητα στοματικού υγρού χωρίς την προσθήκη πεψίνης (pepsin free- SGF) ακολούθησε την

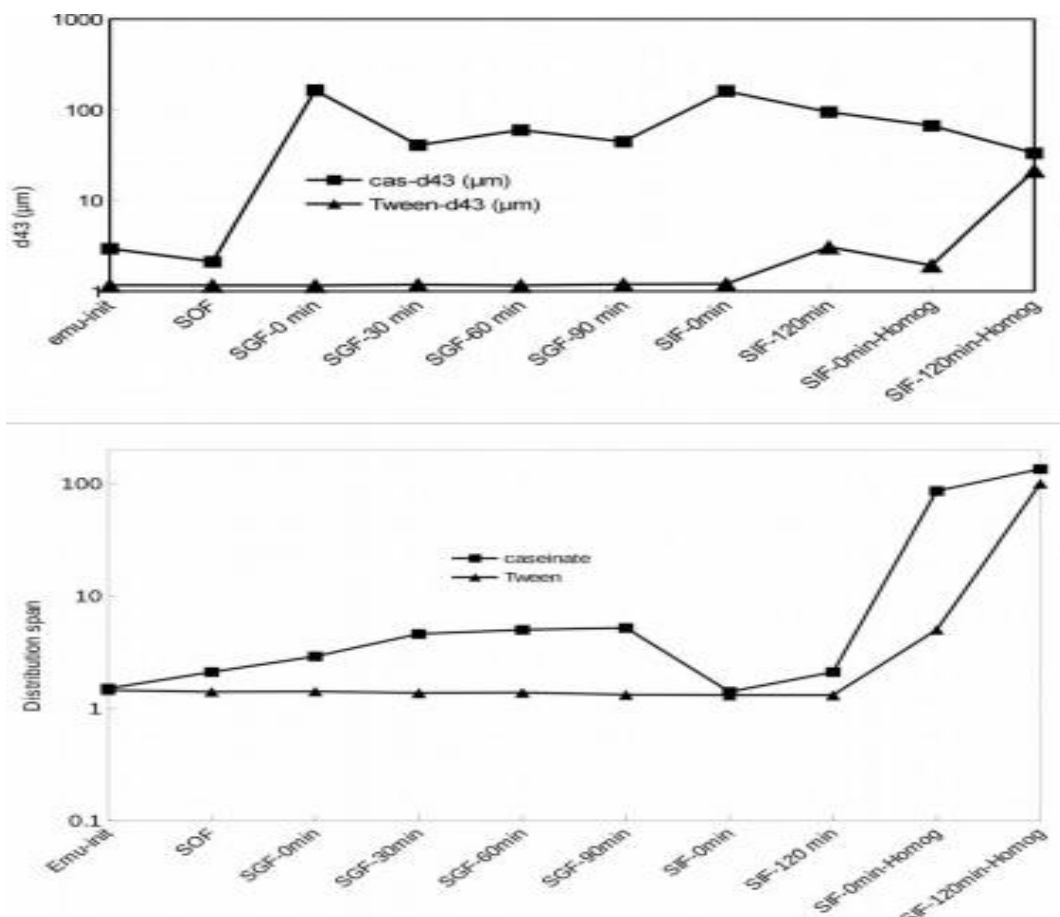
παραπάνω διαδικασία, αναμίχθηκε δηλαδή με μίγμα γαλακτώματος- υγρού στόματος και το παραγόμενο μίγμα κατακρατήθηκε και αυτό στους 37 °C για 2 ώρες. Στη συνέχεια, ποσότητα από τα παραπάνω μείγματα αναμίχθηκαν με ίση ποσότητα εντερικού υγρού (SIF) και τα δείγματα που προέκυψαν διαιρέθηκαν σε ίσες ποσότητες. Τα καινούργια πλέον μίγματα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω διεργασία, κάποια από αυτά ομογενοποιήθηκαν ξανά για 180s ώστε να προσομοιωθεί η λειτουργία του ανθρώπινου πυλωρού ενώ, τα υπόλοιπα παρέμειναν αμετάβλητα. Όλα τα δείγματα (ομογενοποιημένα και μη) κρατήθηκαν ξανά σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 2 ώρες, ώστε να ολοκληρωθούν οι συνθήκες χώνευσης. Καθόλη την διάρκεια της πειραματικής διεργασίας, ανά 30 min, γίνονταν δειγματοληψία για περαιτέρω ανάλυση των μειγμάτων.



Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση της in- vitro χώνευσης για τους δυο τύπους των γαλακτωμάτων.

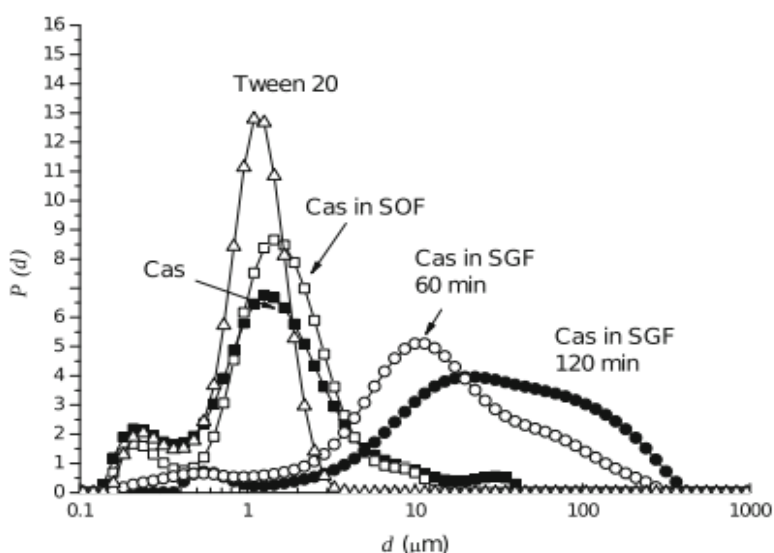
5. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η εξέλιξη των μεγεθών των σωματιδίων των γαλακτώματων σε διάφορα σημεία της *in vitro* διεργασίας φαίνεται στο σχήμα 14: ως αρχική οντότητα, τα γαλακτώματα καζεϊνικού άλατος έχουν μία στενή κατανομή σχετικά μικρών σταγονιδίων με τιμή d_{43} στα 2,9 μm . Με τη διάλυση του γαλακτώματος σε προσομοιωμένο στοματικό υγρό (SOF), το μέγεθος δεν επηρεάζεται. Η μεταφορά στο προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (SGF) επιφέρει μια δραματική αύξηση στη μέση διάμετρο από αρκετές δεκάδες έως εκατό μm . Οι αναγνώσεις παραμένουν έτσι κατά τη διάρκεια των δύο ωρών χειρισμού του γαλακτώματος στο στομάχι. Η διάσπαση του προϊόντος γαστρικής επεξεργασίας στην προσομοιωμένη εντερική φάση δεν έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Παρουσία Tween 20, η κατανομή μεγέθους σωματιδίων παραμένει ανεπηρέαστη, ενώ η επαναομογενοποίηση παρουσία χολικών αλάτων μετά από την εντερική φάση οδηγεί σε αύξηση του d_{43} . Το κατώτερο τμήμα του Σχήματος 14 δείχνει την εξέλιξη του εύρους των κατανομών σωματιδίων κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας: η έκταση των κατανομών σωματιδίων αυξάνει στην γαστρική περιοχή για καζεϊνικό άλας και κατόπιν μειώνεται στο εντερικό υγρό. ενώ αυξάνεται μετά την μετα-γαστρική ομογενοποίηση, ως νέες, μικρότερες, μορφές σταγονιδίων. Το Tween 20 δείχνει σχετική σταθερότητα όσον αφορά το άνοιγμα και δείχνει μόνο μία σχετική αύξηση μετά την μετα-γαστρική ομογενοποίηση παρουσία των χολικών αλάτων.



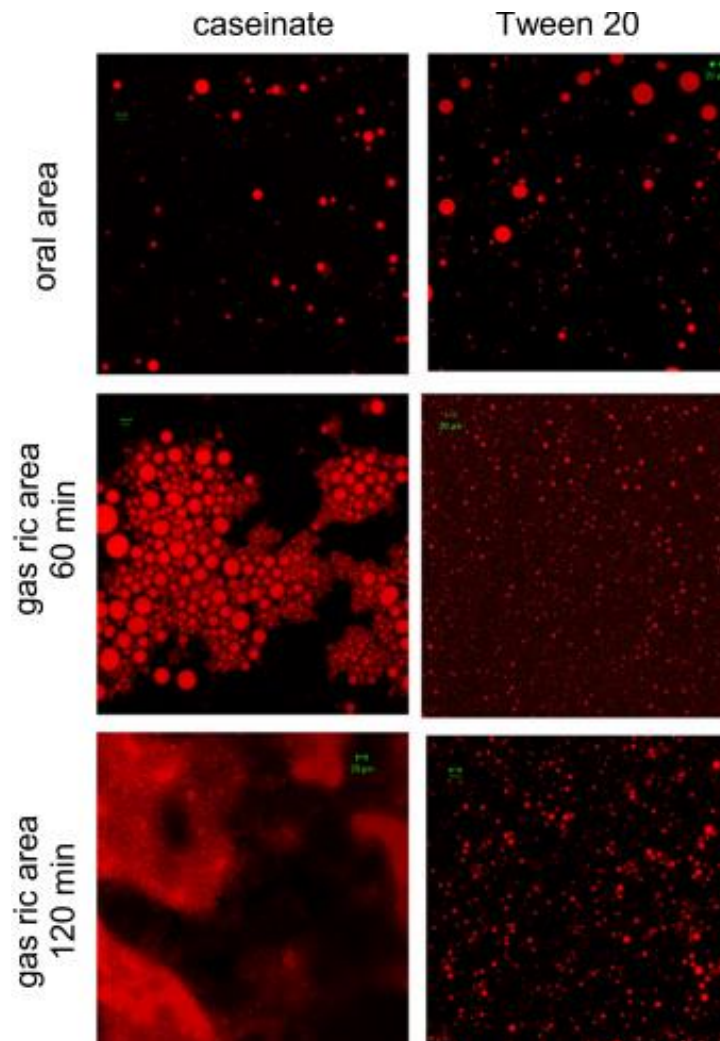
Σχήμα 14: Η εξέλιξη της διαμέτρου d_{43} (πάνω) και του διαστήματος κατανομής (κάτω) των σωματιδίων γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (αρχικό κλάσμα όγκου ελαίου $\phi=0,3$) γαλακτωματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 2% καζεϊνικό νάτριο (τετράγωνα) και 2% Tween 20 (τρίγωνα) κατά τη διαφόρων σταδίων πέψης του μοντέλου.

Οι κατανομές μεγέθους αυτών των υλικών (Σχ. 15) δείχνουν ότι ένας αρχικά περιορισμένος πληθυσμός μικρών σταγονιδίων παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστος από τη διασπορά του στο σάλιο. Τα καζεϊνικά γαλακτώματα αναπτύσσουν μία ισχυρή δεύτερη κορυφή όταν τοποθετούνται στη γαστρική φάση. Η κλίμακα κορυφών κυμαίνεται μεταξύ μερικών δεκάδων έως λιγότερο από 200 μm . Τα σταθεροποιημένα με Tween 20 γαλακτώματα δεν αναπτύσσουν δεύτερη κορυφή, με αποτέλεσμα το d_{43} να παραμένει σταθερό. Η παρατήρηση αυτών των γαλακτωμάτων στο συνεστιακό μικροσκόπιο (σχήμα 16) δείχνει ότι η καζεϊνική ένωση κατά την ανάμιξή της με προσομοιωμένα στοματικά υγρά δεν οδηγεί σε παρατηρήσιμη κροκίδωση, ενώ τα μεγέθη σταγονιδίων (σχήμα 16, άνω αριστερά) αντιστοιχούν στα μεγέθη των σωματιδίων που συζητήθηκαν στα πειράματα μέτρησης διάθλασης (Σχήμα 15). Η μεταφορά στη γαστρική φάση οδηγεί σχεδόν αμέσως σε παρατηρήσιμη κροκίδωση, προκαλώντας οντότητες που θα μπορούσαν να ανιχνευθούν ως τα μεγαλύτερα σωματίδια κατά τη διάρκεια των σταδίων της γαστρικής επεξεργασίας (Εικόνα 15), η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε εκτεταμένη συσσωμάτωση (Εικόνα 16, κάτω αριστερά) και ορατό γαλάκτωμα, καθώς το έλαιο μπορεί να φανεί οπτικά ότι διαχωρίζεται στην κορυφή του γαλακτώματος (μακροσκοπική παρατήρηση).



Σχήμα 15: Σχηματική απεικόνιση των κατανομών μεγέθους σωματιδίων των γαλακτωμάτων (αρχικό κλάσμα όγκου ελαίου $\phi = 0,3$) που γαλακτωματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας καζεϊνικό νάτριο 2% κατά τη διάρκεια επιλεγμένων σταδίων της πέψης του μοντέλου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται για τη κατανομή του γαλακτώματος πριν από την στοματική εισαγωγή (κλειστά τετράγωνα), του γαλάκτωματος μετά την εισαγωγή στο προσομοιωμένο στοματικό υγρό (SOF, ανοιχτά τετράγωνα), μετά από 60 λεπτά (ανοιχτοί κύκλοι) και 120 λεπτά (κλειστοί κύκλοι) με τα γαστρικά υγρά. Οι αρχικές κατανομές

μεγέθους ενός γαλακτώματος $\phi = 0,3$ 2% Tween 20 (ανοικτά τρίγωνα) δείχνονται επίσης ως αναφορά.



Σχήμα 16: Συνεστιακές μικρογραφίες γαλακτωμάτων καζεϊνικού νατρίου ελαίου σε νερό (αριστερή πλευρά) και Tween 20 γαλακτώματα ελαίου σε νερό (δεξιά πλευρά), όπως λαμβάνεται κατά τη διάρκεια διαφόρων σταδίων της *in vitro* χώνευσης. Τα δείγματα έχουν χρωματιστεί με Nile red, ώστε να επισημανθεί η παρουσία ελαίου. Όλες οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm .

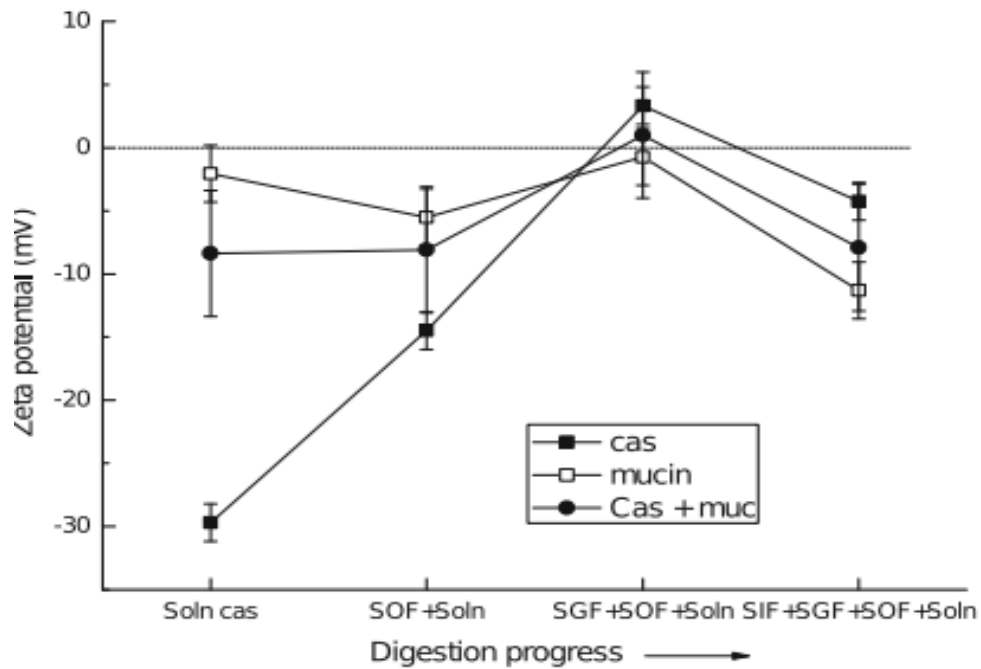
Τα Tween 20-σταθεροποιημένα γαλακτώματα περιλαμβάνουν πολύ μικρά σταγονίδια και δεν κροκκιδώνονται στην στοματική φάση του μοντέλου (άνω δεξιά). Κατά την εισαγωγή τους στην γαστρική φάση και σε αντίθεση με τα γαλακτώματα καζεϊνικών αλάτων, η δομή τους δεν μεταβάλλεται (μέση δεξιά): παραμένουν χωρίς κροκκίδωση ή συσσωμάτωση μέχρι το τέλος της γαστρικής επεξεργασίας (κάτω δεξιά). Αυτό συμβαδίζει με τις αναφορές σχετικά με τον αδρανές χαρακτήρα ενός χημικώς διαφορετικού μέλους της οικογένειας tween, δηλαδή tween 80, κατά τη διάρκεια της πέψης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρά την

έντονη παρουσία βλεννίνης, φαίνεται ότι δεν υπάρχει κροκίδωση εξάντλησης κατά τη διάρκεια της στοματικής ή των μετέπειτα φάσεων.

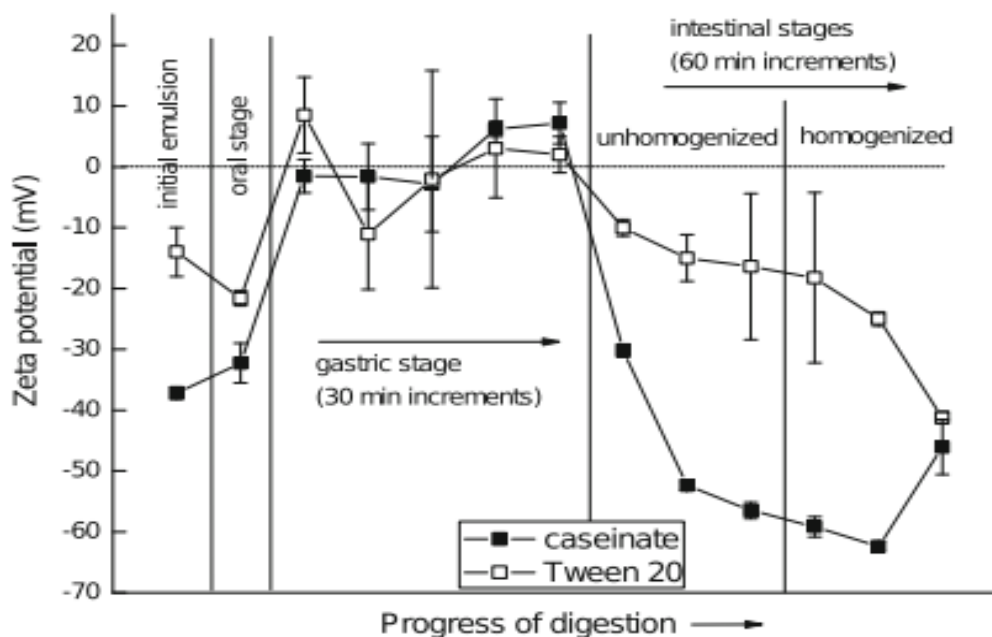
Πληροφορίες σχετικά με τα διαφορετικά καθεστώτα της κροκίδωσης, όπως επηρεάζεται από τις επιβαρύνσεις του καζεϊνικού άλατος και της βλεννίνης (που αρχικά υπάρχουν στα υγρά μοντέλου), μπορεί να επιτευχθεί μέσω των μετρήσεων zeta δυναμικού των συστατικών των συστημάτων καθώς αυτά περνούν μέσα από τα διάφορα στάδια του μοντέλου πέψης. Το σχήμα 17 δείχνει τις τιμές του δυναμικού zeta για τα διαλύματα καζεϊνικών αλάτων, για διαλύματα βλεννίνης και για μικτά συστήματα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στη συγκεκριμένη περίπτωση, η βλεννίνη δεν ήταν ένα εγγενές συστατικό των προσομοιωμένων στοματικών και γαστροεντερικών υγρών, ώστε να ληφθούν αμερόληπτες πληροφορίες για το φορτίο του καζεϊνικού άλατος. Έχουν μελετηθεί επίσης διαλύματα βλεννίνης. Όπως μπορεί να φανεί, η καζεΐνη ξεκινά με τα χαρακτηριστικά του εξαιρετικά αρνητικό δυναμικό zeta, το οποίο με κάποιο τρόπο μετριάζεται μέσω αλληλεπιδράσεων με τα ιοντικά συστατικά των προσομοιωμένων στοματικών υγρών. Η βλεννίνη αρχίζει με αρνητικό δυναμικό zeta. Επειδή η βλεννίνη και η καζεϊνική ένωση είναι αμφότερα φορτισμένα αρνητικά στο στοματικό υγρό, δεν αναμένεται ηλεκτροστατική κροκίδωση και πράγματι δεν έχει παρατηρηθεί στα δεδομένα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως. Στη γαστρική φάση, η καζεΐνη βρίσκεται χαμηλότερα από το ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών συστατικών του και προφανώς κροκιδώνεται, μαζί με την ομοίως αφόρτιστη βλεννίνη. Η σημασία του φορτίου της καζεΐνης στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων παρουσιάστηκε σε πειράματα όπου οι καζεΐνες τροποποιήθηκαν χημικά ώστε να έχουν διαφορετικές τιμές ισοηλεκτρικού σημείου. Η κροκίδωση μεγιστοποιήθηκε στο pH που αντιστοιχεί σε κάθε ισοηλεκτρικό σημείο. Η ρύθμιση του καζεϊνικών με οξύ ορίζει τα ισχυρότερα πηκτώματα σε τιμή pH 4,6, κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των συστατικών πρωτεϊνών. Αυτό απεικονίζεται σαφώς ως κορυφές των μεγάλων σωματιδίων στη γαστρική φάση στο Σχήμα 15 και η έντονη κροκίδωση στο Σχήμα 16 (μέση αριστερή μικρογραφία, που απεικονίζει την κατάσταση κατά την εισαγωγή στην γαστρική φάση). Παρόλο που η δημιουργία αρνητικών φορτίων ήταν αρκετή για να προκληθεί εκτεταμένη κροκίδωση, η εκτεταμένη συσσωμάτωση μπορεί να μην ήταν εφικτή απουσία χαμηλού pH και της δράσης ενζύμων. Το φορτίο επαναλαμβάνεται μερικώς κατά την αύξηση του pH που έρχεται με την επακόλουθη εισαγωγή στην προσομοιωμένη εντερική φάση.

Ως διεξοδικότερη διερεύνηση της ανωτέρω αλληλουχίας, το δυναμικό zeta μετρήθηκε επίσης στα εξεταζόμενα γαλακτώματα καθ' όλη την εξέλιξή τους στο μοντέλο πέψης InfoGest. Το Σχήμα 17 δείχνει τις τιμές δυναμικού zeta που λαμβάνονται για τα γαλακτώματα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι πρωτεΐνες στο SOF, δηλαδή η βλεννίνη και τα ένζυμα, αναμένεται επίσης να συνεισφέρουν στο επιφανειακό φορτίο. Τα σταθεροποιημένα με καζεϊνικά γαλακτώματα παρουσιάζουν εξαιρετικά αρνητικό δυναμικό zeta, το οποίο, ανάλογα με το ιοντικό περιβάλλον και το επίπεδο συσσωμάτωσης, μπορεί να κυμαίνεται από -20 mV έως -60 mV σε ουδέτερο pH. Με την ανάμιξή τους με SOF που περιέχει βλεννίνη, το δυναμικό zeta μειώνεται, δείχνοντας εν μέρει το χαμηλότερο

δυναμικό zeta του δεύτερου κολλοειδούς πληθυσμού του μίγματος, δηλαδή τις μη προσροφημένες βλεννίνες (σχήμα 18). Τέτοια φαινόμενα έχουν αναφερθεί για μίγματα βόειας αλβουμίνης ορού με βλεννίνες. Η επακόλουθη ενσωμάτωση στο προσομοιωμένο γαστρικό υγρό προκαλεί μία πτώση στο pH του συστήματος, οδηγώντας σε τιμές pH πλησίον του ισοηλεκτρικού σημείου των συστατικών πρωτεϊνών του καζεϊνικού άλατος. Αυτό μειώνει το φορτίο τους, ένα φαινόμενο που εκδηλώνεται ως δραστική μείωση της απόλυτης τιμής του δυναμικού zeta σε τιμές μεταξύ -5 mV και + 5 mV, που είναι πρακτικά μηδέν. Αυτό είναι αναμενόμενο από τις καζεΐνες που πέρασαν από το ισοηλεκτρικό σημείο τους, ενώ κάποια από τα θετικά τους φορτία αναμένεται να εξαλειφθούν από το ακόμη αρνητικό φορτίο των βλεννίνων: Τα καζεϊνικά άλατα είναι γνωστό ότι κατακρημνίζονται με βλεννίνη σε pH 3. Αυτό υποδηλώνει ότι η πιο πιθανή θέση για τη βλεννίνη σε αυτό το στάδιο βρίσκεται στη διεπαφή των σταγονιδίων του ελαίου, συν-προσροφημένη και ενδεχομένως γεφυρωμένη με καζεϊνικά σταγονίδια.



Σχήμα 17: Δυναμικό Zeta για διαλύματα καζεϊνικού νατρίου, μυξίνης και του μίγματος 1: 1 β / β σε διάφορα στάδια της in vitro διαδικασίας πέψης.



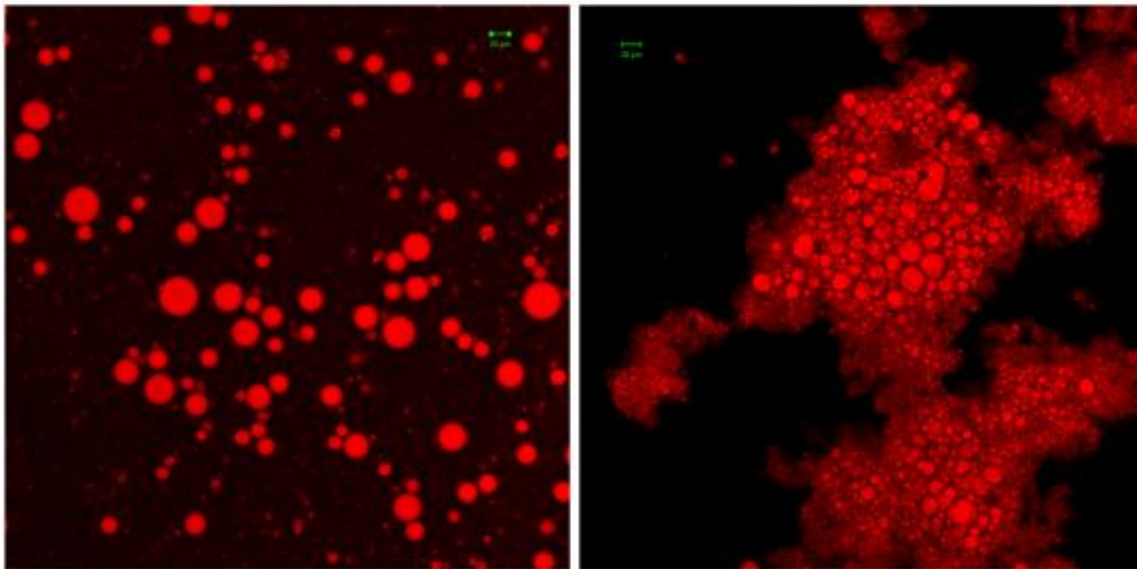
Σχήμα 18: Δυναμικό Zeta για γαλακτώματα γαλακτωματοποιημένα με καζεϊνικό νάτριο ή Tween 20 κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πέψης in vitro.

Αυτή η απομάκρυνση των φορτίων αναμένεται να αναιρεί τυχόν αλληλεπιδράσεις μεγάλης διάρκειας μεταξύ των πρωτεϊνών, επιτρέποντας ελκτικές δυνάμεις μικρού μεγέθους να προκαλούν κροκίδωση, όπως έχει παρατηρηθεί στις μικρογραφίες του σχήματος 16 και τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους σωματιδίων στο σχήμα 15. Εκτεταμένη κροκίδωση συζευγμένη με πρωτεολυτική ενζυμική δραστηριότητα αναμένεται εύλογα να οδηγήσει σε συνένωση, όπως πράγματι συμβαίνει στα τελικά στάδια της γαστρικής επεξεργασίας. Αυτό συμφωνεί με τις αναφορές σχετικά με τις μετρήσεις απουσία βλεννίνης και χωρίς προηγούμενη επεξεργασία από το στόμα. Από την άλλη πλευρά, το Tween 20, που είναι μη ιονικό, δεν αναμένεται να επηρεαστεί από μεταβολές στο pH. Το δυναμικό zeta είναι ελαφρώς αρνητικό, χαρακτηριστικό του σχηματισμού ενός ηλεκτρικού διπλού στρώματος. Η τιμή δυναμικού zeta αυξάνεται σε απόλυτη τιμή κατά την προσθήκη σε SOF, λόγω της παρουσίας αρνητικά φορτισμένης βλεννίνης. Στον SGF τα φορτία εξαλείφθηκαν. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε στο σχήμα 16, δεν παρατηρείται κροκίδωση ή συσσωμάτωση, καθώς δεν αναμένονται σημαντικές ηλεκτροστατικές ιδιότητες μεταξύ του Tween 20 και της βλεννίνης, μόνο η κροκίδωση εξάντλησης θα μπορούσε να προκαλέσει συσσώρευση σταγονιδίων. Προφανώς η συγκέντρωση της βλεννίνης δεν επαρκεί για την επίτευξη αυτού του αποτελέσματος.

Μέχρι αυτό το σημείο έχουν εξελιχθεί δύο διαφορετικά σενάρια που διαφέρουν στην εξάρτηση του pH του διεπιφανειακού φορτίου: ύπαρξη αρνητικού φορτίου, σε συνδυασμό με τιμές ισοηλεκτρικού σημείου μεταξύ 4,5 και 5,5 για την καζεΐνη και απουσία φορτισμένων μονάδων στην περίπτωση Tween 20. Το πρώτο είναι επιρρεπές σε κροκίδωση

που προκαλείται από φορτίο κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο των συστατικών πρωτεϊνών του, σε συνδυασμό με το ακόμη αρνητικό φορτίο της βλεννίνης, οδηγώντας σε κροκίδωση. Η πρωτεόλυση του διεπιφανειακού στρώματος από τα ένζυμα και το χαμηλό pH οδηγεί σε συσσωμάτωση. Το δεύτερο σενάριο είναι πρακτικά ανεξάρτητο από το περιβάλλον του στομάχου.

Για να ανιχνευθεί ο προηγουμένως συζητούμενος ρόλος της πρωτεόλυσης που προκαλείται από πεψίνη, πραγματοποιήθηκε ένα σύνολο πειραμάτων χρησιμοποιώντας προσομοιωμένο γαστρικό υγρό χωρίς πεψίνη (PF-SGF) αντί για φυσιολογικό SGF που περιέχει πεψίνη. Το σχήμα 19 δείχνει την εξέλιξη των κατανομών μεγέθους σωματιδίων και μικρογραφιών σε διάφορα στάδια της στοματικής και γαστρικής πέψης απουσία πεψίνης. Μία σημαντική αύξηση των μεγεθών των σωματιδίων παρατηρείται, αλλά χωρίς την απελευθέρωση ελαίου. Η μικροσκοπική εξέταση (Εικόνα 19) δείχνει ότι τα μεγάλα σωματίδια είναι θύλακες που σχηματίζονται από την πτώση των φορτίων καζεϊνικού άλατος στο χαμηλό pH της γαστρικής περιοχής (όπως συζητήθηκε προηγουμένως), αλλά δεν παρατηρούνται μεγαλύτερα σταγονίδια, ακόμη και στα μεταγενέστερα στάδια τη γαστρική διαδικασία. δηλαδή, η διεγερόμενη από πεψίνη διάσπαση του διεπιφανειακού στρώματος είναι πράγματι μια προϋπόθεση για τη συγχώνευση και την απελευθέρωση ελαίου.



Σχήμα 19: Συνεστιακές μικρογραφίες γαλακτωμάτων καζεϊνικού νατρίου ελαίου σε νερό που λαμβάνονται στην αρχή (αριστερά) μετά και στο τέλος (δεξιά πλευρά) μιας στοματικής - γαστρικής διαδικασίας απουσία πεψίνης. Τα δείγματα έχουν χρωματιστεί με χρωστική Nile red, ώστε να επισημανθεί η παρουσία ελαίου. Όλες οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm.

Στην περίπτωση του καζεϊνικού άλατος, ελλείψει ομογενοποίησης, οι μετρήσεις δυναμικού zeta αναφέρονται σε αυτό που είναι πρακτικά ο ορός του αρχικού γαλακτώματος μετά το ταχύ *creaming* των πολύ μεγάλων, συγχωνευμένων σταγονιδίων. Οι υψηλές αρνητικές τιμές αφορούν την κινητικότητα των διαλυμένων καζεϊνών, οι οποίες απορροφήθηκαν από τις διεπαφές που εξαλείφθηκαν. Η ομογενοποίηση προσθέτει την παράμετρο των χολικών αλάτων, τα οποία θα έπρεπε λογικά να καταλαμβάνουν τη νέα διεπαφή.

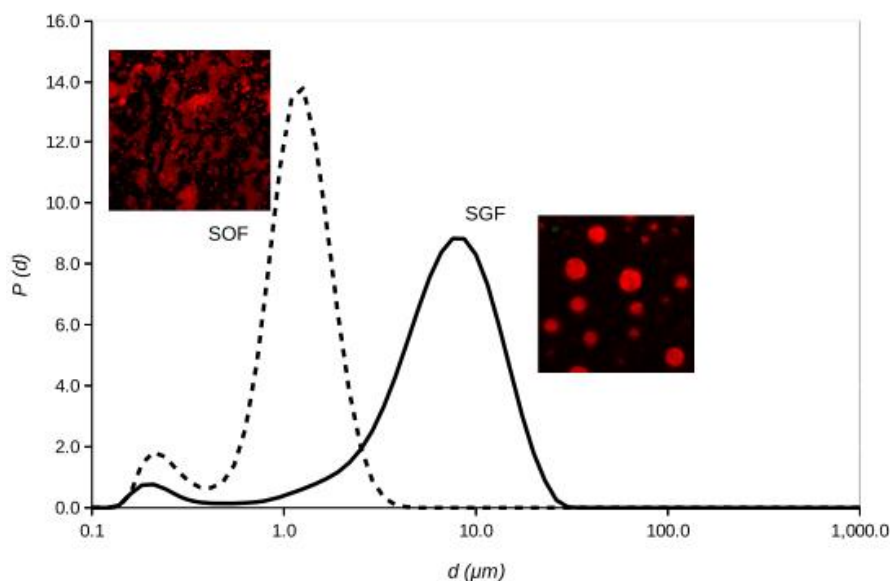
Στην περίπτωση του Tween 20 (χωρίς ομογενοποίηση), η αύξηση του pH με μετακίνηση από το προσομοιωμένο στομάχι στο προσομοιωμένο έντερο έχει σαν αποτέλεσμα την αναστροφή στο δυναμικό zeta του στοματικού τομέα. Στην περίπτωση αυτή το δυναμικό zeta βρίσκεται μεταξύ -10 mV και -20 mV καθώς και οι βλεννίνες και τα χολικά άλατα πρέπει να υπολογίζονται για την έκταση αυτών των τιμών. Σε αυτήν την περίπτωση μπορεί κανείς να μιλήσει για ένα σύστημα το οποίο είναι, τουλάχιστον όσον αφορά τις συνθήκες που επικρατούν στην εργασία, αδρανές ως προς το από του στόματος-γαστρική-εντερικό χημικό περιβάλλον, με πιθανό

Ανακύπτει το ερώτημα σχετικά με τη δυνατότητα ρύθμισης της απελευθέρωσης ελαίου μέσω του ελέγχου της σύνθεσης του διεπιφανειακού στρώματος. Έχει εκτελεστεί μια σειρά πειραμάτων σε ένα διεπιφανειακό στρώμα δύο συστατικών (1% καζεϊνικό νάτριο, 1% Tween 20). Για ένα σωματίδιο ελαίου μεγέθους μικρομερούς και σε $\phi = 0,3$, καμία από τις δύο ουσίες δεν θα πρέπει να είναι ικανή να κορέσει τη διεπαφή, καθώς η συγκέντρωσή τους είναι χαμηλή για τέτοια κάλυψη επιφάνειας εντός αυτής της περιοχής μεγέθους σταγονιδίων, έτσι η τελευταία θα ήταν καλυμμένη από στίγματα και των δύο συστατικών (επαληθεύονται στα τρέχοντα πειράματα λόγω έλλειψης πρωτεΐνης στον ορό όπως προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford). Το Σχήμα 19 δείχνει την εξέλιξη των κατανομών μεγέθους σταγονιδίων αυτού του γαλακτώματος μεικτής διεπιφανειακής στρώσης. Μπορεί να φανεί ότι, κατά την μεταφορά από το στοματικό στο γαστρικό περιβάλλον, το μέγεθος των σταγονιδίων αυξάνεται κατά 5 έως 10, αλλά όχι περισσότερο. Αυτό επαληθεύεται με συνεστιακή μικροσκοπία ως το σχηματισμό μεγαλύτερων σταγονιδίων μέσω εξαιρετικά ελεγχόμενης συγχώνευσης. Υποθέτοντας ότι, όπως προτάθηκε προηγουμένως, η διασύνδεση καλύπτεται από επιθέματα καζεϊνικού και Tween 20, η διάσπαση από το ένζυμο των τμημάτων πλούσια σε καζεϊνικά θα καταστήσει αυτά τα τμήματα της διεπαφής ευαίσθητα σε συνένωση. αυτό το φαινόμενο θα αυξήσει τα μέσα μεγέθη σταγονιδίων, μειώνοντας την περιοχή διεπιφάνειας μέχρι ένα σημείο όπου το Tween 20 επαρκεί για να το καλύψει πλήρως. Εκεί, η συσσωμάτωση διακόπτεται και το μέγεθος των σταγονιδίων σταθεροποιείται.

6. Συμπεράσματα

Τα σταθεροποιημένα με καζεϊνή γαλακτώματα επηρεάζονται άμεσα από τις μεταβολές στο ιοντικό περιβάλλον και το pH, καθώς αυτά μεταβάλλονται από την εισαγωγή στο στόμα, έπειτα στο στομάχι, την παραμονή τους εκεί και την επακόλουθη μεταφορά και διαμονή

τους στο *in vitro* έντερο. Αυτά τα γαλακτώματα δεν θα θρομβωθούν έντονα παρουσία προσομοιωμένου υγρού στόματος, καθώς οι δύο κολλοειδείς πληθυσμοί, τα καλυμμένα με καζεϊνικά σταγονίδια ελαίου και η βλεννίνη, αμφότερα φορτώνονται αρνητικά και η βλεννίνη δεν είναι αρκετά συμπυκνωμένη ώστε να προκαλεί κροκίδωση εξάντλησης. Μετά την εισαγωγή στο στομάχι, τα φορτία εξαλείφονται, οδηγώντας σε γρήγορη κροκίδωση, η οποία εξελίσσεται σε συγχώνευση που προκαλείται από πεψίνη και διάσπαση γαλακτώματος σε ελαιώδη και υδατική φάση εντός 2 ωρών από την εισαγωγή στον γαστρικό χώρο. Η επιστροφή σε ένα ουδέτερο pH στο εντερικό μοντέλο έχει ένα λειτουργικό ρόλο μόνο με την παροχή επαναγαλακτωματοποίησης στον πυλώρο παρουσία χολικών αλάτων, που την περίπτωση αυτή οι πρωτεΐνες δεν συμμετέχουν στη διεπαφή. Στην περίπτωση γαλακτωμάτων σταθεροποιημένων με Tween 20, ο σχηματισμός ενός ηλεκτρικού διπλού στρώματος και η παρουσία βλεννίνης οδηγούν στην εκδήλωση ενός αρνητικού ζετα δυναμικού στην στοματική φάση του μοντέλου. Αν και αυτό εξαλείφεται στο μοντέλο του γαστρικού περιβάλλοντος, τα γαλακτώματα δεν εμφανίζουν κροκίδωση ή συσσωμάτωση. Αυτές οι δύο αξιοσημείωτα διαφορετικές πορείες εξέλιξης μπορούν να συνδυαστούν ως μορφές σχηματισμού ελεγχόμενης συσσωμάτωσης με ανάμιξη του ευαίσθητου στην πεψίνη καζεϊνικού με το ευαίσθητο στην πεψίνη Tween 20 ως γαλακτωματοποιητές. Τέτοιες προσεγγίσεις μπορούν να προωθήσουν στρατηγικές για τον έλεγχο και τη λειτουργικοποίηση των γαλακτωμάτων με βάση τον έλεγχο της διεπιφανειακής σύνθεσης των σταγονιδίων.



Σχήμα 20: Κατανομές μεγέθους σωματιδίων γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (αρχική $\phi = 0,4$) γαλακτωματοποιημένα χρησιμοποιώντας ένα μίγμα 2% καζεϊνικού νατρίου και 2% Tween 20. Τα δεδομένα παρουσιάζονται μετά από εισαγωγή στο προσομοιωμένο στοματικό υγρό (SOF, διακεκομμένη γραμμή) και ένα τέλος μιας διαμονής 120 λεπτών με το προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (SGF, συνεχής γραμμή). Οι αντίστοιχες εγχάρακτες μικροσφαίρες με χρωστική Nile red εμφανίζονται δίπλα στα αντίστοιχα διαγράμματα κατανομής μεγέθους.

7. Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία:

- A. Benichou, A. Aserin, N. Garti. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 29-41, 108-109 (2004)
- A. Sarkar, K.K.T Goh and H. Singh. Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1270–1278 (2009)
- B. Gleize, F. Tourniaire, L. Depezay, R. Bott, M. Nowicki, L. Albi no, D . Lairon, E. Kesse-Guyot, P. Galan, S. Hercberg, P. Borel, *Br J Nutr* **110**, 1 (2013)
- D. J. McClements. *Food emulsions, Principles, Practice and Techniques*, 609 (2005)
- D. Rossetti, G.E. Yabukov, J.R. Stokes, A.-M. Williamson, G.G.Fuller, *Food Hydrocoll* **22**, 1068 (2008)
- D. Semwogerere and E. R. Weeks, Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, **10**, 108, (2005)
- E. Dickinson, C. Ritzoulis, M.J.W. Povey, *J Colloid Interface Sci* **212**, 466 (1999)
- E. Dickinson, M.G. Semenova, L.E. Belyakova, A.S. Antipova, M.M. Il'in, E. Tsapkina, C. Ritzoulis, *J Colloid Interface Sci* **239**, 87 (2001)
- E. Dickinson. Food colloids- An overview. *Colloids and Surfaces*, **42**, 191-204 (1989)
- E. Silletti, M.H. Vingerhoeds, W. Norde, G.A. van Aken, *FoodHydrocoll* **21**, 596 (2007) emulsifying properties using a structure-function approach, *Food Chemistry*, **141:2**,
- G. J. Spreight. Introduction Into the Environment. *Environmental Inorganic Chemistry for Engineers*, **6**, 283-332 (2017)
- G.A. van Aken, E. Bomhof, F.D. Zoet, M. Verbeek, A. Oosterveld, *Food Hydrocoll* **25**, 781 (2011)
- G.F. Furtado, K.C.G. Silva, C.C.P. de Andrade, R.L. Cunha, *J FoodEng* **229**, 86 (2018)
- H. Ma, P. Forrsell, R. Partanen, R. Seppänen, J. Buchert, H. Boer, *J Agric Food Chem* **57**, 3800 (2009)
- H. Singh, A. Sarkar. Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Science Direct* (2011)
- H. Singh, A. Ye, D. Horne. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Science Direct* (2009)
- H. Singh, A. Ye, M.J. Ferrua, *Curr Op Food Sci*, **3**, 85 (2013)
- H.M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood, *J Dairy Sci* **87**, 1641 (2004)
- J. Chen, E. Dickinson, M. Edwards, *J Text Studies* **20**, 377 (1999)
- J. Li, A. Ye, S.J. Leeb, H. Singh, *Coll Surf B* **111**, 80 (2013)
- L. Day, M. Golding, M. Xu, J. Keogh, P. Klifton, T.J. *Food Hydrocoll* **36**, 151 (2014)
- L. Salvia-Trujillo, C. Qian, O. Martin-Belloso, D.J. McClements, *Food Chem* **139**, 878 (2013)

- L. Shi, C. Miller, K.D. Caldwell, P. Valint, Coll Surf B **15**,303(1999)7. M.H. Vingerhoeds, B.J. Blijdenstein, F.D. Zoet, G.A. Van Aken, Food Hydrocoll **19**, 915 (2005)
- M. Golding, T. J. Wooster, The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **15**, 90–101, (2010)
- M. M. Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254 (1976)
- M. M. Robins, D. J. Hibberd. Emulsion flocculation and creaming, in Modern Aspects of Emulsion Science, Binks. *The Royal Society of Chemistry* (1998)
- M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D.J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C.N. Santos, R.P. Singh, G.E. Vegarud, M.S.J. Wickham, W. Weitschies, A Brodkorb Food Funct **5**, 1113 (2014)
- N. Anarjan and C. P. Tan, Effects of Selected Polysorbate and Sucrose Ester Emulsifiers on the Physicochemical Properties of Astaxanthin Nanodispersions, *Molecules* 2013, **18**, 768-777 p. 975-984, (2013)
- Q. Guo, A. Ye, M. Lad, D. Dalgleish, H. Singh, *Soft Matter* **10**, 1214 (2014)
- R. S.H Lam , M. T.Nickerson, Food proteins: a review on their
- R. Zhang, Z. Zhang, H. Zhang, E.A. Decker, D.J. McClements, Food Hydrocoll **45**, 175 (2015)
- Ritzoulis , S. Siasios, K.D. Melikidou, C. Koukiotis, C .Vasiliadou, S. Lolakos, Food Hydrocoll **29**, 382 (2012)
- S. Mun, E.A. Decker, D.J. McClements, *Food Res Int* **40**, 770(2007)
- S. Sabouri, A.J. Wright, M. Corredig, *Food Hydrocoll* **69**, 350 (2007)
- S.H.E. Verkempinck, L. Salvia-Trujillo, L.G. Moens, L. Charleer, A.M. Van Loey, M.E. Hendrickx, T. Grauwet, *Food Chem* **246**, 179(2018)
- S.L. Turgeon, L.-E. Rioux, *Food Hydrocoll* **25**, 1915 (2011)
- Sarkar, D.S. Horne, H. Singh, *Int Dairy J* **20**, 589 (2010)
- Sarkar, K.K.T. Goh, H. Singh, *Food Hydrocoll* **23**, 1270 (2009)
- T.M. Giang, S. Le Feunteun, S. Gaucel, P. Brestaz, M. Anton, A. Meynier, I.C. Trelea, *Food Hydrocoll* **43**, 66 (2015)
- V. Lykopoulou, V. Karageorgiou, C. Vasiliadou, C. Ritzoulis. Local Dynamics During the Mixing of Saliva with a Model Colloidal Food. *Food Biophysics* (2017)
- V. Prasad, D. Semwogerere and Eric R Weeks, Confocal microscopy of colloids. *J. Phys.: Condens. Matter*, **19** 113102, (2007)
- Z. Rousi, C. Ritzoulis, P.D. Karayannakidis, *Food Digestion* **5**,1(2014)

Ελληνική βιβλιογραφία:

- Γ. Γκοτζαμάνης. Ανάπτυξη νέων «ευφρών» κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές-στατιστικό συμπολυμερές, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Σ. Κέντα. Φυσικοχημική μελέτη της σταθερότητας γαλακτωμάτων πρωτεϊνών γάλακτος με την τεχνική της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Χ. Ριτζούλης. Γαλακτώματα και Αφροί. *Φυσικοχημεία Τροφίμων*, 6, 127-129, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη (2015)
- Χ. Χαμαλάκη. Μελετη της συμβολης των νανογαλακτωματων στη σταθεροτητα και την ενδοδερμικη διεισδυση του φιλτρου υπεριωδους ακτινοβολιας ανοbenzone, Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πάτρας (2016)

Ιστότοποι:

- www.thermofisher.com
- <http://altus.mx/metadatos.html>
- www.zeiss.com