



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

**Η ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΦΙΒΡΟΪΝΗΣ ΜΕ
ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΓΛΥΚΟΜΑΝΝΑΝΗΣ**

Βακάλη Μαλαματή

Λοΐζου Χρίστος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

**Η ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΦΙΒΡΟΪΝΗΣ ΜΕ
ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΓΛΥΚΟΜΑΝΝΑΝΗΣ**

Βακάλη Μαλαματή

Λοΐζου Χρίστος

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

ΙΟΥΝΙΟΣ 2013

ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΒΑΣΙΛΗΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στον καθηγητή της σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων, Καραγεωργίου Βασίλη για τις πολύτιμες συμβουλές του και στην καθοδήγηση που μας προσέφερε σε όλη την διάρκεια της έρευνας και συγγραφής αυτής της πτυχιακής εργασίας, καθώς και στον καθηγητή, Ραφαηλίδη Στυλιανό για τη βοήθεια του στην διεκπεραίωση της εργασίας.

Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον καθηγητή Ριτζούλη Χρήστο και τον υποψήφιο διδάκτορα Εξαρχόπουλο Στέλιο για τις συμβουλές τους κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους της πτυχιακής εργασίας.

Η ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΦΙΒΡΟΪΝΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΓΛΥΚΟΜΑΝΝΑΝΗΣ

Βακάλη Μαλαματή

Λοΐζου Χρίστος

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα

Τεχνολογίας Τροφίμων, 54101 Θεσσαλονίκη, Τ.Θ. 14561

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φιβροΐνη είναι ένα φυσικό βιοπολυμερές που πηγάζει από τα αρθρώποδα, με εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες οι οποίες τις προσδίδουν σημαντικά χαρακτηριστικά όπως σκληρότητα, βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδόμηση. Η γλυκομαννάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης με γνωστές ιδιότητες ζελατινοποίησης. Σε αυτή την έρευνα μελετήθηκαν οι ρεολογικές ιδιότητες μιγμάτων φιβροΐνης και γλυκομαννάνης σε διάφορες αναλογίες (0%, 25%, 50%, 75% και 100%), σε θερμοκρασία δωματίου και σε θερμοκρασία 4°C ως προς τον χρόνο και την συχνότητα. Η φιβροΐνη απομονωνώθηκε από κουκούλια *Bombyx mori* και το υδατικό διάλυμα της αναμείχθηκε με υδατικό διάλυμα γλυκομαννάνης στις διάφορες συγκεντρώσεις. Η μελέτη των ρεολογικών παραμέτρων έγινε με ρεόμετρο στους 25°C και 4 °C με δυναμικές δοκιμές ελεγχόμενης παραμόρφωσης. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η φιβροΐνη δημιουργεί πιο συνεκτικά συστήματα από τη γλυκομαννάνη τα οποία κατά τη γήρανση εξελίσσονται σε πηκτές. Αντιθέτως, η γλυκομαννάνη διατηρεί τη συμπεριφορά του υγρού του οποίου η δομή χαλαρώνει κατά τη γήρανση ενώ η ανάμειξη των δύο βιοπολυμερών έχει αρνητική συνέργεια δηλ. η συνεκτικότητα του συστήματος που προκύπτει είναι χαμηλότερη εκείνης του συστήματος της φιβροΐνης και αυξάνει ως ένα βαθμό τη συνεκτικότητα του συστήματος της γλυκομαννάνης. Τέλος, οι δεσμοί των συστημάτων και των δύο βιοπολυμερών φαίνεται να είναι ενθάλπικής φύσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| 1. Υδροπηκτές | 4 |
| 1.1 Εισαγωγή | 4 |
| 1.2 Ταξινόμηση υδροπηκτών | 4 |
| 2. Γλυκομαννάνη | 7 |
| 2.1 Προέλευση | 7 |
| 2.2 Δομή γλυκομαννάνης | 8 |
| 2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες | 8 |
| 3. Μετάξι και φιβροΐνη | 11 |
| 3.1 Γενικά | 11 |
| 3.2 Δομή φιβροΐνης | 12 |
| 3.3 Χαρακτηριστικά μεταξιού | 15 |
| 3.4 Χρήσεις των υλικών μεταξιού | 16 |
| 3.5 Μηχανισμός πήξης της φιβροΐνης | 18 |
| 4. Ρεολογία | 20 |
| 4.1 Εισαγωγή | 20 |
| 4.2 Βασικές έννοιες ρεολογίας | 20 |
| 4.3 Ρεολογία και τρόφιμα | 21 |
| 4.4 Νευτονικά- Μη Νευτονικά υγρά | 22 |
| 4.5 Μικρές Δοκιμές Τάσης– Παλμογραφικές Δοκιμές | 23 |
| 5. Σκοπός | 25 |
| 6. Πειραματικό μέρος | 25 |
| 6.1 Υλικά και όργανα | 25 |
| 6.1.1 Κουκούλια από μεταξοσκώληκα του γένους <i>Bombyx mori</i> | 25 |
| 6.2.2 Παρασκευή πολυσακχαρίτη γλυκομαννάνης | 27 |
| 6.1.3 Χσκευή και υλικά | 26 |
| 6.1.4 Όργανα | 26 |
| 6.2 Μέθοδοι | 27 |
| 6.2.1 Παραλαβή φιβροΐνης απο κουκούλια <i>B.mori</i> | 27 |
| 6.2.2 Παρασκευή πολυσακχαρίτη γλυκομαννάνης | 27 |
| 6.2.3 Παρασκευή διαλύματος γλυκομαννάνης (4%) | 28 |

| | |
|--|----|
| 6.2.4 Παρασκευή διαλύματος φιβροΐνης (1,5%) | 28 |
| 6.2.5 Παρασκευή μιγμάτων φιβροΐνης (1.5%) σε γλυκομαννάνη (4%) | 28 |
| 6.2.6 Μέτρηση ρεολογικών ιδιοτήτων | 28 |
| 7. Αποτελέσματα | 29 |
| 8. Συμπεράσματα | 47 |
| 9. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα | 48 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 49 |

1. Υδροπηκτές

1.1 Εισαγωγή

Πολλά δημοφιλή τρόφιμα μπορούν να θεωρηθούν ως πηκτώματα, όπως τα λουκάνικα, οι ζελέδες φρούτων, μαγειρεμένα ασπράδια αυγών και πολλά άλλα. Ένα πηκτώμα είναι ένα κολλοειδές στο οποίο η στερεά φάση σχηματίζει μια δομή δικτύου που ακινητοποιεί το υγρό. Η αρχική κατάσταση μπορεί να είναι ένα διάλυμα, μια διασπορά, ή ένα εναιώρημα. Ορισμένα τρόφιμα μετατρέπονται σε πηκτώματα μη αντιστρεπτά με το μαγείρεμα, ενώ άλλα, έχουν αναστρέψιμη μορφή. Πηκτή μπορεί να προκύψει είτε από χημική σύνδεση μέσω των ομοιοπολικών αντιδράσεων ή από φυσικές διασυνδέσεις μεταξύ του πολυμερούς. Οι μακρομοριακές ουσίες όπως οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό δικτύου σε τρόφιμα, και συνήθως προκύπτουν υλικά με υψηλό βαθμό ελαστικότητας. Κατά την επεξεργασία, παραγωγή και κατανάλωση τροφίμων, αυτά τα ζελατινοποιημένα συστήματα υποβάλλονται σε μεγάλες παραμορφώσεις και μπορεί να υποστούν υποβάθμιση. Οι υδροπηκτές, οι οποίες είναι κυρίως ρευστές, έχουν την αξιοσημείωτη ικανότητα να συμπεριφέρονται σαν ένα στερεό ενώ διατηρούν πολλά χαρακτηριστικά υγρής συμπεριφοράς. Για να αξιολογηθούν οι ρεολογικές ιδιότητες των πηκτών πολλοί παράγοντες που αφορούν τη σύνθεση και τις πειραματικές συνθήκες πρέπει να ληφθούν υπόψη. Όσο αφορά τη σύνθεση, οι ρεολογικές ιδιότητες εξαρτώνται από την θερμοδυναμική και την δομική συμβατότητα μεταξύ των δύο μακρομορίων, όπως σε μίγμα πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη. Σχετικά με τις πειραματικές συνθήκες, αυτό που ενδιαφέρει είναι ο τρόπος παραγωγής του μίγματος, δηλαδή αν είναι με ανάμιξη ή με έγχυση της μιας φάσης στην άλλη (Barbosa-Canovas *et al.*, 2006).

1.2 Ταξινόμηση υδροπηκτών

Τα πηκτώματα βιοπολυμερούς μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το επίπεδο της διάταξης του μακρομορίου, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια του σχηματισμού δικτύου σε δυο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει πηκτές που σχηματίζονται από ατακτικά βιοπολυμερή, όπως καραγεννάνη, πηκτίνες, άμυλο, ζελατίνη ενώ η δεύτερη αναφέρεται σε δίκτυα πηκτών που αφορούν συγκεκριμένες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυκνότερων και λιγότερο ευέλικτων σωματιδίων, όπως οι θερμικά μετουσιωμένες σφαιρικές πρωτεΐνες και οι κροκιδωμένες πρωτεΐνες από ενζυμική ή χημική υδρόλυση (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2005).

Υδρογέλες είναι μια μοναδική κατηγορία μακρομοριακών δικτύων τα οποία μπορεί να περιέχουν μεγάλο κλάσμα του υδατικού διαλύτη μέσα στη δομή τους. Είναι ιδιαίτερα κατάλληλες για τη βιοϊατρική και έχουν πολλές εφαρμογές στη μηχανική ιστών. Μεταξύ άλλων, γνωστές υδροπηκτές είναι η πολυαιθύλενογλυκολη (PEG), η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), και διάφορα πολυακρυλικά (για παράδειγμα πολυμεθακρυλικό 2-υδροξυαιθύλιο) (PHEMA), λόγω της ικανότητά τους να προσομοιάσουν βιολογικούς ιστούς. Η υδροφιλικότητα του δικτύου οφείλεται στην παρουσία χημικών ομάδων, όπως υδροξυλίων (-OH), καρβοξυλίων (-COOH), αμιδικών ομάδων (-CONH-), σουλφονικών ομάδων (-SO₃H), και άλλων που μπορεί να βρίσκονται εντός του πολυμερούς στη σπονδυλική στήλη ή σε πλευρικές αλυσίδες. Παρόλα αυτά είναι δυνατόν να παραχθούν υδρογέλες που περιέχουν ένα σημαντικό υδρόφοβο τμήμα που προκύπτει από τον συμπολυμερισμό υδρόφιλων και υδρόφοβων πολυμερών. Η αναλογία υδρόφιλου- υδρόφοβου τμήματος, ο βαθμός της εγκάρσιας σύνδεσης, ειδικότερα ο βαθμός ιονισμού και η αλληλεπίδρασή της με τα αντίθετα ιόντα είναι οι σημαντικότερες παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν το σχηματισμό πήγματος. Ως εκ τούτου, η μαθηματική μοντελοποίηση της υδρογέλης και η προβλεψιμότητα της συμπεριφοράς κατά τη διόγκωση έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας. Οι πιο σημαντικές παράμετροι που καθορίζουν τη δομή και τις ιδιότητες των υδρογελών είναι το κλάσμα όγκου του πολυμερούς στη διογκωμένη κατάσταση ($v_{2,s}$), το μοριακό βάρος της πλευρικής αλυσίδας (M_c), και η απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών δεσμών (ξ). Οι υδρογέλες έχουν την ικανότητα να διογκώνονται όταν έρθουν σε επαφή με έναν θερμοδυναμικά συμβατό διαλύτη (Fariba *et al.*, 2010).

Οι υδροπηκτές ή υδρογέλες είναι τρισδιάστατα, κολλοειδή, υδρόφιλα πλέγματα πολυμερών ικανά να συγκρατήσουν (απορροφήσουν) μεγάλες ποσότητες νερού ή βιολογικών υγρών. Σχηματίζονται από υδρόφιλα ομοπολυμερή, συμπολυμερή, ή μακρομερή (προσχηματισμένες μακρομοριακές αλυσίδες) και σταυροειδείς

δεσμούς που σχηματίζουν ένα αδιάλυτο πολυμερές. Αυτά τα πολυμερή είναι συνήθως μαλακά και ελαστικά λόγω της θερμοδυναμικής συμβατότητάς τους με το νερό. Οι υδροπηκτές παρουσιάζουν θερμοδυναμική συμβατότητα με το νερό που τους επιτρέπει να διογκώνονται σε ένα υδατικό μέσο και μπορούν να συγκρατούν νερό από 10-20% μέχρι πάνω από χιλιάδες φορές του ξηρού βάρους τους (Sah & Pramanik, 2011). Βιολογικές υδροπηκτές σχηματίζονται από αγαρόζη, αλγινικό, χιτοζάνη, υαλουρονάνη, ινώδες, και κολλαγόνο, καθώς και πολλά άλλα. Σε γενικές γραμμές, η δομή των υδροπηκτών διαμορφώνεται από ισχυρούς χημικούς δεσμούς (όπως ομοιοπολικούς και ιοντικούς δεσμούς), μόνιμες ή προσωρινές εμπλοκές, μικροκρυσταλλικές δομές και από ασθενείς αλληλεπιδράσεις. Υδροπήγματα παρασκευάζονται και με μια διαδικασία ψύξης-απόψυξης όπου το μη διασυνδεδεμένο πολυμερές καταψύχεται επανειλημμένα και αποψύχεται σε κύκλους για να σχηματιστεί ένα διασυνδεδεμένο δίκτυο. Η τελική μορφολογία του δικτύου μιας υδρογέλης μπορεί να είναι άμορφη, ημι-κρυσταλλική, υπερμοριακή, ή να αποτελείται από υδροκολλοειδή αδρανών υλικών. Οι αλυσίδες που συναποτελούν το δίκτυο μπορεί να βασίζονται σε φυσικούς, συνθετικούς ή υβριδικούς συνδιασμούς. Από ιοντική άποψη, μπορεί να είναι ουδέτερες, κατιονικές, ανιονικές, ή αμφολυτικές και αυτό εξαρτάται από τις ομάδες που ενσωματώνονται στο δίκτυο (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2005).

Σύμφωνα με τον ορισμό του Hoffman η υδροπηκτική είναι η χημική πηκτή που σταθεροποιείται με ομοιοπολικά διασυνδεδεμένα δίκτυα. Αυτές οι χημικές υδροπηκτές μπορούν να παρασκευαστούν είτε με διασύνδεση από υδατοδιαλυτά πολυμερή ή μετατρέποντας υδρόφοβα πολυμερή σε υδρόφιλα πολυμερή τα οποία έχουν σταυροειδείς δεσμούς για να σχηματίσουν ένα δίκτυο. Με μια τέτοια δομή, οι υδροπηκτές είναι σε θέση να διογκώνονται, απορροφώντας μία μεγάλη ποσότητα νερού χωρίς τη διάλυση του πολυμερούς, πράγμα που τους δίνει χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των μαλακών ιστών (Gibas & Janik, 2010).

2. Γλυκομαννάνη

2.1 Προέλευση

Το σαλέπι είναι σκόνη από αλεσμένες ξηρές ρίζες ορχιδέας του γένους *Orchis morio* var. *mascula*. Το παρασκεύασμα που προκύπτει από την ανάμιξη με καυτό νερό ή γάλα ονομάζεται και αυτό σαλέπι και πρόκειται για ένα πηκτό αφέψημα. Πολλές παραλλαγές αυτού είναι γνωστές και καταναλώνονται στη Νότιο-Ανατολική Ευρώπη και στη Μέση Ανατολή. Το σαλέπι ήταν πολύ δημοφιλές και στη δυτική Ευρώπη πριν την άφιξη του καφέ και του τσαγιού. Χρησιμοποιείται και για την παραγωγή ντοντουρμά ως πηκτικό μέσο. Ο κύριος πολυσακχαρίτης του σαλεπιού είναι η γλυκομαννάνη (GM) (Georgiadis *et al.*, 2012).

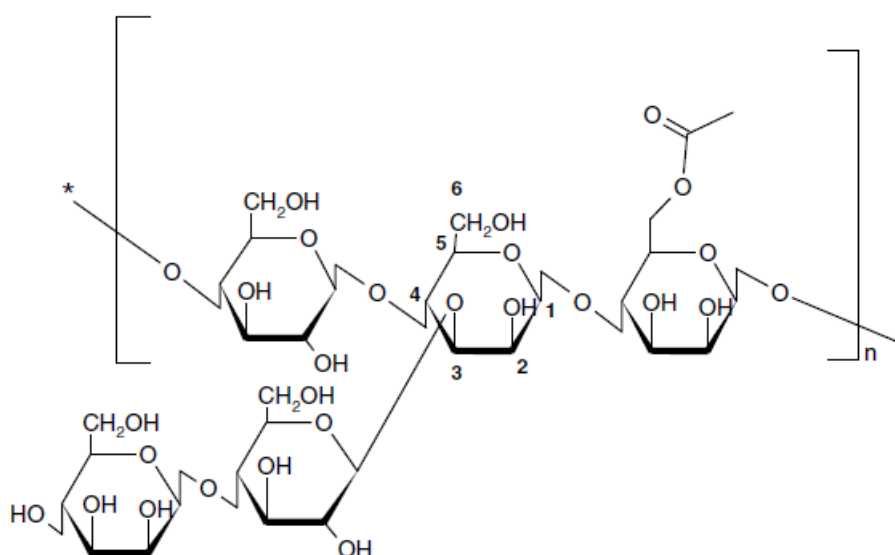
Οι ιδιότητες του σαλεπιού ποικίλουν και εξαρτώνται κυρίως από την περιεκτικότητα σε γλυκομαννάνη. Ανάλογα με τα είδη σαλεπιού ποικίλει και η περιεκτικότητα και πιο συγκεκριμένα μπορεί να περιέχει 7-61% γλυκομαννάνη, 1-36% άμυλο, 0,5-1% αζωτούχες ενώσεις, 0,2-6% ανόργανα συστατικά και 6-12% υγρασία. Από τεχνολογική άποψη το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του σαλεπιού είναι το χαρακτηριστικό ιξώδες στο οποίο βασίζεται και η προσθήκη του στο παραδοσιακό αφέψημα και στο παγωτό. Μελέτες σε υδατικά διαλύματα ζάχαρης με προσθήκη σαλεπιού έδειξαν τη μετατροπή από Νευτώνεια σε μη- Νευτώνεια ρευστά και μια ισχυρή εξάρτηση του ιξώδους από τη θερμοκρασία. Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα ισχύουσες μελέτες για την εκχύλιση υδροκολλοειδών από ρίζες ορχιδέας, χρησιμοποιείται μια σειρά από ρυθμιστικά διαλύματα και τα εκχυλίσματα κατηγοριοποιούνται με βάση το μοριακό βάρος.

Η γλυκομαννάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης της οικογένειας μαννάνη που βρίσκεται άφθονο στη φύση, ιδιαίτερα στα μαλακά ξύλα (ημικυτταρίνη), στις ρίζες και στους βολβούς των φυτών. Παρά την ποικιλία παραλαβής η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η γλυκομαννάνη *konjac* η οποία εξάγεται από κονδύλους της *Amorphophallus konjac*. Ανεξάρτητα όμως από την προέλευση, η γλυκομαννάνη αποτελείται από β, 1-4 δεσμό μαννόζης- D-γλυκόζης και το μόνο που αλλάζει είναι η αναλογία μαννόζης/γλυκόζης που ποικίλει ανάλογα με την πηγή. Για

παράδειγμα η κοπjak γλυκομαννάνη έχει αναλογία 1,6:1 μαννόζη /γλυκόζη ενώ η γλυκομαννάνη που εκχυλίζεται από πεύκο ή ρίζες ορχιδέας έχει αναλογία 2,1:1 και 3,6:1 αντίστοιχα (Teijeiro-Osorio *et al.*, 2009).

2.2 Δομή γλυκομαννάνης

Ο πολυσακχαρίτης αυτός αποτελείται από τη D- γλυκοπυρανοσύλη και τη D-μαννοπυρανοσύλη σε αναλογία 1: 3,3 που συνδέονται μεταξύ τους με β(1-4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η γλυκομαννάνη εμφανίζει κάποιο σημείο διακλάδωσης, πιθανώς μέσω β-(1 → 6) γλυκοζιτικών δεσμών και εκεί βρίσκονται επίσης περιοδικά ακετυλομάδες κατά μήκος της αλυσίδας (σχήμα 1) (Georgiadis *et al.*, 2012).



Σχήμα 1. Χημικός τύπος γλυκομαννάνης (Teijeiro-Osorio *et al.*, 2009).

2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

2.3.1 Διαλυτότητα

Παρόλο που η γλυκομαννάνη είναι υδρόφιλο μόριο η διαλυτότητά της στο νερό μειώνεται λόγω σχηματισμού ισχυρών δεσμών υδρογόνου μετά τη διαδικασία της έκπλυσης και της ξήρανσης. Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που

επηρεάζουν τη διαλυτότητα είναι ο βαθμός ακετυλίωσης. Ειδικότερα η παρουσία ακετυλομάδων βελτιώνει τη διαλυτότητα καθώς αναστέλλουν το σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου.

2.3.2 Μοριακό βάρος

Το μοριακό βάρος έχει προσδιοριστεί με σκέδαση, ιξωδόμετρα και με χρωματογράφους διείσδυσης πηκτής (GPC). Ένα από τα κύρια προβλήματα προσδιορισμού του μοριακού βάρους ήταν η περιορισμένη διαλυτότητά της στο νερό. Στην πραγματικότητα στις μελέτες που έγιναν η γλυκομαννάνη τροποποιήθηκε χημικά για να αυξηθεί η διαλυτότητά της στο νερό ή σε άλλους διαλύτες στους 25 °C. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη γλυκομαννάνη έχει μοριακό βάρος από $1,9 \times 10^6 - 1 \times 10^4$.

Είναι γνωστό ότι ορισμένα ένζυμα μπορούν να μετατρέψουν τους πολυσακχαρίτες σε ολιγοσακχαρίτες. Η πλήρης αποικοδόμηση της γλυκομαννάνης απαιτεί τη δράση της β-μαννανάσης, β-μαννοσιδάσης και β-γλυκοσιδάσης. Η β-μαννανάση έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την υποβάθμιση του πολυσακχαρίτη διότι καταλύει τυχαία τη διάσπαση των β-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών. Η κατανομή αυτών των δεσμών στη γλυκομαννάνη οδηγεί σε μόρια μαννοβιόζης και μανοτριόζης. Η ικανότητα των β-μαννανάσης να υποβαθμίσει τη ραχοκοκαλιά γλυκομαννάνης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως ο αριθμός και η κατανομή των υποκαταστατών επί του σκελετού και η αναλογία της γλυκόζης προς μαννόζη. Αυτό το ένζυμο είναι βακτηριδιακής προέλευσης (*Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Penicillium* sp., *Pseudomonas* sp. και *Vibrio* sp.) ή μυκητιακής (*Streptomyces* sp., *Tyromices* sp., *Trichosporum* sp., *Sclerotium* sp. και *Aspergillus* sp.), βρίσκεται επίσης σε φυτά, σε ζώα, και στην περιοχή του παχέος εντέρου των ανθρώπων. Το ένζυμο β-μαννοσιδάσης οδηγεί στην μετατροπή της γλυκομαννάνης σε D-μαννόζη. Όπως στην περίπτωση της μαννανάσης, αυτό το ένζυμο είναι παρόν σε πολλούς μικροοργανισμούς, φυτά και ζωικούς ιστούς. Τέλος, η αποικοδόμηση από β-γλυκοσιδάση συμβαίνει μόνο στο τερματικό άκρο της μονάδας γλυκόζης σχηματίζοντας μαννόζη.

2.3.3 Βιοφαρμακευτικές εφαρμογές

Η γλυκομαννάνη ως βιοδραστικό πολυμερές, παρόλο που δε θεωρείται αυτόνομο ως φάρμακο, συμβάλλει ως βιοενεργό (έχει βρεθεί ότι μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μετά τη στοματική χορήγηση σε αρουραίους). Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι η γλυκομαννάνη δρα ως αναστολέας στην ανάπτυξη στερεών όγκων όπως σαρκώματος. Έχει ακόμη εφαρμογές στη φαρμακευτική ως φαρμακευτικό έκδοχο σε δισκία, μεμβράνες και υδρογέλες εξαιτίας της πηκτικής ικανότητας (Teijeiro-Osorio *et al.*, 2009).

2.3.4 Ιδιότητες ζελατινοποίησης

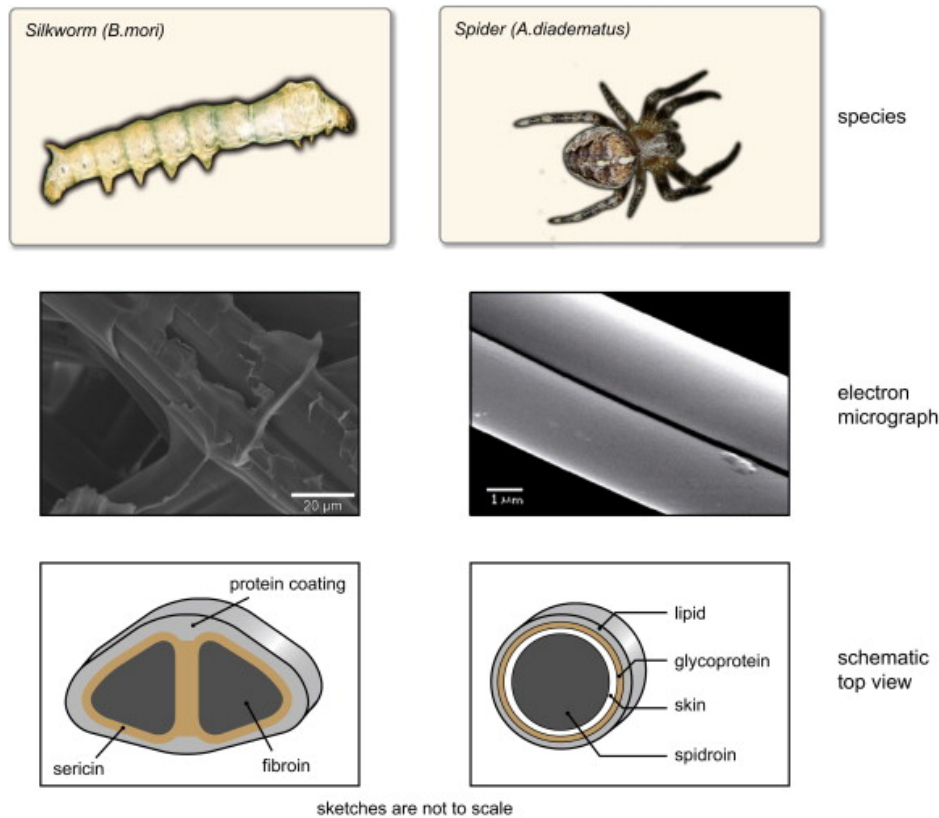
Η γνώση του μηχανισμού πήξης της γλυκομαννάνης καθώς και οι παράγοντες που την επηρεάζουν είναι χρήσιμοι στην κατανόηση του μηχανισμού του σχηματισμού πηκτής. Υπάρχει ένας αριθμός παραμέτρων που επηρεάζουν την πηκτωματοποίηση της γλυκομαννάνης και, ως εκ τούτου, τις ιδιότητες της τελικής δομής της πηκτής. Αυτές οι παράμετροι είναι ο βαθμός ακετυλίωσης της γλυκομαννάνης, το μοριακό της βάρος, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση τόσο της γλυκομαννάνης όσο και του αλκάλειου που εμπλέκονται στη διαδικασία της πήξης. Πηκτή γλυκομαννάνης μπορεί να παρασκευαστεί με θέρμανση διαλύματος γλυκομαννάνης παρουσία αλκαλικών ενώσεων ή παρουσία υψηλών ποσοτήτων ουδέτερου άλατος. Η διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο σχηματισμό πηκτής οφείλεται στην αλληλεπίδραση της όξινης περιοχής της γλυκομαννάνης με αλκάλια. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί διαρθρωτικές αλλαγές στα μόρια της γλυκομαννάνης και έτσι διευκολύνονται η δημιουργία δεσμών υδρογόνου καθώς και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων της γλυκομαννάνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό πηκτής. Οι δεσμοί υδρογόνου, είναι οι κυρίως υπεύθυνοι για το σχηματισμό πηγματος. Όμως φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία λόγω αύξησης της ακετυλίωσης. Επιπλέον, όταν αυξάνεται το pH, οι ανιονικές ομάδες που προκύπτουν μπορούν να αλλάξουν τη συμπεριφορά του ύδατος εντός του δικτύου, τροποποιώντας τις τελικές ιδιότητες των πηκτών γλυκομαννάνης. Συγκεκριμένα, οι Herranz *et al.*, ανέφεραν ότι οι διαφορές μεταξύ των

ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που προκύπτουν από τον τύπο και τη συγκέντρωση των αλκαλίων και από αλληλεπιδράσεις ιόντος-διπόλου μεταξύ αλκανίων και υδροξυλομάδων των αλυσίδων γλυκομαννάνης, και με τα μόρια του νερού, επηρεάζουν τις μηχανικές και ιξωδοελαστικές ιδιότητες των πηκτών GM. Τα αποτελέσματα από τη έρευνα των Solo-de-Zalvidar *et al.*, (2013) έδειξαν ότι σε pH (~ 9.2) τα δείγματα με συγκέντρωση 5% ήταν λιγότερο ελαστικά (υψηλό $\tan\delta$) και για λιγότερο χρόνο σταθερά (υψηλή τιμή δείκτη χαλάρωσης), ενώ ήταν πολύ πιο ευέλικτα (υψηλό πλάτος τάσης (γ_{\max})) και περισσότερο εξαρτώμενα από τη συχνότητα από ότι τα δείγματα με την χαμηλότερη συγκέντρωση γλυκομαννάνης (3%). Αντίθετα, σε υψηλότερο pH (~ 10,7) η συγκέντρωση της γλυκομαννάνης έδειξε να μην επηρεάζει της γέλες που σχηματίστηκαν, με μικρή εξάρτηση από τη συχνότητα και με παρόμοια ευελιξία (γ_{\max})(Herranz *et al.*, 2012).

3. Μετάξι και φιβροΐνη

3.1 Γενικά

Τα βιοπολυμερή όπως τα πολυαμινοξέα, τα πολυνουκλεϊνικά οξέα και οι πολυφαινόλες έχουν εξελιχθεί με το πέρασμα των χρόνων και εξαιτίας των τρισδιάστατων δομών τους έχουν αποκτήσει εξειδικευμένες ιδιότητες (Hardy *et al.*, 2008). Το μετάξι – που δεν είναι κάτι άλλο από μια φυσική πρωτεΐνη που αποτελείται από πολυαμινοξέα– πηγάζει από τα αρθρόποδα, όπως είναι οι μεταξοσκώληκες, οι αράχνες, οι σκορπιοί, τα ακάρεα και οι μέλισσες. Το μετάξι από μεταξοσκώληκες χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία των υφασμάτων. Περίπου 1000 τόνοι μεταξιού παράγονται και επεξεργάζονται ετησίως. Η κάθαρση των ινών μεταξιού αποτελεί μια εύκολη διαδικασία και απαιτεί την χρήση μίας βάσης ή ενός ενζύμου για την απομάκρυνση της σερικίνης (Kundu *et al.*, 2013). Έχει εξαιρετική οπτική διαφάνεια στο ορατό πεδίο και μεγάλη επιφανειακή ομαλότητα που επιτρέπει την χρήση του σε οπτικούς και φωτονικούς βιοαισθητήρες (Tao *et al.*, 2012).



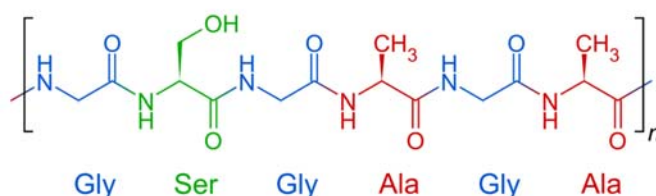
Σχήμα 2. Παραδείγματα ινών μεταξιού που παράγονται από μεταξοσκώληκες και αράχνες. Hardy *et al.*, 2008.

3.2 Δομή φιβροΐνης

Η παραγωγή φιβροΐνης λαμβάνει χώρα στους αδένες των αρθρόποδων (Kund *et al.*, 2013). Η μετατροπή των πρωτεϊνών του μεταξιού σε ίνες πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης των αρθρόποδων. Στο μεταξοσκώληκα, πριν την δημιουργία των ινών ένα διάλυμα τριών πρωτεϊνών εκκρίνεται από δυο αδένες του. Αυτές δημιουργούν δυο νήματα τα οποία εξέρχονται από το κεφάλι του και στεγνώνουν με την βοήθεια του αέρα. Ένα δεύτερο ζευγάρι αδένων εκκρίνει τις κολλοειδείς σερικίνες οι οποίες καλύπτουν τα νήματα φιβροΐνης και διασφαλίζουν την συνοχή του κουκουλιού (Nirmala *et al.*, 2005). Η φιβροΐνη που παράγεται από το είδος *Bombyx mori* είναι καλύτερης και σταθερότερης ποιότητας (Kundu *et al.*, 2013).

Η φιβροΐνη των *Bombyx mori* (*B. mori*) αποτελείται από 3 πρωτεϊνικά συστατικά, τα οποία είναι μία βαριά αλυσίδα [heavy-chain (HC) fibroin = 390 kDa] (Zhou *et al.*,

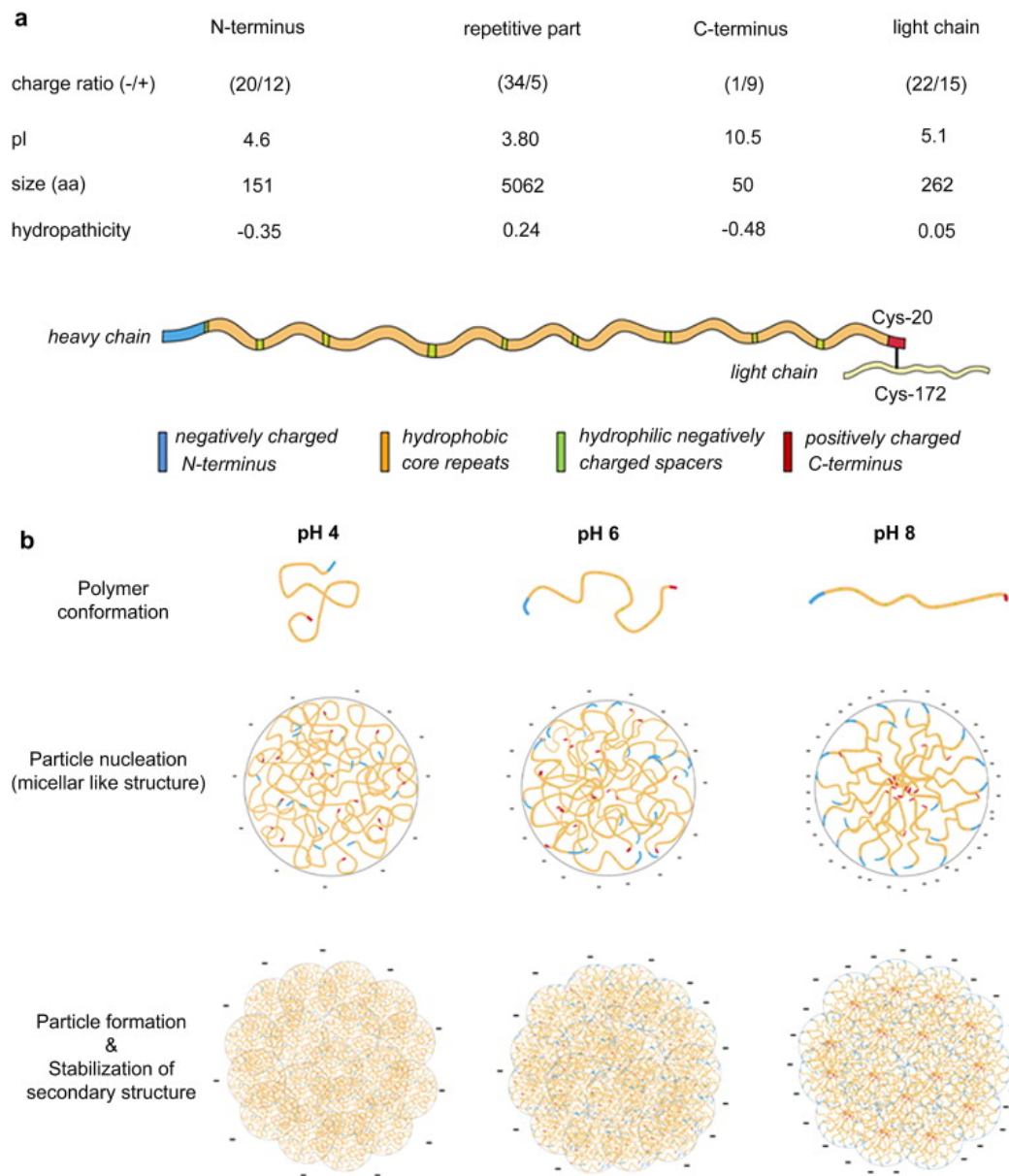
2000) και μια ελαφριά [light-chain (LC) fibroin = 26 kDa] (Yamaguchi *et al.*, 1989) ενωμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό και ενωμένες με μή-ομοιοπολικούς δεσμούς με μια γλυκοπρωτεΐνη, ονομαζόμενη P25 (Chevillard *et al.*, 1986). Οι μοριακές αναλογίες της HC φιβροΐνης της LC φιβροΐνης και της P25 στο μετάξι μουριάς είναι 6:6:1 (Zhou *et al.*, 2001). Σε αντίθεση, το μετάξι που προέρχεται από το είδος Saturniidae, δεν έχει τις LC και P25 και παρουσιάζει διαφοροποιήσεις στην HC και σαν αποτέλεσμα, παρουσιάζει διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες, βιοδραστικότητα και αποικοδόμηση (Rajkhowa *et al.*, 2000). Ο πρόσθιος αδένας του μεταξοσκώληκα είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτά τα τρία πολυπεπίδια. Η γονιδιακή αλληλουχία της φιβροΐνης του *Bombyx mori* αποτελείται από δυο εξόνια και ένα ιντρόνιο (Zhou *et al.*, 2000).



Σχήμα 3. Αλληλουχία αμινοξέων της βαριάς αλυσίδας της φιβροΐνης μεταξιού. Lancashire, 2012.

Η φιβροΐνη μεταξιού είναι κατά 95% κρυσταλλικής μορφής (Zhou *et al.*, 2000). Η βαριά υδρόφοβη αλυσίδα αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη σειρά αμινοξέων Gly-X (όπου X: ala, ser, thr, val) τα οποία σχηματίζουν μια αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια πλούσια σε νανοκρυστάλλους. Οι β-πτυχωτές επιφάνειες βρίσκονται παράλληλα με τον άξονα της ίνας, ο οποίος αποτελείται από νανοΐνες. Αυτές οι δομές είναι ενσωματωμένες στις μη κρυσταλλικές περιοχές (Chen *et al.*, 2002). Τα υδρόφοβα μέρη ενώνονται μεταξύ τους με υδρόφιλες, πολικές πλευρικές αλυσίδες σχηματίζοντας έτσι το άμορφο κομμάτι της δευτεροταγούς δομής. Η ελαστικότητα που παρουσιάζεται στο μετάξι οφείλεται σε αυτή την μη κρυσταλλική δομή (Vollrath *et al.*, 2001). Το δίκτυο των β-πτυχωτών επιφανειών παίζει σημαντικό ρόλο στην δύναμη και την ακαμψία του υλικού (Knowles *et al.*, 2007), ενώ οι μη κρυσταλλικές περιοχές οι οποίες επιτρέπουν πιο ευέλικτες διαπλάσεις συμβάλλουν στην ελαστικότητα (Dong *et al.*, 1991). Η ελαφριά αλυσίδα είναι

υδρόφιλη και σχετικά ελαστική, ενώ η παρουσία της πρωτεΐνης P25 πιστεύεται ότι συμβάλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του συμπλόκου (Sehnal *et al.*, 2004).



Σχήμα 4. Χαρακτηριστικά φιβροΐνης μεταξιού και σχηματισμός σωματιδίων.

α) Χαρακτηριστικά φιβροΐνης με βάση την κατανομή φορτίου στην αλυσίδα των αμινοξέων

β) Πάνω: υποθετική διαμόρφωση της αλυσίδας αμινοξέων σε διάφορες τιμές pH

Μέση: δημιουργία μικκυλίων

Κάτω: συνένωση μικκυλίων σε περιβάλλον φωσφορικού καλίου, και δημιουργία της δευτεροταγούς δομής.

Lammel *et al.*, 2010.

3.3 Χαρακτηριστικά μεταξιού

Το ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μεταξιού που το καθιστούν πιο λειτουργικό σε σχέση με άλλα βιοϋλικά πρωτεϊνικής φύσεως είναι τα ακόλουθα:

- *Σκληρότητα και ολκιμότητα*

Το μετάξι είναι γνωστό για την δύναμη και την σκληρότητα του. Γι' αυτό το λόγο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανάπτυξη ικριωμάτων στην μηχανική ιστών. Οι ίνες μεταξιού λόγω της ευρείας επιλογής σε μηχανικές ιδιότητες παρουσιάζουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα στην ανάπτυξη βιοϋλικών. Σημαντική είναι η παρατήρηση πως παρά τις καλές μηχανικές ιδιότητες των ινών μεταξιού, τα υλικά που παράγονται από διάλυμα φιβροΐνης μεταξιού είναι αδύνατα και εύθραυστα (Rajkhowa *et al.*, 2011). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την πιθανότητα βελτίωσης της δύναμης τους μέσω αλλαγής της δομής κατά την επεξεργασία τους (Ha *et al.*, 2005).

- *Βιοσυμβατότητα*

Η μακρόχρονη χρήση του μεταξιού στα ράμματα έχει καταστήσει το μετάξι ως ένα σημαντικό βιοσυμβατό υλικό. Η ανοσογονικότητα και αντιγονικότητα του μεταξιού έχουν ευρέως μελετηθεί και κάποιες ανοσολογικές αποκρίσεις που οφείλονται στην προέλευση του έχουν καταγραφεί. Γενικά, μελέτες καταδεικνύουν ότι το μετάξι, όταν υποστεί κατάλληλη διαδικασία αποκομμίωσης και εξαγνισμού, μπορεί να γίνει κατάλληλα βιοσυμβατό (Kundu *et al.*, 2013).

- *Βιοαποικοδόμηση*

Το μετάξι έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα βιοϋλικά όσον αφορά την βιοαποικοδόμηση του. Για παράδειγμα, τα πολυγλυκονικά οξέα και πολυλακτικά οξέα τα οποία είναι εγκεκριμένα για χρήση ως βιοϋλικά, μεταβολίζονται σε όξινα παραπροϊόντα, κάτι που δεν συμβαίνει στην περίπτωση του μεταξιού. Η βιοαποικοδόμηση του μεταξιού εξαρτάται από την δευτεροταγή δομή του, γι αυτό και τα αναγεννημένα βιοϋλικά από φιβροΐνη μεταξιού βιοαποικοδομούνται γρηγορότερα από τις ίνες (Kundu *et al.*, 2013)..

- *Υδατοδιαλυτότητα*

Η φιβροΐνη μεταξιού είναι υδατοδιαλυτή όταν βρίσκεται στην μορφή α-έλικας. Ανάλογα με την θερμοκρασία φύλαξης, το pH και την συγκέντρωση του διαλύματος

μεταξιού, η διαλυτότητα αυτή μπορεί να διατηρηθεί για μέρες. Αυτή η ιδιότητα δίνει την δυνατότητα παρασκευής συστημάτων μεταξιού χρησιμοποιώντας απλές συνθήκες όπως διαλύματα νερού και θερμοκρασία δωματίου (Karageorgiou *et al.*, 2004).

- Δομική ευκαμψία

Η δομή του μεταξιού μπορεί να μεταβληθεί κατά την διάρκεια της κλώσης ή της αναγέννησης καθώς αλλάζει η δευτεροταγής δομή, με αποτέλεσμα να αλλάζουν οι ιδιότητες του υλικού όπως η βιοαποικοδόμηση και η αλληλεπίδραση με κύτταρα (Servoli *et al.*, 2005).

3.4 Χρήσεις των υλικών μεταξιού

- Υφαντουργία

Οι ίνες του *Bombyx mori* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή υφασμάτων αιώνες τώρα λόγω της χαρακτηριστικής τους στιλπνότητας και δύναμης και της ικανότητας απορρόφησης υγρασίας. Ο κορμός των πρωτεϊνών μεταξιού έχει μεγάλη ποικιλία κατάλοιπων ενεργών αμινοξέων και αυτό έχει δώσει τη δυνατότητα τροποποίησης των ιδιοτήτων του. Οι ιδιότητες του μεταξιού μπορούν ακόμη να βελτιωθούν με τη δημιουργία συμπολυμερών* για παράδειγμα οι ενώσεις φιβροΐνης-μεθυλμεθακρυλικού-μεθακρυλαμιδίου αυξάνουν το περιεχόμενο του μεταξιού σε υγρασία (Hardy *et al.*, 2008).

- Ράμματα

Εξαιτίας της δύναμης, της βιοσυμβατότητας και της μικρής ανοσογονικότητας του, οι ίνες μεταξιού χρησιμοποιούνται σαν ράμματα για τραύματα (ράμματα για μάτια, χείλη, στοματικές και δερματικές πληγές), αφού με σωστή επεξεργασία καθίστανται μη τοξικές και δεν επιφέρουν ανοσολογικές αντιδράσεις (Garcia-Fuentes *et al.*, 2009 / Hardy *et al.*, 2008).

- Ικρίωματα ιστών

Πολυμερή υλικά με βάση το μετάξι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ικρίωματα ιστών λόγω της βιοσυμβατότητας και της υψηλά ρυθμιζόμενης μορφολογίας τους. Οι ίνες μεταξιού που έχουν μετατραπεί σε νήματα και ακολούθως έχουν υφανθεί

μέσω μόνιμης παραμόρφωσης μπορεί να είναι χρήσιμες στη δημιουργία μοσχευμάτων ιστών (Hogan *et al.*, 2006). Υδροπηκτές φιβροΐνης από *Bombyx mori* έχουν χρησιμοποιηθεί για την *in vitro* ανάπτυξη ανθρώπινων μεσεγχυματικών αρχέγονων κυττάρων (hMSC). Τα κύτταρα κατάφεραν να αναπτυχθούν, να πολλαπλασιαστούν και να επιβιώσουν για πολλές βδομάδες σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας (Hardy *et al.*, 2008). Ακόμη, υδροπηκτές φιβροΐνης έχουν χρησιμοποιηθεί ως ικρίωματα για ανάπτυξη οστικού ιστού, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, σε λαγούς χωρίς την εμφάνιση φλεγμονής (Hardy *et al.*, 2008). Οι Jin *et al.*, (2004) έδειξαν ότι είναι δυνατή η κατασκευή τεχνητών αγγείων αίματος μετά από επικάλυψη ατσάλινων συρμάτων με πορώδες φιλμ φιβροΐνης από *Bombyx mori*.

- Βιοσυμβατές επικαλύψεις

Η βιοσυμβατότητα και η έλλειψη ανοσογονικής απόκρισης από τις πρωτεΐνες του μεταξιού επιτρέπουν την εφαρμογή τους ως υλικά επικάλυψης σε βιοϊατρικά εμφυτεύματα, πιθανώς ως αντιπηκτικά και ως αγωνιστές ή αναστολείς της προσκόλλησης κυττάρων. Η θείωση της υδατοδιαλυτής φιβροΐνης του *Bombyx mori* προσδίδει αντιπηκτικές ιδιότητες σε αυτήν και έτσι επιτρέπει την χρήση των ινών μεταξιού ως επικάλυψη σε εμφυτεύματα όπως είναι τα stent (Hardy *et al.*, 2008). Ταινίες από υδατικά διαλύματα φιβροΐνης, οι οποίες τροποποιήθηκαν χημικά με ένα σάκχαρο, επεξεργάστηκαν με υδατικό διάλυμα μεθανόλης για τον σχηματισμό της β-πτυχωτής, καταστρώντας έτσι τις ταινίες αδιάλυτες στο νερό. Αυτές οι ταινίες βρέθηκαν να έχουν οκτώ φορές μεγαλύτερο ποσοστό πρόσδεσης ηπατοκυττάρων σε σχέση με ταινίες μη τροποποιημένης φιβροΐνης (Gotoh *et al.*, 2004).

- Βιο-μεταλλοποίηση

Το υλικά από μετάξι έχουν χρησιμοποιηθεί σαν οργανικά ικρίωματα για την βιο-μεταλλοποίηση του υδροξυαπατίτη (μεταλλικό στοιχείο των οστών και των δοντιών) και του πυριτίου που υπάρχει στα διάτομα (είδος άλγης). Οι Kino *et al.*, (2006) έδειξαν ότι ταινίες φιβροΐνης που περιείχαν χλωρίδιο του ασβεστίου και επεξεργάστηκαν κατάλληλα για το σχηματισμό της β-πτυχωτής, βοήθησαν στη δημιουργία κρυστάλλων υδροξυαπατίτη μετά από επώαση με σωματικά υγρά.

- Φαρμακευτική

Οι πρωτεΐνες μεταξιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς φαρμάκων στο σώμα εξαιτίας της βιοσυμβατότητας και της εύκολα μετατρέψιμης μορφολογίας τους. Με την χρήση αφρού φιβροΐνης έχει επιτευχθεί ελεγχόμενη αποδέσμευση ασπιρίνης η οποία είχε εγκλωβιστεί στο ικρίωμα. In vitro μελέτες κινητικής έδειξαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό της ασπιρίνης απελευθερώνεται άμεσα τις πρώτες δύο ώρες και ακολούθως ο ρυθμός αποδέσμευσης σταθεροποιείται (Hardy *et al.*, 2008).

- Άλλες χρήσεις

Τα υλικά από πρωτεΐνες μεταξιού χρησιμοποιούνται σαν στερεά υποστρώματα για καταλύτες. Μέσω της δημιουργία λειτουργικών συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα, βρίσκουν εφαρμογή στην ακινητοποίηση καταλυτών. Οι καταλύτες συμπλόκου φιβροΐνης-μεταλλοφθαλοκυανίνης βρίσκουν χρήση στην εξαγνισμό του αέρα καθώς εξολοθρεύουν τις κακές οσμές του υδρόθειου και της θειόλης μεθανίου (Hardy *et al.*, 2008).

Τέλος, η φιβροΐνη μπορεί να επικαλυφθεί με κολλοειδή και νανοσωματίδια, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός υλικού με καινοτόμες ηλεκτρονικές, μαγνητικές και οπτικές ιδιότητες (Hardy *et al.*, 2008).

3.5 Μηχανισμός πήξης της φιβροΐνης

Η πήξη της φιβροΐνης μεταξιού είναι μια διαδικασία που συμβαίνει εξαιτίας της τάσης των αλυσίδων της να σχηματίσουν την πιο σταθερή β-πτυχωτή δομή μέσω κροκιδοποίησης (Moraes *et al.*, 2009). Η ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων βοηθά στην σταθεροποίηση της β-πτυχωτής δομής και την δημιουργία πηκτώματος (Liang & Hirabayash, 1992). Οι υδροπηκτές φιβροΐνης σχηματίζονται όταν σε υδατικά διαλύματα φιβροΐνης επιδράσουν οξέα, παράγοντες αφυδάτωσης, ιόντα ή λυοφιλοποίηση.

Η μετατροπή από διάλυμα σε πηκτή αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης, της θερμοκρασίας και με προσθήκη ιόντων ασβεστίου Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2004). Οι Matsumoto *et al.* μελέτησαν την μετατροπή διαλυμάτων φιβροΐνης μεταξιού σε

πηκτές, υπό την επίδραση διαφόρων φυσικοχημικών συνθηκών με τεχνική οπτικής φωτομετρίας στα 550 nm. Ακόμη, μελέτησαν την εμφάνιση β-πτυχωτής δομής υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις, θερμοκρασίες και pH με τεχνικές μετασχηματισμού Fourier υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR) και κυκλικού διχρωϊσμού (CD). Αυτόματη ζελατινοποίηση συμβαίνει σε διάστημα λίγων ωρών σε διαλύματα συγκέντρωσης >23% wt εξαιτίας των ενδο- και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών του διαλύματος, που οδηγούν σε σχηματισμό β-πτυχωτών δομών οι οποίες μειώνουν την διαλυτότητα της φιβροΐνης στο νερό. Σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της φιβροΐνης, η διαδικασία ζελατινοποίησης επιταχύνεται αφού οι πρωτεΐνες μπορούν να κροκιδωθούν ευκολότερα εξαιτίας των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Ο χρόνος ζελατινοποίησης μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτό συμβαίνει γιατί οι υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών είναι λιγότερο διαλυτές σε ψηλές θερμοκρασίες επιτρέποντας έτσι ταχύτερη κροκιδοποίηση, και επίσης επειδή οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται σε ψηλές θερμοκρασίες επιτρέποντας έτσι περισσότερες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (2006).

Οι συνθήκες υπό τις οποίες μπορούν να δημιουργηθούν οι πηκτές φιβροΐνης και η επίδραση τους στο ρυθμό εμφάνισης τους έχουν απασχολήσει ιδιαίτερα. Οι Hanawa *et al.* (2000) έδειξαν ότι ο ρυθμός πήξης αυξάνεται με την προσθήκη γλυκερόλης στο διάλυμα φιβροΐνης, και εξαρτάται από την συγκέντρωση της γλυκερόλης σε αυτό. Προσθήκη αιθανόλης σε διάλυμα φιβροΐνης μείωσε το χρόνο πήξης της φιβροΐνης καθώς η αιθανόλη ευνοεί την επαφή των αλυσίδων και το σχηματισμό της β-πτυχωτής (Morales *et al.*, 2009). Ο χρόνος ζελατινοποίησης μπορεί να μειωθεί με την προσθήκη στο διάλυμα επιφανειοδραστικής ουσίας με αρνητικό φορτίο (Lu *et al.*, 2011). Οι Ma *et al.* αναφέρουν την δημιουργία κρυστάλλων CaCO₃ σε υδροπηκτή φιβροΐνης μεταξιού μετά από απλή έγχυση ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων (2013). Αυξανόμενες ποσότητες πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) σε διαλύματα φιβροΐνης από μεταξοσκώληκες *Bombyx mori* και *Antheraea pernyi* μείωσαν τον χρόνο πήξης της φιβροΐνης. Χαρακτηρισμός των υδροπηκτών με τεχνική περίθλασης ακτίνων-χ (X-Ray Diffraction), FT-IR και φασματοσκοπία Raman έδειξαν ότι η PEG δεν άλλαξε την δευτεροταγή δομή αλλά πυροδότησε το σχηματισμό επιπλέον β-πτυχωτών (Zhao *et*

al., 2012). Υδροπηκτή φιβροΐνης-οξειδίου του γραφενίου επιδεικνύει εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες, όπως μεγάλη δύναμη εφελκυσμού (Huang *et al.*, 2013). Οι Wu *et al.* εξέτασαν την επίδραση αποστείρωσης με γ-ακτινοβολία και με υψηλή θερμοκρασία σε αυτόκλειστο στην πήξη της φιβροΐνης και παρατήρησαν ότι η γ-ακτινοβολία επάγει την μετατροπή σε β-πτυχωτή και την δημιουργία πηκτής γρηγορότερα από την θερμοκρασία (2011). Προσθήκη συμπολυμερούς PLA-PEG-PLA (PLA: πολυλακτικό οξύ) οδήγησε σε αύξηση του σχηματισμού της δευτοροταγούς δομής και του περιεχομένου των β-πτυχωτών (Zhong *et al.*, 2012).

4. Ρεολογία

4.1 Εισαγωγή

Η ρεολογία είναι η επιστήμη της ροής της ύλης. Με τον όρο ρεολογία αναφερόμαστε στη ροή και στην παραμόρφωση των συστατικών και κυρίως στη συμπεριφορά τους να μεταβαίνουν από την κατάσταση του ρευστού σε αυτή του στερεού. Επιπλέον η ρεολογία ορίζει τη σχέση μεταξύ της πίεσης που ενεργεί σε ένα υλικό με την παραμόρφωση του ή την μεταβολή της ροής του.

Οι ρεολογικές ιδιότητες προσδιορίζονται με τη μέτρηση της πίεσης που ασκείται και της παραμόρφωσης που λαμβάνει χώρα σε συνάρτηση με το χρόνο. Η διαφορά μεταξύ των θεμελιωδών και εμπειρικών ρεολογικών μεθόδων είναι ότι σε αντίθεση με τις τελευταίες οι υπολογισμοί για το μέγεθος και την κατεύθυνση της πίεσης και της παραμόρφωσης θέτουν περιορισμούς στην αποδοχή των δειγμάτων ως προς το σχήμα και τη σύνθεση. Οι θεμελιώδεις δοκιμές έχουν το πλεονέκτημα ότι βασίζονται σε βασικές γνωστές έννοιες και εξισώσεις της φυσικής. Οι εμπειρικές μέθοδοι συχνά χρησιμοποιούνται όταν η σύνθεση και η γεωμετρία είναι πολύπλοκες για να υπολογιστούν από την ισχύ και την παραμόρφωση (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2005).

4.2 Βασικές έννοιες ρεολογίας

Η ρεολογία ασχολείται με το πώς ανταποκρίνονται όλα τα υλικά στις εφαρμοζόμενες δυνάμεις και τάσεις παραμόρφωσης. Οι βασικές έννοιες είναι η

τάση (δύναμη ανά περιοχή) και η παραμόρφωση και είναι το κλειδί για όλες τις ρεολογικές εκτιμήσεις. Η τάση (σ) είναι μέτρηση δύναμης ανά μονάδα επιφάνειας και έχει ως μονάδα μέτρησης Pascal (Pa). Η κατεύθυνση της δύναμης σε σχέση με την επιφάνεια εφαρμογής προσδιορίζει τον τύπο τάσης (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2005).

Ορθή τάση συμβαίνει όταν η δύναμη ενεργεί απευθείας κάθετα σε μια επιφάνεια και μπορεί να επιτευχθεί με τάση ή συμπίεση. Διατμητική τάση προκύπτει όταν η δύναμη ενεργεί παράλληλα με την επιφάνεια. Η παραμόρφωση είναι μια αδιάστατη ποσότητα της σχετικής παραμόρφωσης του υλικού. Η κατεύθυνση της εφαρμοζόμενης τάσης σε σχέση με το υλικό καθορίζει τον τύπο της παραμόρφωσης. Ορθή παραμόρφωση (ϵ) αναφέρεται όταν η παραμόρφωση είναι κανονική στην επιφάνεια του δείγματος. Τα τρόφιμα παρουσιάζουν ορθή παραμόρφωση όταν συμπιέζονται ή έλκονται (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2005).

4.3 Ρεολογία και τρόφιμα

Πέραν του σχεδιασμού του απαραίτητου εξοπλισμού, η ρεολογική μελέτη των τροφίμων επιτρέπει την εκτίμηση της δομής τους, της λειτουργικότητας τους και της κατάστασης τους (π.χ. της μετουσίωσης πρωτεϊνών, ζελατινοποίησης αμύλου, σχηματισμό πηγματος κτλ). Συχνά χρησιμοποιείται για έλεγχο των πρώτων υλών ή των διεργασιών παραγωγής των προϊόντων. Τέλος δεν πρέπει να παραγνωρίζεται ότι οι ρεολογικές ιδιότητες και η υφή των περισσότερων τροφίμων σχετίζονται άμεσα με την ποιότητα του και την αποδοχή από τον καταναλωτή.

Είναι πολύ σημαντική ως εκ τούτου η μελέτη δυνατότητας συσχετισμού της ρεολογικής συμπεριφοράς των τροφίμων, όπως εκτιμάται με οργανοληπτική αξιολόγηση από ομάδες εκπαιδευμένων ή μη δοκιμαστών, με τη μέτρηση μίας ή περισσότερων ρεολογικών ιδιοτήτων με τη χρήση κατάλληλων οργάνων (Rao *et al.*, 1992).

Μοναδικές ρεολογικές ιδιότητες τροφίμων έχουν αναφερθεί και συνοψίζονται σε πολλές δημοσιεύσεις. Ωστόσο οι τιμές μπορεί να μην είναι ακριβείς δεδομένου ότι

οι ρεολογικές μεθόδους είναι αρκετά ευαίσθητες και οι αστάθμητοι παράγοντες όπως ωριμότητα, μέθοδος επεξεργασίας, θερμοκρασία, χρόνος, και αναλυτικές μέθοδοι είναι πολλές και μπορεί να επηρεάσουν τις ρεολογικές ιδιότητες (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2005).

4.4 Νευτονικά- Μη Νευτονικά υγρά

Τα περισσότερα ρευστά υλικά παρουσιάζουν ιξώδη συμπεριφορά. Όταν εξασκείται δύναμη σε απόσταση dy από την κάτω επιφάνεια και η άνω επιφάνεια κινείται με ταχύτητα $u+du$, η απόκριση ενός ιξώδους ρευστού μεταξύ των δύο επιφανειών είναι: $\tau = \mu \frac{du}{dy} = \mu \gamma$ (1) δηλαδή η διατμητική τάση τ (δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας) είναι ανάλογη της κλίσης της ταχύτητας διάτμησης ($-du/dy$ ή γ). Ο συντελεστής αναλογίας μ είναι το ιξώδες του υγρού και εκφράζεται σε μονάδες Pa.s ή poise(p) ($1 \text{ Pa.s} = 1000\text{cp}$). Τα υγρά που ακολουθούν τη σχέση(1) λέγονται Νευτονικά υγρά. Στα Νευτονικά υγρά το ιξώδες δεν εξαρτάται από την κλίση της ταχύτητας διάτμησης ($-du/dy$). Συμπεριφορά Νευτονικού υγρού παρουσιάζει το νερό και ορισμένα υγρά τρόφιμα όπως το γάλα, η κρέμα γάλακτος, τα φυτικά έλαια, τα σιρόπια και το μέλι. Το ιξώδες των Νευτονικών υγρών ελαττώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. Ως εκ τούτου κατά τη διάρκεια των μετρήσεων ιξώδους στα τρόφιμα η διακύμανση της θερμοκρασίας πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή. Για τα περισσότερα Νευτονικά ρευστά η σχέση ιξώδους με τη θερμοκρασία δίνεται εμπειρικά από την εκθετική σχέση τύπου Arrhenius : $\mu = \mu_{\infty} \exp(EA/RT)$ (2)

όπου η ενέργεια ενεργοποίησης EA κυμαίνεται από 5 ως 15 kcal/mol.

Παρ' ότι στη βιομηχανία τροφίμων ο όρος ιξώδες χρησιμοποιείται ευρέως για να περιγράψει τη συμπεριφορά των υγρών τροφίμων στη ροή, τα περισσότερα τρόφιμα δεν παρουσιάζουν συμπεριφορά που περιγράφεται από τη γραμμική σχέση της διατμητικής τάσης ως προς την κλίση της ταχύτητας διάτμησης, της εξίσωσης(1). Τα τρόφιμα αυτά χαρακτηρίζονται ως μη Νευτονικά. Τα μη Νευτονικά υγρά μπορεί να παρουσιάζουν συμπεριφορά πλαστικού Bingham κατά την οποία η ιξώδης συμπεριφορά παρουσιάζεται άνω μιας ελαχίστης διατμητικής τάσης, που καλείται και τάση απόκρισης. Τα πλαστικά Bingham ακολουθούν τη σχέση:

$$\tau = \mu \left(-\frac{du}{dy} \right) + \tau_0 = \mu \gamma + \tau_0 \quad (3)$$

η σταθερά μ στη σχέση(3) χαρακτηρίζεται και ως πλαστικό ιξώδες. Άλλα τρόφιμα παρουσιάζουν ψευδοπλαστική ή πηγνυόμενη συμπεριφορά, η οποία αποδίδεται από τον εκθετικό νόμο : $\tau = K(-du/dy)^n = K \dot{\gamma}^n$ (4)

όπου K : η σταθερά συνεκτικότητας σε Pa.sⁿ και n : ο δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς. Για $n < 1$ η σχέση(4) περιγράφει τα ψευδοπλαστικά (pseudoplastic) τρόφιμα, ενώ για $n > 1$ τα πηγνυόμενα ή εκτατά (dilatant). Τα περισσότερα τρόφιμα παρουσιάζουν ψευδοπλαστική συμπεριφορά όπως φαίνεται από τον Πίνακα1 που δίνει τις ρεολογικές ιδιότητες μιας ποικιλίας ρευστών τροφίμων. Τέλος μικτού τύπου συμπεριφορά (ρευστά Hershel-Bulkley) παρουσιάζουν ορισμένα τρόφιμα που ακολουθούν τον εκθετικό νόμο άνω μιας ελάχιστης διατμητικής τάσης απόκρισης, το, σύμφωνα με την γενική σχέση: $\tau = K(-du/dy)^n + \tau_0 = K \dot{\gamma}^n + \tau_0$ (5)

τα ρευστά αυτά για $n < 1$ ονομάζονται και πλαστικά Casson ενώ για $n > 1$ μικτού τύπου πηγνυόμενα. Η δομή των τροφίμων που παρουσιάζουν πλαστικότητα έχει συνήθως τα εξής χαρακτηριστικά: Είναι διφασικά συστήματα όπου η μία φάση είναι υγρή και η δεύτερη που βρίσκεται σε διασπορά στο υγρό δρα σαν "στερεά", ενώ στην ουσία μπορεί να είναι αέριο(κρέμα γάλακτος) ή και υγρό(μαργαρίνες). Η "στερεά" φάση βρίσκεται σε πολύ λεπτή διασπορά μέσα στη νυγρή φάση και σε ορισμένη αναλογία προς αυτή. Ψηλή αναλογία "στερεού" προκαλεί εύκολο διαμερισμό του υλικού, ενώ ψηλή αναλογία υγρού προκαλεί ροή και με τη βαρύτητα($\tau_0 \rightarrow 0$). Η σωστή αναλογία για την επίτευξη της επιθυμητής πλαστικότητας ποικίλει πολύ και εξαρτάται από το υλικό. Ο πουρές πατάτας π.χ. περιέχει 90% υγρό(νερό), ενώ η λιωμένη σοκολάτα μόνο 35% υγρό (υγροποιημένο λίπος), αλλά και τα δύο είναι πλαστικά (Rao et al., 1999).

4.5 Μικρές Δοκιμές Τάσης– Παλμογραφικές Δοκιμές

Επειδή οι υδροπηκτές είναι ιξωδοελαστικά υλικά, δοκιμές δυναμικής ρεολογίας πραγματοποιούνται για να αξιολογηθούν οι ιδιότητες του συστήματος πηκτής. Στις δυναμικές ρεολογικές δοκιμές έχουμε το μέτρο αποθήκευσης G' , το μέτρο απωλειών G'' και το συντελεστή απώλειας $\tan \delta = \frac{G''}{G'}$. Το G' αντιπροσωπεύει την ελαστική συμπεριφορά σε ένα δείγμα και είναι το μέτρο παραμόρφωσης που

παραμένει κατά τη διάρκεια της διάτμησης. Το μέτρο αποθήκευσης G' εκφράζει επίσης την ποσότητα της ενέργειας που αποθηκεύεται στο υλικό ή ανακτάται ανά κύκλο παραμόρφωσης. Αντίθετα το G'' αντιπροσωπεύει την ανελαστική συμπεριφορά (ιξώδη) ενός δείγματος και είναι το μέτρο της παραμόρφωσης όση ώρα ασκείται δύναμη, ενώ μετά την απομάκρυνση χάνεται. Το G'' είναι ένα μέτρο της ενέργειας που χάνεται σαν ιξώδες σκόρπισμα ανά κύκλο παραμόρφωσης. Για ένα συγκεκριμένο τρόφιμο, τα μεγέθη G' και G'' επηρεάζονται από την συχνότητα, την θερμοκρασία, και την παραμόρφωση. Για τιμές παραμόρφωσης μέσα στην γραμμική περιοχή, τα G' και G'' είναι ανεξάρτητα από την παραμόρφωση (Rao *et al.*, 1999). Εάν το G' είναι μεγαλύτερο από το G'' τότε το δείγμα έχει συμπεριφορά στερεού, δηλαδή η παραμόρφωση θα είναι ελαστική και ανακτήσιμη. Αν το G'' είναι μεγαλύτερο από το G' , τότε θα συμπεριφέρεται ως υγρό και η ενέργεια που χρησιμοποιείται για την παραμόρφωση του υλικού χάνεται μετά την απομάκρυνση.

Από την άλλη το $\tan \delta = \frac{G''}{G'}$ δείχνει την αναλογία ελαστικού-ανελαστικού τμήματος στη συμπεριφορά κατά την παραμόρφωση. Το $\tan \delta = 0$ ($\delta = 0$) αντιστοιχεί σε ελαστική συμπεριφορά. Το $\delta = 90^\circ$ ($\tan \delta = \infty$) αντιστοιχεί σε ανελαστική συμπεριφορά. Αν η γωνία φάσης είναι $0^\circ < \delta < 90^\circ$ το υλικό ονομάζεται ιξωδοελαστικό. Επιπλέον

υπάρχει και το σύνθετο ιξώδες, $\eta^* = \frac{G^*}{\omega}$, μια άλλη χρήσιμη παράμετρος όπου ω είναι η συχνότητα της ταλάντωσης (rad s^{-1}), και το μέτρο σύνθετης

$$\text{ιξωδοελαστικότητας } G^* = \sqrt{G''^2 + G'^2}.$$

Τρεις τύποι δυναμικών δοκιμών μπορούν να διεξαχθούν για να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες για τις πηκτές, την ζελατινοποίηση και την τήξη.

- 1) Μελέτες συχνότητας όπου τα G' και G'' προσδιορίζονται συναρτήσει της συχνότητας με σταθερή θερμοκρασία.
- 2) Μελέτες σάρωσης θερμοκρασίας όπου τα G' και G'' προσδιορίζονται συναρτήσει της θερμοκρασίας σε σταθερή συχνότητα ω και
- 3) Μελέτες σάρωσης χρόνου όπου τα G' και G'' προσδιορίζονται συναρτήσει του χρόνου με σταθερές συχνότητες ω και θερμοκρασία (Lopes *et al.*, 1999).

5. Σκοπός της εργασίας

Μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς της φιβροΐνης σε διάφορες αναλογίες μιγμάτων γλυκομαννάνης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στους 4°C συναρτήσει του χρόνου.

6. Πειραματικό μέρος

6.1 Υλικά και όργανα

6.1.1 Κουκούλια από μεταξοσκώληκα του γένους *Bombyx mori*

Η προμήθεια της πρώτης ύλης, κουκούλια (*Bombyx mori*) έγινε από το Εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Καθηγητή Πασχάλη Χαριζάνη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα δείγματα έφτασαν στο ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης σε κατάλληλη συσκευασία. Αμέσως μετά την άφιξη τους αποθηκεύτηκαν σε ξηραντήριο.

6.1.2 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν :

- Βρωμιούχο Λίθιο (LiBr, Sigma-Aldrich).
- Ανθρακικό Νάτριο (Na₂CO₃, Riedel-de Haën).
- Αποσταγμένο νερό (H₂O).
- Απορρυπαντικό (Skip Active Clean).
- Ακετόνη(C₃H₆O)
- Οξικό οξύ (CH₃COOH)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Οξικό νάτριο
- Διάλυμα Υδροχλωρίου (HCL).
- Υδροξείδιο του καλίου (KOH)

6.1.3 Σκεύη και υλικά

- Ποτήρια ζέσεως.
- Σπάτουλες.
- Μαγνητάκια ανάδευσης.
- Κωνικές φιάλες (250 ml)
- Φιάλη κενού
- Πλαστικά μπουκάλια (100ml)
- Τρυβλία Petri
- Διηθητικό χαρτί
- Δειγματοληπτικοί περιέκτες (αλουμινίου) για το ρεόμετρο
- Πάραφιλμ
- Μεμβράνη διαπίδυσης (MWCO 3500 g/mol; Orange Scientific).
- Χωνί Buchner

6.1.4 Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός (KERN & Sohn GmbH, Electronic Balance, ABJ 220-4M, max 180g, d=0.1mg).
- Ηλεκτρονικό pH-μετρο (Thermo Electron Corporation).
- Υπέρηχοι (Ultrasonic Processor, Hielscher).
- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Fisher Stirring Hotplate, Fisher Scientific).
- Ρεόμετρο (Bohlin Viscometry C-VOR, Bohlin Instrument).
- Φυγόκεντρος (thermo scientific, sorval evolution RC centrifuge)
- Λυοφιλιωτής (Christ gamma 1-20)
- Σφαιρόμυλος (Fritsch)

6.2 Μέθοδοι

6.2.1 Παραλαβή φιβροΐνης απο κουκούλια *B.mori*

Κουκούλια του γένους *Bombyx Mori* τεμαχίζονται και βράζονται σε διάλυμα Na_2CO_3 (0,02M) και απορρυπαντικού (0,3 w/v) για 60 λεπτά, έπειτα ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό για να απομακρυνθεί η σερίκίνη και ακολουθεί ξήρανση στο εναπομένον μετάξι. Το μετάξι διαλύεται σε διάλυμα LiBr (9 M) με συγκέντρωση 15% (w/v) στους 60°C για δύο μέρες. Με την ολοκλήρωση των δύο ημερών, το διάλυμα μεταξιού διηθείται υπό συνθήκες κενού. Το εκχυλισμένο μετάξι τοποθετήθηκε έναντι αποσταγμένου νερού σε ταινία διαπίδυσης για τρεις μέρες για την απομάκρυνση των αλάτων και για τη λήψη διαλύματος της φιβροΐνης. Τέλος το διάλυμα φιβροΐνης αποθηκεύτηκε σε πλαστικά μπουκάλια.

6.2.2 Παρασκευή πολυσακχαρίτη γλυκομαννάνης

Για την παρασκευή του πολυσακχαρίτη γλυκομαννάνης ακολουθήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

Σε 10g σαλέπι προστέθηκαν 506ml ακετόνης και το διάλυμα συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τα 650ml. Ακολούθως, τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως και θερμάνθηκε στους 40°C για μια ώρα. Μετά από διήθηση με χωνί Buchner, στα στερεά υπολείματα προστέθηκαν 300ml αλκοόλης 70%. Το διάλυμα θερμάνθηκε στους 40°C για μια ώρα με ανάδευση και ακολούθως διηθήθηκε ξανά. Το στερεό που συλλέχτηκε στο διηθητικό χαρτί εκπλύθηκε με ακετόνη (300ml). Το διάλυμα ξηράνθηκε για 24 ώρες μέχρι να απομακρυνθεί η ακετόνη και ακολούθως το ξηρό υπόλειμα εκχυλίστηκε με HBSS pH 5.2 (διάλυμα οξικού νατρίου, χλωριούχου νατρίου και οξικού νατρίου), στους 70°C για 30 λεπτά με ανάδευση. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 30'. Το υπερκείμενο φυλάκτηκε στην κατάψυξη, Στο στερεό υπόλειμα προστέθηκαν 600ml HBSS και θερμάνθηκαν στους 70°C για 30 λεπτά με ανάδευση. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε ξανά και το υπερκείμενο φυλάκτηκε στην κατάψυξη. Στη συνέχεια το διάλυμα λυοφιλοποιήθηκε και παραλήφθηκε σε στερεά μορφή και ακολούθως κονιοποιήθηκε σε σφαιρόμυλο και αποθηκεύτηκε.

6.2.3 Παρασκευή διαλύματος γλυκομαννάνης (4%)

Για τη παρασκευή διαλύματος γλυκομαννάνης 4% , προστέθηκαν 2g πολυσακχαρήτη σε 50 ml απεσταγμένο νερό, σε κωνική φιάλη των 50 ml, η οποία ζεστάθηκε σε υδατόλουτρο στους 70°C μέχρι να διαλυθεί το σάκχαρο.

6.2.4 Παρασκευή διαλύματος φιβροΐνης (1,5%)

Το διάλυμα της φιβροΐνης ομογενοποιήθηκε με τη χρήση υπέρηχων για μερικά δευτερόλεπτα και ακολούθως 0.3ml από αυτό τοποθετούνταν σε κομμάτι αλουμινόχαρτου. Το αλουμινόχαρτο αφηνόταν για μία μέρα σε απαγωγό για ξήρανση και μετρίοταν το βάρος της φιβροΐνης για να βρεθεί η συγκέντρωση της. Στη συνέχεια γινόταν η παρασκευή διαλύματος φιβροΐνης 1.5% με απεσταγμένο νερό.

6.2.5 Παρασκευή μιγμάτων φιβροΐνης (1.5%) σε γλυκομαννάνη (4%)

Παρασκευάστηκαν διαλύματα φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη σε συγκεντρώσεις 0% , 25%, 50%, 75% και 100%. Αυτά τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε ειδικούς δειγματοφορείς αλουμινίου για το ρεόμετρο Bohlin. Πάνω από τους δειγματοφορείς τοποθετήθηκαν τρυβλία petri για την προστασία των διαλυμάτων από εξωτερικούς παράγοντες. Η επίδραση της γλυκομαννάνης στην δημιουργία πηκτής μελετήθηκε σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, την θερμοκρασία δωματίου και τους 4°C. Για αυτό το σκοπό κάποια δείγματα φυλάκθηκαν σε ντουλάπι (θερμοκρασία δωματίου) και στο ψυγείο (4°C).

6.2.6 Μέτρηση ρεολογικών ιδιοτήτων

Δείγμα 10ml από τα διαλύματα που περιγράφονται στο 4.2.5 τοποθετήθηκαν στους υποδοχείς του ρεόμετρου και διερευνήθηκε η ρεολογική συμπεριφορά.

Η μελέτη των ρεολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε δυναμικές δοκιμές (Oscillation), υπό ελεγχόμενη παραμόρφωση (control Strain) 0,00001-0,0001. Αυτό έγινε για να διασφαλίσει ότι όλες οι δοκιμές ήταν μέσα στο όρια της γραμμικής ελαστικότητας και οι τιμές των παραμέτρων που καταγράφηκαν οφείλονταν

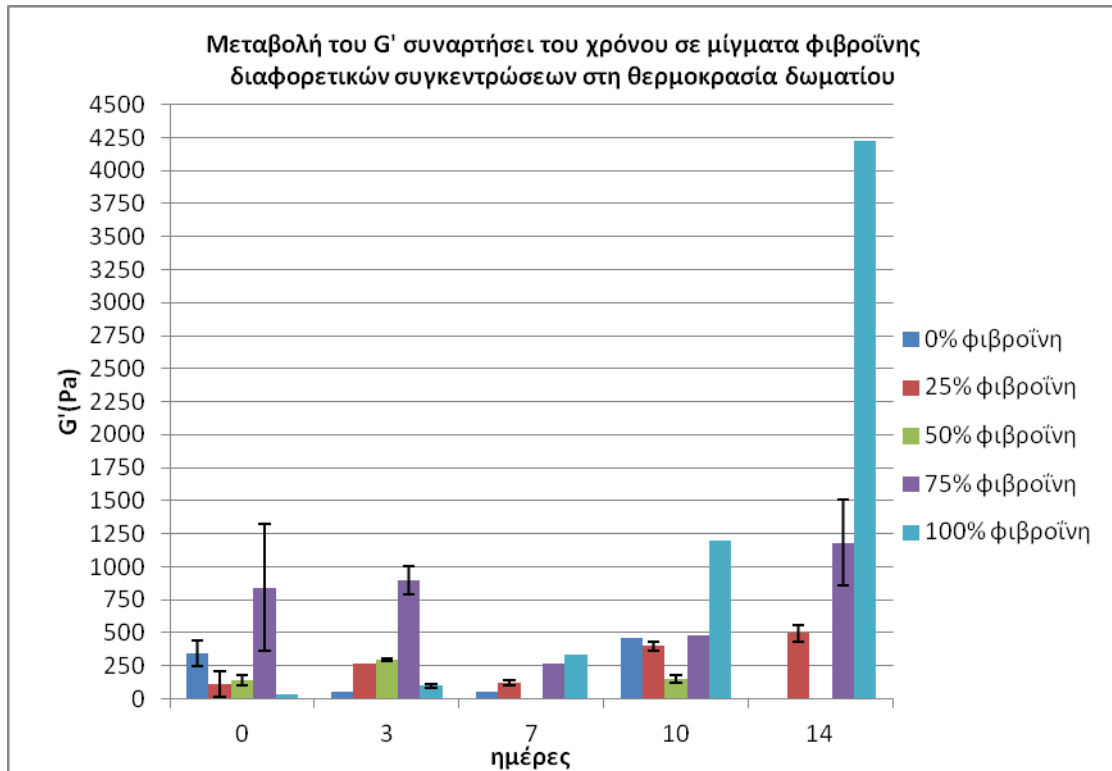
αποκλειστικά και μόνο στα δομικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων χωρίς να έχει συμβεί θραύση δευτερευόντων δεσμών της δομής των συστημάτων αυτών. Τα G' και $\tan\delta$ προσδιορίστηκαν συναρτήσει της θερμοκρασίας στη συχνότητα 0.4136Hz. Το η^* προσδιορίστηκε συναρτήσει της συχνότητας (0.01Hz και 0.4136Hz) σε σταθερή θερμοκρασία (θερμοκρασία δωματίου και 4°C). Οι μετρήσεις γίνονταν σε διαστήματα 0, 3, 7, 10 και 14 ημερών.

7. Αποτελέσματα

Η μελέτη των ρεολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε δυναμικές δοκιμές. Στις δυναμικές δοκιμές σάρωσης υπό ελεγχόμενη παραμόρφωση οι τιμές του συντελεστή ελαστικότητας G' (στη συχνότητα των 0,4136 Hz), της εφαπτομένης της γωνίας δ (στη συχνότητα των 0,4136 Hz) και του μιγαδικού ιξώδους η^* στις συχνότητες 0,01 Hz και 0,4136 Hz παρουσιάζονται στους Πίνακες 1, 2, 3 και 4 για δείγματα διάφορων συγκεντρώσεων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη στην θερμοκρασία δωματίου, ενώ στους Πίνακες 5, 6, 7 και 8 εμφανίζονται οι αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε θερμοκρασία 4°C.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα G' των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%) στη θερμοκρασία δωματίου.

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% φιβροΐνη | | 25% φιβροΐνη | | 50% φιβροΐνη | | 75% φιβροΐνη | | 100% φιβροΐνη | |
|--|-------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Παράμετρος | G' (Pa) | | | | | | | | | |
| ημέρες | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| 0 | 345,9 | 94,1 | 111,5 | 98,3 | 141,3 | 39,4 | 842,6 | 480,0 | 35,0 | 3,1 |
| 3 | 50,7 | - | 262,0 | - | 294,1 | 6,7 | 894,0 | 106,0 | 98,3 | 16,4 |
| 7 | 57,8 | - | 124,0 | 18,3 | - | - | 262,0 | - | 330,2 | - |
| 10 | 462,8 | - | 399,6 | 34,7 | 151,6 | 28,8 | 483,0 | - | 1195,0 | - |
| 14 | - | - | 497,5 | 62,9 | - | - | 1181,5 | 324,6 | 4223,0 | - |

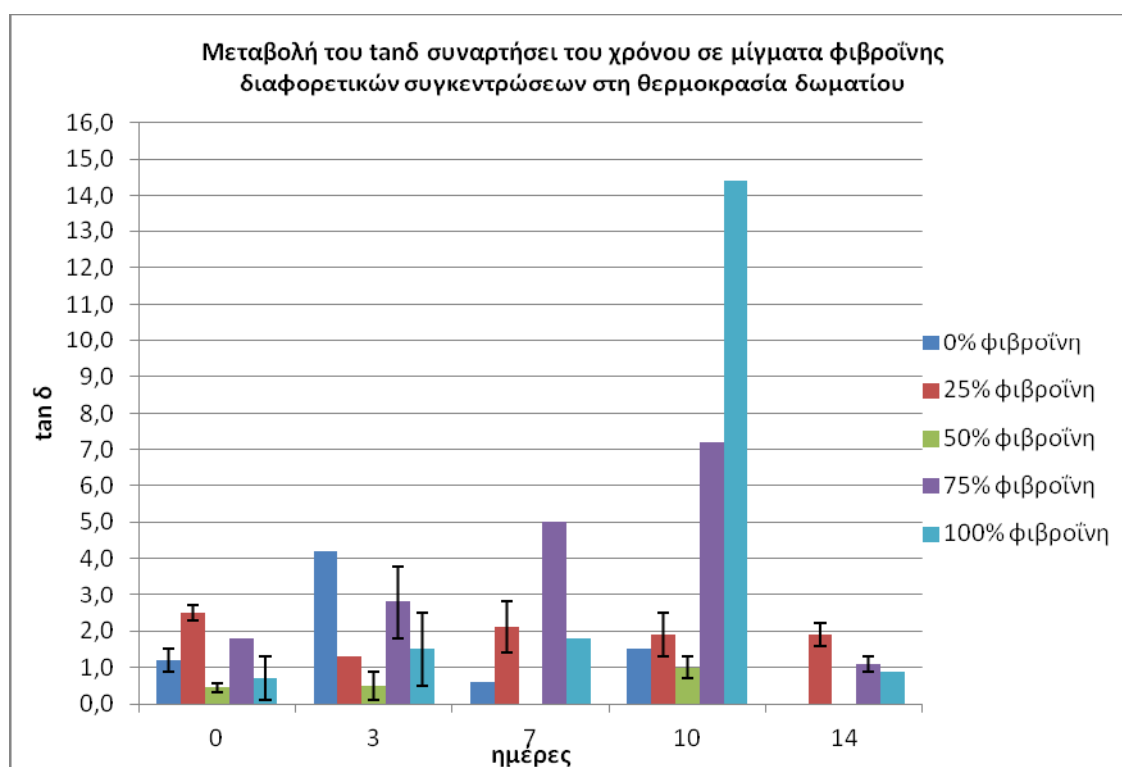


Σχήμα 5: Μεταβολή του G' συναρτήσει του χρόνου σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στη θερμοκρασία δωματίου.

Στο Σχήμα 5 παρατηρείται ότι τα δείγματα με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φιβροΐνης (75% και 100%) παρουσίασαν την μεγαλύτερη ελαστικότητα ειδικότερα τις ημέρες 10 και 14. Αντιθέτως, τα δείγματα με μικρότερη συγκέντρωση φιβροΐνης παρουσιάζουν χαμηλή ελαστικότητα.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα $\tan\delta$ των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%) στη θερμοκρασία δωματίου.

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% φιβροΐνη | | 25% φιβροΐνη | | 50% φιβροΐνη | | 75% φιβροΐνη | | 100% φιβροΐνη | |
|--|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Παράμετρος | $\tan\delta$ | | | | | | | | | |
| ημέρες | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| 0 | 1,2 | 0,3 | 2,5 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | 1,8 | 0 | 0,7 | 0,6 |
| 3 | 4,2 | - | 1,3 | - | 0,5 | 0,4 | 2,8 | 1 | 1,5 | 1,0 |
| 7 | 0,6 | - | 2,1 | 0,7 | - | - | 5,0 | - | 1,8 | - |
| 10 | 1,5 | - | 1,9 | 0,6 | 1 | 0,3 | 7,2 | - | 14,4 | - |
| 14 | - | - | 1,9 | 0,3 | - | - | 1,1 | 0,2 | 0,9 | - |



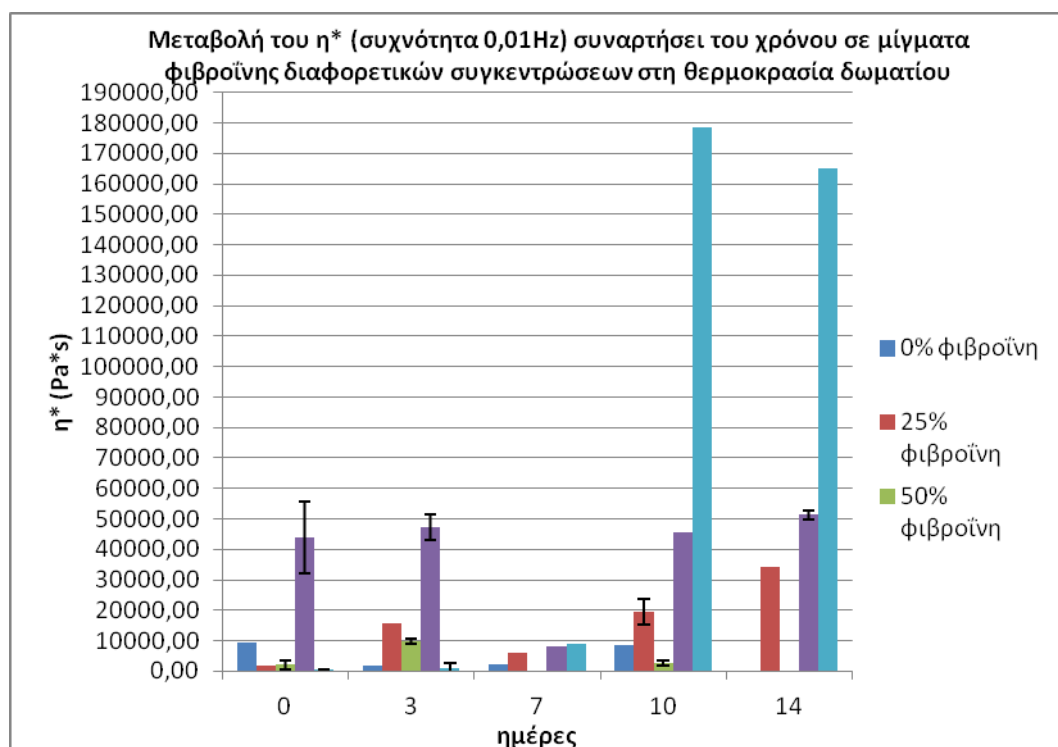
Σχήμα 6: Μεταβολή του $\tan\delta$ συναρτήσει του χρόνου σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στη θερμοκρασία δωματίου.

Στο Σχήμα 6 παρατηρείται μια αυξητική τάση στα δείγματα με συγκέντρωση φιβροΐνης 75% και 100% μέχρι τη 10^η μέρα. Παρατηρείται ακόμη ότι το $\tan\delta$

διατηρείται σε χαμηλές τιμές κατά τη διάρκεια των μετρήσεων στα δείγματα που περιέχουν 50% φιβροΐνη. Τα δείγματα που περιέχουν 25% και 75% φιβροΐνη συμπεριφέρονται ως υγρά καθώς οι τιμές του τ_{shd} είναι πιο ψηλές.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα η^* στη συχνότητα 0,01Hz των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%) στη θερμοκρασία δωματίου.

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% φιβροΐνη | | 25% φιβροΐνη | | 50% φιβροΐνη | | 75% φιβροΐνη | | 100% φιβροΐνη | |
|--|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Παράμετρος | η^* (Pa*s) | | | | | | | | | |
| ημέρες | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| 0 | 9318,5 | 4753,9 | 1958,0 | 58,0 | 2136,5 | 1567,7 | 43995,0 | 11886,5 | 542,1 | 191,4 |
| 3 | 1644,0 | - | 15910,0 | - | 9796,0 | 656,2 | 47265,0 | 4377,0 | 1180,1 | 1414,1 |
| 7 | 2064,0 | - | 6004,0 | 166,9 | - | - | 7986,0 | - | 8868,0 | - |
| 10 | 8647,0 | - | 19625,0 | 4193,1 | 2712,0 | 991,4 | 45610,0 | - | 178400,0 | - |
| 14 | - | - | 19432,0 | 20885,1 | - | - | 51260,0 | 1612,2 | 164900,0 | - |

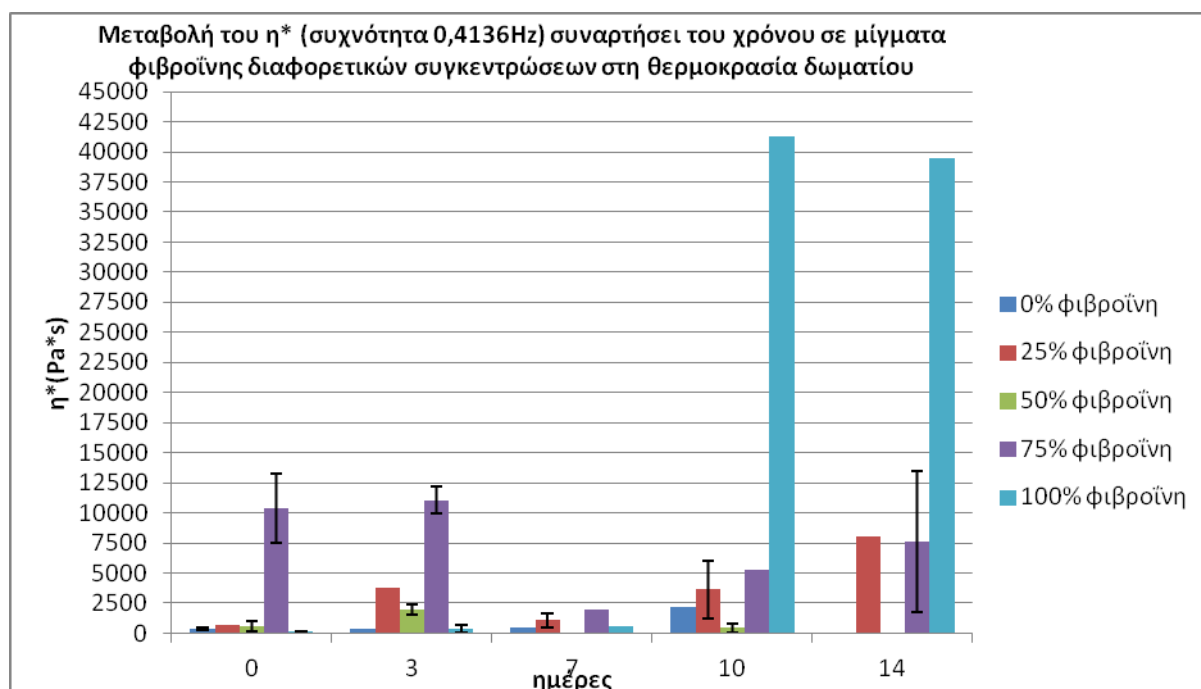


Σχήμα 7: Μεταβολή του η^* συναρτήσει του χρόνου στη συχνότητα 0,01Hz σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στη θερμοκρασία δωματίου.

Στο Σχήμα 7 παρατηρείται γενικά μια αύξηση του σύνθετου ιξώδους σε αυτή τη συχνότητα με την πάροδο του χρόνου όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της φιβροΐνης στα δείγματα. Οι μεγαλύτερες τιμές του η^* παρατηρούνται στις μέρες 10 και 14 για τα δείγματα με συγκέντρωση 75% και 100% φιβροΐνης.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα η^* στη συχνότητα 0,4136Hz των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%) στη θερμοκρασία δωματίου.

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% φιβροΐνη | | 25% φιβροΐνη | | 50% φιβροΐνη | | 75% φιβροΐνη | | 100% φιβροΐνη | |
|--|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Παράμετρος | η^* (Pa*s) | | | | | | | | | |
| ημέρες | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| 0 | 355,0 | 71,0 | 656,9 | 12,6 | 581,1 | 423,8 | 10355,0 | 2863,8 | 139,75 | 44,9 |
| 3 | 392,0 | - | 3723,0 | - | 1962,5 | 405,2 | 11055,0 | 1096,0 | 319,7 | 315,0 |
| 7 | 494,0 | - | 1060,5 | 542,5 | - | - | 1991,0 | - | 559,0 | - |
| 10 | 2186,0 | - | 3614,5 | 2409,1 | 421,7 | 362,9 | 5223,0 | - | 41280,0 | - |
| 14 | - | - | 7999,0 | - | - | - | 7589,0 | 5870,4 | 39510,0 | - |

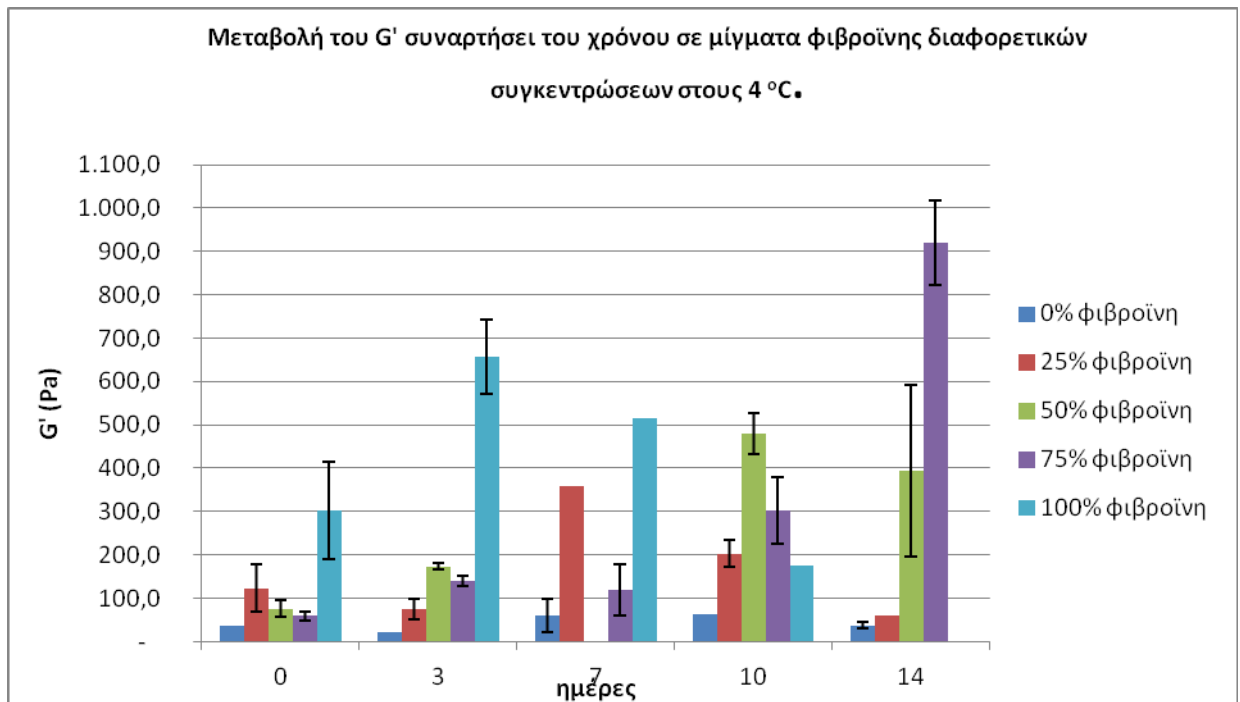


Σχήμα 8: Μεταβολή του η^* συναρτήσει του χρόνου στη συχνότητα 0,4136Hz σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στη θερμοκρασία δωματίου.

Στο Σχήμα 8 φαίνεται μια αύξηση του σύνθετου ιξώδους σε αυτή τη συχνότητα με την πάροδο του χρόνου όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της φιβροΐνης στα δείγματα. Οι μεγαλύτερες τιμές του η^* παρατηρούνται στις μέρες 10 και 14 για τα δείγματα με συγκέντρωση 75% και 100% φιβροΐνης. Οι τιμές του η^* σε αυτή τη συχνότητα είναι πιο μικρές από τις αντίστοιχες του η^* στην μικρότερη συχνότητα (σχήμα 7).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα G' των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%) στους 4°C.

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% | | 25% | | 50% | | 75% | | 100% | |
|--|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|
| | G' (Pa) | | | | | | | | | |
| Παράμετρος | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| ημέρες | | | | | | | | | | |
| 0 | 37,8 | | 123,4 | 54,7 | 75,7 | 18,7 | 59,7 | 10,3 | 302,5 | 112,5 |
| 3 | 21,6 | | 75,6 | 23,0 | 172,8 | 7,6 | 140,0 | 10,5 | 656,6 | 86,1 |
| 7 | 61,1 | 38,6 | 358,6 | | | | 118,5 | 58,6 | 515,3 | |
| 10 | 62,9 | | 202,9 | | 479,4 | 47,6 | 302,7 | 75,8 | 175,5 | |
| 14 | 37,0 | 7,2 | 59,0 | 31,0 | 395,4 | 198,1 | 919,7 | 96,5 | | |

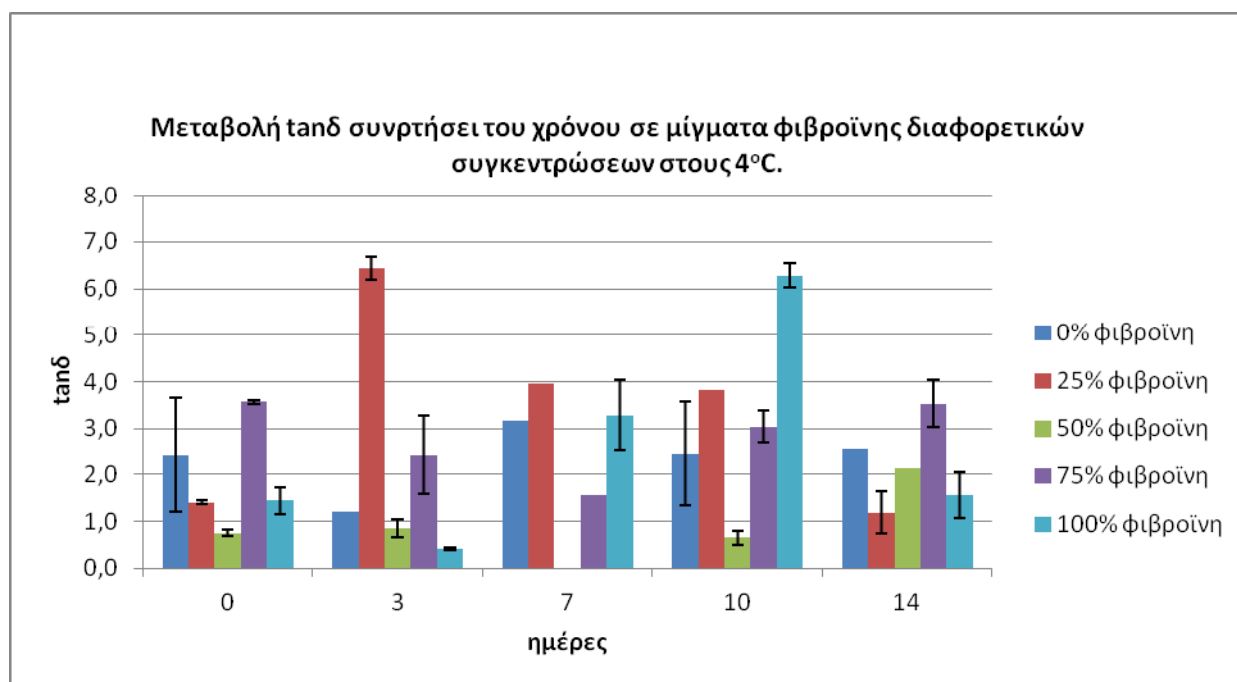


Σχήμα 9: Μεταβολή του G' συναρτήσει του χρόνου σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στους 4°C.

Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται το μέτρο ελαστικότητας των μιγμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις φιβροΐνης στις 0, 3, 7, 10 και 14 ημέρες. Όπως φαίνεται στο σχήμα τη μεγαλύτερη ελαστική συμπεριφορά παρουσίασαν τα δείγματα που περιείχαν 100% φιβροΐνη στις 0, 3 και στις 7 ημέρες ενώ μετά τις 10 ημέρες οι πηκτές υποβαθμίστηκαν και στις 14 ημέρες ήταν αδύνατο να μετρηθούν. Τα μίγματα που περιείχαν 75% φιβροΐνη παρουσίασαν μια αυξανόμενη ελαστική συμπεριφορά με την πάροδο του χρόνου ενώ τα δείγματα που περιείχαν μόνο γλυκομαννάνη παρουσίασαν σταθερά την λιγότερη ελαστική συμπεριφορά.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα $\tan\delta$ των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%) στους 4°C.

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% | | 25% | | 50% | | 75% | | 100% | |
|--|--------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|
| Παράμετρος | $\tan\delta$ | | | | | | | | | |
| ημέρες | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| 0 | 2,4 | 1,2 | 1,4 | 0,0 | 0,8 | 0,1 | 3,6 | 0,0 | 1,5 | 0,3 |
| 3 | 1,2 | | 6,4 | 0,0 | 0,9 | 0,2 | 2,4 | 0,9 | 0,4 | 0,0 |
| 7 | 3,2 | | 4,0 | | | | 1,6 | 0,0 | 3,3 | 0,8 |
| 10 | 2,5 | 1,1 | 3,8 | | 0,7 | 0,2 | 3,0 | 0,4 | 6,3 | 0,3 |
| 14 | 2,6 | | 1,2 | 0,4 | 2,1 | | 3,5 | 0,5 | 1,6 | 0,5 |



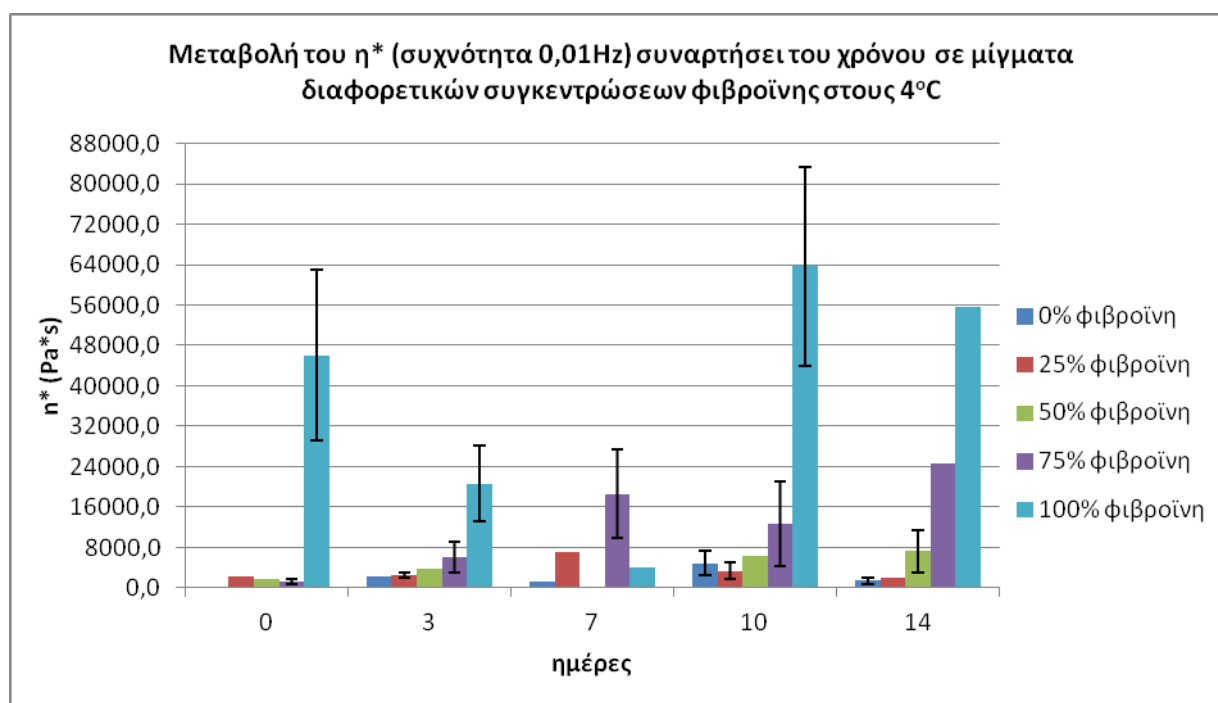
Σχήμα 10: Μεταβολή του $\tan\delta$ συναρτήσει του χρόνου σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στους 4°C.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 10 το δείγμα με 50% φιβροΐνη και 50% γλυκομαννάνη είναι αυτό που σχηματίζει την λιγότερο υγρή πηκτή και τη διατηρεί για 14 ημέρες στους 4°C. Αντίθετα η περισσότερη αναλογία γλυκομαννάνης σε ποσοστό 75%

φαίνεται να μειώνει την ικανότητα σχηματισμού πηκτής και στις 3 ημέρες το δείγμα παρουσιάζει ακόμα περισσότερο συμπεριφορά υγρού.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα η^* στη συχνότητα 0,01Hz των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%).

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% | | 25% | | 50% | | 75% | | 100% | |
|--|-----------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|
| Παράμετρος | η^* (Pa*s) | | | | | | | | | |
| ημέρες | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| 0 | 140,0 | | 2265,0 | 104,7 | 1839,0 | | 1355,0 | 510,6 | 46085,0 | 16921,1 |
| 3 | 2290,0 | | 22488,3 | 445,4 | 3652,0 | | 6106,0 | 3080,2 | 20615,0 | 7544,8 |
| 7 | 1242,0 | 56,6 | 6963,0 | | | | 18630,0 | 8751,9 | 3958,0 | |
| 10 | 4895,5 | 2380,8 | 3311,0 | 1612,2 | 6433,0 | | 12555,7 | 839,6 | 63630,0 | 19756,6 |
| 14 | 1404,1 | 620,7 | 2078,0 | | 7262,5 | 4253,3 | 24560,0 | | 55540,0 | |

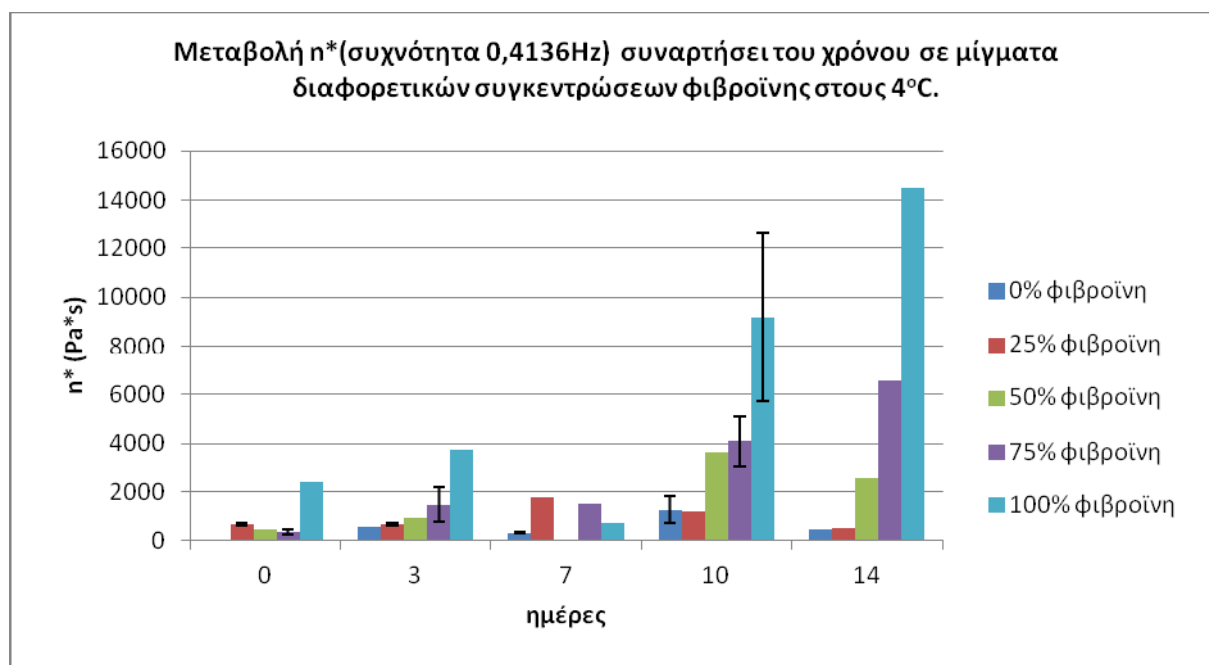


Σχήμα 11: Μεταβολή του η^* συναρτήσει του χρόνου στη συχνότητα 0,01Hz σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στους 4°C.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 11 τα δείγματα που περιείχαν 100% φιβροΐνη παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές σύνθετου ιξώδους στη συχνότητα μέτρησης 0.01Hz σε όλες τις ημέρες. Αυξητική συμπεριφορά με την πάροδο του χρόνου παρουσίασαν και τα μίγματα που περιείχαν 75% φιβροΐνη.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα η^* στη συχνότητα 0,4136Hz των δειγμάτων φιβροΐνης σε γλυκομαννάνη (συγκεντρώσεων 0-100%) στους 4°C.

| Συγκέντρωση φιβροΐνης στη γλυκομαννάνη | 0% | | 25% | | 50% | | 75% | | 100% | |
|--|-----------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|
| Παράμετρος | η^* (Pa*s) | | | | | | | | | |
| ημέρες | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση | Μέσος όρος | Τυπική απόκλιση |
| 0 | 60,2 | | 652,9 | 59,2 | 458,8 | | 350,5 | 126,6 | 2410,0 | |
| 3 | 570,1 | | 662,8 | 60,2 | 922,6 | | 1465,9 | 700,2 | 3747,0 | |
| 7 | 318,3 | 43,8 | 1737,0 | | | | 1488,0 | | 693,3 | |
| 10 | 1261,0 | 565,7 | 1161,0 | | 3620,0 | | 4083,0 | 1012,6 | 9178,5 | 3452,8 |
| 14 | 435,7 | | 497,0 | | 2581,0 | | 6561,0 | | 14510,0 | |

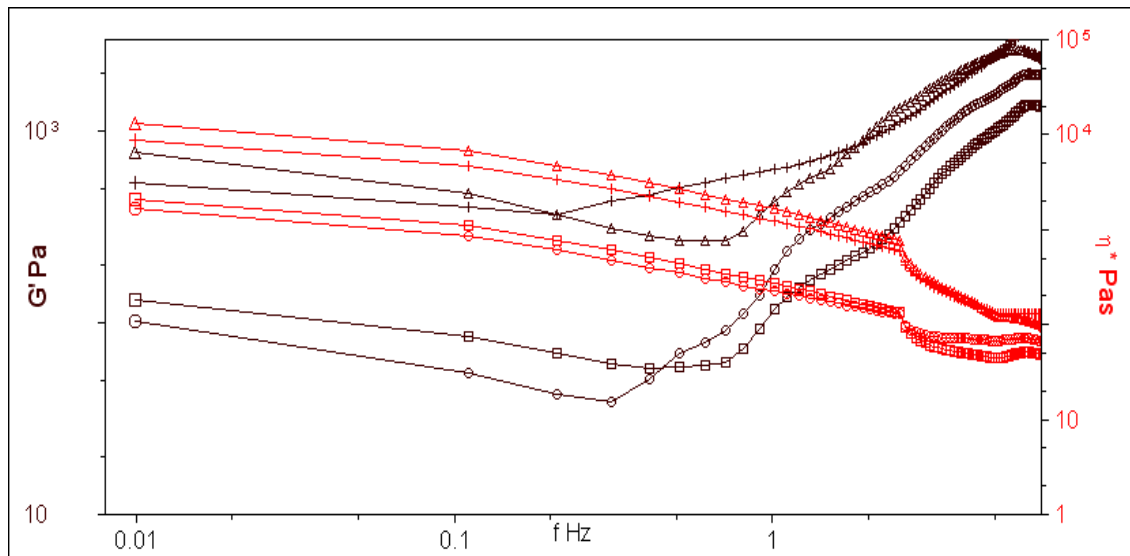


Σχήμα 12: Μεταβολή του η^* συναρτήσει του χρόνου στη συχνότητα 0,4136Hz σε μίγματα φιβροΐνης-γλυκομαννάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στους 4°C.

Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν και οι τιμές του σύνθετου ιξώδους στη συχνότητα μέτρησης 0.4136Hz μόνο που το μέγεθος των τιμών είναι πολύ μικρότερο. Αυξητική τάση με την πάροδο του χρόνου παρουσιάζουν και τα μίγματα με 50% και 75% φιβροΐνη, με τα δεύτερα να παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές.

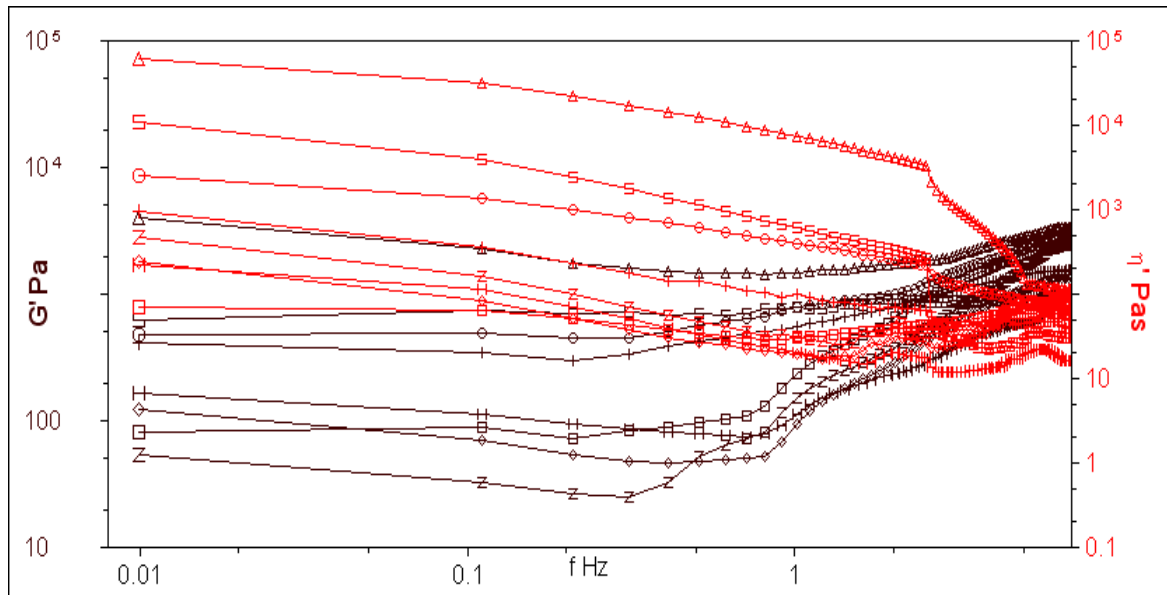
Γενικά παρατηρείται ότι τόσο η φιβροΐνη όσο και η γλυκομαννάνη έχουν ικανότητα σχηματισμού πηκτών και στις δυο θερμοκρασίες. Όπως φαίνεται στα σχήματα 5 και 9 οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις φιβροΐνης στο δείγμα προσφέρουν μεγαλύτερη ελαστικότητα στην πηκτή σε σχέση με τις μικρότερες συγκεντρώσεις. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο έντονο στην θερμοκρασία δωματίου σε σχέση με τους 4°C αφού καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές G' . Το $\tan\delta$ αποτελεί κριτήριο του ιξώδους χαρακτήρα των δειγμάτων δηλ. όσο πιο ψηλή είναι η τιμή αυτή τόσο και πιο έντονα το δείγμα συμπεριφέρεται ως υγρό δηλ. κινείται. Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι οι τιμές του $\tan\delta$ βρίσκονται στα ίδια επίπεδα για τα δείγματα των 2 θερμοκρασιών. Η πιο υγρή πηκτή εμφανίζεται στη συγκέντρωση 100% φιβροΐνης την 10^η ημέρα. Μεγαλύτερες τιμές σύνθετου ιξώδους παρουσιάζονται στα δείγματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φιβροΐνης για τις 2 θερμοκρασίες με το πιο ψηλό η^* να σημειώνεται στην θερμοκρασία δωματίου. Οι τιμές του η^* είναι μικρότερες στα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε η ψηλότερη συχνότητα. Αυτό διαφαίνεται και από τα διαγράμματα $\eta^*=f(\omega)$ στα οποία φαίνεται η τάση μείωσης του σύνθετου ιξώδους με την αύξηση της συχνότητας για όλα τα δείγματα.

Για καλύτερη κατανόηση των ανωτέρω γίνεται παράθεση των γραφικών παραστάσεων των δυναμικών δοκιμών για το εύρος τιμών συχνότητας ταλάντωσης από 0,01 Hz μέχρι 10 Hz. Στο σχήμα 13 παρουσιάζονται οι δυναμικές καμπύλες δειγμάτων 100% γλυκομαννάνης σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στη θερμοκρασία δωματίου.



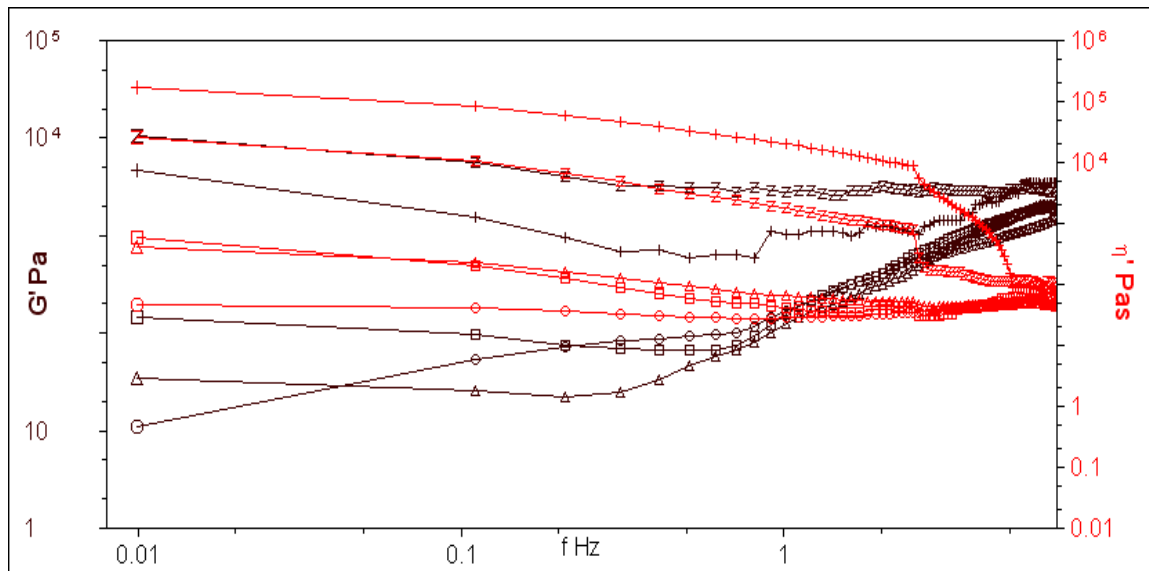
Σχήμα 13. Δυναμικές καμπύλες δειγμάτων 100% γλυκομαννάνης συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στη θερμοκρασία δωματίου: Δ, 0 ημέρες; Ο, 3 ημέρες; □, 7 ημέρες; +, 10 ημέρες.

Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν χαρακτήρα υγρού με τις τιμές του G' να ελαττώνονται στις χαμηλές συχνότητες δείγμα επαρκούς χρόνου χαλάρωσης των δειγμάτων και μετά απότομης αύξησης του G' ένδειξη αδράνειας και αδυναμίας του δείγματος να χαλαρώσει λόγω ταχύτερης εναλλαγής της παραμόρφωσης κατά την ταλάντωση. Επίσης παρατηρείται ότι το η^* συνεχώς μειώνεται ένδειξη ότι παρόλο που η ασκούμενη παραμόρφωση είναι πολύ μικρή κατά πολύ μέσα στα όρια της γραμμικής ελαστικότητας τα δείγματα ρέουν. Τέλος, φαίνεται ότι με την αποθήκευση επέρχεται χαλάρωση της δομής του συστήματος χωρίς να μπορεί να εξηγηθεί και κατόπιν αυξάνουν οι τιμές των ρεολογικών παραμέτρων λόγω επαναδημιουργίας της δομής των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται όσον αφορά τα μεγέθη των τιμών των ρεολογικών παραμέτρων όταν οι μετρήσεις των δειγμάτων της γλυκομαννάνης (100%) έγιναν στους 4°C (σχήμα 14). Κατ' αρχάς είναι αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που μετρήθηκαν στη θερμοκρασία δωματίου, ένδειξη ότι οι δεσμοί είναι ενθαλπικής φύσης, πιθανώς δεσμοί υδρογόνου. Κατά δεύτερο οι μεταβολές στις τιμές των ρεολογικών παραμέτρων σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης φαίνεται να λαμβάνουν χώρα πιο αργά.



Σχήμα 14. Δυναμικές καμπύλες δειγμάτων 100% γλυκομαννάνης συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στους 4°C: Δ,0 ημέρες; O, 3 ημέρες; ▽, 7 ημέρες; +, 11 ημέρες; Z, 14 ημέρες; ϕ, 21 ημέρες; H, 24 ημέρες; S, 27 ημέρες.

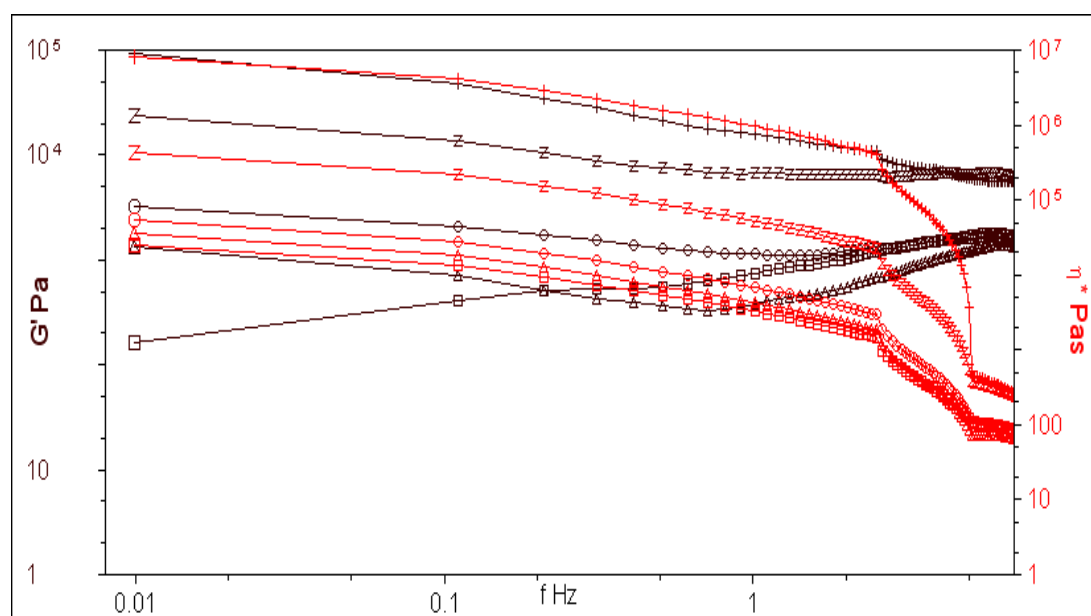
Στη περίπτωση των δειγμάτων που αποτελούνταν από φιβροΐνη (100%) τα αποτελέσματα είναι εκ διαμέτρου αντίθετα (σχήμα 15).



Σχήμα 15. Δυναμικές καμπύλες δειγμάτων φιβροΐνης 100% συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στη θερμοκρασία δωματίου: Δ,0 ημέρες; O, 3 ημέρες; □, 7 ημέρες; +, 10 ημέρες; Z, 14 ημέρες.

Παρατηρείται ότι το σύστημα μεταβάλλει τη δομή του σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης με την αύξηση των τιμών των ρεολογικών παραμέτρων και τη

μετάπτωση του από το καθεστώς του υγρού σε καθεστώς πηκτής με αύξηση του G' κατά δύο τάξεις μεγέθους από την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων μέχρι τη 14^η ημέρα αποθήκευσης. Τα παραπάνω ενισχύονται και από τις τιμές του η^* σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης. Τόσο οι τιμές του G' όσο και οι τιμές του η^* τη τελευταία ημέρα αποθήκευσης (14^η) παραμένουν σχεδόν σταθερές καθ' όλο το φάσμα συχνοτήτων ταλάντωσης που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό αποτελεί καθαρή απόδειξη ότι το σύστημα απέκτησε δομή και πλέον δεν ρέει ή ρέει ελάχιστα δηλ. μετατράπηκε σε πηκτή.

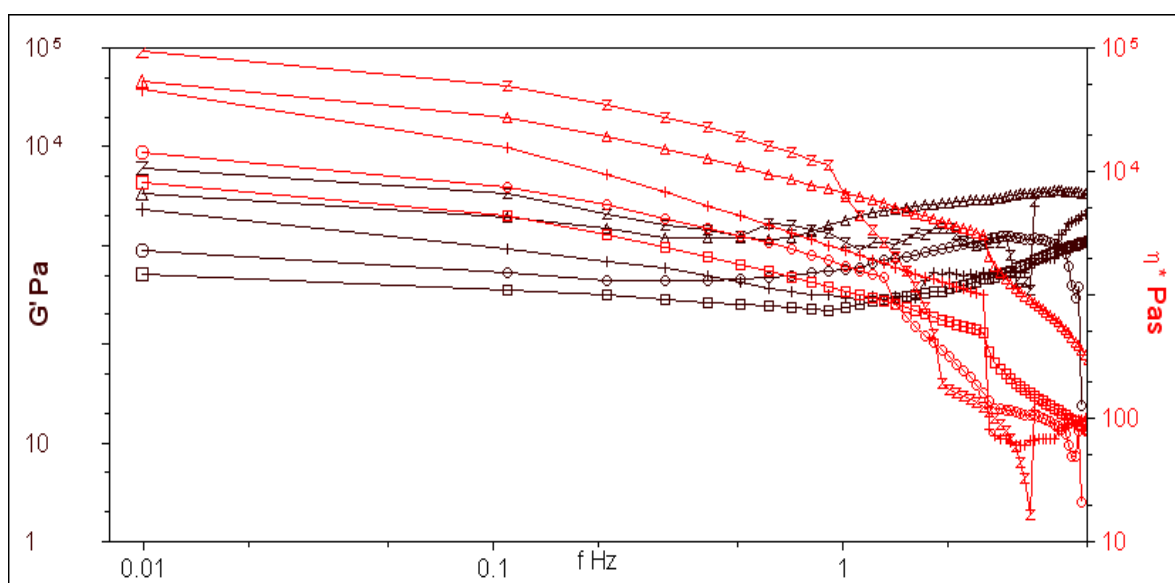


Σχήμα 16. Δυναμικές καμπύλες δειγμάτων φιβροΐνης 100% συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στους 4°C: Δ,0 ημέρες; O, 3 ημέρες; |, 7 ημέρες; +, 10 ημέρες; Z, 14 ημέρες

Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από τις μετρήσεις που έγιναν στους 4°C (σχήμα 16) με τη διαφορά ότι οι τιμές των ρεολογικών παραμέτρων είναι κατά μια τάξη μεγέθους υψηλότερες από εκείνες που μετρήθηκαν στη θερμοκρασία δωματίου που και στη περίπτωση αυτή οι δεσμοί που δημιουργούν τη δομή του συστήματος είναι ενθαλπικής φύσης.

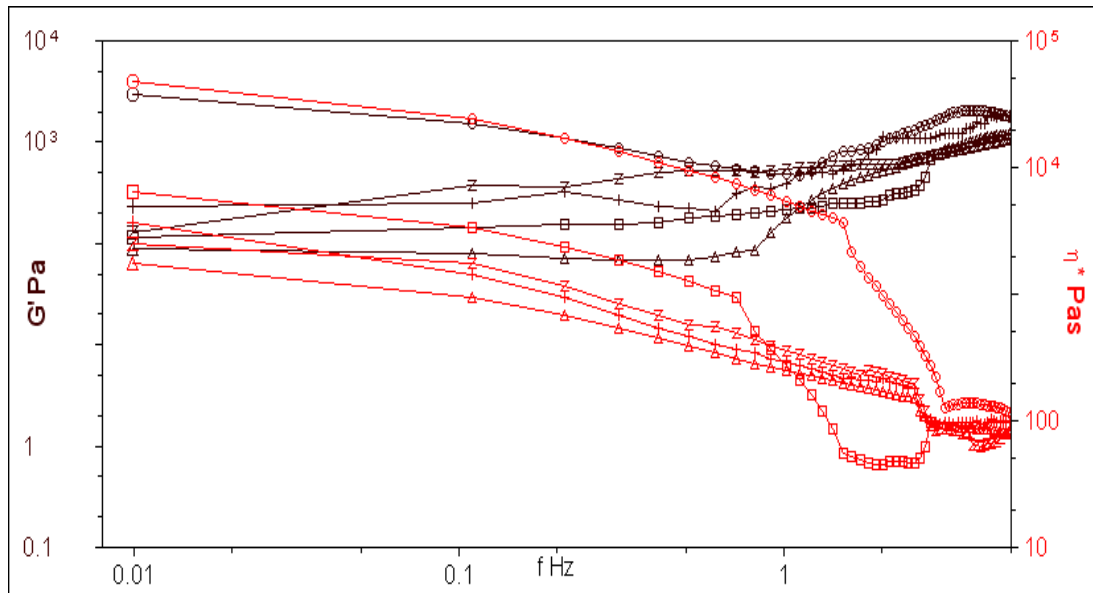
Η συμπεριφορά δειγμάτων που προέκυψαν από ανάμειξη των δύο βιοπολυμερών σε αναλογίες 25/75, 50/50, 75/25 όπως έδειξαν οι μετρήσεις που παρουσιάζονται

στα σχήματα 17 έως 22 βρίσκεται ανάμεσα σ' αυτή του δείγματος της καθαρής φιβροΐνης και αυτής της καθαρής γλυκομαννάνης. Παρατηρείται ότι η συμπεριφορά των μειγμάτων που μετρήθηκαν στους 4°C κλίνει περισσότερο προς αυτήν της φιβροΐνης για μείγματα 75/25 (φιβροΐνη/γλυκομαννάνη) και 50/50 και περισσότερο προς αυτή της γλυκομαννάνης και λιγότερο προς αυτήν της φιβροΐνης σε δείγματα που μετρήθηκαν στη θερμοκρασία δωματίου.



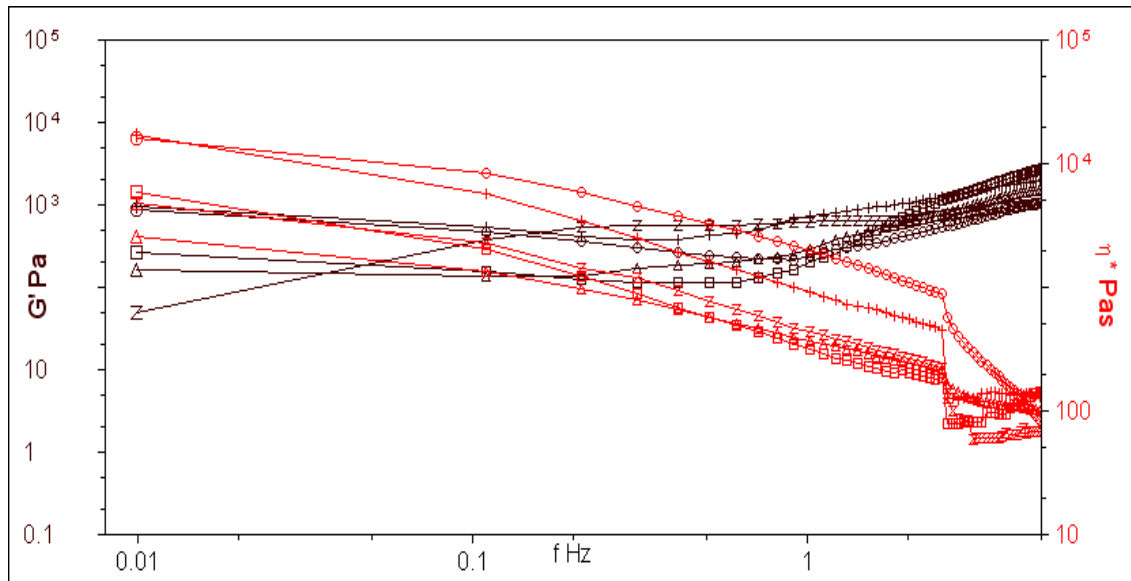
Σχήμα 17. Δυναμικές καμπύλες μειγμάτων (75% φιβροΐνη-25% γλυκομαννάνη) συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στη θερμοκρασία δωματίου: Δ, 0 ημέρες; O, 3 ημέρες; ∩, 7 ημέρες; +, 10 ημέρες; Z, 14 ημέρες.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 17 στα μίγματα που αποτελούνται από 75% φιβροΐνη και 25% γλυκομαννάνη οι τιμές του G' παραμένουν σχεδόν σταθερές καθ' όλο το φάσμα συχνοτήτων ταλάντωσης που χρησιμοποιήθηκαν και σε όλες τις μέρες που αποθηκεύτηκαν. Αυτό σημαίνει ότι ρέουν, όπως αποδεικνύεται και από τη μείωση του η^* αλλά ελάχιστα. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν τα δείγματα και στους 4°C αλλά σε μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη (Σχήμα 18).



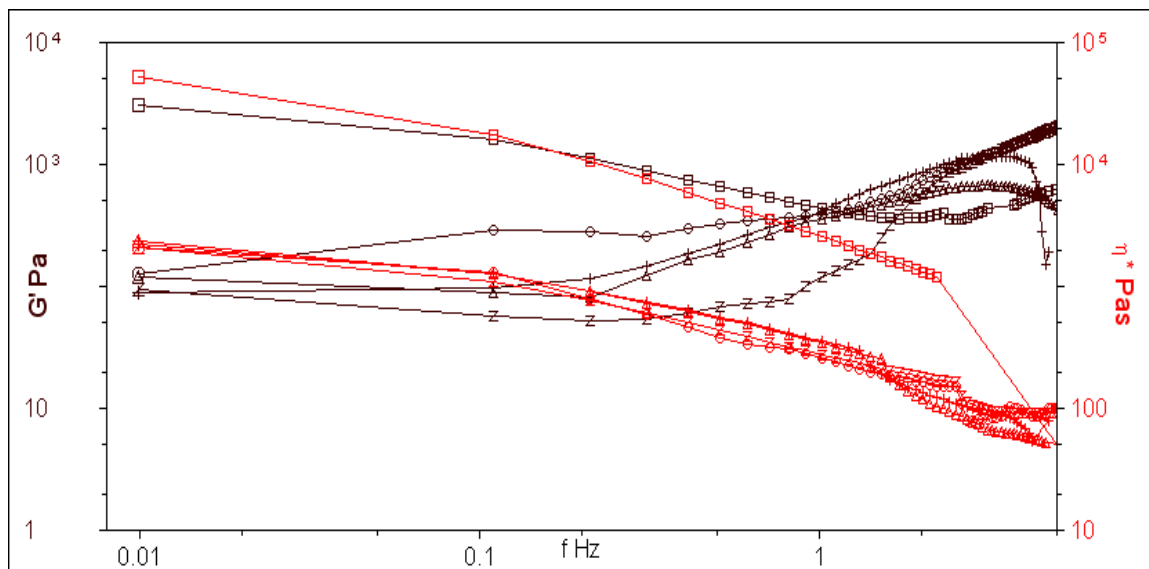
Σχήμα 18. Δυναμικές καμπύλες μειγμάτων (75% φιβροΐνη-25% γλυκομαννάνη) συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στους 4°C: Δ, 0 ημέρες; O, 3 ημέρες; +, 7 ημέρες; *, 10 ημέρες; Z, 14 ημέρες.

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 19 το σύστημα δεν μεταβάλλεται πολύ με την αύξηση του χρόνου αποθήκευσης καθώς οι τιμές του G' διατηρούνται στην ίδια τάξη μεγέθους. Τα δείγματα παρουσιάζουν συμπεριφορά ιξωδοελαστική, δηλαδή ρέουν όπως υποδηλώνεται από τη μείωση του η^* αλλά λίγο καθώς οι τιμές του G' παραμένουν σχεδόν σταθερές σε όλο το εύρος συχνοτήτων και ειδικά μετά την αποθήκευση 14 ημερών το δείγμα έχει σχηματίσει δομή πηκτής καθώς οι τιμές του G' παραμένουν σταθερές σε όλο το φάσμα συχνοτήτων ταλάντωσης που χρησιμοποιήθηκαν.



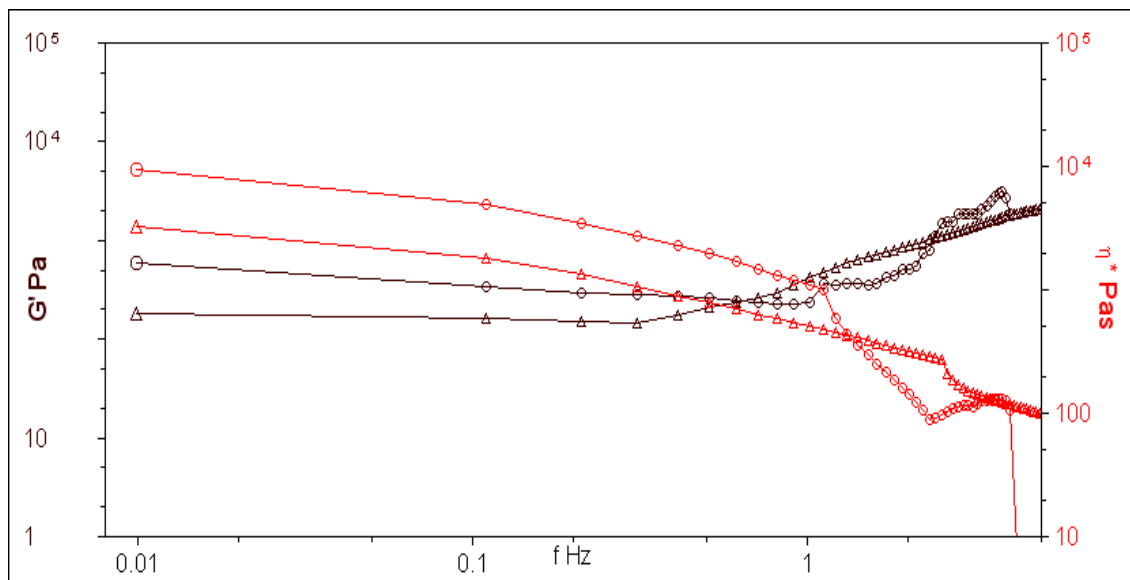
Σχήμα 19. Δυναμικές καμπύλες μειγμάτων (25% φιβροΐνη-75% γλυκομαννάνη) συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στη θερμοκρασία δωματίου: Δ,0 ημέρες; O, 3 ημέρες; ▤, 7 ημέρες; +, 10 ημέρες; Z, 14 ημέρες.

Ωστόσο διαφορετική συμπεριφορά παρουσιάζουν τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C (Σχήμα 20), τα οποία παρουσιάζουν συμπεριφορά υγρού η οποία υποδηλώνεται από τη συνεχή μείωση του σύνθετου ιξώδους και την αύξηση του G' με την αύξηση της συχνότητας παραμόρφωσης. Τα δείγματα μετά την αποθήκευση 7 ημερών παρουσίασαν αύξηση και στις δύο ρεολογικές παραμέτρους γεγονός που υποδηλώνει το σχηματισμό μιας πιο σταθερής δομής στην οποία όμως επήλθε χαλάρωση μετά την περαιτέρω αποθήκευση (10 και 14 ημέρες).

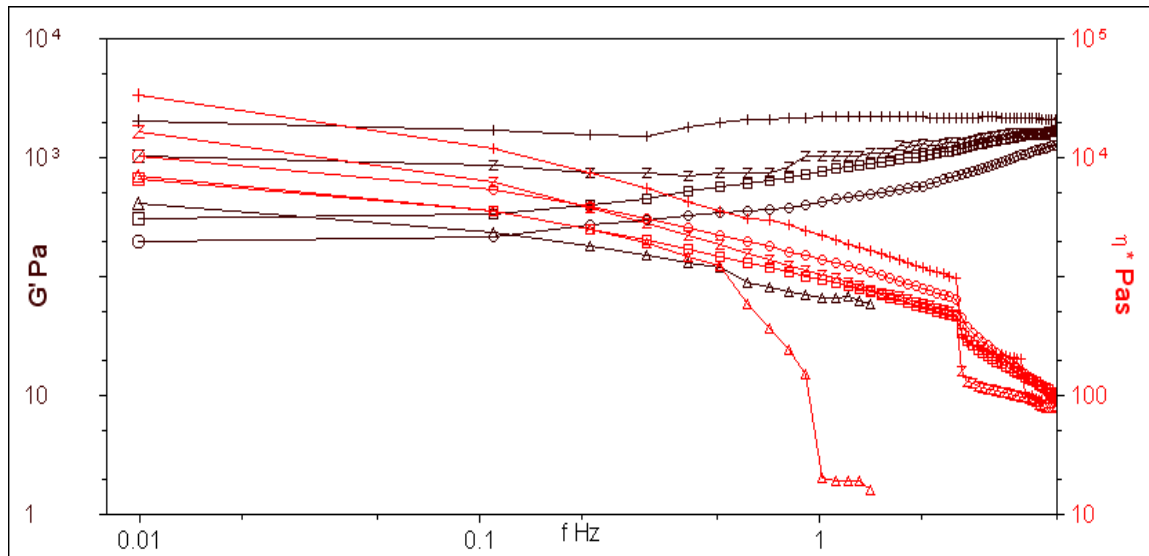


Σχήμα 20. Δυναμικές καμπύλες μειγμάτων (25% φιβροΐνη-75% γλυκομαννάνη) συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στους 4°C : Δ, 0 ημέρες; Ο, 3 ημέρες; †, 7 ημέρες; +, 10 ημέρες; Z, 14 ημέρες.

Τα δείγματα που περιείχαν 50% φιβροΐνη-50% γλυκομαννάνη στη θερμοκρασία δωματίου παρουσιάζουν αρχικά σε μικρές συχνότητες σχετικά σταθερές τιμές G' και η^* . Με την αύξηση της συχνότητας επέρχεται αύξηση του G' και ταυτόχρονη μείωση του η^* , δηλαδή τα δείγματα παρουσιάζουν συμπεριφορά υγρού. Η μείωση του σύνθετου ιξώδους σε συνάρτηση με την αύξηση της συχνότητας δείχνει ότι τα μοριακά συστατικά της δομής των δειγμάτων εμφανίζουν κινητικότητα με τους δεσμούς διασύνδεσης στο πλέγμα των δειγμάτων να ολισθαίνουν ο ένας σε σχέση με τον άλλο. Στα αντίστοιχα δείγματα που διατηρήθηκαν στους 4°C παρατηρείται μείωση των τιμών η^* και αύξηση των τιμών του G' με σταθεροποίηση του G' να συμβαίνει μετά την 10^η ημέρα. Άρα με την πάροδο του χρόνου τα δείγματα φαίνεται να ρέουν λιγότερο καθώς σταθεροποιείται η δομή τους. Οι ρεολογικές παράμετροι σε αυτή τη θερμοκρασία έχουν υψηλότερες τιμές από τις αντίστοιχες της θερμοκρασίας δωματίου, γεγονός που δείχνει την πιθανότητα ύπαρξης δεσμών ενθαλπικής φύσης.



Σχήμα 21. Δυναμικές καμπύλες μειγμάτων (50% φιβροΐνη-50% γλυκομαννάνη) συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στη θερμοκρασία δωματίου: Δ, 0 ημέρες; Ο, 3 ημέρες.



Σχήμα 22. Δυναμικές καμπύλες μειγμάτων (50% φιβροΐνη-50% γλυκομαννάνη) συναρτήσει συχνοτήτων 0,01-10 Hz και του χρόνου στους 4°C: Δ, 0 ημέρες; O, 3 ημέρες; ∩, 10 ημέρες; +, 14 ημέρες; Z, 17 ημέρες.

8. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που μπορούν να προκύψουν από τη παρούσα εργασία είναι τα ακόλουθα:

- Η φιβροΐνη δημιουργεί πιο συνεκτικά συστήματα από τη γλυκομαννάνη τα οποία κατά τη γήρανση εξελίσσονται σε πηκτές.
- Η γλυκομαννάνη διατηρεί τη συμπεριφορά του υγρού του οποίου η δομή χαλαρώνει κατά τη γήρανση.
- Οι δεσμοί των συστημάτων και των δύο βιοπολυμερών είναι ενθαλπικής φύσης.
- Η ανάμειξη των δύο βιοπολυμερών έχει αρνητική συνέργεια δηλ. η συνεκτικότητα του συστήματος που προκύπτει είναι χαμηλότερη εκείνης του συστήματος της φιβροΐνης και αυξάνει ως ένα βαθμό τη συνεκτικότητα του συστήματος της γλυκομαννάνης.

9. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- ψεκασμός των αλουμινένιων δειγματοφορέων με σπρέυ σιλικόνης έτσι που να αποφεύγεται η αντίδραση με τα δείγματα.
- τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται σε σταθερή θερμοκρασία. Τα δείγματα θερμοκρασίας δωματίου φυλάσσονταν στο εργαστήριο υπό μη ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας η οποία μεταβαλλόταν σημαντικά κατά τη διάρκεια της ημέρας.
- επανάληψη των πειραμάτων με διαλύματα φιβροΐνης και γλυκομαννάνης μεγαλύτερων συγκεντρώσεων.
- επανάληψη των πειραμάτων με έλεγχο του pH καθώς επηρεάζει την δημιουργία β-πτυχωτών φιβροΐνης και άρα τον σχηματισμό πηκτής.
- μελέτη της δομής των δειγμάτων φιβροΐνης-γλυκομαννάνης με τεχνική Περίθλασης Ακτινών Χ (XRD).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alonso-Sande, M., Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C., and Alonso, MJ., (2009). European Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **72**, 453–462.

Barbosa-Canovas,G.V., Kokini, J.,Ma, L., Ibarz,A (1996) The rheology of semiliquid foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, **39**, 1-69.

Chen, X., Knight, D. P., Shao, Z. & Vollrath, F. (2002). Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy: effect of potassium ions on Nephila spidroin films. *Biochemistry*, **41**, 14944–14950.

Chevillard, M., Couble, P. & Prudhomme, J. C. (1986). Complete nucleotide sequence of the gene encoding the Bombyx mori silk protein P25 and predicted amino acid sequence of the protein. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 6341–6342.

Dong, Z. Y., Lewis, R. V. & Middelhaugh, C. R. (1991). Molecular mechanism of spider silk elasticity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **284**, 53–57.

Fariba, G., Samira, V., and Ebrahim, V., (2010) Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review, **19** (5), 375-398.

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

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

Gibas, I. & Janik, H., (2010) Review: Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications, *Chemistry & Chemical Technology*, **4**, 297-304.

Gotoh, Y., Niimi, S., Hayakawa, T., and Miyashita, T., (2004). Preparation of lactose–silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, **25**(6), 1131–1140.

- Ha, S., Tonelli, A. and Hudson, S., (2005). Structural studies of Bombyx mori silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning, *Biomacromolecules*, **6** (3), 1722–1731.
- Hanawa, T., Maeda, R., Suzuki, M., Sugihara, M. and Nakajima, S., (2000). New Oral Dosage Form for Elderly Patients. III. Stability of Trichlormethiazide in Silk Fibroin Gel and Various Sugar Solutions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **26**(10), 1091–1097.
- Hardy, J., Romer, L. and Scheibel, T., (2008). Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*, **49**, 4309-4327.
- He, Y., Zhang, N., Li, W., Jia, N., Chen, B., Zhou, K., Zhang, J., Chen, Y., and Zhou, C., (2011). N-terminal Domain of Bombyx mori Fibroin Mediates the Assembly of Silk in Response to pH Decrease. *Journal of Molecular Biology*, **418**, 197-207.
- Horan, R.L., Collette, A.L., Lee, C., Antle, K., Chen, J.S., and Altman, G.H., (2006). Yarn design for functional tissue engineering. *Journal of Biomechanics*, **39**(12), 2232–40.
- Huang, L., Li, C., Yuan, W. and Shi, G., (2013). Strong composite films with layered structures prepared by casting silk fibroin-graphene oxide hydrogels. *Nanoscale*, **5**(9), 3780-3786.
- Jin, H.J., Park, J., Valluzzi, R., Cebe, P., and Kaplan, D.L., (2004). Biomaterial Films of Bombyx Mori Silk Fibroin with Poly (ethylene oxide). *Biomacromolecules*, **5**(3), 711–717.
- Karageorgiou, V., Meinel, L., Hofmann, S., Malhotra, A., Volloch, V. and Kaplan, D., (2004). Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, **71A** (3), 528–537.
- Kim, U.J., Park, J., Li, C., Jin, H., Valluzzi, R., and Kaplan, D., (2004). Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*, **5** (3), 786–792.

Kino, R., Ikoma, T., Yunoki, S., Monkawa, A., Matsuda, A., Kagata, G., Asakura, T., Munekata, M., and Tanaka, J., (2006). Biodegradation of Multilayer Silk Fibroin and Hydroxyapatite Composite Material. *Bioceramics*, **18**, 309–311, 1169–1172.

Knowles, T. P., Fitzpatrick, A. W., Meehan, S., Mott, H. R., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. & Welland, M. E. (2007). Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science*, **318**, 1900–1903.

Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S., Wang, X. (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**(4), 457-470.

Lancashire, R., (2012). Chemistry of Garments: Animal Fibres.

http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Textiles/Animal_Fibres.html

Lammel, A., Hu, X., Park, S., Kaplan, D. and Scheibel, T., (2010). Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*, **31** (16), 4583-4591.

Lopes da Silva, J.A., Rao, A. M. (1999) Rheology of fluid and semisolid foods principles and applications, *Rheological behavior of food systems*, 319-368.

Lu, S.Z., Wu, X.L. and Luo, M.Q., (2011). Silk fibroin sol-gel transitions in different solutions. *China International Silk Conference on Inheritance and Innovation - Modern Silk Road (conference article)*.

Ma, Y., Feng, Q. and Bourrat, X., (2013). A novel growth process of calcium carbonate crystals in silk fibroin hydrogel system. *Materials Science and Engineering C*, **33**(4), 2413-2420.

Matsumoto, A., Chen, J., Collette, A.L., Kim, U.J., Alyman, G.H., Cebe, P. and Kaplan, D.L., (2006). Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions. *Journal of Physical Chemistry B*, **110**(43), 21630-21638.

Moraes, M., Silva, M., Nogueira, GM. and Beppu, MM., (2009). Silk fibroin hydrogels formed by addition of ethanol.

Rajkhowa, R., Gupta, VB., and Kothari, VK., (2000). Tensile stress–strain and recovery behavior of Indian silk fibers and their structural dependence, *Journal of Applied Polymer Science*, **77** (11), 2418–2429.

Rao, M.A (1992) "Measurement of Viscoelastic Properties of Fluid and semisolid Foods", in *Viscoelastic Properties of Food*, M.A. Rao and J.F. Steffe (editors), 1-53, Marcel Dekker, New York

Rao, M.A. (1999) "Rheology of Fluid and Semisolid Foods-Principles and Applications", Aspen Publications, Inc, Maryland

Rajkhowa, R., Levin, B., Redmond, SL., Wang, L., Kanwar, JR., Atlas, MD. and Wang, X., (2011). Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, **97A** (1) 37–45.

Ratcliffe, I., Williams, P., English, R., Meadows, J., (2013). Small strain deformation measurements of konjac glucomannan solutions and the influence of borate cross-linking. *Carbohydrate Polymers*, **95**, 272–281.

Sah, M., & Pramanik, K., (2011). Preparation, characterization and in vitro study of biocompatible fibroin hydrogel. *African Journal of Biotechnology*, **40**, 7878-7892.

Sehna, F. and Žurovec, M., (2004). Construction of silk fiber core in lepidoptera. *Biomacromolecules*, **5** (3), 666–674.

Servoli, E., Maniglio, D., Motta, A., Predazzer, R., and Migliaresi, C., (2005). Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts, *Macromolecular Bioscience*, **5** (12), 1175–1183.

Solo-de-Zaldívar, B., Tovar, CA., Borderías, AJ., Herranz, B., (2013). Effect of deacetylation on the glucomannan gelation process for making restructured seafood products. *Food Hydrocolloids*.

Tabilo-Munizaga, G., Gustavo, V., and Barbosa-Cánovas, (2005). Rheology for the food industry *Journal of Food Engineering*, **67** 147–156.

Tao, H., Kaplan, DL., Omenetto, FG., (2012). Silk Materials — a road to sustainable high technology. *Advanced Materials*, **24** (2012), 2824–2837.

Vollrath, F. and Knight, DP., (2001). Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **410** (2001), 541–548.

Wu, X., Mao, L., Qin, D. and Lu, S., (2011). Impact of sterilization methods on the stability of silk fibroin solution, 2011. *International Conference on Advanced Design and Manufacturing Engineering (conference article)*.

Yamaguchi, K., Kikuchi, Y., Takagi, T., Kikuchi, A., Oyama, F., Shimura, K. & Mizuno, S. (1989). Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *Journal of Molecular Biology*, **210**, 127–139.

Zhao, H., Xiong, S., Li, M., Zhang, Q. and Liu, G., (2012). Comparison of gelation time and polyalcohol effect on hydrogels from domestic and wild silk fibroins. *Advances in Materials Science and Engineering*, **2012**.

Zhong, T., Deng, C., Gao, Y., Chen, M. and Zuo, B., (2012). Studies of in situ-forming hydrogels by blending PLA-PEG-PLA copolymer with silk fibroin solution. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **100 A**(8), 1983-1989.

Zhou, C. Z., Confalonieri, F., Jacquet, M., Perasso, R., Li, Z. G. & Janin, J. (2001). Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins*, **44**, 119–122.

Zhou, C., Confalonieri, F., Jacquet, M., Perasso, R., Li, Z. and Janin, J. (2001). Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, **44** (2), 119–122.

Zhou, C., Confalonieri, F., Medina, N., Zivanovic, Y., Esnault, C., Yang, T., Jacquet, M., Janin, J., Duguet, M., Perasso, R., and Li, Z. (2000). Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Research*, 2000, **28** (12), 2413-2419.