

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της Σύνθεσης Μικροσωματιδίων από HBSS Σαλεπιού**  
**Study of Synthesis of HBSS Salep Microparticles**

Σκούφα Μυρτώ

Θεσσαλονίκη 2013

## Μελέτη της Σύνθεσης Μικροσωματιδίων από HBSS Σαλεπιού

Σκούφα Μυρτώ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ),  
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.

Ημερομηνία: 2-10-2013

Εισηγητής: Καραγεωργίου Βασίλειος

## Μελέτη της Σύνθεσης Μικροσωματιδίων από HBSS Σαλεπιού

Σκούφα Μυρτώ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ),  
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141,

### Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια στη βιομηχανία τροφίμων παρουσιάζει ενδιαφέρον η επιστήμη της νανοτεχνολογίας, για την ανάπτυξη νέων λειτουργικών υλικών και προϊόντων, την επεξεργασία σε μικρο- και νανοκλίμακα και το σχεδιασμό νανοαισθητήρων για την ασφάλεια των τροφίμων και τη βιοασφάλεια. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το μέγεθος σωματιδίων από πολυσακχαρίτη σαλεπιού (HBSS), τα οποία σχηματίστηκαν με δύο μεθόδους. Η πρώτη είναι η τεχνική της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη κι η δεύτερη η μέθοδος της γαλακτωματοποίησης. Για την πρώτη μέθοδο μελετήθηκαν παράλληλα και κάποιες παράμετροι, οι οποίες θεωρήθηκε ότι πιθανόν να έχουν επίδραση στο μέγεθος των σωματιδίων HBSS. Οι παράμετροι αυτές ήταν η επίδραση της συσκευής υπερήχων, η επίδραση του PVA ως σταθεροποιητή, η επίδραση της παροχής αιθανόλης, η επίδραση της διαμέτρου της βελόνας και η επίδραση της φιβροΐνης. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της σκέδασης του φωτός.

Διαπιστώθηκε ότι η χρήση συσκευής υπερήχων με ρύγχος μειώνει το μέγεθος των σωματιδίων HBSS σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η χρήση λουτρού υπερήχων και ότι το μέγεθος των σωματιδίων HBSS αυξάνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας του PVA. Παρατηρήθηκε ακόμα ότι μεγάλος ρυθμός παροχής αιθανόλης (2,0 ml/s) και η χρήση βελόνας διαμέτρου 1,60 mm για την παροχή αιθανόλης, και τα δύο σε συνδυασμό με χρήση υπερήχων, έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό σωματιδίων HBSS με μικρότερο μέγεθος. Επίσης, η προσθήκη φιβροΐνης σε διάλυμα HBSS ώστε να σχηματιστεί μίγμα αυτών με αναλογία 1:1, επηρεάζει θετικά το σχηματισμό σωματιδίων HBSS μικρού μεγέθους. Τέλος, στη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, η προσθήκη φιβροΐνης σε διάλυμα HBSS ώστε να σχηματιστεί μίγμα αυτών με αναλογία 1:1, σε συνδυασμό με χρήση υπερήχων, επηρεάζει θετικά το σχηματισμό σωματιδίων HBSS μικρού μεγέθους.

Παρατηρήθηκε ότι είναι εφικτός ο σχηματισμός σωματιδίων HBSS στη κλίμακα των μικρομέτρων, ωστόσο με τις μεθόδους που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός αυτών στη κλίμακα των νανομέτρων.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	3
2.1. Σαλέπι.....	3
2.1.1. HBSS από σαλέπι.....	3
2.2. Φιβροΐνη.....	3
2.2.1. Εφαρμογές της φιβροΐνης μεταξιού .....	6
2.3. Πολυβινυλική αλκοόλη .....	7
2.4. Μικρο- και νανοτεχνολογία .....	8
2.4.1. Μέθοδοι διαμόρφωσης συστατικών τροφίμων .....	8
2.4.2. Εξεταζόμενες μέθοδοι σχηματισμού μικροσωματιδίων HBSS .....	10
2.4.3. Εφαρμογές της μικροτεχνολογίας.....	12
2.4.4. Οι νανοεπιστήμες στη βιομηχανία τροφίμων .....	12
2.5. Μικροενθυλάκωση.....	14
2.5.1. Τεχνικές μικροενθυλάκωσης.....	14
2.6. Σκέδαση φωτός .....	15
2.6.1. Μέτρηση του μεγέθους σωματιδίων με σκέδαση του φωτός .....	16
2.6.2. Εφαρμογές της σκέδασης φωτός στην ανάλυση τροφίμων .....	16
3. Σκοπός της εργασίας.....	17
4. Πειραματικό μέρος .....	18
4.1. Υλικά.....	18
4.1.1. Αντιδραστήρια.....	18
4.1.2. Όργανα .....	18
4.2. Μέθοδοι ανάλυσης .....	19
4.2.1. Εκχύλιση HBSS από σαλέπι.....	19
4.2.2. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη .....	19
4.2.3. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης.	20
4.2.4. Μέτρηση μεγέθους σωματιδίων.....	21
4.2.5. Στατιστική ανάλυση .....	21

5. Αποτελέσματα - συζήτηση .....	23
5.1. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη .....	23
5.1.1. Επίδραση της συσκευής υπερήχων .....	23
5.1.2. Επίδραση του PVA ως σταθεροποιητή .....	23
5.1.3. Επίδραση της παροχής αιθανόλης.....	26
5.1.4. Επίδραση της διαμέτρου της βελόνας.....	28
5.1.5. Επίδραση της φιβροΐνης .....	30
5.2. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης.....	31
5.3. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων.....	32
6. Συμπεράσματα.....	34
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	35
8. Βιβλιογραφία .....	36
Παραρτήματα.....	39

## 1. Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία ασχολείται με την εφαρμογή, την παραγωγή και την επεξεργασία υλικών με μέγεθος μικρότερο σε από 1000 nm. Πολλοί επιστήμονες σε όλο τον κόσμο έχουν αναγνωρίσει τη συνεισφορά των νανοεπιστημών και της τεχνολογίας στη βιομηχανία τροφίμων. Για τη μεταβολή της δομής και του μεγέθους των συστατικών των τροφίμων σε διάφορες κλίμακες μεγέθους μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι, όπως η άλεση, η ομογενοποίηση, η μικρορευστοποίηση, η χρήση υπερήχων, ο ηλεκτροψεκασμός και η ταχεία εκτόνωση του υπερκρίσιμου διαλύματος. Οι νανοεπιστήμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το χειρισμό και τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των τροφίμων (Sanguansri and Augustin, 2006).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το μέγεθος σωματιδίων από HBSS (Hot Buffer Soluble Solids), ο οποίος είναι ένας πολυσακχαρίτης που εκχυλίζεται από σαλέπι. Το σαλέπι είναι ένα είδος αλεύρου, το οποίο πιστεύεται ότι έχει θρεπτικές και καταπραϋντικές ιδιότητες (Karaman et al., 2012). Οι πολυσακχαρίτες από σαλέπι είναι γνωστό ότι είναι καλοί σταθεροποιητικοί παράγοντες καθώς αυξάνουν το ιώδες της συνεχούς φάσης των γαλακτωμάτων λάδι σε νερό (o/w) (Georgiadis et al., 2012).

Μια από τις παραμέτρους οι οποίες μελετήθηκαν ήταν η επίδραση της φιβροΐνης μεταξιού στο μέγεθος των σωματιδίων HBSS. Το μετάξι που έχει ερευνηθεί περισσότερο είναι το μετάξι κουκουλιού από το μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (Wenk et al., 2011). Οι ίνες μεταξιού αποτελούνται από δύο μικρονημάτια φιβροΐνης ενσωματωμένα σε μία γλυκοπρωτεΐνη που λειτουργεί σαν κόλλα επικάλυψης (Hardy & Scheibel, 2010). Λόγω της βιοσυμβατότητάς της, η φιβροΐνη μεταξιού βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων. Λόγω της αλληλουχίας των αμινοξέων της, μπορεί επίσης να υποστεί χημική τροποποίηση (Wenk et al., 2011).

Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), ώστε να μελετηθεί η επίδρασή της ως σταθεροποιητής στο μέγεθος των σωματιδίων HBSS. Η πολυβινυλική αλκοόλη είναι ένα υδρόφιλο, βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό συνθετικό πολυμερές (Jiang et al., 2011), το οποίο προέρχεται από πολύ-(οξικό βινύλιο) (PVAc). Οι κύριες εφαρμογές του PVA είναι στη βιομηχανία χαρτιού και κλωστοϋφαντουργίας, καθώς και στη συσκευασία των τροφίμων (Kim et al., 2004). Επίσης, η πολυβινυλική αλκοόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες περιοχές του τομέα της βιοϊατρικής (Jiang et al., 2011).

Τέλος, για τον προσδιορισμό μεγέθους σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της σκέδασης του φωτός, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό μεγέθους σωματιδίων σε κολλοειδή συστήματα, εναιωρήματα, κτλ (Ζαχαρής, 2010). Σε πολυδισπαρμένα συστήματα, μετρήσεις της σκέδασης του φωτός σε

διαφορετικές γωνίες δίνουν πληροφορίες για την κατανομή μεγεθών των σωματιδίων που απαρτίζουν ένα κολλοειδές σύστημα (Ριτζούλης, 2010).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της σύνθεσης μικροσωματιδίων από HBSS σαλεπιού με τη χρήση της μεθόδου της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη, ερευνώντας παράλληλα παραμέτρους που την επηρεάζουν, αλλά και της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης.

## 2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1. Σαλέπι

Το σαλέπι είναι ένα είδος αλεύρου (κοκκώδης ουσία) που προέρχεται από τις αποξηραμένες ρίζες των φυτών *Orchis*, *Ophyris*, *Serapias*, *Platanthera* και *Dactylorhiza*. Είναι ουδέτερη, υδατοδιαλυτή φυτική ίνα και πιστεύεται ότι έχει θρεπτικές και καταπραϋντικές ιδιότητες (Georgiadis et al., 2012 and Karaman et al., 2012).

Ο κύριος πολυσακχαρίτης των εκχυλισμάτων του σαλεπιού είναι η γλυκομαννάνη, η οποία, όπως λαμβάνεται από την *Orchis morio*, αποτελείται από υπολείμματα d-γλυκοπυρανοζυλίου και D-μαννοπυρανοζυλίου σε αναλογία 1:3,3. Η κύρια αλυσίδα της αποτελείται από υπολείμματα γλυκοζυλίου και μαννοζυλίου συνδεδεμένα με β-1, 4 δεσμούς. Τα εκχυλίσματα σαλεπιού περιέχουν επίσης άμυλο και πρωτεΐνες σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Με την ονομασία σαλέπι είναι επίσης γνωστό ένα πηχτό αφέψημα, το οποίο παράγεται από ζεστά εκχυλίσματα του φυτού *Orchis morio*. Διάφορα σκευάσματα αυτού του αφεψήματος είναι δημοφιλή στη νοτιοανατολική Ευρώπη και στη Μέση Ανατολή. Το σαλέπι ως αφέψημα παρασκευάζεται συνήθως με ανάμιξη ζεστού νερού ή γάλακτος με σκόνη ορχιδέας (Georgiadis et al., 2012).

Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια στην παρασκευή διαφορετικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων παγωτών και ποτών με βάση γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και σε ορισμένα φάρμακα (Karaman et al., 2012).

#### 2.1.1. HBSS από σαλέπι

Το HBSS (Hot Buffer Soluble Solids) είναι ένας πολυσακχαρίτης που εκχυλίζεται από σαλέπι και εξάγεται σε θερμοκρασία 70°C και pH 5,2. Αποτελείται από έναν πληθυσμό μορίων με μοριακό βάρος κατά προσέγγιση 600-700 kDa, έναν πληθυσμό με μοριακό βάρος περίπου 50 kDa, έναν πληθυσμό με μοριακό βάρος περίπου 12 kDa και έναν πληθυσμό ολιγοσακχαριτών.

Οι πολυσακχαρίτες από σαλέπι είναι γνωστό ότι είναι καλοί σταθεροποιητικοί παράγοντες καθώς αυξάνουν το ιξώδες της συνεχούς φάσης των γαλακτωμάτων λάδι σε νερό (o/w) (Georgiadis et al., 2012).

### 2.2. Φιβροΐνη

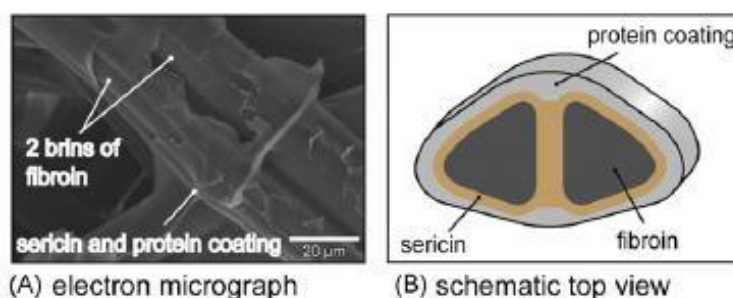
Το μετάξι που έχει ερευνηθεί περισσότερο είναι το μετάξι κουκουλιού από το μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (Wenk et al., 2011). Οι ίνες μεταξιού είναι περίπου 10-25mm σε διάμετρο (Veragi & Kaplan, 2007) και αποτελούνται από δύο μικρονημάτια πρωτεΐνης (γνωστά ως brins) ενσωματωμένα σε μία γλυκοπρωτεΐνη που λειτουργεί σαν κόλλα επικάλυψης (Σχήμα 1A και B). Τα brins είναι νημάτια φιβροΐνης και αποτελούνται από δέσμες (διαμέτρου περίπου 100nm) νανοϊνών



(διαμέτρου 5nm η κάθε μία), οι οποίες είναι ευθυγραμμισμένες με τον επιμήκη άξονα της ίνας.

Οι νανοΐνες φιβροΐνης αποτελούνται από ένα συγκρότημα τριών πρωτεϊνών: μια μεγάλη πρωτεΐνη, γνωστή ως βαριάς αλυσίδας (H-chain) φιβροΐνη (περίπου 350 kDa.), η οποία συνδέεται μέσω δισουλφιδικών δεσμών με μια δεύτερη μικρή πρωτεΐνη, γνωστή ως ελαφριάς αλυσίδας (L-chain) φιβροΐνη (περίπου 25 kDa). Η τρίτη μικρή γλυκοπρωτεΐνη, που είναι γνωστή ως η πρωτεΐνη P25 (περίπου 30 kDa), συνδέεται με τις άλλες δύο μέσω μη-ομοιοπολικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Οι μοριακές αναλογίες των τριών πρωτεϊνών H-chain:L-chain:P25 είναι 6:6:1.

Η γλυκοπρωτεΐνη που λειτουργεί σαν κόλλα ονομάζεται σηρικίνη (ένα σύνολο γλυκοπρωτεϊνών πλούσιο σε σηρίνη), η οποία είναι 20-310 kDa (Wenk et al., 2011) και περιβάλλει τα νημάτια φιβροΐνης. Επίσης εξασφαλίζει τη συνοχή του κουκουλιού, κρατώντας τα δίδυμα νημάτια ενωμένα και αποτελεί το 25-30% του βάρους της ίνας (Σχήμα 1A και B) [16]. Τέλος, η ίνα επικαλύπτεται με μία ποικιλία άλλων πρωτεϊνών ώστε να προστατευτεί το κουκούλι από μικρόβια και αρπακτικά (Σχήμα 1B) (Hardy & Scheibel, 2010).

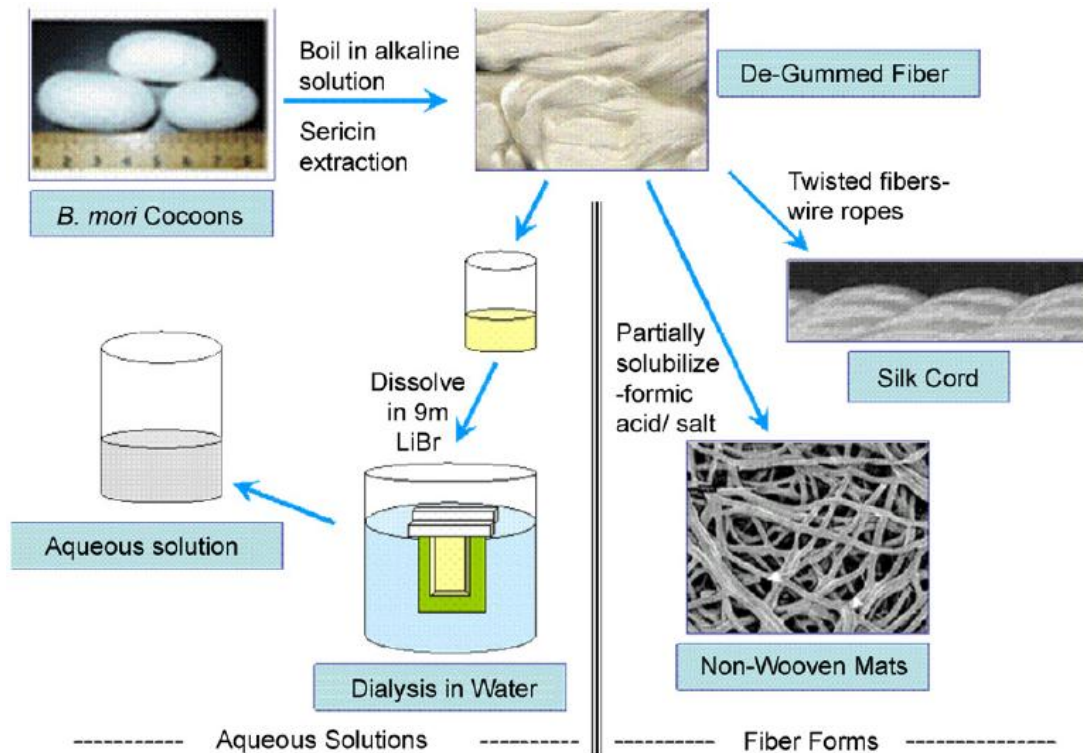


Σχήμα 1. A) Μικρογράφημα ηλεκτρονίων ίνας κουκουλιού μεταξοσκώληκα του γένους *Bombyx mori*, B) Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας ίνας κουκουλιού

(Hardy & Scheibel, 2010)

Λόγω της υψηλής υδροφιλικής των σηρικινών σε σχέση με τη φιβροΐνη, αυτές μπορούν να αφαιρεθούν εύκολα με βρασμό του μεταξιού σε αλκαλικά διαλύματα (Σχήμα 2). Η βαριά αλυσίδα της φιβροΐνης μεταξιού περιέχει εναλλασσόμενες υδρόφοβες και υδρόφιλες ομάδες, παρόμοιες με εκείνες που έχουν παρατηρηθεί σε αμφίφιλες ομάδες συμπολυμερών (Wenk et al., 2011).

Οι καθαρισμένες από τις σηρικίνες ίνες μεταξιού μπορούν είτε να υποστούν επεξεργασία σε διάφορους τύπους προϊόντων μεταξιού, είτε να παρασκευάσουν υδατικά διαλύματα με διάλυση σε βρωμιούχο λίθιο, διαπίδυση στο νερό και τελική διαμόρφωση σε υδατικό διάλυμα φιβροΐνης για παρασκευή διαφόρων υλικών.

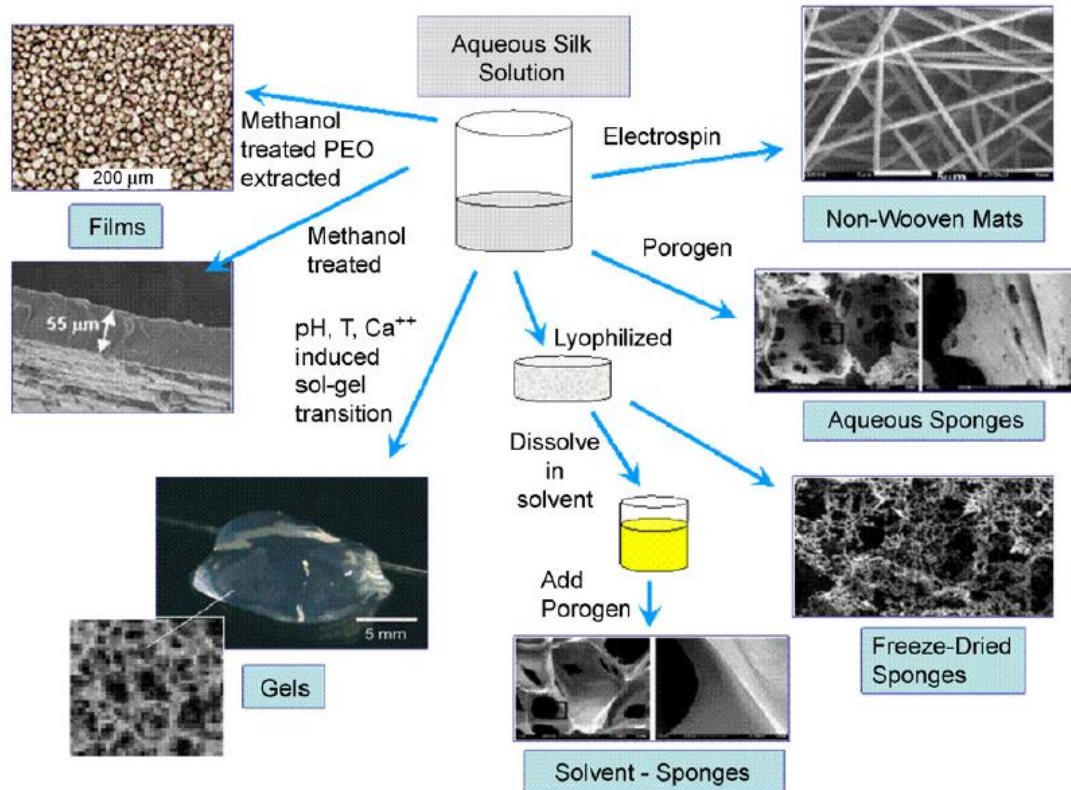


Σχήμα 2. Απεικόνιση των δύο κατηγοριών επεξεργασιών που μπορούν να υποστούν οι ίνες της φιβροΐνης, μετά τον καθαρισμό τους από τις σηρικίνες.

(Vepari & Kaplan, 2007)

400.000 τόνοι ξηρών κουκουλιών μεταξοσκωλήκων είναι διαθέσιμοι το χρόνο παγκοσμίως για τη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας και συνεπώς και για τις εφαρμογές βιοϋλικών. Από υδατικά ή διαλυτά σκευάσματα των φυσικών μορφών των ινών μεταξιού μπορούν να παρασκευαστούν αρκετά διαφορετικά σε μορφολογία υλικά, για χρήση ως βιοϋλικά σε βιοϊατρικές εφαρμογές (Σχήμα 3). Οι ίνες πρέπει πρώτα να διαλυθούν σε υδατικά συστήματα και στη συνέχεια να επαναδιαμορφωθούν στις επιθυμητές μορφές (Vepari & Kaplan, 2007).

Η φιβροΐνη μεταξιού έχει ερευνηθεί εκτενώς, λόγω του ότι θεωρείται κατάλληλο βιοϋλικό για την παρασκευή μηρών για υποστρώματα κυτταροκαλλιεργειών και συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων. Έχει υποστεί επεξεργασία με σκοπό το σχηματισμό ινών, μεμβρανών και μορίων και η περισσότερη ερευνητική εργασία έχει στραφεί στις ευρέως μελετημένες μεμβράνες φιβροΐνης (Baimark et al., 2010).



Σχήμα 3. Τρόποι επεξεργασίας της μορφολογίας του μεταξιού από υδατικό διάλυμα φιβροΐνης.

(Vepari & Kaplan, 2007)

### 2.2.1. Εφαρμογές της φιβροΐνης μεταξιού

Η φιβροΐνη μεταξιού έχει χρησιμοποιηθεί στην κλωστοϋφαντουργία για χιλιάδες χρόνια και ως υλικό ραμμάτων στη βιοϊατρική για αιώνες, αλλά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν μελετηθεί και οι δυνατότητές της ως βιοϋλικό. Είναι γνωστό ότι η φιβροΐνη μεταξιού έχει εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες, βιοσυμβατότητα με μια ποικιλία κυττάρων, ευαισθησία σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση και χαμηλή φλεγμονώδη απόκριση (Nogueira et al., 2011).

Λόγω της βιοσυμβατότητάς της, η φιβροΐνη βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων και η εύκολη κατεργασία της με το νερό επιτρέπει την κατασκευή εύκολα ρυθμιζόμενων μορφολογιών υπό ήπιες συνθήκες. Η απλότητα της εφαρμογής διαφόρων προφίλ απελευθέρωσης με απλή αλλαγή της συγκέντρωσής της, εφαρμογή πολλαπλών επικαλύψεων ή μεταβολή της περιεκτικότητας του β-φύλλου, καθιστά τη φιβροΐνη μεταξιού ιδιαίτερα ελκυστικό υλικό.

Λόγω της αλληλουχίας των αμινοξέων της, η φιβροΐνη μεταξιού μπορεί επίσης να υποστεί χημική τροποποίηση. Αμίνες, αλκοόλες, φαινόλες, καρβοξυλικές ομάδες και θειόλες έχουν ερευνηθεί ως δυναμικές δραστικές πλευρικές ομάδες για τη χημική τροποποίηση της φιβροΐνης μεταξιού.

Θεωρείται ότι με την εισαγωγή διακριτών ομάδων στη φιβροΐνη και μεταβάλλοντας το βαθμό ενεργοποίησής της ανά μόριο, μπορεί να παραχθεί μια ποικιλία φαρμάκων σε διαφορετικές ποσότητες και με ευδιάκριτες κινητικές ιδιότητες, παρέχοντας ένα ευρύ φάσμα ρυθμιζόμενων συστημάτων απελευθέρωσης φαρμάκου (Wenk et al., 2011).

Οι εφαρμογές των μεμβρανών φιβροΐνης είναι περιορισμένες λόγω της μεγάλης ευθραυστότητάς τους σε ξηρή κατάσταση. Οι φτωχές μηχανικές ιδιότητες των μεμβρανών φιβροΐνης θα μπορούσαν να βελτιωθούν με συνδυασμό τους με άλλα πολυμερή σώματα. Άλλες ιδιότητες, όπως η αλλαγή της μορφής και οι θερμικές ιδιότητες εξαρτώνται από τις αναλογίες των αναμίξεων. Έχει αναφερθεί ακόμα, η προετοιμασία των μικρομορίων φιβροΐνης με διάφορες τεχνικές για εφαρμογές απελευθέρωσης φαρμάκων (Baimark et al., 2010).

Οι Garcia – Fuentes et al. (2009) μελέτησαν ικρίωματα φιβροΐνης/υαλουρονικού οξέος και συμπέραναν ότι η επεξεργασία με μεθανόλη να μετατρέπει τη μικροδομή των ικριωμάτων φιβροΐνης/υαλουρονικού οξέος σε πορώδη, γεγονός που επιτρέπει τη χρησιμοποίησή τους σε εφαρμογές μηχανικής ιστών. Βρήκαν ακόμη, ότι αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε υαλουρονικό οξύ βελτιώνεται η ικανότητα των ικριωμάτων φιβροΐνης/υαλουρονικού οξέος να διευκολύνουν την ανάπτυξη κυττάρων και ιστών, ενώ παράλληλα μειώνεται η διατηρησιμότητα της μάζας τους.

Οι Baimark et al. (2010) αναφέρουν ότι αναμεμειγμένα μικρομόρια φιβροΐνης/αμύλου με κατάλληλη για την κάθε εφαρμογή αναλογία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων, αφού παρουσιάζουν ομοιόμορφη σφαιρική δομή και θερμική σταθερότητα.

### **2.3. Πολυβινυλική αλκοόλη**

Η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA) είναι ένα πολλά υποσχόμενο και φθινό είδος πολυμερούς (Li-sheng et al., 2007). Είναι ένα υδρόφιλο, βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό συνθετικό πολυμερές (Jiang et al., 2011), το οποίο προέρχεται από πολύ-(οξικό βινύλιο) (PVAc). Οι κύριες εφαρμογές του PVA είναι στη βιομηχανία χαρτιού και κλωστοϋφαντουργίας, σε ταινίες ανθεκτικές στο οξυγόνο, σε κόλλες, στη συσκευασία των τροφίμων, σε μεμβράνες αφαλάτωσης και σε μεμβράνες έκχυσης (Kim et al., 2004).

Επίσης, η πολυβινυλική αλκοόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες περιοχές του τομέα της βιοϊατρικής. Πρόσφατα, οι υδροπηκτές PVA έχουν καταστεί ιδιαίτερα ελκυστικές στον τομέα της «μηχανικής ιστών» για την επισκευή και την αναγέννηση μιας ευρείας ποικιλίας ιστών και οργάνων, συμπεριλαμβανομένων καρδιακών βαλβίδων, εμφυτευμάτων κερατοειδούς, και υποκατάστατων ιστών χόνδρων. Ακόμα, μελετήθηκαν ικρίωματα με βάση το PVA με σκοπό να αντικαταστήσει τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα τεχνητά μοσχεύματα.

Υδροπηκτές παρασκευασμένες από PVA είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πολυμερή λόγω των ιδιοτήτων και της βιοσυμβατότητάς τους (Shi & Xiong, 2012). Σε παλαιότερες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία υδροπηκτές PVA για την καλλιέργεια ζωντανών κυττάρων, επειδή έχουν μεγάλους πόρους και είναι ικανές για αποικοδόμηση (Jiang et al., 2011).

Η PVA μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για βιοτεχνητά υλικά, αλλά και για άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται στην ιατρική έρευνα. Προβλέποντας την παραμόρφωση των μαλακών ιστών, αναλύοντας θεραπευτικές παρεμβάσεις και προσομοιώνοντας επεμβάσεις επεμβατικής χειρουργικής, οι επιστήμονες μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά τις προτεινόμενες θεραπείες, καθώς και την ακρίβεια των χειρουργικών διαδικασιών (Jiang et al., 2011). Τέλος, όπως αναφέρουν οι Li-sheng et al. (2007), η PVA είναι κατάλληλη για μικροβιακή ακινητοποίηση, καθώς είναι μη τοξική για τους μικροοργανισμούς.

#### **2.4. Μικρο- και νανοτεχνολογία**

Η νανοτεχνολογία ασχολείται με την εφαρμογή, την παραγωγή και την επεξεργασία υλικών με μέγεθος μικρότερο σε από 1000 nm. Οι νανοεπιστήμες είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο που συγκεντρώνει ερευνητές από τη χημεία, τη φυσική, τη βιολογία και τη μηχανική, σημειώνοντας μεγάλο ενδιαφέρον σε πολλούς κλάδους. Παρέχει τις μεθόδους και το πλαίσιο για την κατανόηση και την ανάπτυξη υλικών και προϊόντων με νέες ιδιότητες που προέρχονται από τη συγκρότηση των νανοδομών (Sanguansri and Augustin, 2006).

Περιοχές στη βιομηχανία τροφίμων που μπορούν να επωφεληθούν από τη νανοτεχνολογία είναι η ανάπτυξη νέων λειτουργικών υλικών, η επεξεργασία σε μικρο- και νανοκλίμακα, η ανάπτυξη νέων προϊόντων και ο σχεδιασμός νανοαισθητήρων για την ασφάλεια των τροφίμων και τη βιοασφάλεια (Sanguansri and Augustin, 2006).

Στα παραπάνω περιλαμβάνονται υλικά συσκευασίας με βελτιωμένες ιδιότητες φραγμού και αυξημένη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες και μηχανικές καταπονήσεις, συστήματα διανομής θρεπτικών συστατικών που επιτρέπουν στοχευμένη παροχή, νανοαισθητήρες για ανίχνευση παθογόνων και μολυσματικών παραγόντων και χημικών προϊόντων, καθώς επίσης νανοσωλήνες και ενεργοποιημένες μεμβράνες για αποτελεσματική επεξεργασία και παροχή. Οι εφαρμογές αυτές αποτελούν παραδείγματα χρήσεων της νανοτεχνολογίας για την επίτευξη προϊόντων με βελτιωμένο έλεγχο, επιλεκτικότητα, ασφάλεια, λειτουργικότητα και βιοδιαθεσιμότητα (Augustin and Sanguansri, 2009).

##### **2.4.1. Μέθοδοι διαμόρφωσης συστατικών τροφίμων**

Διάφορες μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταβολή της δομής και του μεγέθους των συστατικών των τροφίμων σε διάφορες κλίμακες μεγέθους και έτσι υπάρχει η δυνατότητα να ρυθμιστεί η συμπεριφορά αυτο-συναρμολόγησης

των συστατικών των τροφίμων και να μεταβληθεί η λειτουργικότητά τους. Παρακάτω παραθέτονται οι επιλεγμένες τεχνολογίες που έχουν καθιερώσει τη χρήση ή τη δυνατότητα δόμησης συστατικών τροφίμων στη βιομηχανία τροφίμων.

### 1. Άλεση

Η διεργασία της άλεσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Οι τεχνικές άλεσης χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια για τη μείωση του μεγέθους των φαρμακευτικών κόνεων, με σκοπό τη βελτίωση της απορρόφησής τους από τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυξάνοντας την επιφάνεια των συστατικών των τροφίμων, αυξάνεται ο ρυθμός απορρόφησης του νερού, βελτιώνεται η διαλυτότητα των ξηρών προϊόντων και αυξάνεται η δυνατότητα πραγματοποίησης χημικών αντιδράσεων (π.χ. οξείδωση, πέψη, απελευθέρωση αρώματος, δραστικότητα καταλύτη, δραστικότητα ενζύμων). Η δομή των τροφίμων είναι επίσης σημαντική, καθώς υπαγορεύει το πως, πότε, και που μπορούν να αποδεσμευτούν τα θρεπτικά συστατικά και οι γεύσεις τους.

### 2. Ομογενοποίηση

Στην ομογενοποίηση, ένα υγρό προϊόν ή πολτός υποβάλλεται σε υψηλή διατμητική τάση. Ομογενοποιητές έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του μεγέθους των λιποσφαιριδίων ώστε να βελτιωθεί η σταθερότητα των γαλακτωμάτων. Οι ομογενοποιητές υψηλής πίεσης είναι ικανοί να παράγουν λεπτότερα (finer) γαλακτώματα γάλακτος από ότι οι συμβατικοί ομογενοποιητές. Η γαλακτωματοποίηση μεμβράνης είναι μια εναλλακτική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό γαλακτωμάτων με στενή κατανομή μεγέθους σωματιδίων και απαιτεί σχετικά λιγότερο επιφανειοδραστικό από άλλες διεργασίες υψηλής ενέργειας (Augustin and Sanguansri, 2009).

Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι ικανή να διαρρήξει μακρομόρια. Χρησιμοποιώντας υψηλής πίεσης ομογενοποιητές μπορεί να τροποποιηθεί η δομή βιοπολυμερών όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δηλαδή να σχηματιστούν σύμπλοκα πρωτεΐνης/πολυσακχαρίτη ή να δημιουργηθούν μικροσωματίδια συσσωματωμάτων πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης/πολυσακχαρίτη. Πρόσφατη εργασία έχει δείξει ότι η ομογενοποίηση υπερ-υψηλής πίεσης μπορεί να μεταβάλλει τη δομή των πρωτεϊνών που προσροφώνται στη διεπιφάνεια του γαλακτώματος.

### 3. Μικρορευστοποίηση

Το πλεονέκτημα της μικρορευστοποίησης έναντι της συμβατικής ομογενοποίησης είναι ο σχηματισμός μιας στενότερης κατανομής μεγέθους των σταγονιδίων ελαίου όταν χρησιμοποιείται για την παρασκευή γαλακτωμάτων. Ωστόσο, σε πολύ υψηλές πιέσεις (>40-60MPa), υπάρχει ο κίνδυνος τα σταγονίδια να συσσωματωθούν εκ νέου. Η μικρορευστοποίηση μπορεί επίσης να αποδιοργανώσει αδρανή υλικά και να αποπολυμερίσει μακρομόρια αλλάζοντας τη λειτουργικότητά.

#### 4. Υπέρηχοι

Υψηλής ισχύος υπέρηχοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάρρηξη των κυττάρων, τη διασπορά συσσωματωμάτων, την τροποποίηση της υφής των τροφίμων και την κρυστάλλωση. Το υπερηχητικό κύμα προκαλεί έντονη τοπική θέρμανση και αυτό δημιουργεί φυσαλίδες αερίου, οι οποίες δημιουργούν κοιλότητες και οδηγούν σε έντονη πίεση και διάτμηση. Η υψηλή πίεση και η διάτμηση είναι αυτές που προκαλούν φυσική διάρρηξη των συστατικών των τροφίμων και μπορούν να αλλάξουν το ρυθμό των χημικών αντιδράσεων.

#### 5. Ηλεκτροψεκασμός

Ο ηλεκτροψεκασμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία ο σχηματισμός των σταγονιδίων γίνεται ηλεκτροστατικά. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο θα «τραβήξει» την επιφάνεια του υγρού ώστε να σχηματιστούν σταγονίδια, μειώνοντας την δύναμη της επιφανειακής τάσης. Χρησιμοποιώντας αυτήν την τεχνική μπορούν να σχηματιστούν σταγονίδια μεγέθους νανομέτρων που περιέχουν ηλεκτρικό φορτίο. Η εισαγωγή του ηλεκτρικού φορτίου σε κάθε σταγονίδιο κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του, επιτρέπει την ύπαρξη ηλεκτροστατικής σταθερότητας και αποτρέπει την συνένωση των σταγονιδίων.

Ο έλεγχος της εναπόθεσης και της απελευθέρωσης είναι επίσης δυνατός μέσω του ελέγχου της φόρτισης, όπου το υγρό μπορεί να φορτιστεί ώστε να προσελκυθεί από αντίθετα φορτισμένες επιφάνειες (Augustin and Sanguansri, 2009).

#### 6. Ταχεία εκτόνωση του υπερκρίσιμου διαλύματος

Η ταχεία εκτόνωση του υπερκρίσιμου διαλύματος (rapid expansion of supercritical solution, RESS) είναι μια διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Αρχικά το προϊόν διαλύεται σε ένα υπερκρίσιμο ρευστό (συνήθως διοξείδιο του άνθρακα) και στη συνέχεια το διάλυμα αποσυμπιέζεται γρήγορα μέσω ενός ακροφύσιου ψεκασμού, προκαλώντας έτσι εξαιρετικά ταχεία πυρήνωση του προϊόντος σε ένα ιδιαίτερα διεσπαρμένο υλικό. Ο πιο σημαντικός περιορισμός της RESS είναι η χαμηλή διαλυτότητα των ενώσεων σε υπερκρίσιμα ρευστά, ενώ η χρήση ενός συν-διαλύτη για τη βελτίωση της διαλυτότητας είναι συνήθως δαπανηρή. Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την παραγωγή νανοσωματιδίων πολλές τεχνολογίες που βασίζονται στο χειρισμό υπερκρίσιμων υγρών (Augustin and Sanguansri, 2009).

### 2.4.2. Εξεταζόμενες μέθοδοι σχηματισμού μικροσωματιδίων HBSS

#### Καθίζηση πολυσακχαριτών σε αιθανόλη

Για την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου που αναφέρεται στην παρούσα εργασία ως «καθίζηση πολυσακχαριτών σε αιθανόλη», λόγω έλλειψης

βιβλιογραφίας για το σχηματισμό σωματιδίων από HBSS, εξετάζονται οι αντίστοιχες μέθοδοι για τη δημιουργία σωματιδίων από άμυλο.

Σε πρόσφατες μελέτες, έχουν δοκιμαστεί νέες διεργασίες για την παραγωγή νανοσωματιδίων αμύλου, όπως

- καθίζηση άμορφου αμύλου
- συνδυασμός σχηματισμού συμπλόκου και ενζυμικής υδρόλυσης προς σχηματισμό νανοκρυστάλλων (πχ. σύμπλοκο με λιπίδια)
- μικρορευστοποίηση

Αναφέρεται ότι παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αμύλου με καθίζηση διαλύματος αμύλου σε αιθανόλη. Φυσικό άμυλο αναμίχθηκε με νερό και ζελατινοποιήθηκε πλήρως. Στη συνέχεια, προστέθηκε αιθανόλη σταγόνα-σταγόνα στο διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου με παράλληλη ανάδευση. Στη συνέχεια, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε με αιθανόλη για την απομάκρυνση του νερού και το ίζημα ξηράθηκε για την απομάκρυνση της αιθανόλης. Τα νανοσωματίδια που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ενός βιο-νανο-σύνθετου (Le Corre et al., 2010).

### **Γαλακτωματοποίηση**

Τα γαλακτώματα είναι κolloειδή συστήματα διασποράς, τα οποία προκύπτουν από την ανάμιξη δύο μη μιγνυόμενων υγρών από τα οποία το ένα βρίσκεται διασπαρμένο σε μορφή μικρότατων σταγονιδίων (ασυνεχής φάση) σε όλη τη μάζα του άλλου υγρού (συνεχής φάση) (Λάγουρη, 2004).

Ένας εύκολος τρόπος ταξινόμησης των γαλακτωμάτων είναι ο διαχωρισμός τους σε δύο μεγάλες ομάδες με βάση τη φύση της εξωτερικής φάσης. Οι δύο ομάδες ονομάζονται γαλακτώματα «λάδι-σε-νερό» (λ/ν) και «νερό-σε-λάδι» (ν/λ). Οι όροι «λάδι» και «νερό» είναι πολύ γενικοί, αφού σχεδόν κάθε ισχυρά πολικό, υδρόφιλο υγρό ανήκει στην κατηγορία «νερό» και κάθε μη πολικό υγρό θεωρείται «λάδι» (Lissant, 1974).

Η εμφάνιση ενός γαλακτώματος εξαρτάται από τη διάμετρο της σταγόνας. Εάν η διάμετρος είναι μεταξύ 0,15 και 100 μm, τότε το γαλάκτωμα έχει εμφάνιση θολή-γαλακτώδη. Σε αντίθεση, τα μικρογαλακτώματα (διάμετρος: 0,0015-0,15 μm) είναι διαφανή και σημαντικά πιο σταθερά γιατί ο ρυθμός κατακάθισης εξαρτάται από τη διάμετρο των σταγόνων (Belitz et al., 2006).

Όταν αναμειγνύονται λάδι και νερό χωρίς τη χρήση γαλακτωματοποιητή, η αρχική διασπορά του λαδιού είναι ασταθής (το λάδι συνενώνεται μέχρι τον πλήρη διαχωρισμό του διαλύματος σε δύο φάσεις, λαδιού και νερού).

Τα γαλακτώματα σταθεροποιούνται με την προσθήκη ενός τρίτου συστατικού, το οποίο ονομάζεται γαλακτωματοποιητής (Lynch & Griffin, 1974). Πιο συγκεκριμένα,



οι γαλακτωματοποιητές είναι ουσίες των οποίων το μόριο περιέχει συνήθως μια υδρόφοβη (μη πολική) και μια υδρόφιλη (πολική) ομάδα (Λάγουρη, 2004). Οι γαλακτωματοποιητές μπορεί να είναι επιφανειοδραστικές ενώσεις, κόμμεα ή λεπτοδιαμερισμένοι πηλοί.

Στη σύνθεση ενός σταθερού γαλακτώματος λαμβάνουν μέρος τρεις ξεχωριστοί μηχανισμοί, από τους οποίους όλοι μαζί ή ο καθένας ξεχωριστά μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε μια συγκεκριμένη περίπτωση:

1. Μείωση της διεπιφανειακής τάσης
2. Σχηματισμός μιας άκαμπτης διεπιφανειακής μεμβράνης
3. Ηλεκτρικά φορτία (Lynch & Griffin, 1974)

#### **2.4.3. Εφαρμογές της μικροτεχνολογίας**

Η χρήση της μικροτεχνολογίας και της ρομποτικής επιτρέπει την παραγωγή περισσότερων παράλληλων συσκευών ανάλυσης με χαμηλότερο κόστος (Souteyrand et al., 2000).

Η γνώση και τα εργαλεία που επιτρέπουν την ανάπτυξη συστημάτων αποθήκευσης για τη χορήγηση φαρμάκων με τη χρήση μικροτεχνολογίας, προέρχονται από διάφορους τομείς συμπεριλαμβανομένης της χημείας, της επιστήμης των υλικών, της μηχανικής, της πληροφορικής, και της μικροηλεκτρονικής. Συσκευές που συνδυάζουν συστήματα αποθήκευσης και μικροτεχνολογία χρησιμοποιούν παθητικούς ή ενεργητικούς μηχανισμούς που επιτρέπουν τη μεταφορά τόσο μικρό-, όσο και μακρομοριακών φαρμάκων με αύξηση της εξειδίκευσης και του ελέγχου (Stevenson et al., 2012).

Η επέκταση της μεθοδολογίας της μικροτεχνολογίας θα επιτρέψει γρήγορη (αυτοματοποιημένη), μικρογραφημένη και παράλληλη επεξεργασία των δειγμάτων στο μέλλον (Wurm et al., 2010).

Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν τη χρήση της μικροτεχνολογίας ως ενός πολύ χρήσιμου εργαλείου για την επεξεργασία και ανάλυση κυττάρων. Η επιστήμη αυτή φαίνεται να έχει προχωρήσει σε τέτοιο επίπεδο, ώστε να επιτρέπει τον έλεγχο των μηχανικών, ηλεκτρικών και βιοχημικών παραμέτρων στην κλίμακα των νανομέτρων (Anderson and van den Berg, 2004).

Πρότυπες τεχνικές της μικροτεχνολογίας είναι η υγρή και ξηρή χάραξη, η βαθιά χάραξη, διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας και καθαρισμού της επιφάνειας, η συγκόλληση και διασύνδεση με το μακρόκοσμο (Wurm et al., 2010).

#### **2.4.4. Οι νανοεπιστήμες στη βιομηχανία τροφίμων**

Οι Sangiansri and Augustin (2006) αναφέρουν ότι πολλοί επιστήμονες σε όλο τον κόσμο έχουν αναγνωρίσει τη συνεισφορά των νανοεπιστημών και της τεχνολογίας στη βιομηχανία τροφίμων. Η ανάπτυξη νέων υλικών και προϊόντων τροφίμων

περιλαμβάνει την εφαρμογή διαφόρων διεργασιών κατά μονάδα (π.χ. θέρμανση, διάτμηση, ξήρανση, κατάψυξη) ή τη μεταβολή της σύνθεσης των συστατικών (π.χ. pH, ιοντική ισχύς, προσθήκη τασιενεργών και σακχάρων), ώστε να σχεδιαστούν και να δημιουργηθούν τρόφιμα διαφόρων συνθέσεων, με τροποποιημένη υφή, πιο ελκυστικά στους καταναλωτές. Επίσης γίνεται εξέταση των ιδιοτήτων του προκύπτοντος προϊόντος σε μακροσκοπικό επίπεδο, ώστε να βελτιστοποιηθεί η σύνθεση και η επεξεργασία του προϊόντος.

Οι νανοεπιστήμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το χειρισμό και τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των τροφίμων, όπως μιας πρωτεΐνης, ενός λιπιδίου ή ενός πολυσακχαρίτη, καθώς και της συμπεριφοράς της αυτό-συναρμολόγησής τους σε μοριακή κλίμακα, ώστε να ληφθούν οι επιθυμητές δομικές και ρεολογικές ιδιότητες. Η κατανόηση του πως τα συστατικά των τροφίμων είναι δομημένα και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους θα επιτρέψει τον ακριβή χειρισμό των μορίων των τροφίμων για το σχεδιασμό νέων τροφίμων που θα είναι πιο υγιεινά, πιο νόστιμα και πιο ασφαλή (Sanguansri and Augustin, 2006).

Αναφέρεται μια τεχνολογία, κατά την οποία η ενθυλάκωση διαφορετικών γεύσεων ή δραστικών παραγόντων σε διάφορα συστήματα συστατικών, όπως τα μικροσφαιρίδια και τα νανοσφαιρίδια, αλλάζει το άρωμα κατά τη διάρκεια της χρήσης του προϊόντος. Ένα ευρύ φάσμα γεύσεων, αισθητήριων δεικτών, και άλλων δραστικών συστατικών μπορούν να προσδοθούν με τον τρόπο αυτό ώστε να παραταθεί η απελευθέρωσή τους και η αισθητήρια αντίληψη στο στόμα. Η νανοτεχνολογία μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί για να τροποποιηθούν προϊόντα τροφίμων ώστε τα θρεπτικά συστατικά, οι πρωτεΐνες και τα αντιοξειδωτικά να μεταφέρονται πιο αποτελεσματικά και αποδοτικά στο ανθρώπινο σώμα. Μία βασική στρατηγική για την παροχή αυτών των συστατικών σε τρόφιμα είναι η χρήση της μικροενθυλάκωσης. Η μικροενθυλάκωση περιλαμβάνει την επικάλυψη ή την παγίδευση ενός επιθυμητού συστατικού (πυρήνας) μέσα σε ένα δευτερογενές υλικό (μήτρα ενθυλάκωσης) και χρησιμοποιείται για να καλύψει το χρώμα και τη γεύση των θρεπτικών ουσιών, και να προστατεύσει τα ευαίσθητα θρεπτικά συστατικά κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης.

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη βιομηχανία τροφίμων είναι να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα των επιθυμητών συστατικών των τροφίμων με την εξασφάλιση απελευθέρωσης στην επιθυμητή θέση στο σώμα, εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα ότι το προστιθέμενο θρεπτικό συστατικό/βιοδραστικό δεν αναιρεί τις οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων. Η βιομηχανία τροφίμων περιορίζεται στη χρήση των συστατικών τροφίμων για ενθυλάκωση (π.χ. πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και γαλακτωματοποιητές τροφίμων) και εξακολουθεί να υπάρχει ακόμη σε μεγάλο βαθμό ακάλυπτη ανάγκη στον τομέα της απελευθέρωσης των θρεπτικών συστατικών στο σώμα μέσω τεχνολογιών ενθυλάκωσης που χρησιμοποιούν τρόφιμα ως μήτρα ενθυλάκωσης (Sanguansri and Augustin, 2006).

## 2.5. Μικροενθυλάκωση

Γενικώς, η μικροενθυλάκωση ορίζεται ως η τεχνολογία που περικλείει μικρά στερεά σωματίδια, υγρά σταγονίδια ή αέρια, σε μία μήτρα επικάλυψης. Το επικαλυμμένο ή παγιδευμένο υλικό, επίσης γνωστό ως πυρήνας, γέμισμα, εσωτερική φάση ή ωφέλιμο φορτίο, είναι συνήθως το ενεργό συστατικό το οποίο πρέπει να προστατευθεί από το περιβάλλον ή/και να απελευθερωθεί με ελεγχόμενο ρυθμό. Το υλικό επικάλυψης ονομάζεται κάψουλα, κέλυφος, μεμβράνη, μεταφορέας, ενθυλακωτικό ή μήτρα.

Η μικροενθυλάκωση αναπτύχθηκε αρχικά το 1950, με μια διαδικασία που ονομάζεται κροκίδωση, για τη δημιουργία χαρτιού που δεν περιέχει άνθρακα. Η διαδικασία περιλαμβάνει ένα διαλυτό πολυμερές, όπως η ζελατίνη, που «ωθείται» να βγει από το διάλυμα και να σχηματίσει κέλυφος γύρω από διεσπαρμένα σταγονίδια ενός ελαίου στη διεπιφάνεια με ένα υδατικό μέσο. Το περίβλημα ζελατίνης σκληραίνει με την προσθήκη γλουταραλδεΐδης, και τα μικροσκοπικά σφαιρίδια συλλέγονται και ξηραίνονται. Από τότε, έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνολογίες για την παρασκευή μικροσωματιδίων για διάφορες εφαρμογές όπως φαρμακευτική, τρόφιμα, καλλυντικά, χημικά, και βιομηχανίες εκτύπωσης (Li, 2009).

### 2.5.1. Τεχνικές μικροενθυλάκωσης

Οι τεχνικές μικροενθυλάκωσης διακρίνονται σε φυσικές/μηχανικές και χημικές διεργασίες:

Φυσικές/μηχανικές διεργασίες

- Ξήρανση με ψεκασμό
- Κατάψυξη/ψύξη με ψεκασμό
- Εξώθηση
- Λυοφιλίωση
- Επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης
- Συνεξώθηση

Χημικές διεργασίες

- Κροκίδωση
- Πηκτωματοποίηση
- Παγίδευση λιποσωμάτων
- Μοριακή ένταξη
- Συν-κρυστάλλωση
- Εξάτμιση του διαλύτη / εκχύλιση
- Διεπιφανειακός ή in-situ πολυμερισμός (Li, 2009).

## 2.6. Σκέδαση φωτός

Όταν μια δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα υλικό, τα ηλεκτρόνια του υλικού αλληλεπιδρούν με το φως, διεγείρονται και επανεκπέμπουν την απορροφούμενη ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις με το ίδιο ακριβώς μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Σκέδαση του φωτός ονομάζεται ο διασκορπισμός των φωτεινών ακτινών που λαμβάνει χώρα όταν προσπέσουν σε μικροσκοπικά σωματίδια, με αποτέλεσμα τη διάχυσή τους στο χώρο.

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μεγέθους σωματιδίων σε κolloειδή συστήματα, εναιωρήματα, κτλ (Ζαχαρής, 2010) και αποτελεί μια από τις σημαντικότερες πειραματικές τεχνικές για το χαρακτηρισμό των πολυμερών σε αραιά διαλύματα. Συνίσταται στη μέτρηση της ακτινοβολίας η οποία σκεδάζεται από το διάλυμα, σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, το μέγεθος και το σχήμα των κέντρων σκέδασης, τις οπτικές ιδιότητες των σκεδαστών και τη γωνία παρατήρησης.

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός είναι μια γρήγορη μέθοδος, μη καταστρεπτική για το δείγμα, απόλυτη (αφού δεν χρειάζεται βαθμονόμηση) και μπορεί να εφαρμοστεί σε συστήματα τα οποία αποτελούνται από μεγάλο αριθμό σωματιδίων. Έχει όμως δύο μειονεκτήματα: το δείγμα δεν πρέπει να είναι πολύ πυκνό για να μην γίνεται πολλαπλή σκέδαση και δεν πρέπει να υπάρχει πουθενά στο σύστημα σκόνη, διότι τα σωματίδια σκόνης αποτελούν και αυτά κέντρα σκέδασης (Γκοτζαμάνης, 2007).

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός διακρίνεται στη:

- Στατική σκέδαση φωτός (static light scattering)
- Δυναμική σκέδαση φωτός (dynamic light scattering) (Ζαχαρής, 2010)

### **Στατική Σκέδαση Φωτός (Static Light Scattering, SLS)**

Η τεχνική της στατικής σκέδασης του φωτός βασίζεται στην πολωσιμότητα των σωματιδίων, στα οποία επάγεται διπολική ροπή όταν ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια τους. Μετράται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό συγκεκριμένες γωνίες για ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων του πολυμερούς στο διάλυμα.

Υπάρχουν δυο κυρίως θεωρίες οι οποίες περιγράφουν τη στατική σκέδαση του φωτός και χρησιμοποιούνται ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων. Η πρώτη είναι η θεωρία Rayleigh που αναφέρεται στη σκέδαση του φωτός από ισότροπα αιωρούμενα σωματίδια με διαστάσεις μικρότερες από το μήκος κύματος  $\lambda$  της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ( $<\lambda/20$ ). Η δεύτερη είναι η θεωρία Debye, η οποία περιγράφει τη σκέδαση φωτός από σωματίδια, των οποίων οι διαστάσεις είναι

συγκρίσιμες με το μήκος κύματος  $\lambda$  της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ( $>\lambda/20$ ) (Γκοτζαμάνης, 2007).

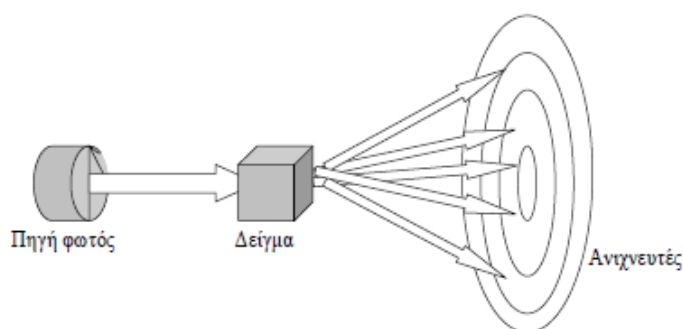
### **Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)**

Η δυναμική σκέδαση είναι επίσης γνωστή ως *ψευδο-ελαστική σκέδαση φωτός* (quasi-elastic light scattering, QELS) και *φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων* (photon correlation spectroscopy). Σήμερα η τεχνική της δυναμικής σκέδασης του φωτός χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του συντελεστή διάχυσης (μεταφοράς και περιστροφής) σε αραιά διαλύματα, του μεγέθους και του σχήματος των σωματιδίων (Γκοτζαμάνης, 2007).

#### **2.6.1. Μέτρηση του μεγέθους σωματιδίων με σκέδαση του φωτός**

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες, υπάρχει ισχυρή εξάρτηση του μεγέθους των σωματιδίων και της γωνίας σκέδασης του προσπίπτοντος φωτός. Έτσι με δεδομένη τη γωνία σκέδασης και με γνωστούς τους δείκτες διάθλασης του μέσου διασποράς και των διεσπαρμένων σωματιδίων, είναι δυνατός ο υπολογισμός του μεγέθους των διεσπαρμένων σωματιδίων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, σε πολυδισεπαρμένα συστήματα, μετρήσεις της σκέδασης του φωτός σε διαφορετικές γωνίες δίνουν πληροφορίες για την κατανομή μεγεθών των σωματιδίων που απαρτίζουν ένα κολλοειδές σύστημα. Έτσι μία συσκευή (Σχήμα 4) σχεδιασμένη να καταγράφει το μοτίβο σκέδασης του φωτός από μία κολλοειδή διασπορά, περιλαμβάνει μία πηγή φωτός, ένα θάλαμο δείγματος και έναν καταγραφέα της έντασης της σκέδασης σε διάφορες γωνίες (Ριτζούλης, 2010).



Σχήμα 4. Αναπαράσταση των βασικών στοιχείων συσκευής στατικής σκέδασης φωτός (Ριτζούλης, 2010)

#### **2.6.2. Εφαρμογές της σκέδασης φωτός στην ανάλυση τροφίμων**

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός χρησιμοποιείται στην τεχνολογία τροφίμων για το χαρακτηρισμό του μεγέθους διεσπαρμένων σωματιδίων σε κολλοειδή συστήματα (γάλα, μαγιονέζα) αλλά και για τον προσδιορισμό της κατανομής του μεγέθους σωματιδίων (πρωτεΐνες, πολυμερή, μικκύλια, υδατάνθρακες) σε υγρά συστήματα (γαλακτώματα, εναιωρήματα) (Ζαχαρής, 2010).

### **3. Σκοπός της εργασίας**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της σύνθεσης μικροσωματιδίων από HBSS σαλεπιού με τη χρήση δύο μεθόδων και ερευνώντας παραμέτρους που τις επηρεάζουν:

- Τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη
- Τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

## **4. Πειραματικό μέρος**

### **4.1. Υλικά**

#### **4.1.1. Αντιδραστήρια**

- Αιθανόλη
- Πολυβινυλο-αλκοόλη (PVA)
- Οξικός αιθυλεστέρας
- HBSS
- Φιβροΐνη

#### **4.1.2. Όργανα**

- Περισταλτική αντλία τύπου Minipuls 3 της εταιρείας Gilson
- Λουτρό υπερήχων S30H της εταιρείας Elmasonic
- Συσκευή υπερήχων με ρύγχος Ultrasonic Processor τύπου UP100H της εταιρείας Hielscher
- Συσκευή ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων με σκέδαση φωτός Mastersizer 2000 της εταιρείας Malvern Instruments Ltd
- Αυτόματος διανομέας της συσκευής CAM200 της εταιρείας KSV
- Σύριγγα Gastight 1010 (εσωτερικής διαμέτρου 0,413 mm) της εταιρείας Hamilton
- Βελόνες εσωτερικής διαμέτρου 0,11 mm και 1,60 mm της εταιρείας Hamilton
- Μαγνητικός αναδευτήρας της εταιρείας Fisher Scientific  
Μαγνητικός αναδευτήρας της εταιρείας Fisher Scientific

## **4.2. Μέθοδοι ανάλυσης**

### **4.2.1. Εκχύλιση HBSS από σαλέπι**

Ποσότητα αλεσμένου σαλεπιού εκχυλίζεται δύο φορές με 300 mL αιθυλικής αλκοόλης 70% v/v στους 40 °C για μια ώρα. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση ώστε να παραληφθούν τα αδιάλυτα στην αλκοόλη στερεά και ακολουθούν δύο εκπλύσεις του στερεού υπολείμματος με 150 mL ακετόνης. Το υπόλειμμα ξηραίνεται σε συνθήκες περιβάλλοντος για 24 ώρες.

Στη συνέχεια, 10 g του ξηρού υπολείμματος εκχυλίζονται τρεις φορές με 600 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου 0,05M σε pH 5,2 στους 70 °C για 30 λεπτά. Μετά από κάθε εκχύλιση ακολουθεί φυγοκέντριση. Το υπερκείμενο υγρό που λαμβάνεται μετά από την τρίτη φυγοκέντριση λυοφιλοποιείται (Georgiadis et al., 2012).

### **4.2.2. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη**

Παρασκευάστηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης HBSS και διηθήθηκε υπό κενό, χρησιμοποιώντας γυάλινο ηθμό (νούμερο 2). Το διήθημα φιλτραρίστηκε με τη χρήση φίλτρων 1 μm.

Σε 5ml του παραπάνω διαλύματος προστέθηκε ίσος όγκος αιθανόλης με τη βοήθεια περιστατικής αντλίας ταχύτητας 7 rpm. Το διάλυμα αιθανόλης προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα, χρησιμοποιώντας βελόνα 18 G , ενώ το διάλυμα βρισκόταν υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση μέσα σε ποτήρι ζέσεως των 25 ml, το οποίο κλείστηκε με ταινία parafilm για να αποτραπεί η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη (αιθανόλη) κατά τη διάρκεια της προσθήκης του (Ma et al., 2008).

Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε διάλυμα.

Μελετήθηκαν τέσσερεις παράμετροι που επηρεάζουν τη σύνθεση μικροσωματιδίων με τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη.

#### **4.2.2.1. Επίδραση της συσκευής υπερήχων**

Μελετήθηκε η επίδραση της συσκευής υπερήχων στο μέγεθος των σχηματιζόμενων μικροσωματιδίων. Μετά το τέλος της σύνθεσης των μικροσωματιδίων, δείγμα διαλύματος HBSS οδηγήθηκε στη συσκευή υπερήχων με ρύγχος της εταιρείας Hielscher, ενώ ένα άλλο δείγμα οδηγήθηκε στο λουτρό υπερήχων της εταιρείας Elmasonic.

#### **4.2.2.2. Επίδραση του PVA ως σταθεροποιητή**

Μελετήθηκε ακόμα η επίδραση του PVA ως σταθεροποιητή των σχηματιζόμενων μικροσωματιδίων. Για αυτό το λόγο έγινε προσθήκη ξηρής ποσότητας PVA σε διάλυμα HBSS (0,5%), ώστε τα παραγόμενα διαλύματα να έχουν μικρότερη, ίση ή



μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε PVA από τη συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος (0,25%, 0,50% και 0,75%). Μελετήθηκε και ένα διάλυμα χωρίς την προσθήκη PVA.

#### **4.2.2.3. Επίδραση της παροχής αιθανόλης**

Εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές παροχές (0,5 ml/s και 2,0 ml/s) αιθανόλης, έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση της παροχής της αιθανόλης στο μέγεθος των σωματιδίων.

#### **4.2.2.4. Επίδραση της διαμέτρου της βελόνας**

Μελετήθηκε η επίδραση της διαμέτρου της βελόνας με την οποία έγινε η παροχή της αιθανόλης στα διαλύματα HBSS, στο μέγεθος των μικροσωματιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο βελόνες διαφορετικής εσωτερικής διαμέτρου (0,11 mm και 1,60 mm) για την προσθήκη αιθανόλης στο διάλυμα HBSS.

#### **4.2.2.5. Επίδραση της φιβροΐνης**

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της φιβροΐνης στο σχηματισμό μικροσωματιδίων από HBSS. Παρασκευάστηκαν διαλύματα HBSS 1%, SF 1% και μίγμα HBSS:SF με αναλογία 1:1. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό των τριών διαλυμάτων ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας γυάλινο ηθμό (νούμερο 2) και πραγματοποιήθηκε ξεχωριστό φιλτράρισμα των διηθημάτων με τη χρήση φίλτρων 1 μm.

Η μετέπειτα διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την περιγραφή της παραγράφου 4.2.2..

#### **4.2.3. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης**

Παρασκευάστηκαν διαλύματα HBSS 1%, SF 1% και μίγμα HBSS:SF με αναλογία 1:1. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό των τριών διαλυμάτων ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας γυάλινο ηθμό (νούμερο 2) και πραγματοποιήθηκε ξεχωριστό φιλτράρισμα των διηθημάτων με τη χρήση φίλτρων 1 μm.

Έγινε προσθήκη 5 ml από το κάθε διάλυμα σε 50 ml διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας ταχύτητας 7 rpm. Η προσθήκη έγινε σταγόνα-σταγόνα, χρησιμοποιώντας βελόνα 18 G, ενώ το διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα βρισκόταν υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση μέσα σε ποτήρι ζέσεως των 80 ml, το οποίο κλείστηκε με ταινία parafilm για να αποτραπεί η εξάτμιση οργανικών διαλυτών κατά τη διάρκεια της διάχυσης (Baimark et al., 2010).

Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε διάλυμα.

Τα αναμεμειγμένα μικροσωματίδια ανακτήθηκαν με πιπέτα και αραιώθηκαν στα 10 ml σε ισομοριακό διάλυμα αλκοόλης-νερού.

#### 4.2.4. Μέτρηση μεγέθους σωματιδίων

Μετρήθηκε το μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων και παρατηρήθηκε το εύρος κατανομής των μεγεθών τους, με τη χρήση συσκευής ανάλυσης σωματιδίων.

Σε κάθε διάλυμα έγινε χρήση υπερήχων ώστε να επιτευχθεί η επαναδιασπορά των μικροσωματιδίων. Τέλος, μετρήθηκε ξανά το μέγεθος τους με τη βοήθεια της συσκευής ανάλυσης σωματιδίων, ώστε να εξεταστεί η επίδραση των υπερήχων.

#### 4.2.5. Στατιστική ανάλυση

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab 16. Η μεταβλητή σε όλους τους ελέγχους ήταν το μέγεθος των σωματιδίων HBSS και όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με βάση τη στατιστική σημαντικότητα 0,05. Η κανονικότητα και η ομοιογένεια μελετήθηκαν με τη χρήση των ελέγχων Ryan-Joiner και Levene, αντίστοιχα.

#### Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη

- Επίδραση της συσκευής υπερήχων

Για την εκτίμηση της επίδρασης του λουτρού υπερήχων και της συσκευής υπερήχων με ρύγχος στο μέγεθος των σωματιδίων HBSS, εφαρμόστηκε ο έλεγχος της υπόθεσης σύγκρισης δυο ανεξάρτητων δειγμάτων (2 sample independent t-test).

- Επίδραση του PVA ως σταθεροποιητή

Εφαρμόστηκε ο έλεγχος της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων καθώς και της αλληλεπίδρασης τους (ANOVA). Ο ένας παράγοντας της ανάλυσης ήταν η συγκέντρωση του PVA στα διαλύματα HBSS (0%, 0,25%, 0,50% και 0,75%) και ο δεύτερος ήταν η χρήση υπερήχων, δηλαδή μετρήθηκε το μέγεθος των σωματιδίων πριν και μετά τη χρήση υπερήχων.

- Επίδραση της παροχής αιθανόλης

Εφαρμόστηκε ο έλεγχος της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων καθώς και της αλληλεπίδρασης τους (ANOVA). Οι δύο παράγοντες της ανάλυσης ήταν η παροχή της αιθανόλης (χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές παροχές 0,5 ml/s και 2,0 ml/s) και η χρήση υπερήχων (μετρήθηκε το μέγεθος των σωματιδίων πριν και μετά τη χρήση υπερήχων).

- Επίδραση της διαμέτρου της βελόνας

Εφαρμόστηκε ο έλεγχος της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων καθώς και της αλληλεπίδρασης τους (ANOVA). Ο πρώτος παράγοντας της ανάλυσης ήταν η διάμετρος της βελόνας με την οποία γίνεται η παροχή της αιθανόλης στο διάλυμα (επιλέχθηκαν δύο βελόνες με εσωτερικές διαμέτρους 0,11 mm και 1,60 mm) και ο

δεύτερος η χρήση υπερήχων (μετρήθηκε το μέγεθος των σωματιδίων πριν και μετά τη χρήση υπερήχων).

- Επίδραση της φιβροΐνης

Εφαρμόστηκε ο έλεγχος της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων καθώς και της αλληλεπίδρασης τους (ANOVA). Ο ένας παράγοντας της ανάλυσης ήταν το είδος του διαλύματος (παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα: HBSS 1%, HBSS:SF 1:1 και SF 1%). Ο δεύτερος παράγοντας ήταν η χρήση υπερήχων, δηλαδή μετρήθηκε το μέγεθος των σωματιδίων πριν και μετά τη χρήση υπερήχων.

### **Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης**

Εφαρμόστηκε ο έλεγχος της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων καθώς και της αλληλεπίδρασης τους (ANOVA). Οι δύο παράγοντες της ανάλυσης ήταν το είδος του διαλύματος (παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα: HBSS 1%, HBSS:SF 1:1 και SF 1%) και η χρήση υπερήχων (μετρήθηκε το μέγεθος των σωματιδίων πριν και μετά τη χρήση υπερήχων).

## 5. Αποτελέσματα - συζήτηση

### 5.1. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη

#### 5.1.1. Επίδραση της συσκευής υπερήχων

Από τον έλεγχο της υπόθεσης σύγκρισης δύο ανεξάρτητων δειγμάτων παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος των σωματιδίων του διαλύματος HBSS 1%, που σχηματίστηκαν υπό την επίδραση των δύο διαφορετικών συσκευών υπερήχων διαφέρει σημαντικά στατιστικά ( $p = 0,017$ ). Κρίνοντας από τις τιμές των δύο μέσων όρων συνεπάγεται το συμπέρασμα ότι ο μέσος όρος του μεγέθους των σωματιδίων των διαλυμάτων στα οποία έγινε χρήση της συσκευής υπερήχων με ρύγχος (282  $\mu\text{m}$ ) ήταν μικρότερος από αυτόν των διαλυμάτων στα οποία έγινε χρήση του λουτρού υπερήχων (787  $\mu\text{m}$ ) (Παράρτημα 1).

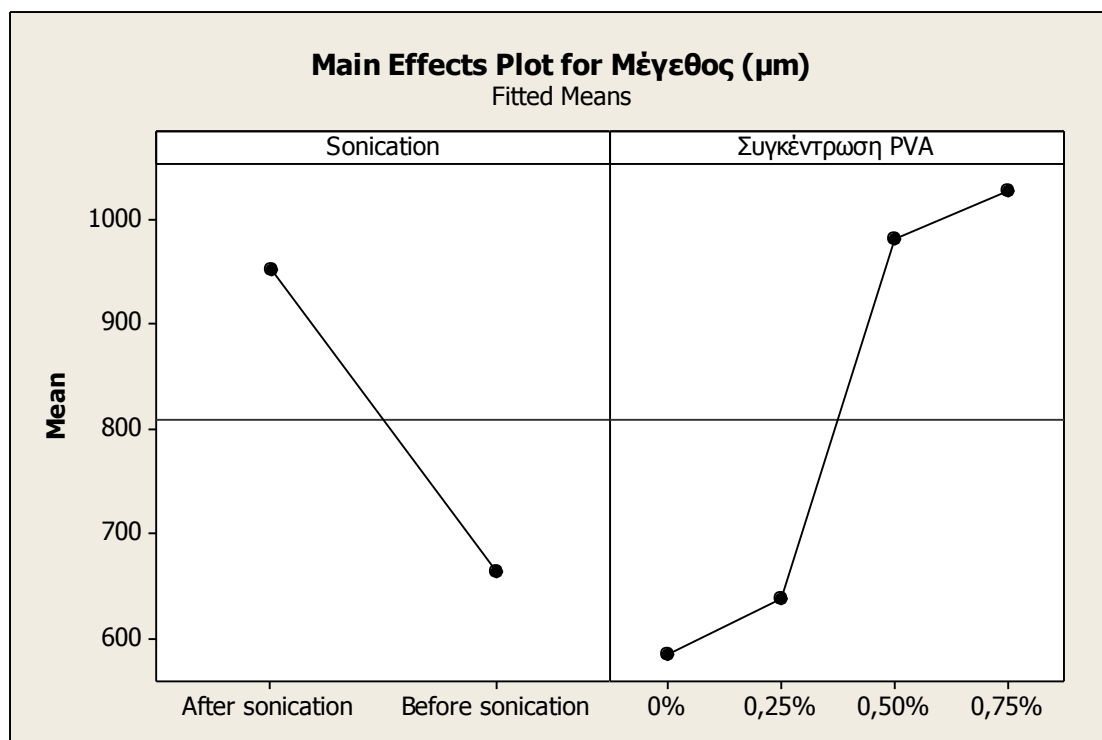
#### 5.1.2. Επίδραση του PVA ως σταθεροποιητή

Από τα αποτελέσματα της σύγκρισης πολλαπλών παραγόντων (Two way ANOVA) παρατηρείται ότι και οι δύο κύριοι παράγοντες είναι στατιστικά σημαντικοί, ενώ στατιστικά σημαντικός εμφανίζεται και ο όρος της αλληλεπίδρασης αφού για όλους ισχύει ότι  $p < 0,001$ . Αφού η τιμή F του όρου της αλληλεπίδρασης (7,79) είναι μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές των κύριων παραγόντων ( $F_{\text{Συγκέντρωση PVA}} = 22,36$ ,  $F_{\text{Sonication}} = 35,84$ ), θα πρέπει να συγκριθούν μεταξύ τους οι μέσοι όροι όλων των συνδυασμένων επιπέδων. Λόγω του ότι η τιμή F του παράγοντα της χρήσης υπερήχων (Sonication) είναι μεγαλύτερη από των υπολοίπων, συμπεραίνεται ότι η επαναδιασπορά με τη χρήση υπερήχων είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο το μέγεθος των σωματιδίων (Παράρτημα 2).

Από τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων των μέσων όρων του Tukey συμπεραίνεται ότι οι μέσοι όροι του μεγέθους των σωματιδίων στα διαλύματα που περιέχουν 0% (585,6  $\mu\text{m}$ ) και 0,25% PVA (638,9  $\mu\text{m}$ ), είναι ίσοι. Επίσης είναι μικρότεροι από τους μέσους όρους του μεγέθους των σωματιδίων στα διαλύματα που περιέχουν 0,50% (980,0  $\mu\text{m}$ ) και 0,75% PVA (1026,3  $\mu\text{m}$ ), οι οποίοι είναι επίσης ίσοι (Σχήμα 5). Δηλαδή ισχύει

Συγκέντρωση PVA:	0%	=	0,25%	<	0,50%	=	0,75%
Μέσοι όροι μεγέθους ( $\mu\text{m}$ ):	585,6	=	638,9	<	980	=	1026,3

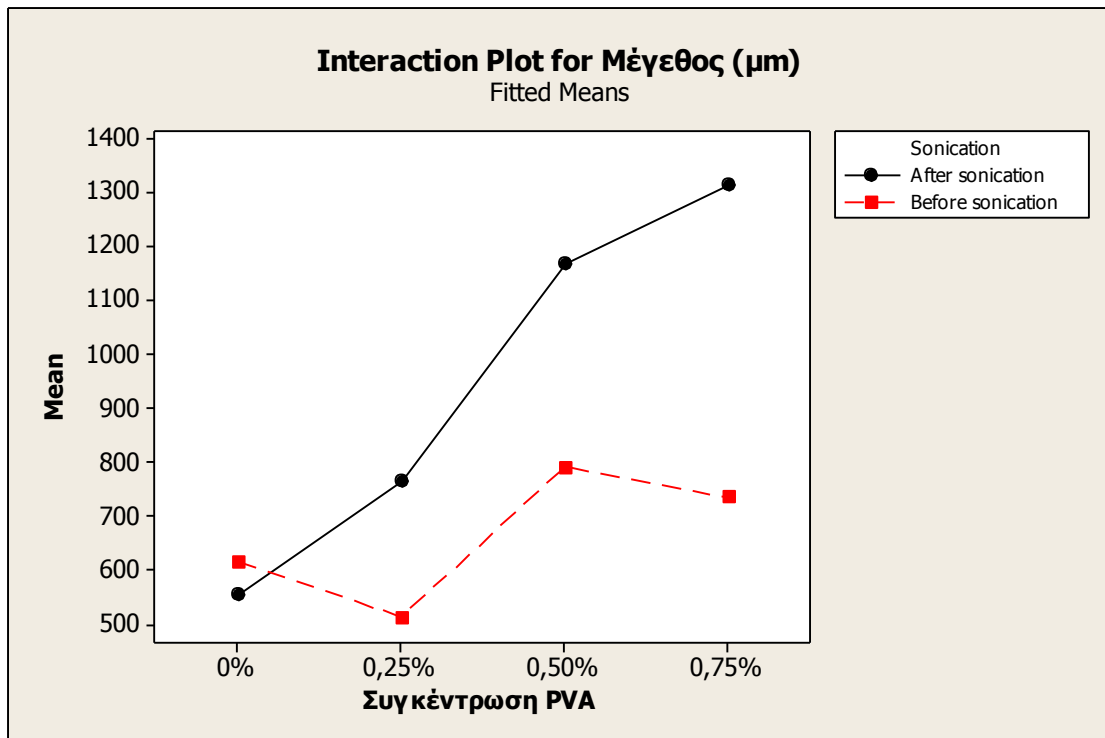
Συμπεραίνεται ακόμη ότι ο μέσος όρος των μεγεθών των σωματιδίων πριν τη χρήση υπερήχων (663,655  $\mu\text{m}$ ) είναι μικρότερος από το μέσο όρο των μεγεθών των σωματιδίων μετά τη χρήση υπερήχων (951,718  $\mu\text{m}$ ) (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Γράφημα μέσων όρων επίδρασης του PVA ως σταθεροποιητή στο μέγεθος των μικροσωματιδίων

Από το γενικό γραμμικό μοντέλο, παρατηρείται το είδος της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων. Η πορεία του μεγέθους των σωματιδίων μετά τη χρήση υπερήχων είναι συνεχώς ανοδική (Σχήμα 6). Αντίθετα, πριν τη χρήση υπερήχων παρατηρείται μείωση του μεγέθους μέχρι τη συγκέντρωση 0,25% (χιαστή παρεμβολή), ενώ ακολουθείται ο ίδιος ρυθμός μεταβολής και στις δύο περιπτώσεις ως τη συγκέντρωση 0,50%. Στη συνέχεια, ο ρυθμός μεταβολής του μεγέθους των σωματιδίων πριν τη χρήση υπερήχων διατηρείται μάλλον σταθερός ως τη συγκέντρωση 0,75%.

Συνακόλουθα, η χρήση υπερήχων προκαλεί ανοδική πορεία του μεγέθους με την αύξηση της συγκέντρωσης του PVA, ενώ δεν παρατηρείται αξιόλογη μεταβολή χωρίς τη χρήση υπερήχων. Το τελευταίο έρχεται σε αντίθεση με τα συμπεράσματα των Wang et al. (2010), οι οποίοι αναφέρουν μείωση του μεγέθους των μικροσφαιρών φιβροΐνης/PVA μετά τη χρήση υπερήχων.

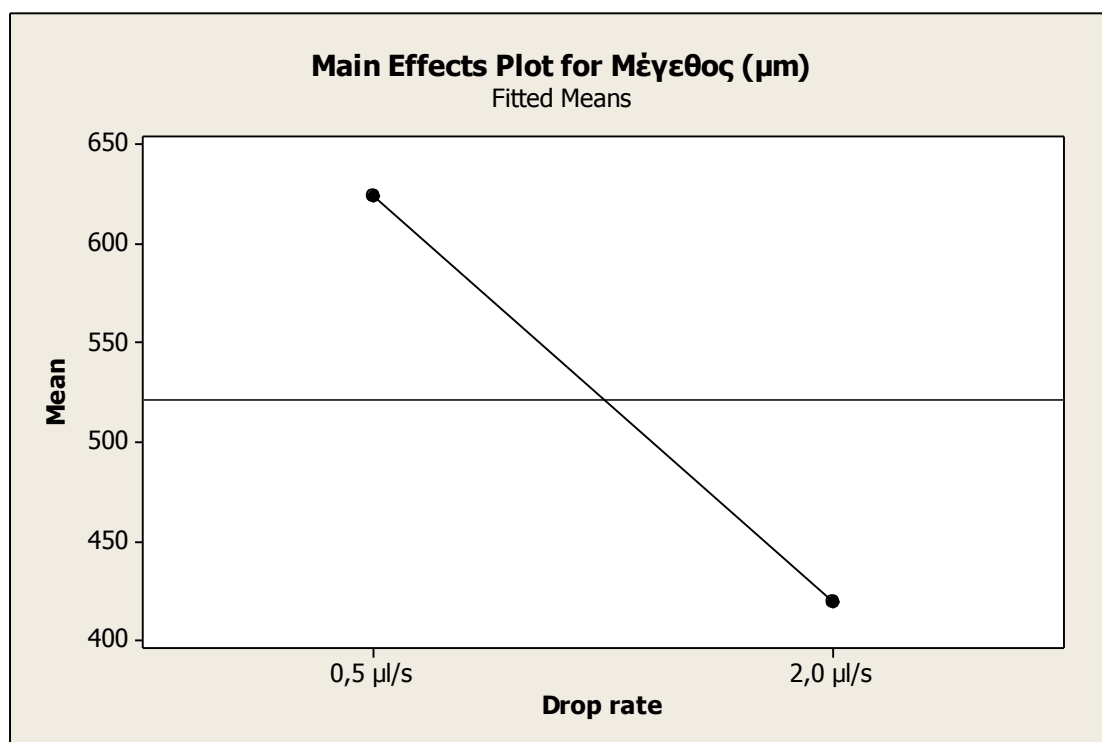


Σχήμα 6. Γράφημα αλληλεπίδρασης επίδρασης του PVA ως σταθεροποιητή στο μέγεθος των μικροσωματιδίων

### 5.1.3. Επίδραση της παροχής αιθανόλης

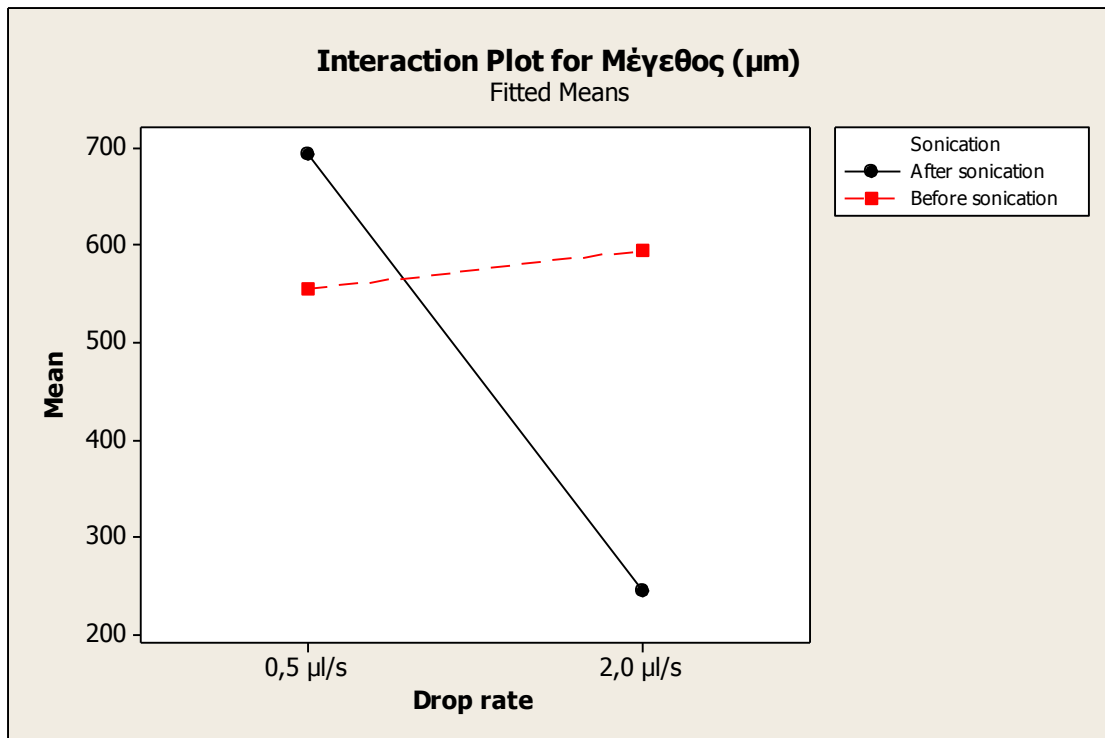
Από τα αποτελέσματα της σύγκρισης πολλαπλών παραγόντων (Two way ANOVA) παρατηρείται ότι ο παράγοντας της χρήσης υπερήχων (Sonication) δεν είναι στατιστικά σημαντικός ( $p = 0,140$ ), ενώ ο παράγοντας της παροχής της αιθανόλης (Drop rate) ( $p = 0,006$ ) καθώς και ο όρος της αλληλεπίδρασης ( $p = 0,001$ ) είναι σημαντικοί στατιστικά (Παράρτημα 3).

Από τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων των μέσων όρων του Tukey συμπεραίνεται ότι ο μέσος όρος του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν με παροχή αιθανόλης 2,0 μl/s (623,994 μm) είναι μικρότερος από το μέσο όρο του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν με παροχή αιθανόλης 0,5 μl/s (418,899 μm) (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Γράφημα μέσων όρων επίδρασης της παροχής αιθανόλης στο μέγεθος των μικροσωματιδίων

Από το γενικό γραμμικό μοντέλο, παρατηρείται το είδος της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων. Στο γράφημα αλληλεπίδρασης (Σχήμα 8) φαίνεται ότι πριν τη χρήση υπερήχων ο ρυθμός μεταβολής του μεγέθους των σωματιδίων είναι μάλλον σταθερός, ενώ μετά τη χρήση υπερήχων υπάρχει μείωση του μεγέθους με την αύξηση της παροχής της αιθανόλης.



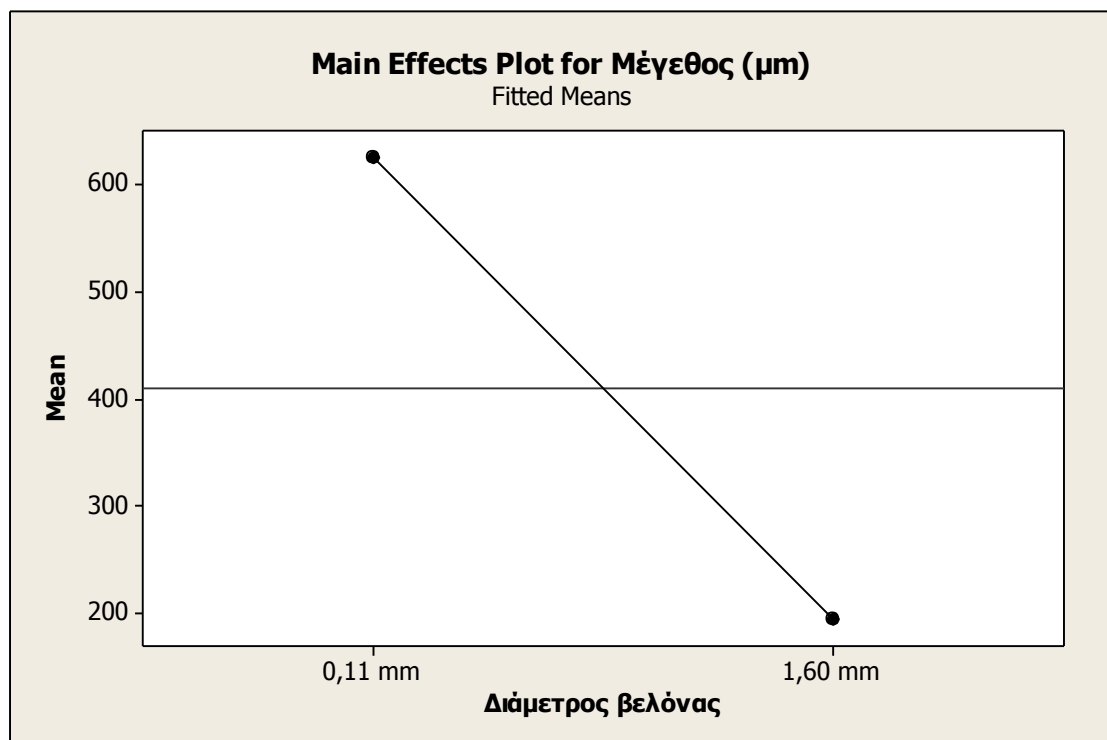
Σχήμα 8. Γράφημα αλληλεπίδρασης επίδρασης της παροχής αιθανόλης στο μέγεθος των μικροσωματιδίων



#### 5.1.4. Επίδραση της διαμέτρου της βελόνας

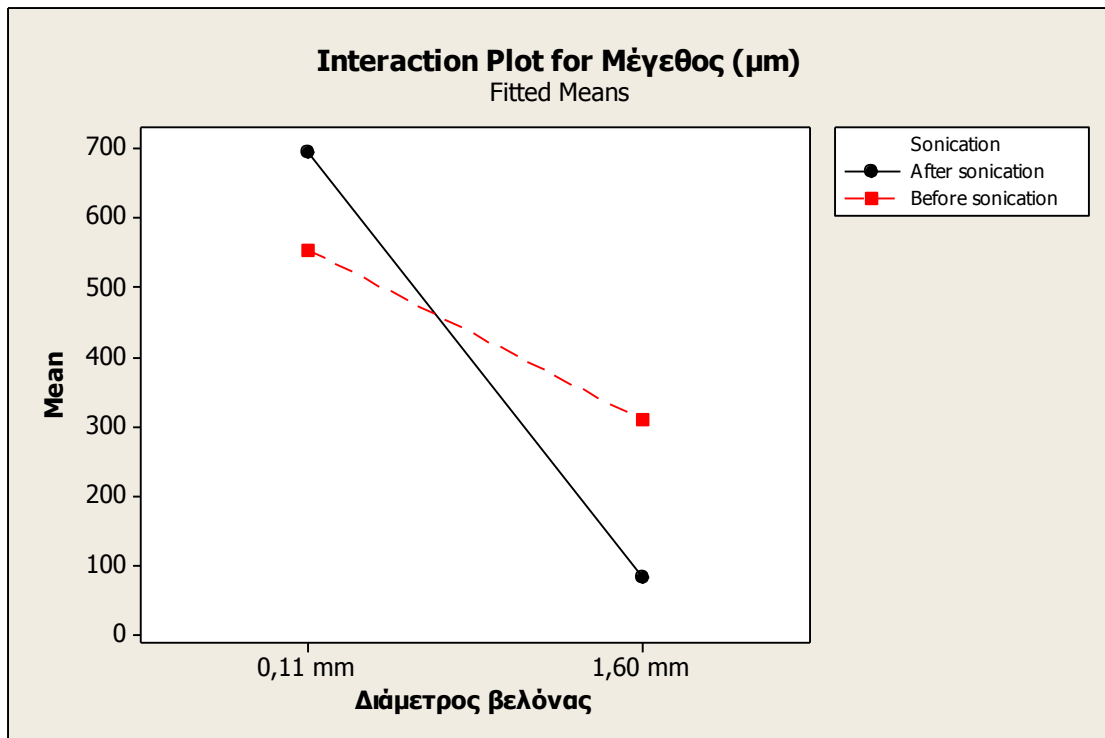
Παρατηρείται ότι ο παράγοντας της χρήσης υπερήχων (Sonication) δεν είναι στατιστικά σημαντικός ( $p = 0,512$ ), ενώ ο παράγοντας του είδους της βελόνας ( $p < 0,001$ ) καθώς και ο όρος της αλληλεπίδρασης ( $p = 0,009$ ) είναι σημαντικοί στατιστικά (Παράρτημα 4).

Από τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων των μέσων όρων του Tukey συμπεραίνεται ότι ο μέσος όρος του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν με τη χρήση βελόνας διαμέτρου 1,60 mm (195,1  $\mu\text{m}$ ) είναι μικρότερος από το μέσο όρο του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν με τη χρήση βελόνας διαμέτρου 0,11 mm (624,0  $\mu\text{m}$ ) (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Γράφημα μέσων όρων επίδρασης της διαμέτρου της βελόνας στο μέγεθος των μικροσωματιδίων

Από το γενικό γραμμικό μοντέλο, παρατηρείται το είδος της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων. Στο σχήμα 10 παρουσιάζεται το γράφημα της αλληλεπίδρασης των παραγόντων. Παρατηρείται ότι το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται αυξάνοντας την εσωτερική διάμετρο της βελόνας από την οποία γίνεται η παροχή της αιθανόλης στο διάλυμα, ενώ η μείωση είναι εντονότερη μετά τη χρήση υπερήχων.



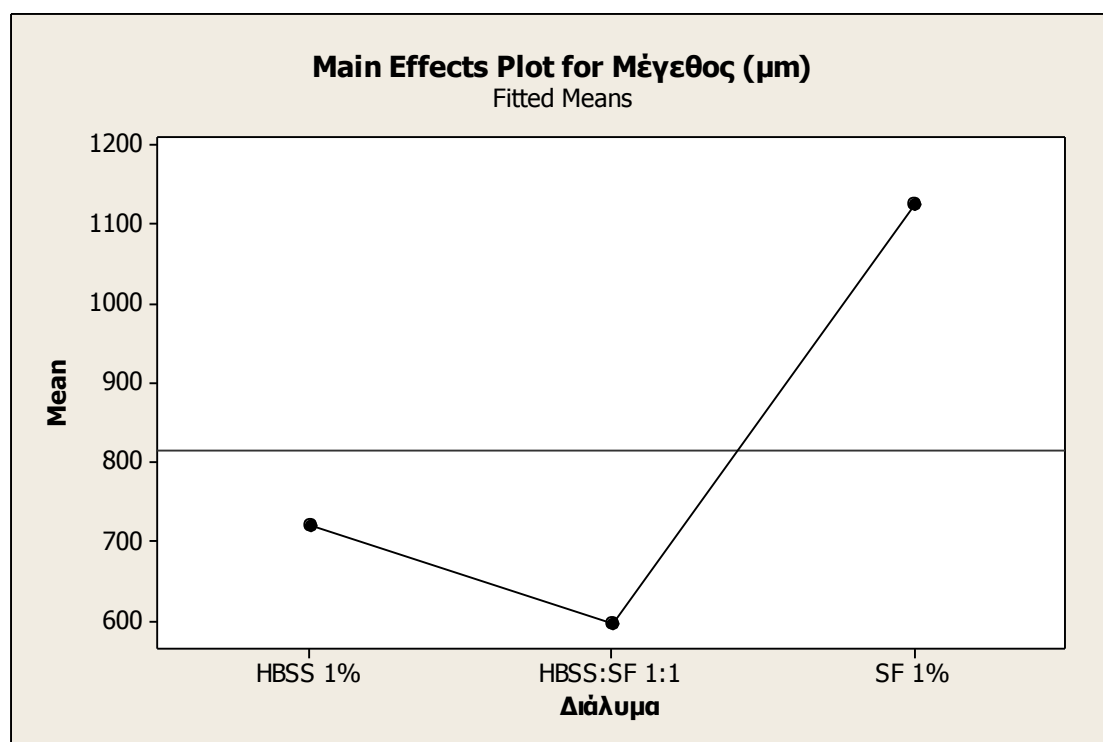
Σχήμα 10. Γράφημα αλληλεπίδρασης επίδρασης της διαμέτρου της βελόνας στο μέγεθος των μικροσωματιδίων

### 5.1.5. Επίδραση της φιβροΐνης

Από τα αποτελέσματα της σύγκρισης πολλαπλών παραγόντων (Two way ANOVA) παρατηρείται ότι ο παράγοντας του είδους του διαλύματος (Διάλυμα) δεν είναι στατιστικά σημαντικός ( $p = 0,070$ ), όπως επίσης και ο παράγοντας της χρήσης υπερήχων (Sonication) ( $p = 0,915$ ) (Παράρτημα 5).

Με λιγότερη αυστηρότητα, δηλαδή με βάση τη στατιστική σημαντικότητα 0,1 (αντί για 0,05) παρατηρείται πως ο παράγοντας του είδους του διαλύματος εμφανίζεται στατιστικά σημαντικός. Από τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων των μέσων όρων του Tukey συμπεραίνεται ότι ο μέσος όρος του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν στο διάλυμα φιβροΐνης (SF 1%) (1126,5 μm) είναι μεγαλύτερος από τους μέσους όρους του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν στα άλλα δύο διαλύματα. Οι μέσοι όροι του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν στα διαλύματα HBSS 1% και HBSS:SF 1:1 είναι ίσοι (719,5 μm και 596,1 μm αντίστοιχα).

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τους Ma et al. (2008), οι οποίοι αναφέρουν ότι τα περισσότερα σωματίδια αμύλου είχαν μέγεθος 50 – 300 nm. Αυτό κατά κύριο λόγο οφείλεται στη φύση του πολυσακχαρίτη.



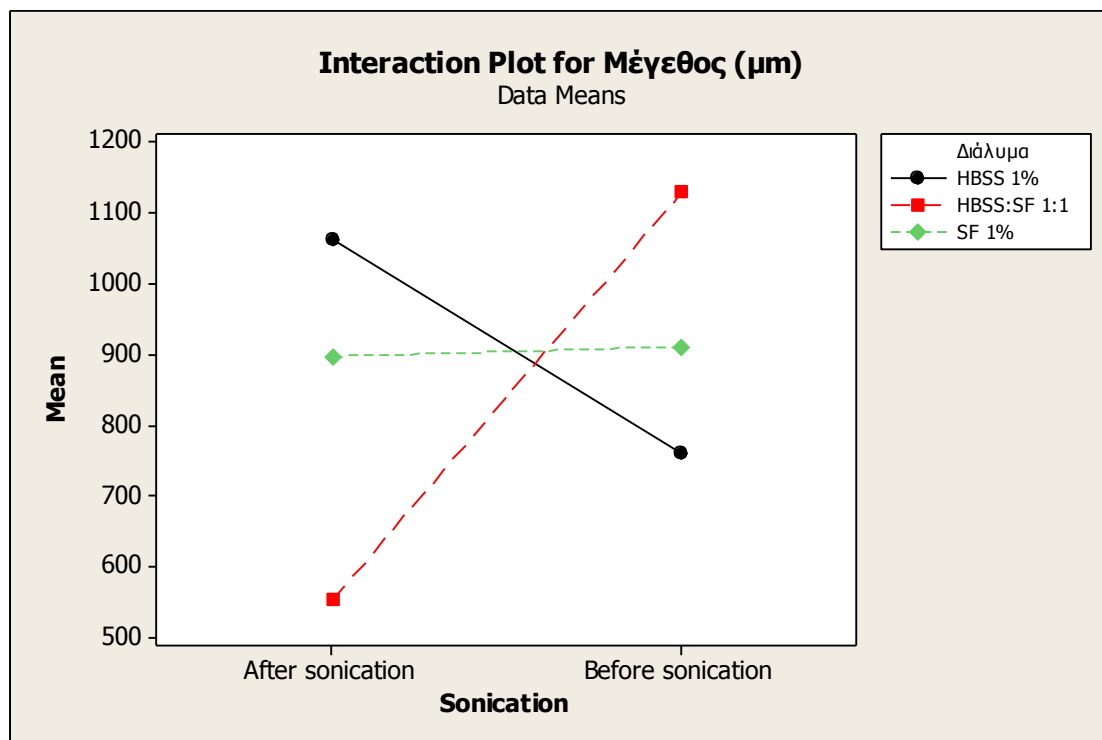
Σχήμα 11. Γράφημα μέσων όρων επίδρασης της φιβροΐνης στο μέγεθος των μικροσωματιδίων

## 5.2. Σύνθεση μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

Από τα αποτελέσματα της σύγκρισης πολλαπλών παραγόντων (Two way ANOVA) παρατηρείται ότι οι παράγοντες του είδους του διαλύματος (Διάλυμα) και της χρήσης υπερήχων (Sonication) δεν είναι στατιστικά σημαντικοί ( $p_{\text{Διάλυμα}} = 0,708$ ,  $p_{\text{Sonication}} = 0,216$ ), ενώ στατιστικά σημαντικός εμφανίζεται ο όρος της αλληλεπίδρασής τους ( $p < 0,001$ ) (Παράρτημα 6).

Από το γενικό γραμμικό μοντέλο, παρατηρείται το είδος της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων. Στο σχήμα 12 φαίνεται πως στο διάλυμα HBSS 1% το μέγεθος των σωματιδίων αυξάνεται με τη χρήση υπερήχων, ενώ στο διάλυμα της φιβροΐνης (SF 1%) ο ρυθμός μεταβολής του μεγέθους των σωματιδίων είναι μάλλον σταθερός. Σημαντική μείωση μετά τη χρήση υπερήχων εμφανίζεται στο μέγεθος των σωματιδίων του μίγματος αυτών, HBSS:SF 1:1.

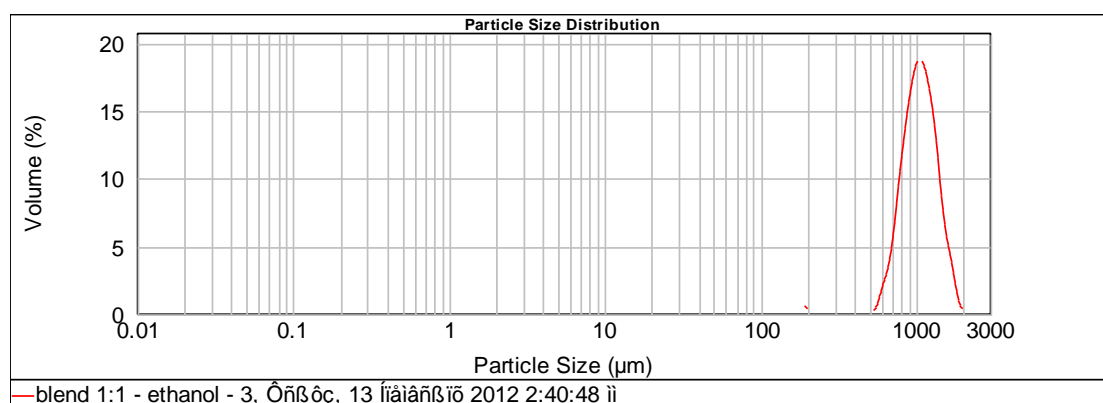
Οι Baiemark et al. (2010) αναφέρουν ότι το μεγαλύτερο κλάσμα μάζας των σωματιδίων αμύλου και φιβροΐνης παρουσιάστηκε σε μεγέθη  $> 150 \mu\text{m}$ , ενώ στο διάλυμα μίγματος φιβροΐνης:αμύλου με αναλογία 1:1, το μέγεθος των περισσότερων σωματιδίων ήταν  $< 80 \mu\text{m}$ . Ένας κύριος παράγοντας που τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι η φύση του χρησιμοποιούμενου πολυσακχαρίτη.



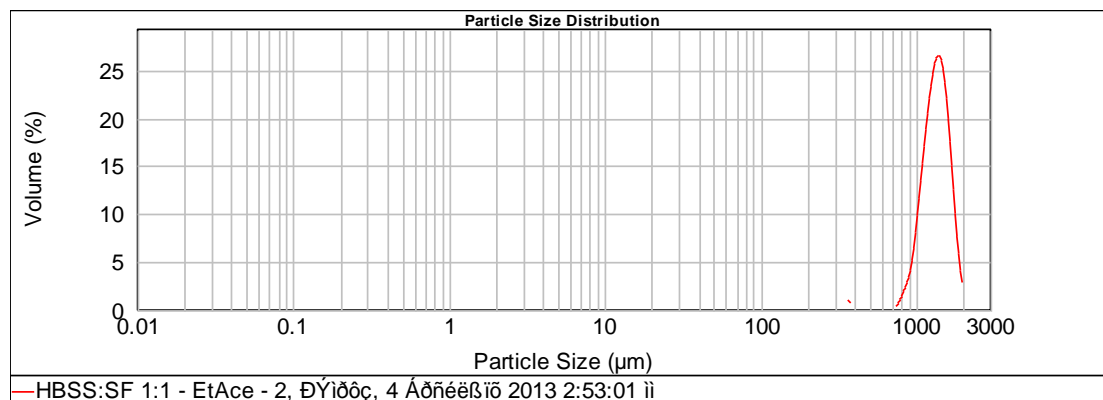
Σχήμα 12. Γράφημα αλληλεπίδρασης σύνθεσης μικροσωματιδίων από HBSS με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

### 5.3. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

Από τη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων στη συσκευή ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων με σκέδαση φωτός Mastersizer 2000, παρατηρήθηκε ότι η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίστηκαν από όλα τα πειράματα ήταν κοντά στα 1000μm. Στα Σχήματα 13 και 14 δίνονται γραφήματα που προήλθαν από το σχηματισμό μικροσωματιδίων HBSS με τις μεθόδους της καθίζησης και της γαλακτωματοποίησης, υπό την επίδραση της φιβροΐνης.



Σχήμα 13. Γράφημα κατανομής μεγέθους σωματιδίων του διαλύματος HBSS:SF 1:1, που σχηματίστηκαν με τη μέθοδο της καθίζησης πολυσακχαριτών σε αιθανόλη



Σχήμα 14. Γράφημα κατανομής μεγέθους σωματιδίων του διαλύματος HBSS:SF 1:1, που σχηματίστηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

Οι Baemark et al. (2010) μελέτησαν αναμεμειγμένα μικρομόρια φιβροΐνης/αμύλου σε διάφορες αναλογίες. Συμπέραναν ότι τα μικρομόρια των διαλυμάτων φιβροΐνης και αμύλου (100%) έδειξαν το μεγαλύτερο κλάσμα μάζας σε μεγέθη >150 μm. Ανέφεραν ακόμη ότι, στα μικρομόρια των αναμεμειγμένων διαλυμάτων, το μέγεθος

των μορίων μειωνόταν καθώς αυξάνονταν η αναλογία της φιβροΐνης στα διαλύματα.

Συγκρίνοντας τις δύο μελέτες, συμπεραίνεται τα σχηματιζόμενα και με τις δύο εξεταζόμενες μεθόδους σωματίδια HBSS είχαν πολύ ευρύτερη κατανομή μεγέθους από αυτά που σχηματίστηκαν με την επίδραση της φιβροΐνης σε ένα άλλο πολυσακχαρίτη, όπως το άμυλο. Αυτό κατά κύριο λόγο οφείλεται στη διαφορετική φύση των δύο πολυσακχαριτών.

## **6. Συμπεράσματα**

### **Καθίζηση πολυσακχαριτών σε αιθανόλη**

- ❖ Η χρήση συσκευής υπερήχων με ρύγχος μειώνει το μέγεθος των σωματιδίων HBSS σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η χρήση του λουτρού υπερήχων.
- ❖ Το μέγεθος των σωματιδίων HBSS αυξάνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας του PVA, ενώ με τη χρήση υπερήχων δεν παρατηρείται μείωση του μεγέθους.
- ❖ Μεγάλος ρυθμός παροχής αιθανόλης (2,0 ml/s) σε συνδυασμό με χρήση υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό σωματιδίων HBSS με μικρότερο μέγεθος από ότι η εφαρμογή μικρότερου ρυθμού παροχής αιθανόλης.
- ❖ Η χρήση βελόνας μεγαλύτερης διαμέτρου (1,60 mm) για την παροχή αιθανόλης σε συνδυασμό με χρήση υπερήχων, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό σωματιδίων HBSS με μικρότερο μέγεθος από ότι η χρήση βελόνας μικρότερης διαμέτρου.
- ❖ Η προσθήκη φιβροΐνης σε διάλυμα HBSS ώστε να σχηματιστεί μίγμα αυτών με αναλογία 1:1, επηρεάζει θετικά το σχηματισμό σωματιδίων HBSS μικρού μεγέθους.

### **Γαλακτωματοποίηση**

- ❖ Η προσθήκη φιβροΐνης σε διάλυμα HBSS ώστε να σχηματιστεί μίγμα αυτών με αναλογία 1:1, σε συνδυασμό με χρήση υπερήχων, επηρεάζει θετικά το σχηματισμό σωματιδίων HBSS μικρού μεγέθους.

### **Γενικά συμπεράσματα**

- ❖ Είναι εφικτός ο σχηματισμός σωματιδίων HBSS στη κλίμακα των μικρομέτρων, ωστόσο με τις μεθόδους που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός αυτών στη κλίμακα των νανομέτρων.

## 7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- ❖ Μελέτη επίδρασης της φιβροΐνης στα σωματίδια HBSS σε αναλογίες διαφορετικές της 1:1.
- ❖ Μελέτη επίδρασης στο μέγεθος των σωματιδίων HBSS άλλων σταθεροποιητών.
- ❖ Μελέτη και άλλων παραμέτρων επίδρασης στο μέγεθος των σωματιδίων HBSS με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης.
- ❖ Μελέτη σχηματισμού μικροσωματιδίων HBSS με προσθήκη διπλάσιου όγκου αιθανόλης.
- ❖ Μελέτη της επίδρασης χρήσης υπερήχων μεγαλύτερης έντασης.
- ❖ Μελέτη σχηματισμού σωματιδίων HBSS σε νανο-κλίμακα μέσω σχηματισμού συμπλόκου με άλλα συστατικά.
- ❖ Μελέτη ύπαρξης και απομάκρυνσης πρωτεϊνών από το εκχύλισμα HBSS.



## 8. Βιβλιογραφία

### Ελληνική βιβλιογραφία

Γκοτζαμάνης Γ. (2007). Ανάπτυξη νέων «ευφυών» κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές-στατιστικό συμπολυμερές. Διαδακτορική διατριβή. Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών στην επιστήμη και τεχνολογία των πολυμερών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.

Ζαχαρής Κ. (2010). Σημειώσεις Ενόργανης Ανάλυσης Τροφίμων, Θεσσαλονίκη.

Λάγουρη Β. (2004). Σημειώσεις εργαστηριακών ασκήσεων Χημείας Τροφίμων, Θεσσαλονίκη.

Ριτζούλης Χ. (2010). Σημειώσεις στο εργαστηριακό μάθημα Ενόργανη Ανάλυση Τροφίμων. Θεσσαλονίκη.

Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. (2006), *Χημεία Τροφίμων*, 3<sup>η</sup> έκδοση, Τζιόλα, Θεσσαλονίκη

### Ξένη βιβλιογραφία

Anderson H. and van den Berg A. (2004). Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 44-49.

Augustin M.A. and Sanguansri P. (2009). Nanostructured Materials in the Food Industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, **58**, 184-207.

Baimark Y., Srisa-ard M., Srihanam P. (2010). Morphology and thermal stability of silk fibroin/starch blended microparticles. *eXPRESS Polymer Letters Vol.4*, **12**, 781–789.

Garcia-Fuentes M., Meinel A.J., Hilbe M., Meinel L., Merkle H.P. (2009). Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. *Biomaterials*, **30**, 5068–5076.

Georgiadis N., Ritzoulis C., Charchari E., Koukiotis C., Tsiptsias C., Vasiliadou C. (2012). Isolation, characterization and emulsion stabilizing properties of polysaccharides from orchid roots (salep). *Food Hydrocolloids*, **28**, 68-74.

Hardy J.G., Scheibel T.R. (2010). Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science*, **35**, 1093–1115

Jiang S., Liu S. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **4**, 1228-1233.

Karaman S., Yilmaz M.T., Ertugay M.F., Baslar M., Kayacier A. (2012). Effect of ultrasound treatment on steady and dynamic shear properties of glucomannan based salep dispersions: Optimization of amplitude level, sonication time and

temperature using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, **19**, 928-938

Kim D.S., Park H.B., Rhim J.W., Lee Y.M. (2004). Preparation and characterization of crosslinked PVA/SiO<sub>2</sub> hybrid membranes containing sulfonic acid groups for direct methanol fuel cell applications. *Journal of Membrane Science*, **240**, 37-48

Le Corre D., Bras J. & Dufresne A. (2010). Starch Nanoparticles: A Review. *Biomacromolecules*, **11**, 1139–1153.

Li Y.O. (2009). Development of microencapsulation-based technologies for micronutrient fortification in staple foods for developing countries. pp. 18-28, Dissertation, Graduate Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, University of Toronto, Toronto, Canada.

Li-sheng Z., Wei-zhong W., Jian-long W. (2007). Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Environmental Sciences*, **19**, 1293-1297.

Lissant K.J. (1974). Basic theory. In: *Emulsions and Emulsion Technology*, (Lissant K.J.), pp 1-70, Marcel Dekker, Inc., New York.

Lynch M.W. and Griffin W.C. (1974). Food Emulsions. In: *Emulsions and Emulsion Technology*, (Lissant K. J.), pp 1-70, Marcel Dekker, Inc., New York.

Ma X., Jian R., Chang P.R., Yu J. (2008). Fabrication and Characterization of Citric Acid-Modified Starch Nanoparticles/Plasticized-Starch Composites. *Biomacromolecules*, **9**, 3314–3320

Nogueira G.M., de Moraes M.A., Dori3n Rodas A.C., Higa O.Z., Beppu M.M. (2011). Hydrogels from silk fibroin metastable solution: Formation and characterization from a biomaterial perspective. *Materials Science and Engineering C*, **31**, 997–1001.

Sanguansri P. and Augustin M.A. (2006). Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 547-556.

Shi Y. and Xiong D. (2012). Microstructure and friction properties of PVA/PVP hydrogels for articular cartilage repair as function of polymerization degree and polymer concentration. *Wear*.

Souteyrand E., Cloarec J.P., Martin J.R., Cabrera M., Bras M., Chauvet J.P., Dugas V., Bessueille F. (2000). Use of microtechnology for DNA chips implementation. *Applied Surface Science*, **164**, 246–251.

Stevenson C.L., Santini Jr J.T., Langer R. (2012). Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, 1590–1602.

Vepari C., Kaplan D L. (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*, **32**, 991–1007.

Wang X., Yucel T., Lu Q., Hu X., Kaplan D.L. (2010). Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials*, **31**, 1025–1035.

Wenk E., Merkle H.P., Meinel L. (2011). Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, **150**, 128–141

Wurm M., Schopke B., Lutz D., Möller J., Zeng A.P. (2012). Microtechnology meets systems biology: The small molecules of metabolome as next big targets. *Journal of Biotechnology*, **149**, 33–51.

## Παραρτήματα

### Παράρτημα 1

#### Υποθέσεις

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

#### Two-Sample T-Test and CI: Με ρύγχος; Λουιτρό

Two-sample T for Με ρύγχος vs Λουιτρό

	N	Mean	StDev	SE Mean
Με ρύγχος	8	282	254	90
Λουιτρό	6	787	430	176

Difference = mu (Με ρύγχος) - mu (Λουιτρό)

Estimate for difference: -505

95% CI for difference: (-904; -107)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -2,76 P-Value = 0,017 DF = 12

Both use Pooled StDev = 338,4766

Από τον έλεγχο 2-Sample t, που πραγματοποιήθηκε στην μεταβλητή μεγέθους, φαίνεται πως ισχύει η εναλλακτική υπόθεση  $H_A$  ( $p = 0,017$ ), δηλαδή παρουσιάζεται στατιστική διαφορά στο μέγεθος των μικροσωματιδίων με τη χρήση των δύο διαφορετικών συσκευών υπερήχων.

## Παράρτημα 2

### Υποθέσεις

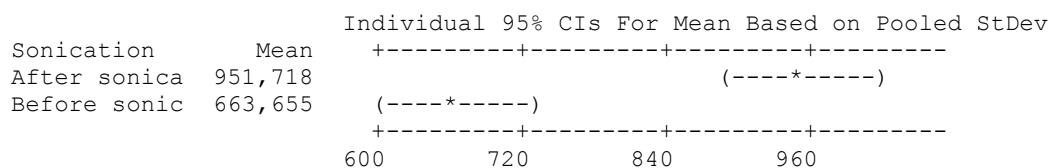
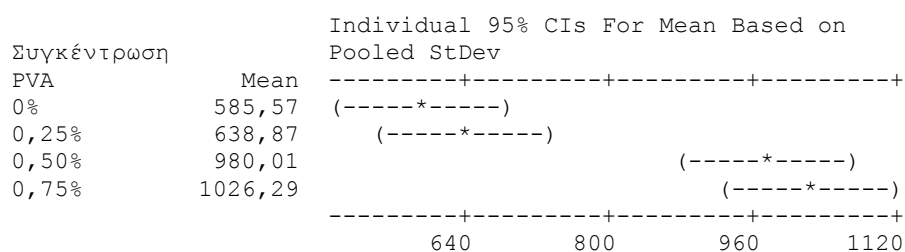
$H_0$ : οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

$H_A$ : οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

### Two-way ANOVA: Μέγεθος (μm) versus Συγκέντρωση PVA; Sonication

Source		DF	SS	MS	F	P
Συγκέντρωση PVA		3	2795726	931909	22,36	0,000
Sonication		1	1493648	1493648	35,84	0,000
Interaction		3	973638	324546	7,79	0,000
Error		64	2667202	41675		
Total		71	7930213			

S = 204,1    R-Sq = 66,37%    R-Sq(adj) = 62,69%



### Grouping Information Using Tukey Method

Συγκέντρωση PVA	N	Mean	Grouping
0,75%	18	1026,3	A
0,50%	18	980,0	A
0,25%	18	638,9	B
0%	18	585,6	B

Sonication	N	Mean	Grouping
After sonication	36	951,7	A
Before sonication	36	663,7	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## General Linear Model: Μέγεθος ( $\mu\text{m}$ ) versus Sonication; Συγκέντρωση PVA

Factor	Type	Levels	Values
Sonication	fixed	2	After sonication; Before sonication
Συγκέντρωση PVA	fixed	4	0%; 0,25%; 0,50%; 0,75%

Analysis of Variance for Μέγεθος ( $\mu\text{m}$ ), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Sonication	1	1493648	1493648	1493648	35,84	0,000
Συγκέντρωση PVA	3	2795726	2795726	931909	22,36	0,000
Sonication*Συγκέντρωση PVA	3	973638	973638	324546	7,79	0,000
Error	64	2667202	2667202	41675		
Total	71	7930213				

S = 204,145    R-Sq = 66,37%    R-Sq(adj) = 62,69%

Unusual Observations for Μέγεθος ( $\mu\text{m}$ )

Obs	Μέγεθος ( $\mu\text{m}$ )	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
10	98,99	555,93	68,05	-456,94	-2,37 R
11	961,65	555,93	68,05	405,72	2,11 R
17	83,36	555,93	68,05	-472,57	-2,46 R
26	83,71	513,00	68,05	-429,29	-2,23 R
35	83,71	764,74	68,05	-681,03	-3,54 R
46	653,88	1168,96	68,05	-515,08	-2,68 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Από τον έλεγχο Two-way ANOVA, που πραγματοποιήθηκε στην μεταβλητή μεγέθους, φαίνεται πως ισχύει η εναλλακτική υπόθεση  $H_A$ , δηλαδή υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές στο μέγεθος των μικροσωματιδίων και για τους δύο κύριους παράγοντες, αλλά και για τον όρο της αλληλεπίδρασης αφού για όλους ισχύει ότι  $p < 0,001$ .

### Παράρτημα 3

#### Υποθέσεις

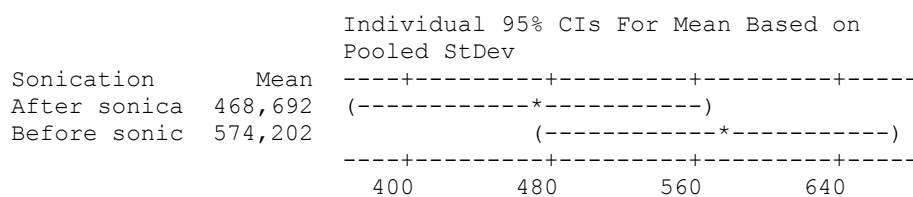
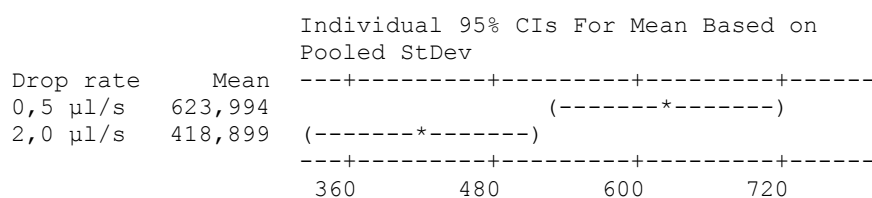
H<sub>0</sub>: οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

H<sub>A</sub>: οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

#### Two-way ANOVA: Μέγεθος (μm) versus Drop rate; Sonication

Source	DF	SS	MS	F	P
Drop rate	1	378578	378578	8,66	0,006
Sonication	1	100191	100191	2,29	0,140
Interaction	1	540080	540080	12,35	0,001
Error	32	1399187	43725		
Total	35	2418036			

S = 209,1 R-Sq = 42,14% R-Sq(adj) = 36,71%



#### Grouping Information Using Tukey Method

Drop rate	N	Mean	Grouping
0,5 μl/s	18	624,0	A
2,0 μl/s	18	418,9	B

Means that do not share a letter are significantly different.

#### General Linear Model: Μέγεθος (μm) versus Sonication; Drop rate

Factor	Type	Levels	Values
Sonication	fixed	2	After sonication; Before sonication
Drop rate	fixed	2	0,5 μl/s; 2,0 μl/s

Analysis of Variance for Μέγεθος (μm), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Sonication	1	100191	100191	100191	2,29	0,140
Drop rate	1	378578	378578	378578	8,66	0,006
Sonication*Drop rate	1	540080	540080	540080	12,35	0,001
Error	32	1399187	1399187	43725		
Total	35	2418036				

S = 209,104 R-Sq = 42,14% R-Sq(adj) = 36,71%

Unusual Observations for Μέγεθος (μm)

Obs	Μέγεθος (μm)	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
16	183,96	693,72	69,70	-509,76	-2,59 R
17	1108,31	693,72	69,70	414,59	2,10 R
22	192,97	594,14	69,70	-401,17	-2,03 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Από τον έλεγχο Two-way ANOVA, που πραγματοποιήθηκε στην μεταβλητή μεγέθους, φαίνεται πως για τον παράγοντα της χρήσης υπερήχων (Sonication) ισχύει η μηδενική υπόθεση  $H_0$  ( $p = 0,140$ ), ενώ για τον παράγοντα της παροχής της αιθανόλης (Drop rate) ( $p = 0,006$ ) καθώς και για τον όρο της αλληλεπίδρασης ( $p = 0,001$ ) ισχύει η εναλλακτική υπόθεση  $H_A$ . Πιο αναλυτικά, η χρήση υπερήχων δεν είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας, ενώ ο παράγοντας της παροχής της αιθανόλης και ο όρος της αλληλεπίδρασης είναι σημαντικοί στατιστικά.



## Παράρτημα 4

### Υποθέσεις

H<sub>0</sub>: οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

H<sub>A</sub>: οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

### Two-way ANOVA: Μέγεθος (μm) versus Διάμετρος βελόνας; Sonication

Source	DF	SS	MS	F	P
Διάμετρος βελόνας	1	1655884	1655884	43,04	0,000
Sonication	1	16887	16887	0,44	0,512
Interaction	1	300658	300658	7,81	0,009
Error	32	1231208	38475		
Total	35	3204638			

S = 196,2    R-Sq = 61,58%    R-Sq(adj) = 57,98%

### Grouping Information Using Tukey Method

Διάμετρος βελόνας	N	Mean	Grouping
0,11 mm	18	624,0	A
1,60 mm	18	195,1	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Μέγεθος (μm) versus Διάμετρος βελόνας; Sonication

Factor	Type	Levels	Values
Διάμετρος βελόνας	fixed	2	0,11 mm; 1,60 mm
Sonication	fixed	2	After sonication; Before sonication

Analysis of Variance for Μέγεθος (μm), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Διάμετρος βελόνας	1	1655884	1655884	1655884	43,04	0,000
Sonication	1	16887	16887	16887	0,44	0,512
Διάμετρος βελόνας*Sonication	1	300658	300658	300658	7,81	0,009
Error	32	1231208	1231208	38475		
Total	35	3204638				

S = 196,151    R-Sq = 61,58%    R-Sq(adj) = 57,98%

Unusual Observations for Μέγεθος (μm)

Obs	Μέγεθος (μm)	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
7	166,50	554,27	65,38	-387,77	-2,10 R
16	183,96	693,72	65,38	-509,76	-2,76 R
17	1108,31	693,72	65,38	414,59	2,24 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Από τον έλεγχο Two-way ANOVA, που πραγματοποιήθηκε στην μεταβλητή μεγέθους, φαίνεται πως για τον παράγοντα της χρήσης υπερήχων (Sonication) ισχύει η μηδενική υπόθεση  $H_0$  ( $p = 0,512$ ), ενώ για τον παράγοντα του είδους της βελόνας ( $p < 0,001$ ) καθώς και για τον όρο της αλληλεπίδρασης ( $p = 0,009$ ) ισχύει η εναλλακτική υπόθεση  $H_A$ . Πιο συγκεκριμένα, η χρήση υπερήχων δεν είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας, ενώ ο παράγοντας του είδους της βελόνας και ο όρος της αλληλεπίδρασης είναι σημαντικοί στατιστικά.

## Παράρτημα 5

### Υποθέσεις

$H_0$ : οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

$H_A$ : οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

### Two-way ANOVA: Μέγεθος (μm) versus Διάλυμα; Sonication

Source	DF	SS	MS	F	P
Διάλυμα	2	308106	154053	13,22	0,070
Sonication	1	170	170	0,01	0,915
Error	2	23310	11655		
Total	5	331586			

S = 108,0    R-Sq = 92,97%    R-Sq(adj) = 82,43%

### Grouping Information Using Tukey Method

Διάλυμα	N	Mean	Grouping
SF 1%	2	1126,5	A
HBSS 1%	2	719,5	B
HBSS:SF 1:1	2	596,1	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Από τον έλεγχο Two-way ANOVA, που πραγματοποιήθηκε στην μεταβλητή μεγέθους, φαίνεται πως για τον παράγοντα του διαλύματος ( $p = 0,070$ ) ισχύει η μηδενική υπόθεση  $H_0$ , όπως επίσης και για τον παράγοντα της χρήσης υπερήχων (Sonication) ( $p = 0,915$ ).

## Παράρτημα 6

### Υποθέσεις

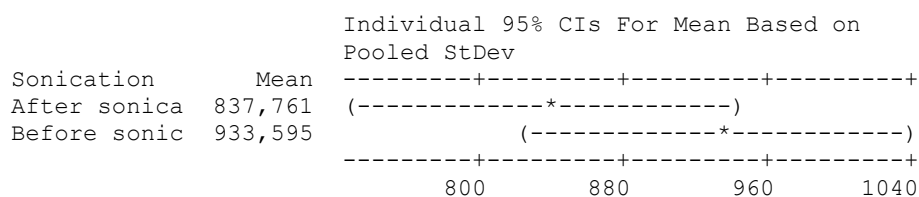
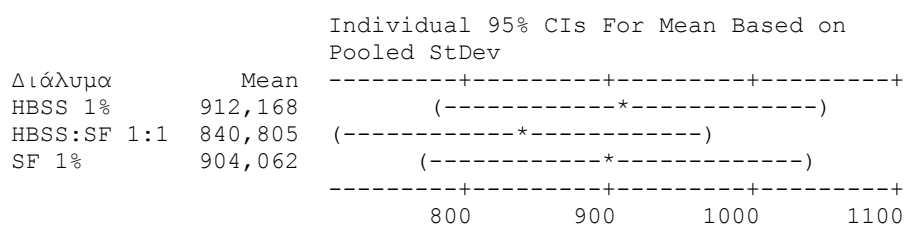
H<sub>0</sub>: οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

H<sub>A</sub>: οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους για το συγκεκριμένο παράγοντα

### Two-way ANOVA: Μέγεθος (μm) versus Διάλυμα; Sonication

Source	DF	SS	MS	F	P
Διάλυμα	2	54959	27479	0,35	0,708
Sonication	1	123987	123987	1,57	0,216
Interaction	2	1779566	889783	11,27	0,000
Error	48	3789202	78942		
Total	53	5747714			

S = 281,0 R-Sq = 34,07% R-Sq(adj) = 27,21%



### General Linear Model: Μέγεθος (μm) versus Διάλυμα; Sonication

Factor	Type	Levels	Values
Διάλυμα	fixed	3	HBSS 1%; HBSS:SF 1:1; SF 1%
Sonication	fixed	2	After sonication; Before sonication

Analysis of Variance for Μέγεθος (μm), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Διάλυμα	2	54959	54959	27479	0,35	0,708
Sonication	1	123987	123987	123987	1,57	0,216
Διάλυμα*Sonication	2	1779566	1779566	889783	11,27	0,000
Error	48	3789202	3789202	78942		
Total	53	5747714				

S = 280,966 R-Sq = 34,07% R-Sq(adj) = 27,21%

Unusual Observations for Μέγεθος (μm)

Obs	Μέγεθος (μm)	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
52	227,52	897,06	93,66	-669,54	-2,53 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Από τον έλεγχο Two-way ANOVA, που πραγματοποιήθηκε στην μεταβλητή μεγέθους, φαίνεται πως για τον παράγοντα του διαλύματος ( $p = 0,708$ ) και για τον παράγοντα της χρήσης υπερήχων (Sonication) ( $p = 0,216$ ) ισχύει η μηδενική υπόθεση  $H_0$ , ενώ για τον όρο της αλληλεπίδρασης ( $p < 0,001$ ) ισχύει η εναλλακτική υπόθεση  $H_A$ . Πιο συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντικός είναι μόνο ο όρος της αλληλεπίδρασης.