



ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ



**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ
ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΣΑΛΙΟΥ.**

**THE EFFECT OF THE ARCHITECTURE OF EMULSIONS IN
INTERACTION WITH SALIVA COMPONENTS.**

ΦΕΖΟΥΛΛΑΟΥ ΓΚΡΙΣΕΛΝΤΑ

**Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Τμήμα
Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141**

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

Εισηγητής: Ριτζούλης Χρήστος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρασκευάστηκε σειρά γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό με καζεϊνικό νάτριο ως γαλακτωματοποιητή και μελετήθηκε η επίδραση του ασβεστίου στην κροκιδωσή του. Το ασβέστιο κροκιδώνει, λόγω ηλεκτροστατικών έλξεων με τα διεπιφανειακά προσροφημένα καζεϊνικά, τα γαλακτώματα σε συγκέντρωσή του άνω των 9 mM.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν γαλακτώματα με μικτά διεπιφανειακά στρώματα καζεϊνικών και μη-ιονικού Tween20 και εκτέθηκαν σε 30 mM CaCl₂. Καθώς το Tween20 δεν αλληλεπιδρά με το ασβέστιο, δημιουργούνται στην επιφάνεια των λιποσφαιριδίων ζώνες κολλητικές (καζεϊνικά κροκιδούμενα με ασβέστιο) και μη-κολλητικές (Tween20) ενώ η αναλογία των δυο τασιενεργών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς τύπου συγκόλλησης των λιποσφαιριδίων, άρα σε διαφορετικές αρχιτεκτονικές.

Μελετήθηκε η συμπεριφορά των γαλακτωμάτων διαφορετικής αρχιτεκτονικής σε *in vitro* πέψη και παρατηρήθηκε ότι η αρχιτεκτονική επηρεάζει άμεσα τη βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών όπως οι πρωτεΐνες και το λίπος. Η ελεγχόμενη αρχιτεκτονική τέτοιου είδους θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων για την διευκόλυνση ή την αποτροπή της βιοαπελευθέρωσης συστατικών που ήδη υπάρχουν στο τρόφιμο (λίπος, θρεπτικές η αλλεργιογόνες πρωτεΐνες, λιποδιαλυτές τοξίνες ή βιταμίνες).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1. Εισαγωγή.....	4
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	5
2.1 Γαλακτώματα.....	5
2.1.1 Καζεϊνικό νάτριο.....	5
2.1.2 Tween20.....	6
2.1.3 Συνύπαρξη των δυο γαλακτωματοποιητών.....	7
2.2 Αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων	7
2.2.1 Παρουσία ιόντων.....	7
2.2.2 Κατά την έκθεση στην στοματική κοιλότητα	8
3. Σκοπός της εργασίας.....	9
4. Πειραματικό μέρος	9
4.1 Υλικά και όργανα.....	9
4.1.1 Υλικά.....	9
4.1.2 Εργαστηριακά όργανα.....	10
4.2 Μέθοδοι	10
4.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων και γαλακτωμάτων.....	10
4.2.2 Παρασκευή προσομοιωμένου στοματικού υγρού.....	12
5. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	13
5.1 Μελέτη των διάφορων συγκεντρώσεων CaCl ₂	13
5.2 Επίδραση του CaCl ₂ σε γαλακτώματα με διάφορες αναλογίες Tween20 και καζεϊνικό νάτριο.....	15
5.3 Επίδραση της μυξίνης σε γαλακτώματα με διάφορες αναλογίες Tween20 και καζεϊνικό νάτριο και 30 mmol CaCl ₂	20
5.4 Φασματοσκοπική απορρόφηση UV/Vis.....	24
6. Συμπεράσματα.....	25
7. Βιβλιογραφία.....	26

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα τρόφιμα και στις ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές, συστήματα γαλακτωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα για τη χορήγηση ελαίων ή υδρόφοβων φαρμάκων, είτε ενδοφλέβια είτε τοπικά. Σε αυτές τις εφαρμογές, μία σημαντική πρόκληση είναι η δημιουργία γαλακτωμάτων υψηλής σταθερότητας. Από τη φύση τους, τα συστήματα γαλακτώματος είναι θερμοδυναμικά ασταθή. Οι αλλαγές στη σταθερότητα θα έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στο μέγεθος των σταγονιδίων και άλλες ιδιότητες που σχετίζονται με την εφαρμογή. Κατά την αποσταθεροποίηση ενός συστήματος γαλακτώματος, η κροκίδωση, η συσσωμάτωση και η δημιουργία κρέμας κανονικά συμβαίνουν πριν από τον τελικό διαχωρισμό φάσης. Αυτά τα φαινόμενα μεταβάλλουν δραστικά τα χαρακτηριστικά συστηματικής κατανομής και απελευθέρωσης γαλακτωμάτων, η σταθερότητα των οποίων, ως εκ τούτου, αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τις περισσότερες φαρμακευτικές εφαρμογές. (L. Shi et.al)

Στα επεξεργασμένα τρόφιμα, τα λιπίδια ενσωματώνονται κανονικά μέσα στο τρόφιμο με τη μορφή ενός γαλακτώματος. Υπάρχουν πολλά κοινά τρόφιμα που θεωρούνται γαλακτώματα: γάλα, μαργαρίνη, παγωτό, μαγιονέζα, σάλτσες σαλάτας, κρέμες καφέ, σοκολάτα, παρασκευάσματα για βρέφη, λουκάνικα, αρτοσκευάσματα και σάλτσες όπως η ολλανδέζικη. Όταν συσκευάζονται και κατασκευάζονται σε μεγαλύτερη κλίμακα, τα περισσότερα από αυτά τα τρόφιμα χρειάζονται γαλακτωματοποιητές για να σταθεροποιήσουν το μείγμα και να διατηρήσουν τα διαφορετικά συστατικά από το να διαχωριστούν. Η λεκιθίνη είναι ένας κοινός γαλακτωματοποιητής που απαντάται φυσιολογικά στο σογιέλαιο. Οι κρόκοι αυγών είναι ένα άλλο παράδειγμα γαλακτωματοποιητή. περιέχουν λεκιθίνη και χοληστερόλη, γεγονός που τους καθιστά εξαιρετικό συνδετικό υλικό για σάλτσες όπως η μαγιονέζα.

Τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό αποτελούν τη βάση για πολλά προϊόντα διατροφής. Τα γαλακτώματα τροφίμων ελαίου σε νερό είναι σύνθετα κολλοειδή συστήματα που αποτελούνται από σταγονίδια ελαίου και διάφορα συστατικά υδατικής φάσης - όπως βιοπολυμερή, υδατάνθρακες και άλατα - με διαφορετικά μεγέθη και συγκεντρώσεις. οι αλληλεπιδράσεις τους καθορίζουν τη σταθερότητα της θερμότητας, τη σταθερότητα σε κρέμασμα, το ιξώδες και την υφή των γαλακτωμάτων. Υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων να αναπτύσσονται θρεπτικά φαγητά και ποτά με βάση γαλάκτωμα ελαίου σε νερό, ειδικά σε υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες για ιατρική χρήση. (Y. Liang et.al, 2017)

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 Γαλακτώματα

Ένα γαλάκτωμα είναι ένα πολύπλοκο σύστημα από την άποψη της σύνθεσης επειδή περιέχει σταγονίδια ελαίου που διασπείρονται σε μία υδατική φάση (J. Sun et.al, 2019). Ωστόσο, ένα γαλάκτωμα θα πρέπει να σταθεροποιείται με γαλακτωματοποιητές λόγω των ασταθών ιδιοτήτων του (E. Dickinson & V. Galazka, 1992) (K. Wang et.al, 2018). Τα γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη σχετική κατανομή του λαδιού 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 γάλα κρέμα, σάλτσες, μαγιονέζα, ποτά και σούπες. Ένα σύστημα που αποτελείται από σταγονίδια νερού, τα οποία είναι διεσπαρμένα σε μια ελαιώδη φάση ονομάζεται γαλάκτωμα νερό σε λάδι (W/O), όπως μαργαρίνη και 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. Τα επιφανειοδραστικά χρησιμοποιούνται γενικά για τη βελτίωση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων τροφίμων. Οι δύο πιο σημαντικοί τύποι επιφανειοδραστικών υλικών στην τροφή είναι πρωτεΐνες και επιφανειοδραστικά χαμηλού μοριακού βάρους (K. Wang et.al, 2018).

2.1.1 Καζεΐνικό Νάτριο

Τα συστατικά πρωτεΐνης ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται συχνά σε τρόφιμα ως γαλακτωματοποιητές λόγω της ικανότητάς τους να διευκολύνουν το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (A. Kulmyrzaev et.al, 2000), (E. Dickinson & S.T. Hong, 1997), (E. Dickinson, 2001), (L.M. Human, 1996).

Αυτά τα συστατικά διαλύονται σε μια υδατική φάση που στη συνέχεια ομογενοποιείται με μια ελαιώδη φάση, κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης τα αμφίφυλα μόρια πρωτεΐνης ορού γάλακτος απορροφούνται γρήγορα στην επιφάνεια των παρασκευασμένων σταγονιδίων ελαίου. Η προσρόφηση πρωτεϊνών μειώνει την ενδοεπιφανειακή τάση, η οποία διευκολύνει την περαιτέρω διάσπαση των σταγονιδίων και επομένως αυξάνει την αποτελεσματικότητα ομοιογενοποίησης. (A. Kulmyrzaev et.al, 2000) , (P. Walstra, 1996). Οι πρωτεΐνες σχηματίζουν επίσης μια προστατευτική μεμβράνη γύρω από σταγονίδια που τους εμποδίζει να συσσωματώνονται με τους γείτονές τους τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά την ομογενοποίηση (A. Kulmyrzaev et.al, 2000), (E. Dickinson, 1997).

Οι πρωτεΐνες γάλακτος σε διαλυτή και διεσπαρμένη μορφή εκτιμώνται ευρέως ως συστατικά τροφίμων με εξαιρετικά χαρακτηριστικά επιφανειακής δράσης και σταθεροποίησης κolloειδών (H. Mulder & P. Walstra, 1974) , (E. Dickinson, 2001). Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού γαλακτώματος, τα διάφορα πρωτεϊνικά μόρια και συσσωματώματα απορροφώνται ταχέως στην επιφάνεια των νεοπλασματικών σταγονιδίων ελαίου. Η προκύπτουσα στερική σταθεροποιητική στιβάδα προστατεύει αμέσως τα λεπτά σταγονίδια από την ανάκαμψη και στη συνέχεια παρέχει φυσική σταθερότητα στο γαλάκτωμα κατά τη διάρκεια της μεταγενέστερης επεξεργασίας και της μακροχρόνιας αποθήκευσης (E. Dickinson, 2001). Οι καζεΐνες είναι μια οικογένεια μη δομημένων αμφίφυλων πρωτεϊνών γάλακτος γνωστές ως $\alpha S1$, $\alpha S2$, β και κ , οι οποίες έχουν την τάση να σχηματίζουν φυσικά πολύπλοκα συσσωματώματα με αναφερόμενα μέσα μεγέθη μέχρι 300nm (C.H. Iriart et.al, 2016). Το καζεϊνικό νάτριο (NaCas) προκύπτει από την απομάκρυνση του φωσφορικού ασβεστίου και χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία και στη βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητής γαλακτώματος και παράγοντας σχηματισμού αφρού (C.H. Iriart et.al, 2016). Αυτά τα χαρακτηριστικά και το γεγονός ότι είναι ένα φυσικό προϊόν καθιστούν το καζεϊνικό άλας έναν καλό γαλακτωματοποιητή για την παρασκευή ενός γαλακτώματος τροφίμων (L. Perungini et. al, 2018).

2.1.2 Tween20

Τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά Tween20 δεν είναι ευαίσθητα στην παρουσία ηλεκτρολυτών (όπως μεταλλικά άλατα) σε ένα μέσο. Έχουν ευρεία χρήση σε οικιακές και βιομηχανικές εφαρμογές όπως καθαρισμός, προσωπική φροντίδα, φαρμακείο, μικροβιολογία, αφροί τροφίμων και σταθεροποίηση γαλακτώματος, χρώματα και επιχρίσματα, φινίρισμα υφασμάτων και προστασία των καλλιεργειών. Τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά είναι επίσης χρήσιμα ως συστήματα μοντέλων διαλυτοποίησης φαρμάκων. Χρησιμοποιούνται επιπλέον ως προσροφητικά πρότυπα για τη διερεύνηση των διεπιφανειακών φαινομένων κατά τη διάρκεια των διαδικασιών διαβροχής, αφρισμού, γαλακτωματοποίησης και εκχύλισης. Σε τέτοιες λειτουργίες εμφανίζονται ιδιότητες μη ισορροπίας, επομένως, η διαδικασία προσρόφησης των επιφανειοδραστικών μορίων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. (A. Bak i& W. Podgorska, 2016)

2.1.3 Συνύπαρξη των δυο γαλακτωματοποιητών

Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις συνύπαρξης πρωτεϊνών και επιφανειοδραστικών ουσιών στη διεπιφάνεια ελαίου/νερού (O/W), δηλαδή στην περίπτωση ελαίου ή υδατοδιαλυτών επιφανειοδραστικών ουσιών (L. Perungini et. al, 2018), (Y. Fang & D.G. Dalgleish, 1993), (G. Doxastakis & P. Sherman, 1986). Η συμπεριφορά των μικτών συστημάτων που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες συσχετίζεται έντονα με την παρουσία δομών συσχέτισης τασιενεργού-πρωτεΐνης και διεπιφανειακών αλληλεπιδράσεων (L. Perungini et. al, 2018).

Τα επιφανειοδραστικά χαμηλού μοριακού βάρους μειώνουν την επιφάνεια ή την επιφανειακή τάση σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με τα μακρομοριακά επιφανειοδραστικά, η διαφορά αυτή σχετίζεται κυρίως με τις διαφορές στον προσανατολισμό και τη διαμόρφωση στη διεπιφάνεια. Γενικά, τα επιφανειοδραστικά χαμηλής μοριακής μάζας απορροφούνται γρήγορα και προσανατολίζονται σωστά μεταξύ των δύο φάσεων διευκολύνοντας τη μέγιστη μείωση της διεπιφανειακής τάσης (L. Perungini et. al, 2018). Οι πρωτεΐνες είναι λιγότερο επιφανειοδραστικές σε σύγκριση με τα επιφανειοδραστικά χαμηλής μοριακής μάζας, επειδή οι πρωτεΐνες μειώνουν την διεπιφανειακή τάση σχηματίζοντας μια συνεχή ιξωδοελαστική μεμβράνη γύρω από τα σταγονίδια που όπως μια μεμβράνη σταθεροποιεί τη διασκορπισμένη φάση, επιφανειοδραστικά χαμηλής μοριακής μάζας δεν σχηματίζουν ένα τέτοιο ιξωδοελαστικό φιλμ (L. Perungini et. al, 2018).

Η συμπεριφορά των μικτών συστημάτων εξαρτάται από τη φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και γαλακτωματοποιητών στη διεπιφάνεια πετρελαίου-νερού, ωστόσο οι απλοί μη ιονικοί γαλακτωματοποιητές εκτοπίζουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος από τη διεπιφάνεια επειδή σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικών παράγουν χαμηλή τάση διεπιφάνειας (J. Chen & E. Dickinson, 1998), (L. Perungini et. al, 2018).

2.2 Αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων

2.2.1 Παρουσία ιόντων

Μερικές μελέτες εξέτασαν την επίδραση των ιόντων ασβεστίου στη σταθερότητα και στη ρεολογία των γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό που σταθεροποιήθηκαν με πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Τα ιόντα ηλεκτρολυτών επηρεάζουν τη συσσωμάτωση των σταθεροποιημένων με πρωτεΐνη σταγονιδίων με διάφορους τρόπους. Πρώτον, μειώνουν την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ των σταγονιδίων μέσω ηλεκτροστατικής διαλογής. Δεύτερον, μπορούν να

δεσμευτούν σε αντίθετα φορτισμένες ομάδες στην επιφάνεια των σταγονιδίων γαλακτώματος, ελαττώνοντας το μέγεθος της ζ-δυνατοτήτων τους και μειώνοντας έτσι την ηλεκτροστατική απώθηση. Τρίτον, η δέσμευση ιόντων μπορεί να αυξήσει την απωθητική ενυδάτωση μικρής εμβέλειας μεταξύ σταγονιδίων, η οποία μπορεί να αντιτίθεται στη συσσώρευση των σταγονιδίων. Τέλος, υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρολύτη μεταβάλλουν τη δομική οργάνωση μορίων νερού, η οποία μεταβάλλει τη δύναμη των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ μη πολικών ομάδων.

Η σύνδεση ιόντων ασβεστίου με πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχει μελετηθεί υπό διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (C.P. Pappas & J. Rothwell, 1991) , (A. Ye & H. Singh, 2000) , (A. Kulmyrzaev et.al, 2000). Η δέσμευση του Ca^{2+} στις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος μειώνει τις ηλεκτροστατικές αντιδράσεις και προάγει τις αλληλεπιδράσεις των υδρόφοβων περιοχών, οι οποίες μπορεί αναπόφευκτα να επηρεάσουν τη συμπεριφορά απορρόφησης της πρωτεΐνης στη διασύνδεση ελαίου-νερού και τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων που σχηματίζονται με πρωτεΐνες ορού γάλακτος (A. Ye & H. Singh, 2000).

2.2.2 Κατά την έκθεση στην στοματική κοιλότητα

Η μυξίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη, είναι το κύριο συστατικό του βλεννογόνου, το οποίο καλύπτει τις επιφάνειες των επιθηλιακών οργάνων και χρησιμεύει ως φυσικό φράγμα μεταξύ του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος και της μεμβράνης πλάσματος (L. Shi et.al). Το σάλιο έχει pH 6-7 και αποτελείται από πρωτεΐνες, ουσίες χαμηλής μοριακής μάζας (κυρίως ηλεκτρολύτες) και περισσότερο από 99% νερό (M.H. Vingerhoeds et.al, 2005). Οι πρωτεΐνες στο σάλιο (1-2 mg/ml) περιλαμβάνουν ένζυμα, ανοσοσφαιρίνες, αντιβακτηριακές πρωτεΐνες, πλούσιες σε προλίνη πρωτεΐνες (έως 45% κ.β. ολικής πρωτεΐνης) και μυξίνες (M.H. Vingerhoeds et.al, 2005). Οι μυξίνες είναι εξαιρετικά γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες με διάφορες λειτουργίες στο σάλιο. Για παράδειγμα, είναι υπεύθυνοι για την τυπική ιξωδοελαστική συμπεριφορά του σάλιου, απαραίτητη για τη συγκράτηση του στο στόμα. Η μυξίνη τείνει να συσσωρεύει και να δημιουργεί πηκτές όταν ένα γαλάκτωμα καταναλώνεται για λίγα δευτερόλεπτα στο στόμα. Σε αυτό το σύντομο χρονικό διάστημα, το γαλάκτωμα υφίσταται φυσικές και βιοχημικές μεταβολές όπως ανάμιξη με σάλιο (M.H. Vingerhoeds et.al, 2005). Η προσθήκη μυξίνης σε γαλακτώματα νερού σε λάδι σταθεροποιημένη με καζεϊνικό νάτριο σε pH 7 είχε σαν αποτέλεσμα κροκίδωση (C. Ritzoulis et.al, 2012). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μυξίνη στο γαστρικό σύστημα των χοίρων και η επίδρασή της στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων σταθεροποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μίγμα καζεϊνικού νατρίου με ένα μη ιονικό τασιενεργό μελετήθηκε.

3. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Μελέτη της επίδρασης των γαλακτωματοποιητών (Tween20 + καζεϊνικό νάτριο) στα γαλακτώματα υπό συνθήκες κροκίδωση με σκοπό τη χειραγώγηση της δομής τους.
- Μελέτη της επίδρασης του CaCl_2 στα γαλακτώματα υπό διαφορετικές αναλογίες γαλακτωματοποιητών ευαίσθητων και μη στα ιόντα ασβεστίου.
- Μελέτη της τύχης των παραπάνω δομημένων γαλακτωμάτων σε συνθήκες *in vitro* χώνευσης.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

4.1.1 Υλικά

Το υπερ-καθαρό νερό παρήχθη από συσκευή ELRA Purelab μοντέλο Flex 3 (Veolia Water Technologies, High Wycombe, UK) και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα. Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκε Tris (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο $M=121,14 \text{ g/mol}$ και NaN_3 (αζίδιο νατρίου) ως συντηρητικό. Μυξίνη από στομάχι χοίρου (τύπος II). Tween 20 (ιξώδες υγρό) αγοράστηκε από την SigmaAldrich (St. Louis, MO). $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 αγοράστηκαν από την Merck (Darmstadt, Γερμανία). KCl και NaHCO_3 αγοράστηκαν και τα δύο από την Mallinkrodt (St. Louis, MO). Το $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ αγοράστηκε από την ChemLab (Zedelgem, Βέλγιο). Ο Nile Red και ο Nile Blue αγοράστηκαν από την TCI (Tokyo Chemical Industry, UK) και την Alfa Aesar (Karlsruhe, Γερμανία) αντίστοιχα. Το καζεϊνικό νάτριο χορηγήθηκε από την MEVGAL A.E. Το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των γαλακτωμάτων ήταν η μυγλούλη. Το πρότυπο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή προσομοιωμένων υγρών από του στόματος για κάθε τύπο γαλακτώματος βασίζεται στη μέθοδο Consensus InfoGest. Χρησιμοποιήθηκε HCl 1N για τη ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος.

4.1.2 Όργανα

Το μέγεθος των σταγονιδίων και οι κατανομές μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας τον Αναλυτή μεγέθους σωματιδίων διαθλάσεως με λέιζερ Malvern (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Ένα δείγμα προστέθηκε στη μονάδα διασποράς μέχρις ότου η σκίαση ήταν μεταξύ 10 και 20%. Το μέγεθος των γαλακτωματοποιημένων σταγονιδίων χαρακτηρίστηκε από τη μέση διάμετρο του όγκου $d [3.2]$. Οι μετρήσεις ZETA πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, NY). Οι μικρογραφίες διεργασιών ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ένα ομοειδές μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ Carl Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Germany). Μεγέθυνση $\times 10$ χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση των γαλακτωμάτων. Τα δείγματα βάφτηκαν και παρατηρήθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή. Η φθορίζουσα χρωστική ουσία Nile Red, που διαλύθηκε σε ακετόνη (0,1% β / ο), χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση της ελαιώδους φάσης. Η φθορίζουσα βαφή Nile Blue, που παρασκευάστηκε παρόμοια, χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των πρωτεϊνών σε γαλακτώματα. Τα ζωγραφισμένα δείγματα (υγρό ή στερεό) τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου καλυμμένες με καλυπτρίδες. Κάθε δείγμα ελήφθη χρησιμοποιώντας μία γυάλινη ράβδο. Για ομογενοποίηση των γαλακτωμάτων, χρησιμοποιήθηκε ένας ομογενοποιητής υπερήχων (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany). Χρησιμοποιήθηκε ένα Thermo Scientific Orion Benchtop (Thermo Fisher Scientific, MA) 3 αστέρων για τη ρύθμιση του pH και των μετρήσεων.

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων και γαλακτωμάτων

Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1L με προσθήκη 10mmol Tris (1.21g) και 0.05% Sodium Azide (0.5g) σε νερό. Έπειτα από μαγνητική ανάδευση τριών λεπτών, ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος σε pH=7 με σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl 1N. Το ρυθμιστικό διάλυμα αυτό, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως η υδατική φάση για την παρασκευή όλων των γαλακτωμάτων.

Για τη μέθοδο της φασματοσκοπικής απορρόφησης, φτιάχτηκαν δύο ομάδες διαλυμάτων με Tris (30ml), καζεϊνικό νάτριο και μυξίνη σε συγκέντρωση 0.1% σε διάφορες αναλογίες όπως περιγράφονται στον Πίνακα 1. Όμοια, φτιάχτηκαν άλλες δυο ομάδες διαλυμάτων με Tris (30ml), Tween20 και μυξίνη σε συγκέντρωση 0.1% σε διάφορες αναλογίες. Τα δείγματα υπέστησαν μαγνητική ανάδευση για 7-10 λεπτά. Ακολούθως, στα μισά διαλύματα προστέθηκε 30mmol $CaCl_2$.

Πίνακας 1. Περιγραφή των διάφορων αναλογιών στα διαλύματα απορρόφησης.

A/A	Διαλύματα NaCas+μυξίνη=0.1%		Διαλύματα Tween20+μυξίνη=0.1%	
	NaCas (%)	Μυξίνη (%)	Tween20 (%)	Μυξίνη (%)
1	100%=0.03 g	-	100%=0.03 g	-
2	80% =0.024 g	20% =0.006 g	80% =0.024 g	20% =0.006 g
3	60% =0.018 g	40% =0.012 g	60% =0.018 g	40% =0.012 g
4	50% =0.015 g	50% =0.015 g	50% =0.015 g	50% =0.015 g
5	40% =0.012 g	60% =0.018 g	40% =0.012 g	60% =0.018 g
6	20% =0.006 g	80% =0.024 g	20% =0.006 g	80% =0.024 g
7	-	100%=0.03 g	-	100%=0.03 g

Tween20 και καζεϊνικό νάτριο χρησιμοποιήθηκαν ως γαλακτωματοποιητές για την παρασκευή επτά γαλακτωμάτων των 100ml ελαίου σε νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα Tris χρησιμοποιήθηκε ως υδατική φάση 80% και 20% μυγλούλη ως η λιπαρή φάση ($d=0.774 \text{ g/ml}$) με διαφορετική αναλογία καζεϊνικού νατρίου-Tween20 σε συγκέντρωση 1% όπως φαίνεται στον Πίνακα 2. Σε κάθε προμίγμα γαλακτώματος προστέθηκε το αντίστοιχο ποσοστό γαλακτωματοποιητών και ελαίου. Ακολούθησε μαγνητική ανάδευση που κυμαίνονταν σε 5-15 λεπτά ανάλογα με το δείγμα και στη συνέχεια ακολούθησε ομογενοποίηση υπό ήπια μαγνητική ανάδευση με υπερηχητική συσκευή Hielscher ομογενοποιητής UP-100H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) που λειτουργεί σε 100 W και 30 kHz. Η ομογενοποίηση πραγματοποιήθηκε για 180 δευτερόλεπτα σε 100 κύκλους (συνεχής λειτουργία) και σε 1 (μέγιστο) εύρος. Έχει ληφθεί μέριμνα για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του δείγματος κατά την ομογενοποίηση. Τα γαλακτώματα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε σφραγισμένα υάλινα φιαλίδια για αποθήκευση μέχρι τη χρήση. Αυτά τα γαλακτώματα είχαν μεγέθη σταγονιδίων $d=[3.2]$ που κυμαίνονταν από 0.76 ± 0.13 έως $1.36 \pm 0.15 \mu\text{m}$.

Πίνακας 2. Παρασκευή γαλακτωμάτων.

Δείγματα	Tris (ml)	Μυγλούλη(g)	Tween20 (g)	NaCas (g)
1	80	15.48	-	1
2	80	15.48	0.2	0.8
3	80	15.48	0.4	0.6
4	80	15.48	0.5	0.5
5	80	15.48	0.6	0.4
6	80	15.48	0.8	0.2
7	80	15.48	1	-

Αφού παρασκευάστηκαν τα γαλακτώματα, προστέθηκαν 30 mmol $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (147 g/L) για να μελετηθεί η επίδραση του CaCl_2 σε αυτά.

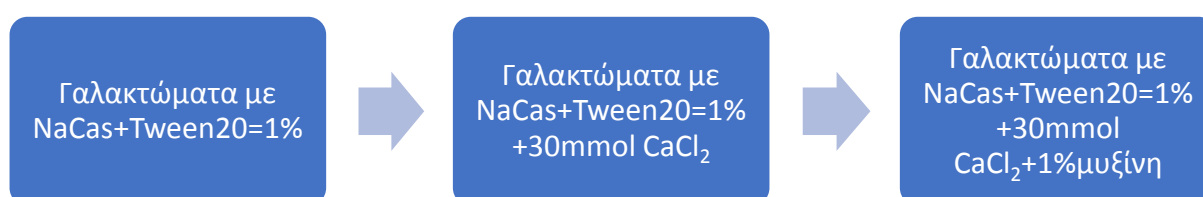
4.2.2 Παρασκευή προσομοιωμένου στοματικού υγρού

Το προσομοιωμένο στοματικό υγρό (SOF) έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με τον Πίνακα 3 (η συνταγή βασίζεται στο πρωτόκολλο InfoGest). Οι τιμές pH ρυθμίστηκαν στο 7 με την προσθήκη σταγονιδίων διαλύματος 20% HCl ή NaOH.

Table 3. Σύσταση SOF.

Άλατα	SOF	
	Συγκέντρωση(gL ⁻¹)	Όγκος (mL)
KCl	37.3	15.1
KH ₂ PO ₄	68	3.7
NaHCO ₃	84	6.8
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.5
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.06
CaCl ₂	33.3	0.1
Μυξίνη *	5	2

Για να παρασκευαστεί προσομοιωμένο σάλιο, 0,5% της μυξίνης στομάχου του χοίρου (τύπος II) αναμίχθηκε σε 50 mL διαλύματος SOF. Διεξήχθη in vitro εξέλιξη με προσθήκη 1% του προσομοιωμένου σάλιου σε κάθε γαλακτώμα όπως φαίνεται στο σχήμα 1 και αναδεύτηκε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



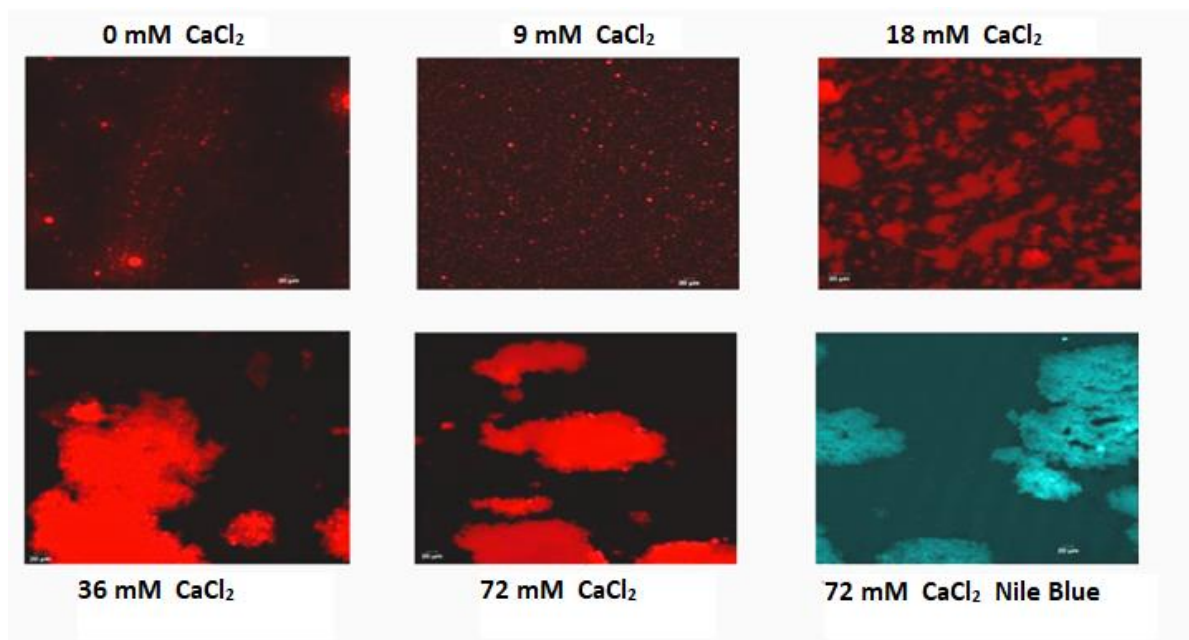
Σχήμα 1. Απεικόνιση παρασκευής γαλακτωμάτων.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

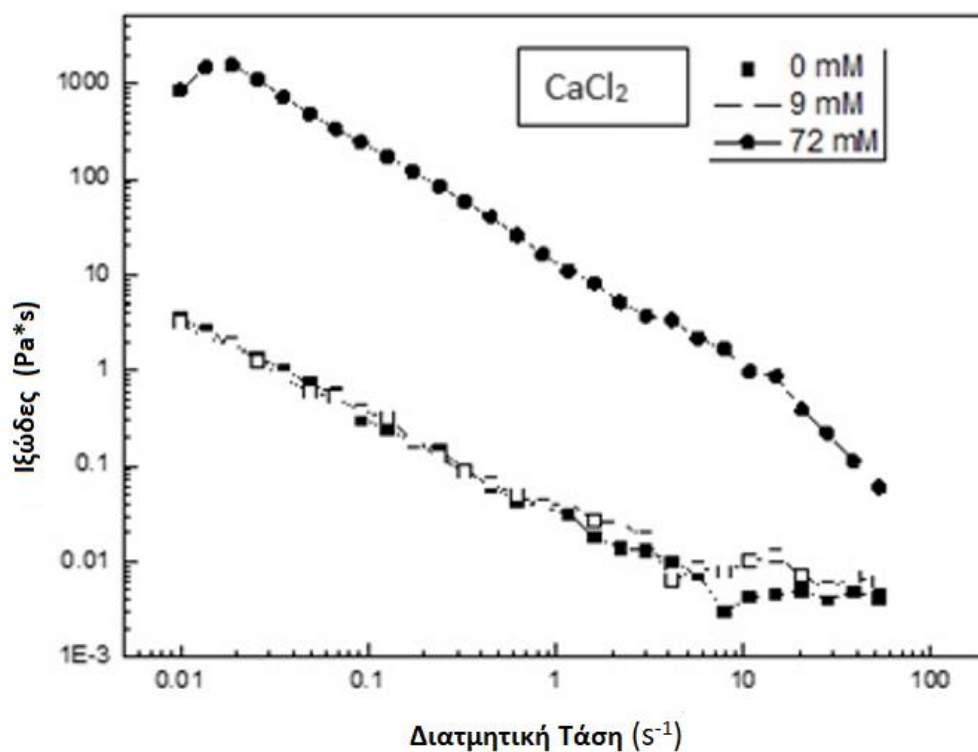
5.1 Μελέτη των διάφορων συγκεντρώσεων CaCl_2 .

Μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης CaCl_2 ως προς την κροκίδωση σε γαλακτώματα που περιείχαν 1% καζεϊνικό νάτριο, η οποία ήταν αναγκαία στα επόμενα στάδια της μελέτης. Το ασβέστιο έχει σημαντική επίδραση στη δομή του καζεϊνικού άλατος. Κάτω από μια κρίσιμη συγκέντρωση ασβεστίου (περίπου τα 10 mM), το σύστημα περιλαμβάνει κυρίως μικρά συσσωματώματα πρωτεϊνών. Πάνω από το σημείο συσσωμάτωσης σχηματίζεται μια διαφορετική δομή, που αποτελείται από μεγαλύτερα συσσωματώματα που περιέχουν περιοχές πυκνότερης πρωτεΐνης και ασβεστίου (A. Smialowska et.al, 2017).

Πέραν των 0 mM συγκεντρώσεις CaCl_2 8mmol δημιούργησαν κάποια κροκίδωση στα γαλακτώματα ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε έντονη συσσωμάτωση σταγονιδίων και κροκίδωση όπως φαίνεται στο Σχήμα 2. Στα 36mmol CaCl_2 η κροκίδωση των σταγονιδίων ήταν ικανοποιητική και επιλέχθηκε ως ποσότητα για τις κροκιδώσεις των γαλακτωμάτων. Με αύξηση της συγκέντρωσης πάνω από το όριο των 32mmol, επέρχεται και περαιτέρω αύξηση του όγκου της κροκίδωσης (J.A.M. Bolivar & J.L.O Vinuesa, 1999).



Σχήμα 2. Συνεστιακές μικρογραφίες γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό με 1% καζεϊνικό νάτριο pH 7 και διάφορες συγκεντρώσεις CaCl_2 . (Πάνω) Αριστερά προς δεξιά : 0 mmol, 9 mmol, 18 mmol CaCl_2 . (Κάτω) Αριστερά προς δεξιά : 36 mmol, 72 mmol CaCl_2 . Κόκκινο: χρωστική Nile Red Μπλε: λιπόφιλη χρωστική Nile Blue



Διάγραμμα 1. Απεικόνιση της συσχέτισης του ρυθμού διάτμησης ιξώδους σε συγκεντρώσεις 0,9,72 mmol CaCl₂ γαλακτώματα ελαίου σε νερό με 1% καζεϊνικό νάτριο και pH 7.

Οι μετρήσεις έδειξαν ότι τα κροκιδωμένα σταγονίδια προκάλεσαν αύξηση του ιξώδους των γαλακτωμάτων. Αυτό ήταν αναμενόμενο αφού η κροκίδωση αυξάνει το κλάσμα όγκου των σταγονιδίων σε ένα γαλάκτωμα με αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους (R.J. Hunter, 1986). Όπως απεικονίζεται και στο Διάγραμμα 1, το μεγαλύτερο ιξώδες με μεγάλη διαφορά, είχε το γαλάκτωμα με 72 mmol CaCl₂. Ενώ στα γαλακτώματα με 0 και 9 mmol αντίστοιχα, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο ιξώδες.

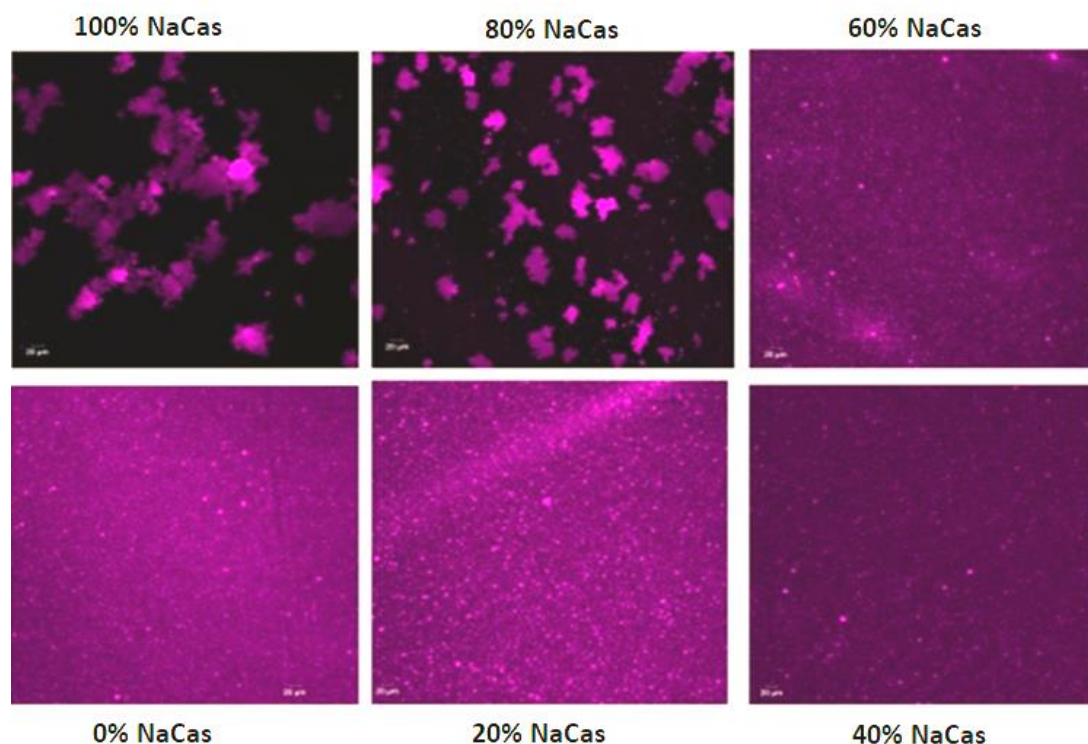
5.2. Μελέτη και επίδραση CaCl_2 σε γαλακτώματα με διάφορες συγκεντρώσεις καζεϊνικού νατρίου και Tween20.

Τα καζεϊνικά, λοιπόν, χρησιμοποιούμενα ως γαλακτωματοποιητές δημιουργούν γαλακτώματα που κροκιδώνονται από το ασβέστιο του CaCl_2 σε συγκεντρώσεις άνω των 18 mM. Το μη ιονικό τασιενεργό Tween20 εκτοπίζει άμεσα τα καζεϊνικά από την επιφάνεια των λιποσφαιριδίων, ενώ το ίδιο δεν κροκιδώνεται παρουσία ασβεστίου. Κατά τα παραπάνω, παρασκευάστηκε σειρά γαλακτωμάτων με αυξούμενη συγκέντρωση Tween20 στην επιφάνεια των λιποσφαιριδίων, συνεπώς με μειωμένη ευαισθησία στο ασβέστιο.

Παρασκευάστηκε σειρά γαλακτωμάτων με άθροισμα συγκέντρωσης καζεϊνικού νατρίου και Tween20 ίσο με 1%. Ο σκοπός ήταν η δημιουργία διαφορετικού επιφανειακού εμβαδού περιοχών ευαίσθητων και μη-ευαίσθητων στο ασβέστιο στην επιφάνεια των λιποσφαιριδίων. Χλωριούχο ασβέστιο 30mmol χρησιμοποιήθηκε για την κροκίδωση των γαλακτωμάτων .

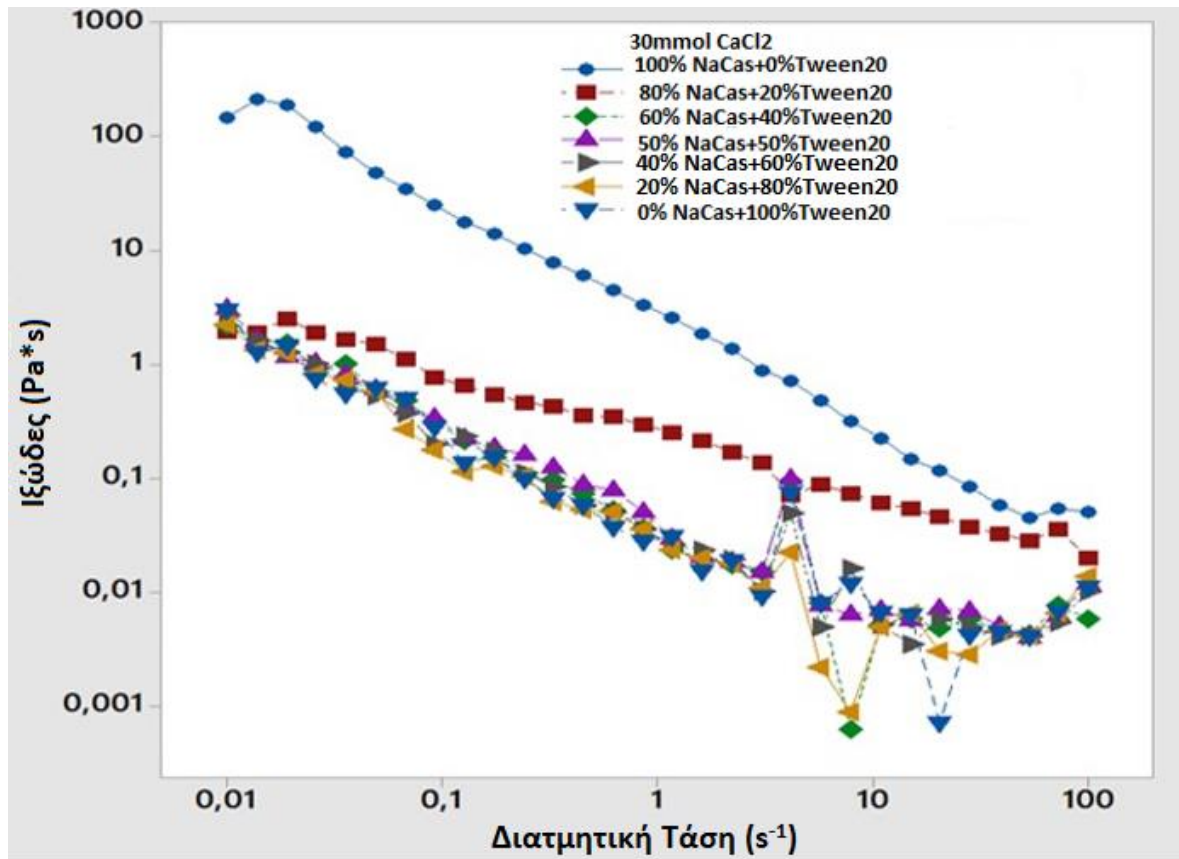
Η επίδραση του CaCl_2 στα γαλακτώματα που υπερίσχυε το καζεϊνικό νάτριο ήταν διαφορετική σε σχέση με τα γαλακτώματα που είχαν περισσότερη ποσότητα Tween20. Μεγαλύτερη κροκίδωση εμφάνισε το μίγμα με 100% καζεϊνικό νάτριο και καθόλου ποσότητα Tween20 και τη δεύτερη μεγαλύτερη κροκίδωση το γαλάκτωμα με 80% καζεϊνικό νάτριο και μικρή ποσότητα Tween20. Σε αντίθεση, όσο έπεφτε η ποσότητα καζεϊνικού νατρίου με παράλληλη αύξηση του Tween20 , τα γαλακτώματα δεν κροκιδώνονταν (Σχήμα 3).

Αυτό είναι αναμενόμενο κατά τα παραπάνω, επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση ότι η αναλογία της επιφάνειας των λιποσφαιριδίων της ευαίσθητης στο ασβέστιο (καλυμμένη με καζεϊνικά) προς την επιφάνεια της αδρανούς προς το ασβέστιο (καλυμμένη με Tween20) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ελεγχόμενη συγκόλληση λιποσφαιριδίων, συνεπώς την κατά βούληση δόμηση των γαλακτωμάτων.



Σχήμα 3. Συνεστιακές μικρογραφίες γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό με 1% καζεϊνικό νάτριο+Tween20 σε διάφορες αναλογίες, pH 7 και 30mmol CaCl₂. (Πάνω) Αριστερά προς δεξιά : 100% καζεϊνικό νάτριο, 80% καζεϊνικό νάτριο+20% Tween20 , 60% καζεϊνικό νάτριο+40% Tween20 .(Κάτω) Δεξιά προς αριστερά: 40% καζεϊνικό νάτριο+60% Tween20, 20% καζεϊνικό νάτριο+80% Tween20, 100% Tween20. Μωβ:Nile Red χρωστική.

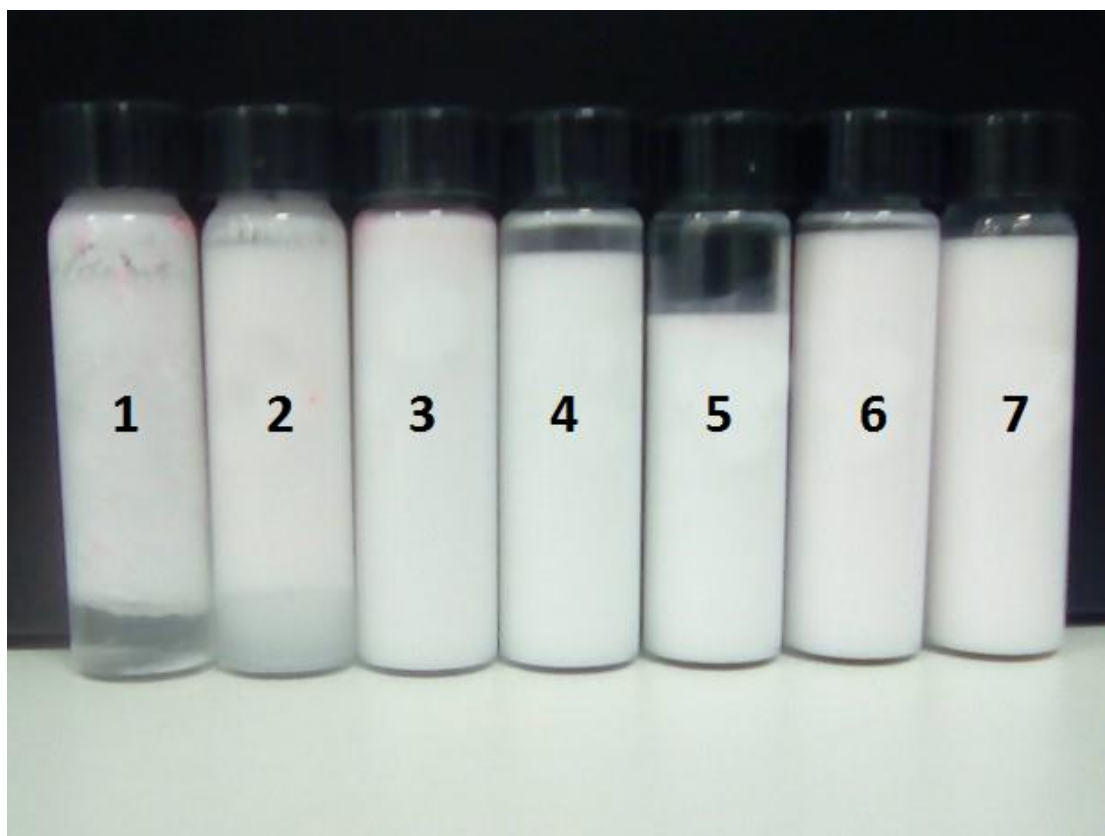
Τα ιόντα ηλεκτρολυτών ενισχύουν τη συσσωμάτωση των σταθεροποιημένων με πρωτεΐνη σταγονιδίων με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα μειώνουν την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ των σταγονιδίων ή δεσμεύονται σε αντίθετα φορτισμένες ομάδες στην επιφάνεια σταγονιδίων των γαλακτωμάτων. Επιπλέον, σε pH 7 κυριαρχούν τα δισθενή ιόντα Ca⁺² που είναι πιο αποτελεσματικά στην δέσμευση με αντίθετες φορτισμένες ομάδες (P.C. Hiemenz & R. Rajagopalan, 1997) (J.N. Israelachvili, 1992). Ενώ τα επιφανειοδραστικά μικρότερου μοριακού βάρους που απορροφούνται και τοποθετούνται κατάλληλα ανάμεσα στις δύο φάσεις μειώνουν σημαντικά την διεπιφανειακή τάση (L. Perungini et. al, 2018).



Διάγραμμα 2. Απεικόνιση της συσχέτισης του ιξώδους σε σχέση με τον ρυθμό διάτμησης σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό με διάφορες αναλογίες καζεϊνικού νατρίου +Tween20 σε συγκέντρωση 1%, pH 7 και 30mmol CaCl₂.

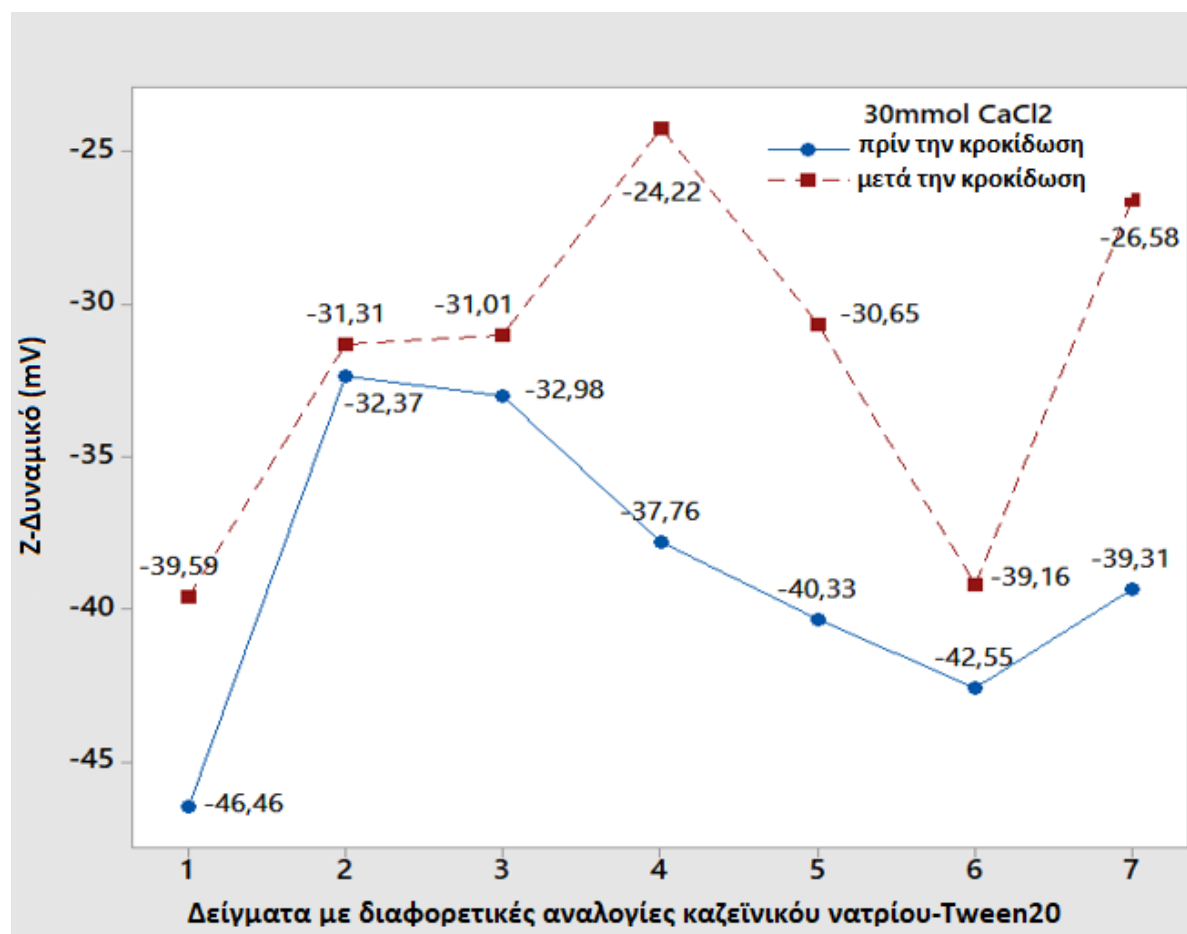
Όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση του μεγέθους των συσσωματωμένων σταγονιδίων, επέφερε αύξηση του ιξώδους. Στο Διάγραμμα 2 , φαίνεται ότι η προσθήκη CaCl_2 αύξησε σημαντικά το ιξώδες στο δείγμα που δεν περιείχε ποσότητα Tween20 σε αυτό. Ενώ, όσο αυξάνεται η ποσότητα του επιφανειοδραστικού στο γαλάκτωμα τόσο μειώνεται η κροκίδωση, συνεπώς και το ιξώδες.

Μικρότερη συγκέντρωση Tween20 ήταν αιτία για έντονη συσσωμάτωση σταγονιδίων με αποτέλεσμα μη σταθερά γαλακτώματα που χάνανε την κρεμώδη υφή τους και διαχωρίζονταν σε δυο φάσεις. (Σχήμα 4)



Σχήμα 4. Εικόνα γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό με 1% καζεϊνικό νάτριο+Tween20 σε διάφορες αναλογίες, pH 7 και 30mmol CaCl_2 . Αριστερά προς δεξιά : 100% καζεϊνικό νάτριο, 80% καζεϊνικό νάτριο+20% Tween20 , 60% καζεϊνικό νάτριο+40% Tween20, 40% καζεϊνικό νάτριο+60% Tween20, 20% καζεϊνικό νάτριο+80% Tween20, 100% Tween20.

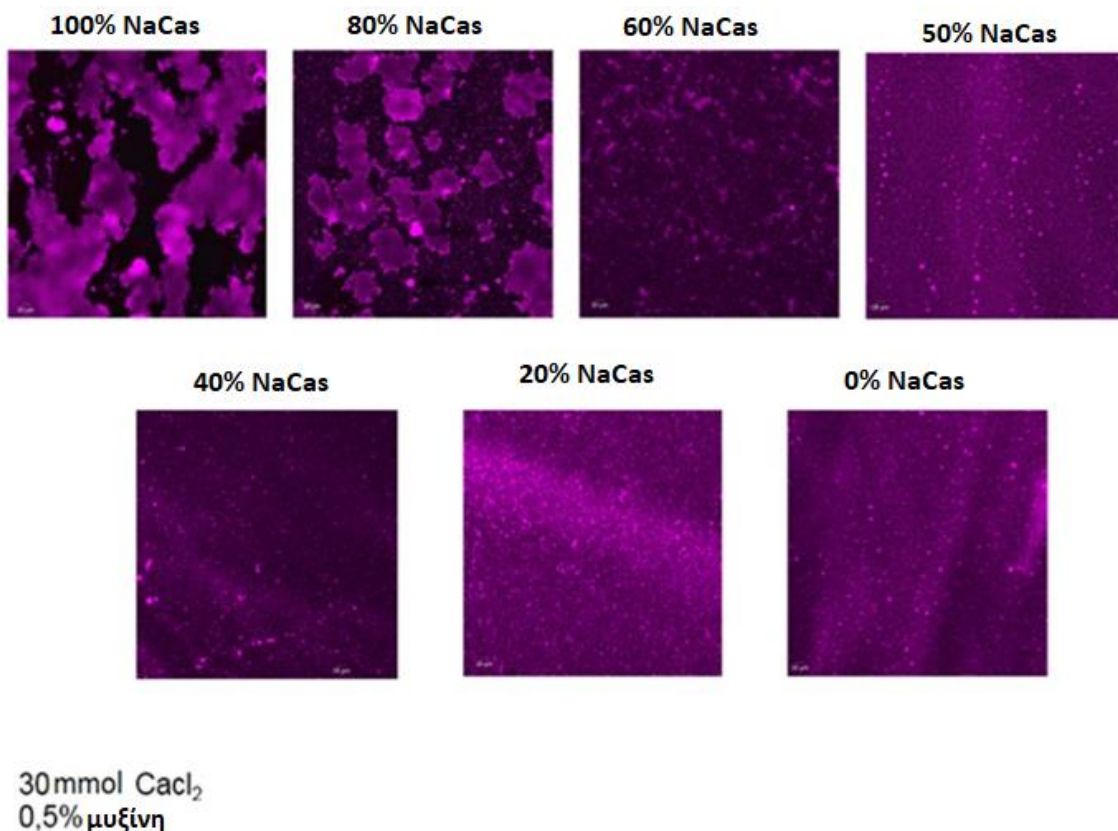
Όταν ιόντα δεσμεύονται σε αντίθετα φορτισμένες ομάδες στην επιφάνεια των σταγονιδίων γαλακτώματος, ελαττώνουν το μέγεθος του Z-δυναμικού τους και μειώνουν έτσι την ηλεκτροστατική απώθηση (A. Kulmyrzaev et.al, 2000). Στο Διάγραμμα 3, παρατηρείται η αρνητική πτώση του Z-δυναμικού για κάθε ένα γαλάκτωμα αφού προστέθηκε CaCl₂ και επιτεύχθηκε κροκίδωση.



Διάγραμμα 3, Απεικόνιση του Z-Δυναμικού σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό με συγκέντρωση 1% καζεϊνικού νατρίου+Tween20 πριν και μετά την προσθήκη 30mmol CaCl₂ (κροκίδωση). Όπου τα δείγματα που απεικονίζονται με την σειρά : 1=100% καζ.νάτριο, 2=80% καζ.νάτριο+20%Tween20, 3=60% καζ.νάτριο+40%Tween20, 4=50% καζ.νάτριο+50%Tween20, 5=40% καζ.νάτριο+60%Tween20, 6=20% καζ.νάτριο+80%Tween20, 7=100% Tween20

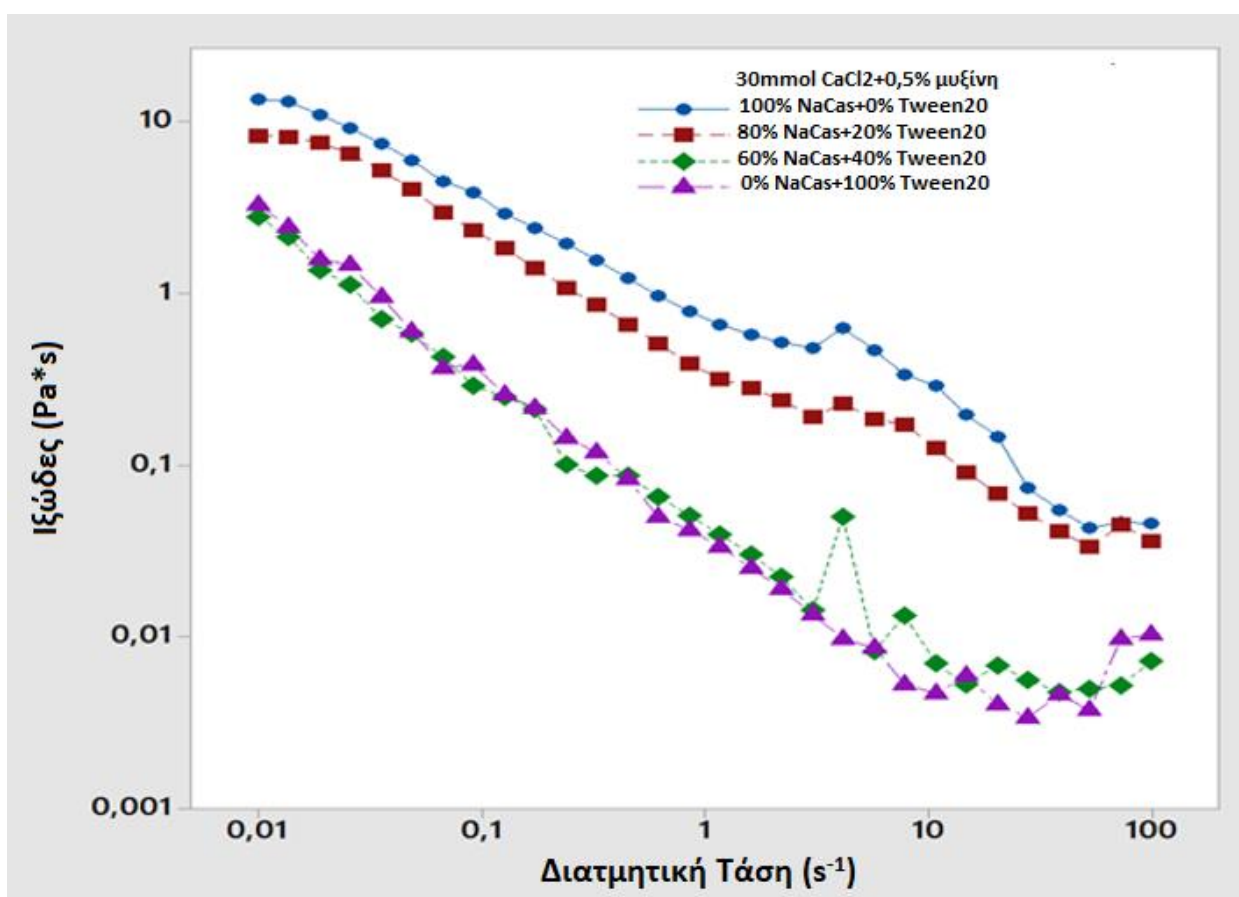
5.3 Επίδραση της μυξίνης σε γαλακτώματα με διάφορες αναλογίες Tween20 και καζεϊνικό νάτριο και 30 mmol CaCl₂

Στη συνέχεια του πειράματος, για να μελετηθεί η μεταβολή της αρχιτεκτονικής των γαλακτωμάτων μέσα στην στοματική κοιλότητα, χρησιμοποιήθηκε μυξίνη ως προσομοιωτής σάλιου. Με την προσθήκη μυξίνης στα γαλακτώματα παρατηρήθηκε άμεση και επιπλέον κροκίδωση στα ήδη κροκιδωμένα δείγματα. Ωστόσο, στα μίγματα που υπερίσχυε το Tween20 δεν παρατηρήθηκε αλλαγή. (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Συνεστιακές μικρογραφίες γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό με 1% καζεϊνικό νάτριο+Tween20 σε διάφορες αναλογίες, pH 7, 30mmol CaCl₂ και 0,5% μυξίνη. (Πάνω) Αριστερά προς δεξιά : 100% καζεϊνικό νάτριο, 80% καζεϊνικό νάτριο+20% Tween20, 60% καζεϊνικό νάτριο+40% Tween20, 50% καζεϊνικό νάτριο+20% Tween20. (Κάτω) Αριστερά προς δεξιά: 40% καζεϊνικό νάτριο+60% Tween20, 20% καζεϊνικό νάτριο+80% Tween20, 100% Tween20. Μωβ:Nile Red χρωστική.

Τα γαλακτώματα ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, με κυρίαρχη κροκίδωση να εμφανίζει το δείγμα χωρίς Tween20 . Συνεπώς, μεγαλύτερο ιξώδες έδειξε να έχουν τα γαλακτώματα με περισσότερη ποσότητα καζεϊνικού νατρίου, ενώ τα υπόλοιπα γαλακτώματα δεν είχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



Διάγραμμα 4. Απεικόνιση της συσχέτισης του ιξώδους σε σχέση με τον ρυθμό διάτμησης σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό με αναλογίες 100%καζεϊνικού νατρίου +0%Tween20 καθώς και 80%καζεϊνικού νατρίου +20%Tween20 pH 7, 30mmol CaCl₂ και προσθήκης 0,5% μυζίνης.

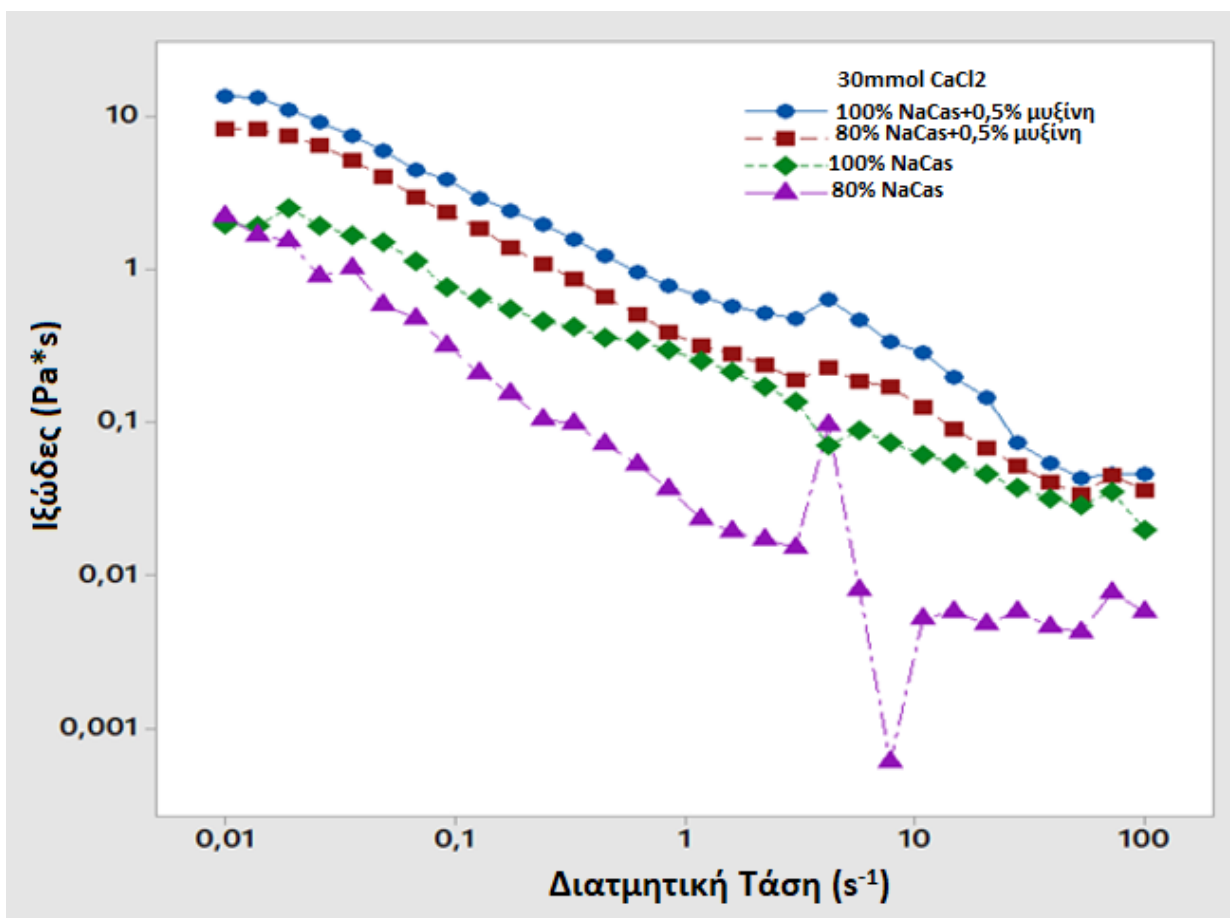
Τα γαλακτώματα με Tween20 κατά την είσοδο στην στοματική κοιλότητα δεν εμφάνισαν διαφορά στην αρχιτεκτονική των γαλακτωμάτων (E. Koukoura et.al, 2018). Σε άλλη μελέτη στην οποία τα γαλακτώματα παρασκευάστηκαν από ένα χημικά διαφορετικό και πιο διαδεδομένο μέλος της οικογένειας Tween, το σταθεροποιημένο γαλάκτωμα Tween 80 δεν εμφάνισε ούτε αυτό αστάθειες . (G.A. Aken et.al, 2011)

Στο Σχήμα 6, φαίνεται ότι στα γαλακτώματα που προστέθηκε μυζίνη ενώ παράλληλα υπήρχε μεγαλύτερη ποσότητα καζεϊνικού νατρίου η δομή των γαλακτωμάτων άλλαξε και το μίγμα αποσταθεροποιήθηκε με αποτέλεσμα να χάσει την κρεμώδη υφή του. Εντούτοις, τα γαλακτώματα με Tween20 είχαν σταθερή δομή και η προσθήκη μυζίνης δεν επηρέασε την αρχιτεκτονική τους.



Σχήμα 6. Εικόνα γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό με 1% καζεϊνικό νάτριο+Tween20 σε διάφορες αναλογίες, pH 7 και 30mmol CaCl₂. Αριστερά προς δεξιά : 100% καζεϊνικό νάτριο, 80% καζεϊνικό νάτριο+20% Tween20 , 60% καζεϊνικό νάτριο+40% Tween20, 40% καζεϊνικό νάτριο+60% Tween20, 20% καζεϊνικό νάτριο+80% Tween20, 100% Tween20.

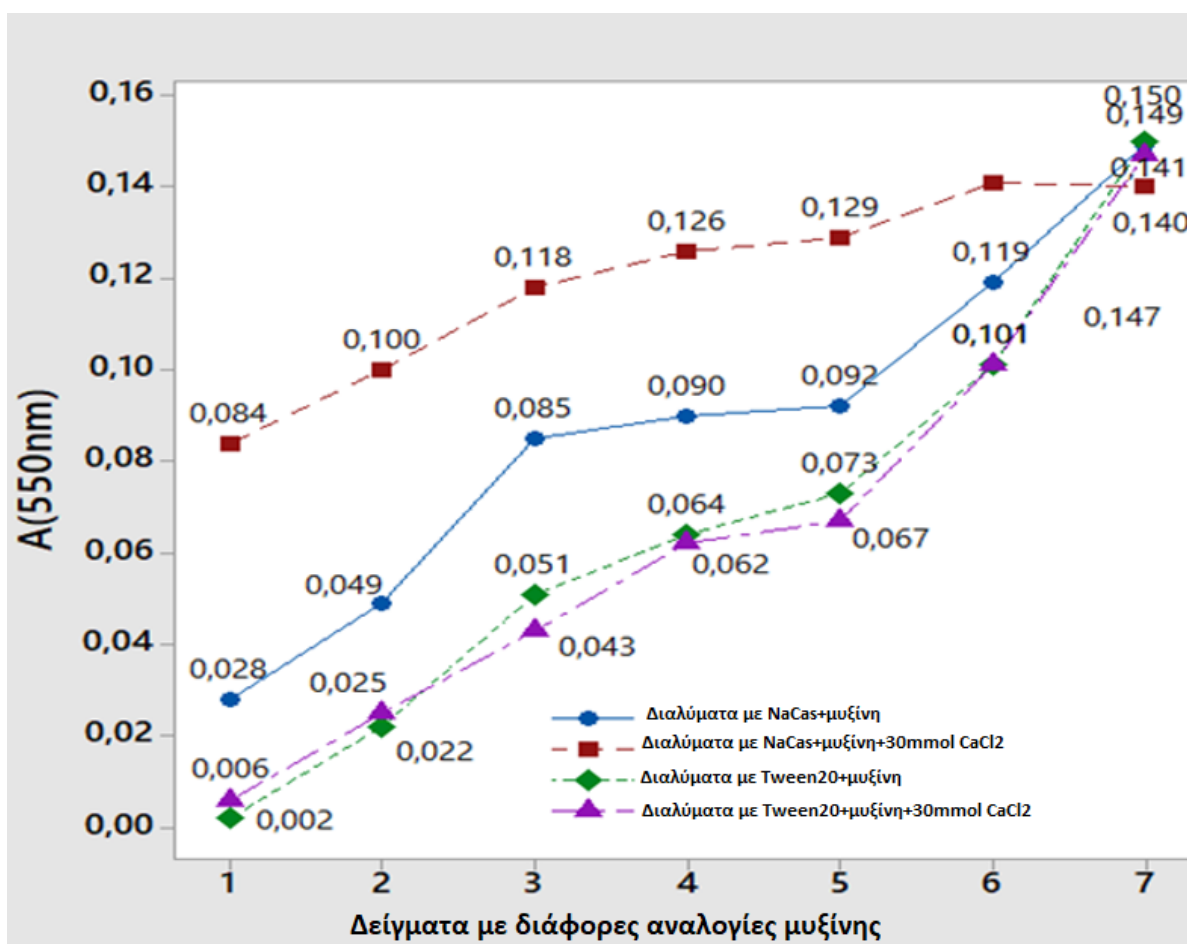
Όταν ένα γαλάκτωμα καταναλώνεται παραμένει για μερικά δευτερόλεπτα στο στόμα, σε αυτό το μικρό χρονικό διάστημα το γαλάκτωμα υπόκειται σε φυσικές και βιοχημικές αλλαγές όπως η ανάμιξη με το σάλιο (M.H. Vingerhoeds et.al, 2005). Η προσθήκη μυξίνης σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό σταθεροποιημένα με καζεϊνικό νάτριο σταθερά σε pH 7, οδήγησε σε κροκίδωση, αποδεικνύοντας ότι η μυξίνη αλληλεπιδρά με προσροφημένες πρωτεΐνες και ότι η μυξίνη έχει τη τάση να κροκιδώνει και να δημιουργεί πηκτές (M.H. Vingerhoeds et.al, 2005), (C. Ritzoulis et.al, 2012). Στο Διάγραμμα 5, γαλακτώματα με ποσότητα μυξίνης σε αυτά έδειξαν να έχουν μεγαλύτερο ιξώδες σε σύγκριση με τα γαλακτώματα ίδιας σύστασης αλλά χωρίς μυξίνη.



Διάγραμμα 5. Απεικόνιση της συσχέτισης του ιξώδους σε σχέση με τον ρυθμό διάτμησης σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό με αναλογίες 100% καζεϊνικού νατρίου+0% Tween20 καθώς και 80% καζεϊνικού νατρίου+20% Tween20 pH 7 και 30mmol CaCl₂. Τα δύο από τα τέσσερα δείγματα έχουν προσθήκη 0,5% μυξίνης.

5.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΖΕΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ TWEEN20 ΜΕ ΑΣΒΕΣΤΙΟ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.

Η φασματοσκοπική ατομική απορρόφηση είναι μια γρήγορη, ποσοτική και μη επεμβατική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοφαρμακευτικές εταιρίες (S. Andris & J. Hubbuch, 2018). Έχει εφαρμοστεί και στο παρελθόν για την παρακολούθηση της μελέτης των πρωτεϊνών και μικρών μορίων (Κ.Α. Bakeev, 2005) (N. Brestrich et.al, 2014) (S.K. Hansen, 2013). Η Fei Gao και η Guang Yang έδειξαν ότι γαλακτώματα με μεγαλύτερη ιοντική ισχύ είχαν μεγαλύτερη απορρόφηση ενώ όσο αυξανόταν η ποσότητα του ιοντικού συμπλόκου τόσο μεγαλύτερη ήταν η απορρόφηση. Στο Διάγραμμα 6, διαλύματα με παρουσία CaCl_2 έδειξαν να έχουν μεγαλύτερη απορρόφηση από τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς CaCl_2 . Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν το ρόλο του ασβεστίου στην επιλεκτική κροκίδωση των καζεϊνικών και τη σχετική αδράνεια του Tween20.



Διάγραμμα 6. Φασματοσκοπική απορρόφησης δειγμάτων με διάφορες αναλογίες μυζίνης και καζεϊνικού νατρίου ή μυζίνης και Tween20 όπως αναγράφονται στον Πίνακα 1.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα καζεϊνικά, χρησιμοποιούμενα ως γαλακτωματοποιητές, δημιουργούν γαλακτώματα που κροκιδώνονται από το ασβέστιο του CaCl_2 σε συγκεντρώσεις άνω των 18 mM. Κατά τα παραπάνω, παρασκευάστηκε σειρά γαλακτωμάτων διαφορετικού επιφανειακού εμβαδού περιοχών ευαίσθητων και μη-ευαίσθητων στο ασβέστιο στην επιφάνεια των λιποσφαιριδίων καζεϊνικό νάτριο και το μη-ευαίσθητο στο ασβέστιο Tween20.

Η ελεγχόμενη κροκίδωση αυτών με το CaCl_2 έδωσε σειρά γαλακτωμάτων με ελεγχόμενη συγκολλητικότητα κατά την κροκίδωσή τους, καθώς οι περιοχές οι καλυμμένες με καζεϊνικά κροκιδώνονται παρουσία ασβεστίου, ενώ αυτές με Tween20 όχι. Η εν λόγω μεταβολή στη συγκολλητικότητα ελέγχθηκε ότι επηρεάζει τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια *in vitro* χώνευσης, συνεπώς μπορεί αν μελετηθεί ως στρατηγική για τη ρύθμιση της πέψης και βιοδιαθεσιμότητας των συστατικών των τροφίμων.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. Bak i& W. Podgorska. (2016). Interfacial and surface tensions of toluene/water and air/water systems with nonionic surfactants Tween 20 and Tween 80. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **504**, 414-425.
- A. Kulmyrzaev, R. Chanamai, D.J. McClements, (2000). Influence of pH and CaCl₂ on the stability of dilute whey protein stabilized emulsions. *Food Research International*, **33**, 15-20.
- A. Kulmyrzaev, M.P.C. Sivestre, D.J. McClements, (2000). Rheology and stability of whey protein stabilized emulsions with CaCl₂ concentrations. *Food Research International*, **33**, 21-25.
- A. Smialowska, L.M. Merino, B. Ingham, A.J. Carr, (2017). Effect of calcium on the aggregation behaviour of caseinates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* , 113-123.
- A. Ye & H. Singh. (2000). Influence of calcium chloride addition on the properties of emulsions stabilized by whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, **14**, 337-346.
- C. Ritzoulis, S. Siasos, K.D. Melikidou, C. Koukiotis, C. Vasiliadou, S. Lolakos, (2012). Inetaction between pig gastric mucin and sodium caseinate in solutions and in emulsions. *Food Hydrocolloids*, **29**, 382-388.
- C.H. Iriart, J.M. Avalos, M.L. Herrera, R.J. Candal, C.L.P. Oliviera, I.L. Torriani, (2016). New insights about flocculation process in sodium caseinate-stabilized emulsions. *Food Research International*, 338-346.
- C.P. Pappas & J. Rothwell. (1991). The effect of heating, alone or in presence of calcium or lactose, on calcium binding to milk proteins. *Food Chemistry*, 183-201.
- E. Dickinson & S.T. Hong. (1997). Influence of an anionic surfactant and the rheology of heat-set-β-lactoglobulin-stabilized emulsion gels. *Colloids and Surfaces*, **127**, 1-10.
- E. Dickinson & V. Galazka. (1992). Emulsion stabilation by protein-polysaccharide complexes. *Gums and Stabilisers for the food industry*, **6**, 351-362.
- E. Dickinson. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk protein: overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, **80**, 2607-2619.
- E. Dickinson. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **20**, 197-210.
- E. Koukoura, M. Panagiotopoulou, A. Pavlou, V. Karageorgiou, D.G. Fatouros, C. Vasiliadou, C. Ritzoulis, (2018). In vitro digestion of caseinate and Twenn20 emulsions. *Food Biopsysichs*.

- F. Gao & G. Yang. (2018). Role of the ionic strength on protein fouling during ultrafiltration by synchronized UV/Vis spectroscopy and electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of Membrane Science*, **563**, 592-601.
- F. Lopez, F. Cuomo, P.L. Nostro, A. Ceglie, (2013). Effectes of solvent and alkaline earth metals on the heat-induced precipitation process of sodium caseinate. *Food Chemistry*, **136**, 266-272.
- G. Doxastakis & P. Sherman. (1986). The interaction of sodium caseinate with monoglyceride and diglyceride at the oil-water interface and its effect on interfacial rheological properties. *Colloid Polymer Science*, **264**, 254-259.
- G.A. Aken, E. Bornhof, F.D. Zoet, M. Verbeek, A. Oosterveld, (2011). Differences in in vitro gastric behaviour between homogenized milk and emulsions stabilized by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. *Food Hydrocolloids*, **25**, 781-788.
- H. Mulder & P. Walstra. (1974). The milk fat Globule.
- J. Chen & E. Dickinson. (1998). Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsions: effect of protein-surfactant interactions. *Food Chemistry*, **46**, 91-97.
- J. Sun, W. Liu, M. Feng, X. Xu, G. Zhou, (2019). Characterization of olive oil emulsions stabilized by flaxseed gum. *Journal of Food Engineering*, **247**, 74-79.
- J.A.M. Bolivar & J.L.O Vinuesa. (1999). How proteins stabilize colloidal particles by means of hydration forces. *Langmuir*, **15**, 2644-2653.
- J.N. Israelachvilli. (1992). Intermolecular and surface forces. *Academic Press*.
- K. Wang, G. Li, B. Zhang, (2018). Opposite results of emulsion stability evaluated by the TSI and the phase separation proportion. *Colloids and Surfaces A*, **558**, 402-409.
- K.A. Bakeev. (2005). Process Analytical Technology . *Blackwell Publishing*.
- L. Perungini, G. Cinelli, M. Cofelice, A. Ceglie, F. Lopez, F. Cuomo, (2018). Effect of the coexistence of sodium caseinate and Tween20 as stabilizers of food emulsions at acidic pH. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, **168**, 163-168.
- L. Shi, C. Miller, K.D. Caldwell, P. Vakint, (1999). Effect of mucin addition on the stability of oil-water emulsions. *Colloids and Surfaces*, **15**, 303-312.
- L.M. Human. (1996). Processing whey protein for uses as a food ingredient. *Food Technology*, **50**, 49-52.
- M.H. Vingerhoeds et.al. (2005). Emulsions flocculation induced by saliva mucin. *Food Hydrocolloids*, **19**, 915-922.
- N. Brestrich, T. Briskot, A. Osberghaus, J. Hubbuch, (2014). A tool for selective inline quantification of coeluting proteins in chromatography using analysis and partial least squares regression. *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 1365-1373.
- P. Walstra. (1996). Dispersed systems: basic consideration. *Food Chemistry*, 91-155.

- P.C. Hiemenz & R. Rajagopalan. (1997). Principles of colloid and surface chemistry. *Marcel-Dekker*, 3.
- R.J. Hunter. (1986). Foundations of Colloid Science. *Oxford University Press*.
- S. Andris & J. Hubbuch. (2018). Monitoring of antibody-drug conjugation reactions with UV/Vis spectroscopy. *Journal of Biotechnology*, **288**, 15-22.
- S.K. Hansen. (2013). Selective high throughput protein quantification based on UV absorption spectra. *Biotechn. Bioeng.*, **110**, 448-460.
- Y. Liang et.al. (2017). The heat stability of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions: A review. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **28**, 63-73.
- Y. Fang & D.G. Dalgleish. (1993). Casein adsorption on the surface of oil-in-water emulsions modifies by lecithin. *Colloids Surfaces*, **1**, 357-364.