



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

## **ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Σύνθεση σωματιδίων από πολυσακχαρίτη κεφειράνης για εγκλεισμό θρεπτικών  
ουσιών ή φαρμάκων**

**Γιανάκ Όλγα  
Λάσκαρη Ζωή- Σπυριδούλα**

**Θεσσαλονίκη 2014**

**Σύνθεση σωματιδίων από πολυσακχαρίτη κεφιράνης για εγκλεισμό θρεπτικών  
ουσιών ή φαρμάκων**

**Γιανάκ Όλγα  
Λάσκαρη Ζωή- Σπυριδούλα**

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

**Θεσσαλονίκη 2014**

**Καραγεωργίου Βασίλης**

### Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στον καθηγητή μας, Καραγεωργίου Βασίλη για τις πολύτιμες συμβουλές του, την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη που μας έδειξε καθ 'όλη τη διάρκεια της έρευνας και συγγραφής αυτής της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον υποψήφιο διδάκτορα, Εξαρχόπουλο Στέλιο για τις πολύτιμες συμβουλές και την υπομονή που επέδειξε κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της πτυχιακής εργασίας μας και τον ερευνητικό συνεργάτη Φιλόθεου Ανδρέα για τη βοήθεια του στην διεκπεραίωση της εργασίας μας. Τέλος, τις οικογένειες μας για την συμπαράσταση και υποστήριξη που έδειξαν.

**Σύνθεση σωματιδίων από πολυσακχαρίτη κεφιράνης για εγκλεισμό θρεπτικών ουσιών ή φαρμάκων**

**Γιανάκ Όλγα**

**Λάσκαρη Ζωή- Σπυριδούλα**

**ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής,  
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 54101 Θεσσαλονίκη, Τ.Θ. 14561**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο εγκλεισμός αλβουμίνης βοείου ορού σε σωματίδια κεφιράνης και μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης, η επίδραση της διατομής της βελόνας και του ρυθμού ροής της αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση της μερικής υδρόλυσης της κεφιράνης στο μέγεθος, στο δείκτη πολυδιασποράς, στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο. Η καλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης παρατηρήθηκε με συγκέντρωση αλβουμίνης 0,1% w/v. Η αύξηση της ροής της αιθανόλης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποτελεσματικότητας και την μείωση του φορτίου, ενώ η μείωση της διατομής της βελόνας μείωσε την αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης. Η μερική υδρόλυση επέφερε μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και αύξηση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης. Επιπλέον, μελετήθηκε ο εγκλεισμός του καζεϊνικού νατρίου και τέλος, η απελευθέρωση των δυο αυτών πρωτεϊνών με την πάροδο του χρόνου από τα σωματίδια, όπου δεν παρατηρήθηκε η απελευθέρωση τους.

Περιεχόμενα :	
1. Εισαγωγή	7
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	8
2.1 Νανοτεχνολογία	8
2.1.1 Σημασία νανοσωματιδίων	8
2.1.2 Ενθυλάκωση	9
2.1.3 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων από πολυσακχαρίτες	11
2.1.4 Θεωρία ελεγχόμενης απελευθέρωσης	14
2.2 Κεφιράνη	18
3. Σκοπός της εργασίας	19
4. Πειραματικό Μέρος	19
4.1 Υλικά	19
4.1.1 Αντιδραστήρια	19
4.1.2 Όργανα	19
4.2 Μέθοδοι ανάλυσης	20
4.2.1 Εγκλεισμός αλβουμίνης βοείου ορού σε σωματίδια κεφιράνης	20
4.2.1.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης βοείου ορού	21
4.2.1.2 Επίδραση του ρυθμού παροχής αιθανόλης	22
4.2.1.3 Επίδραση της διατομής της βελόνας	22
4.2.1.4 Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια του σωματιδίου κεφιράνης	22
4.2.1.5 Μελέτη απελευθέρωσης αλβουμίνης βόειου ορού από σωματίδια κεφιράνης	22
4.2.1.6 Μέθοδος εγκλεισμού αλβουμίνης βόειου ορού σε μερικώς υδρολυμένα σωματίδια κεφιράνης με τριφθοροξικό οξύ	23
4.2.1.7 Εγκλεισμός καζεϊνικού νατρίου σε σωματίδια κεφιράνης	23
4.2.1.8 Μελέτη απελευθέρωσης καζεϊνικού νατρίου από σωματίδια κεφιράνης	25
4.2.1.9 Μέτρηση μεγέθους και δείκτης πολυδιασποράς σε σωματίδια κεφιράνης	25
4.3 Στατιστική ανάλυση	25
5. Αποτελέσματα –συζήτηση	25
5.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο των σωματιδίων κεφιράνης	25
5.2 Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφιράνης	27
5.3 Επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο αλβουμίνης	28
5.4 Επίδραση της διατομής της βελόνας στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο αλβουμίνης	30
5.5 Μελέτη απελευθέρωσης αλβουμίνης βόειου ορού από σωματίδια κεφιράνης με την πάροδο του χρόνου	31

5.6 Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου	32
5.7 Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς σε σωματίδια κεφίρανης με αλβουμίνη και στο φορτίο των σωματιδίων κεφίρανης	33
5.8 Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης μετά από μερική υδρόλυση	35
5.9 Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης	35
5.10 Επίδραση της προσθήκης καζεϊνικού νατρίου στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης	37
5.11 Επίδραση των διαφορετικών πρωτεϊνών στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο των σωματιδίων κεφίρανης	37
5.12 Μελέτη της απελευθέρωσης καζεϊνικού νατρίου από σωματίδια κεφίρανης με την πάροδο του χρόνου	39
6. Συμπεράσματα	40
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	41
8. Βιβλιογραφία	42
9. Παραρτήματα	45

## 1.Εισαγωγή

Τα μικροσωματίδια που φτιάχνονται από πολυμερή παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως συστήματα μεταφοράς (delivery systems) για τα τρόφιμα και για φαρμακευτικές εφαρμογές. Στη βιομηχανία των τροφίμων υπάρχουν ποικίλα συστατικά τροφίμων όπως βιταμίνες, προβιοτικά, γεύσεις, αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες κ. α που μπορούν να εγκλειστούν σε μικροσωματίδια (Li et al., 2009) .

Για εφαρμογές στα τρόφιμα τα μικροσωματίδια θα μπορούσαν όχι μόνο να καλύψουν τη δυσάρεστη γεύση ορισμένων συστατικών αλλά και να προστατέψουν τα συστατικά των τροφίμων από αποικοδόμηση (denaturalization) ( Li et al., 2009) .

Τα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις συμβατικές δοσολογικές μορφές, οι οποίες περιλαμβάνουν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα, μειωμένη τοξικότητα, μπορούν να καταλήξουν σε στοχευόμενα όργανα και έχουν ιδιότητες ελεγχόμενης απελευθέρωσης εξαιτίας της βιοαποικοδόμησης τους (Liu et al .,2007) .

Η κεφιράνη είναι ένας υδατοδιαλυτός μικροβιακός πολυσακχαρίτης που λαμβάνεται από τη χλωρίδα των κόκκων κεφίρ και περιέχει περίπου ίσες ποσότητες γλυκόζης και γαλακτόζης (Ghamselou et al., 2011) .

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν ο εγκλεισμός της αλβουμίνης βόειου ορού και καζεϊνικού νατρίου σε σωματίδια κεφιράνης, καθώς και η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων. Τέλος μελετήθηκε η απελευθέρωση αυτών των ουσιών από τα σωματίδια κεφιράνης με την πάροδο του χρόνου.

## 2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1 Νανοτεχνολογία

Η νανοτεχνολογία ασχολείται με την ανάπτυξη και αξιοποίηση των δομών και τα χαρακτηριστικά των οργανωτικών συσκευών στην ενδιάμεση κλίμακα μεταξύ μεμονωμένων μορίων και περίπου 100 nm, όπου νέες ιδιότητες προκύπτουν σε σύγκριση με τα υλικά χύμα (bulk), δηλαδή υπάρχει δυνατότητα να δημιουργηθούν προσαρμοσμένες νανοδομές και διατάξεις για συγκεκριμένες λειτουργίες με έλεγχο σε ατομικό και μοριακό επίπεδο (Roco., 1999) .

Η νανοτεχνολογία αναγνωρίζεται ως αναδυόμενη τεχνολογία που επιτρέπει για τον 21<sup>ο</sup> αιώνα καθορισμένους τομείς πληροφοριών πέραν της τεχνολογίας και βιοτεχνολογίας . Αυτό οφείλεται στην επιστημονική σύγκλιση της φυσικής, χημείας, βιολογίας, των υλικών και της μηχανικής στη νανοκλίμακα, και στη σημασία του ελέγχου της ύλης σε νανοκλίμακα σχεδόν όλων των τεχνολογιών. (Roco., 1999)

Η παρασκευή νανοσωματιδίων είναι ένα βασικό στοιχείο της νανοτεχνολογίας , διότι οι ειδικές ιδιότητες που προκύπτουν από τα νανοσωματίδια, τους νανοκρυστάλλους ή τις νανοεπιστρώσεις (nanolayer) και την συναρμολόγηση των πρόδρομων σωματιδίων και συναφών δομών είναι η πιο γενική διαδρομή για την παραγωγή νανοδομημένων υλικών. Σημαντικοί τομείς που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τα νανοσωματίδια και την νανοτεχνολογία είναι τα υλικά προηγμένης τεχνολογίας, όπως τα ηλεκτρονικά, τα βιοτεχνολογικά, τα φαρμακευτικά και οι αισθητήρες (Roco., 1999) .

#### 2.1.1 Σημασία νανοσωματιδίων

Οι διεργασίες παραγωγής νανοσωματιδίων αποσκοπούν στο να επωφεληθούν από τα τέσσερα είδη επιδράσεων:

- ✓ Νέες φυσικές, χημικές ή βιολογικές ιδιότητες που προκαλούνται από την κλιμάκωση μεγέθους.

Μικρότερο μέγεθος σωματιδίων καθορίζει μεγαλύτερη διεπιφανειακή περιοχή, έναν αυξημένο αριθμό των μορίων στις διεπιφάνειες των σωματιδίων, κβαντικές ηλεκτρομαγνητικές αλληλεπιδράσεις, αυξημένη τάση (tension) στην επιφάνεια και αποτελεσματική επίδραση στο μέγεθος (size confinement effects). Οι κυματοειδείς ιδιότητες των ηλεκτρονίων μέσα στη ύλη επηρεάζονται από τις διαφοροποιήσεις του όγκου και του σχήματος στην κλίμακα του νανόμετρου.

- ✓ Νέα φαινόμενα οφείλονται στη μείωση του μεγέθους στο σημείο όπου η αλληλεπίδραση κλίμακας μήκους των φυσικών, χημικών και βιολογικών φαινομένων συγκρίνεται με το μέγεθος των σωματιδίων ή των αντίστοιχων κόκκων μικροδομής.(microstructure grain)



- ✓ Παραγωγή νέων ατομικών, μοριακών και μακρομοριακών δομών των υλικών με τη χρήση διαφόρων μεθόδων:
- ✓ Χημεία (τρισεδιάστατη δομή μακρομορίων) , νανοκατασκευή (δημιουργία νανοδομών σε επιφάνειες, χειραγώγηση τρισεδιάστατων δομών) ή η βιοτεχνολογία (εξελικτική προσέγγιση βιο- υφής και τρισεδιάστατη μοριακή αναδίπλωση) .
- ✓ Σημαντική αύξηση του βαθμού πολυπλοκότητας και της ταχύτητας των διεργασιών σε συστήματα σωματιδίων. Αλλάζει η κλίμακα του χρόνου, λόγω των μικρότερων αποστάσεων και του αυξημένου φάσματος των δυνάμεων με εγγενώς σύντομη χρονική κλίμακα (Roco., 1999) .

### 2.1.2 Ενθυλάκωση

Η Ενθυλάκωση είναι η τεχνολογία που χρησιμοποιείται για εγκλεισμό ευαίσθητων συστατικών ( βιοενεργά συστατικά, βιταμίνες, αρώματα κλπ) μέσα σε προστατευτικά πλέγματα από άλλα υλικά ( υδατάνθρακες, μαλτοδεξτρίνες, κολλοειδή κλπ ) ώστε να προστατευθούν από δυσμενείς επιδράσεις του περιβάλλοντος το οποίο βρίσκονται ή κατά την εφαρμογή επεξεργασιών το οποίο υφίστανται. Ευαίσθητα συστατικά στη θερμότητα ή στην οξείδωση μπορούν να προστατευτούν με εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας. Επίσης, με την κατάλληλη επιλογή του μέσου μέσα στο οποίο θα προστατευθεί το ευαίσθητο υλικό, μπορεί να ελεγχθεί και ο χρόνος απελευθέρωσης του ώστε να προκύψει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα (Τσακιρόγλου., 2013).

#### Πλεονεκτήματα ενθυλάκωσης

- Αύξηση της διαλυτότητας των ουσιών σε συγκεκριμένο μέσο εγκλεισμού
- Αύξηση του χρόνου αποθήκευσης των ουσιών, και συνεπώς του χρόνου ζωής τους
- Κάλυψη μη επιθυμητής οσμής και γεύσης
- Διατήρηση του αρώματος των ουσιών κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους
- Προστασία από μικροβιολογικές μολύνσεις
- Δημιουργία σταθερών και τυποποιημένων συστατικών
- Μετατροπή υγρών ουσιών σε στερεή σκόνη, με αποτέλεσμα ευκολότερο χειρισμό και χορήγηση των ουσιών, χαμηλό κόστος αποθήκευσης και συσκευασίας και εξοικονόμηση ανθρώπινου δυναμικού
- Προστασία των δραστικών συστατικών από τη θερμότητα και το φώς
- Ελεγχόμενη απελευθέρωση των ουσιών

- Μείωση της οξειδωσης και των τοξικών προϊόντων που αυτή παράγει
- Αποφυγή αλληλεπίδρασης των συστατικών

### **Μέθοδοι ενθυλάκωσης**

Οι πιο γνωστοί μέθοδοι ενθυλάκωσης είναι οι χημικοί και μηχανικοί:

Χημικοί μέθοδοι

- Διαχωρισμός φάσεων (coarsening)
- Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complex)
- Προσρόφηση (adsorption)
- Συγκρυστάλλωση (co-crystallization)

Μηχανικοί μέθοδοι

- Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη
- Περιστρεφόμενος δίσκος (spinning disc)
- Εξώθηση ή εκβολή (extrusion)
- Ψύξη με ψεκασμό (spray cooling /spray chilling)
- Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)
- Ρευστοποιημένη κλίνη

### **Μέσα εγκλεισμού**

Ως μέσα εγκλεισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά υλικά, το καθένα από τα οποία παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα, όσο και μειονεκτήματα. Οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι υδατάνθρακες, η κυτταρίνη, τα κόμμεα, αλλά και άλλες συνθετικές ενώσεις που προκύπτουν από το συνδυασμό των παραπάνω, αποτελούν παράδειγμα τέτοιων υλικών.

Η επιλογή της ουσίας που θα χρησιμοποιηθεί ως μέσο εγκλεισμού είναι πολύ σημαντική και δεν γίνεται τυχαία αλλά εξαρτάται από τη φύση του προς ενθυλάκωσης συστατικού και άλλους σημαντικούς παράγοντες.

Οι παράγοντες αυτοί έγκεινται στο ότι το μέσο θα πρέπει να μην αντιδρά με το συστατικό, να παρέχει τη καλύτερη δυνατή προστασία του συστατικού από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, να έχει εύχρηστη μορφή (π. χ. χαμηλό ιξώδες ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις) , να γαλακτωματοποιείται εύκολα και τέλος, να παρέχει τη δυνατότητα απελευθέρωσης των συστατικών σε συγκεκριμένο χρόνο και χώρο (Τσακιρόγλου., 2013).

### **2.1.3 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων από πολυσακχαρίτες**

#### **Κροκίδωση/ καθίζηση (Coacervation/precipitation)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πολυσακχαριτών που καθιζάνουν ή κροκιδώνονται όταν έρχονται σε επαφή με ένα αλκαλικό διάλυμα. Τα σωματίδια παράγονται με διασπορά του διαλύματος του πολυσακχαρίτη μέσα σε ένα αλκαλικό διάλυμα, όπως υδροξείδιο του νατρίου ή μεθανόλη χρησιμοποιώντας ένα ακροφύσιο πεπιεσμένου αέρα, σχηματίζοντας έτσι τα σωματίδια συσσωματώματος (the coacervate particles), τα οποία διαχωρίζονται και καθαρίζονται με διήθηση και πλένονται με ζεστό και κρύο νερό (Ariola et al., 2013) .

#### **Γαλάκτωμα με σχηματισμό σταυροδεσμών (emulsion by crosslinking)**

Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την εγκάρσια σύνδεση (the crosslinking) της αμινοοάδας των πολυσακχαριτών με ομάδες αλδεΐδης του παράγοντα σταυρωτής σύνδεσης (crosslinking agent). Γαλάκτωμα νερό σε έλαιο (W/ O) παρασκευάζεται και σταθεροποιείται με ένα επιφανειοδραστικό. Τότε το σταθεροποιημένο γαλάκτωμα συνδυάζεται με ένα παράγοντα σταυρωτής σύνδεσης όπως γλουταραλδεΐδη για να σχηματίσει σφαιρίδια(Ariola et al., 2013) .

#### **Αντίστροφα / ανάστροφα μικκύλια (Inverse/reverse micelles)**

Αντίστροφα μικκύλια είναι σταθερά μίγματα που αποτελούνται από νερό, λάδι και το επιφανειοδραστικό. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο είναι δυνατόν να ληφθούν μικρότερα πολυμερικά νανοσωματίδια (1-10 nm) με μια πιο ομοιόμορφη διανομή σε σύγκριση με άλλες μεθόδους παρασκευής. Το μέγεθος, η πολυδιασπορά και η θερμοδυναμική σταθερότητα των σωματιδίων διατηρούνται σε ένα δυναμικό σύστημα ισορροπίας. Η μέθοδος περιλαμβάνει την παρασκευή ενός διαλύματος επιφανειοδραστικού σε έναν οργανικό διαλύτη, στο οποίο προστίθενται το διάλυμα του πολυσακχαρίτη και η δραστική ουσία υπό συνεχή ανάδευση, σχηματίζοντας έτσι ένα διαφανές μικρογαλάκτωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται ο παράγοντας διασύνδεσης όπου διατηρείται υπό συνεχή ανάδευση (Ariola et al., 2013) .

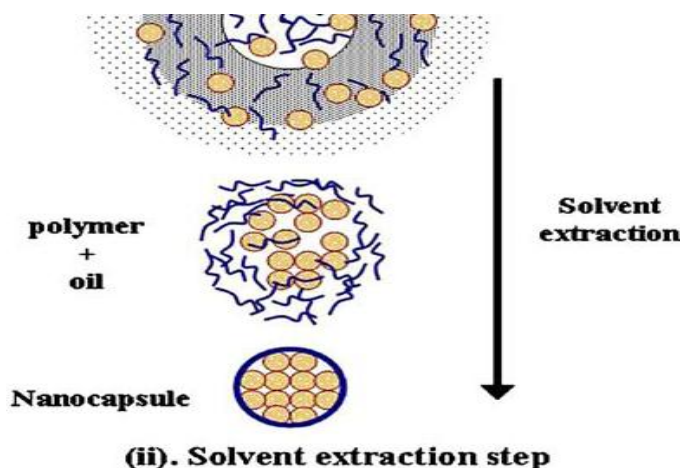
## Spray drying

Ξήρανση με ψεκασμό είναι η διαδικασία που χρησιμοποιείται πιο εκτεταμένα στη φαρμακευτική βιομηχανία για την επεξεργασία των πλεγμάτων (μήτρων) για να παράξουν ξηρές σκόνες, κόκκους και σφαιρίδια από διαλύματα και αιωρήματα πολυσακχαριτών. Αυτή η τεχνική είναι πολύ ευπροσάρμοστη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμοανθεκτικά φάρμακα, θερμοευαίσθητα φάρμακα, διαλυτά ή αδιάλυτα στο νερό και υδρόφιλα ή υδρόφοβα πολυμερή. Είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, είναι φθηνή, παράγει μικρού μεγέθους σωματίδια και μπορεί να αναδιατυπώσει τα σωματίδια υπό τη μορφή εναιωρημάτων, καψουλών ή δισκίων. Η μέθοδος αυτή θεωρείται γρήγορη, απλή και αποτελεσματική και βασίζεται στην ξήρανση των εκνεφομένων σταγονιδίων (atomized) από ένα ρεύμα θερμού αέρα.

Η τεχνική περιλαμβάνει την παρασκευή ενός διαλύματος από πολυσακχαρίτη στην οποία η δραστική ένωση και ο παράγοντας που δημιουργεί σταυροειδούς δεσμούς (γλουταραλδεύδη, ή τριπολυφωσφορικό νάτριο) προστίθενται διαδοχικά. Το προκύπτον διάλυμα ψεκάζεται μέσω ενός ρεύματος θερμού αέρα, προκαλώντας ταχεία εξάτμιση του διαλύτη για να σχηματιστούν τα επιθυμητά σωματίδια (Ariola et al., 2013).

## Γαλάκτωμα με εκχύλιση διαλύτη (Emulsion-solvent extraction)

Σε αυτή τη μέθοδο ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη μερικώς αναμίξιμο σε νερό σε ένα διάλυμα πολυσακχαρίτη που περιέχει ένα σταθεροποιητικό παράγοντα (δηλ. πολοξαμερές) υπό μηχανική ανάδευση, ακολουθούμενη από ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (Σχήμα 1). Το γαλάκτωμα στη συνέχεια αραιώνεται με μια μεγάλη ποσότητα ύδατος για την εκχύλιση του οργανικού διαλύτη. Τα νανοσωματίδια σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της διάχυσης του οργανικού διαλύτη σε νερό. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για υδρόφοβα φάρμακα και επιτρέπει ένα υψηλό ποσοστό φόρτωσης φαρμάκου (Peniche & Peniche., 2011).



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού σωματιδίων με γαλάκτωμα εκχύλισης διαλύτης (Vauthier & Bouchemal., 2009)

### **Συσσωμάτωση σταγονιδίων γαλακτώματος (emulsion – droplet coalescence)**

Η μέθοδος περιλαμβάνει την παρασκευή ενός σταθερού νερό σε έλαιο γαλάκτωμα ενός διαλύματος πολυσακχαρίτη σε υγρό έλαιο παραφίνης και ενός παρόμοιου αλλά με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου σαν την υδατική φάση. Με ανάμιξη και των δύο γαλακτωμάτων με έντονη ανάδευση, τα σταγονίδια συνενώνονται και μικρά σωματίδια πολυσακχαρίτη καθιζάνουν, και έτσι χρησιμοποιώντας αυτή τη διαδικασία τα νανοσωματίδια σχηματίζονται (Peniche & Peniche., 2011).

### **Ιοντική ζελατινοποίηση (ionic gelation)**

Τα νανοσωματίδια που προέρχονται από την διαδικασία της ιοντικής ζελατινοποίησης συντίθενται σε τελείως υδατικά μέσα. Ιονικές νανοπηκτές (ionic nanogels) μπορούν να ληφθούν από υδατικά διαλύματα φορτισμένων πολυσακχαριτών που πήζουν με την παρουσία μικρών ιόντων αντίθετης φόρτισης. Η πηκτωματοποίηση του πολυσακχαρίτη θα πρέπει να πραγματοποιείται σε πολύ αραιό διάλυμα χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις του παράγοντα σχηματισμού πήξης κάτω από το σημείο πήξης. Αυτό αντιστοιχεί στο στάδιο του προ-πήγματος στο οποίο οι αλυσίδες του πολυμερούς αντιδρούν με τον παράγοντα πηκτωματοποίησης σχηματίζοντας μικρά συμπλέγματα που μπορούν να επισημαίνονται με ηλεκτρονική μικροσκοπία ή από μια σαφή μείωση του ιξώδους του διαλύματος του πολυσακχαρίτη. Τα συμπλέγματα αυτά στη φάση του προ πήγματος σταθεροποιούνται σχηματίζοντας σύμπλοκα με φορτισμένους πολυηλεκτρολύτες (Tiyaboonthai., 2003).

### **Γαλακτωματοποίηση αντίστροφης αφαλάτωσης**

Η μέθοδος γαλακτωματοποίησης αντίστροφης αφαλάτωσης είναι παρόμοια με την μέθοδο διάχυσης γαλακτωματοποίησης του διαλύτη. Η κύρια διαφορά προέρχεται από την σύνθεση του γαλακτώματος. Το γαλάκτωμα μορφοποιείται με ένα διαλύτη πολυμερούς ο οποίος είναι συνήθως εντελώς αναμίξιμος με το νερό, όπως η ακετόνη. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τη γαλακτωματοποίηση του πολυμερούς διαλύματος στην υδατική φάση περιλαμβάνει τη διάλυση υψηλής συγκέντρωσης άλατος που έχει επιλεγεί για την έντονη αφαλάτωση που επιδρά στην υδατική φάση. Η κατακάθιση του διαλυμένου στα σταγονίδια του γαλακτώματος πολυμερούς μπορεί να προκληθεί μέσω αντίστροφης εξαλάτωσης η οποία επιτυγχάνεται απλώς με αραιώση του γαλακτώματος με περίσσεια νερού.

Πράγματι η αραίωση μειώνει την συγκέντρωση άλατος στη συνεχή φάση του γαλακτώματος που επάγει τον διαλύτη πολυμερούς να μεταναστεύει έξω από τα σταγονίδια του γαλακτώματος. Στην πράξη, χρησιμοποιούνται μηχανικές διαδικασίες για την παρασκευή του γαλακτώματος. Ένας κολλοειδής σταθεροποιητής όπως η πολυβινυλοαλκοόλη (PVA) μπορεί να προστεθεί στην υδατική φάση για να βελτιωθεί η σταθερότητα των τελικών πολυμερικών νανοσωματιδίων που παράγονται κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εγκλεισμό λιπόφιλων φαρμάκων τα οποία γενικά προστίθενται στο διάλυμα (Vauthier & Bouchemal., 2009).

### **Σύμπλοκο ηλεκτρολύτη (polyelectrolyte complex)**

Σύμπλοκο ηλεκτρολύτη ή αυτοσυναρμολόγηση πολυηλεκτρολύτη είναι ένας όρος για να περιγραφούν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από αυτοσυναρμολόγηση του κατιονικού φορτισμένου πολυμερούς και DNA πλασμιδίου. Ο μηχανισμός σχηματισμού συμπλόκου ηλεκτρολύτη περιλαμβάνει την εξουδετέρωση του φορτίου μεταξύ του κατιονικού πολυμερούς και του DNA που οδηγεί στη μείωση υδροφιλικότητας του πολυηλεκτρολύτη συστατικού αυτοσυναρμολόγησης. Αρκετά κατιονικά πολυμερή (δηλ. ζελατίνη, πολυαιθυλαμίνη), έχουν επίσης αυτή την ιδιότητα. Γενικότερα, αυτή η τεχνική είναι απλή και ήπια μέθοδος παρασκευής, χωρίς να εμπλέκονται δυσμενής συνθήκες. Το μέγεθος των συμπλόκων κυμαίνεται από 50 nm έως 700 nm (Tiyaboonchai., 2003) .

### **2.1.4 Θεωρία ελεγχόμενης απελευθέρωσης**

Η τεχνολογία της ελεγχόμενης απελευθέρωσης (controlled release) ενεργών ουσιών από πολυμερικές μήτρες αποτελεί αποτέλεσμα σύμπραξης διαφόρων επιστημών όπως η φαρμακευτική, χημεία πολυμερών και η νανοτεχνολογία. Βασική της ιδέα είναι ο συνδυασμός (είτε πρόκειται για εγκλωβισμό, είτε για διασύνδεση) μιας δραστικής ουσίας με κατάλληλο πολυμερικό (συνήθως) φορέα και η αποδέσμευσή της από τον τελευταίο, με προκαθορισμένο ρυθμό ώστε να μεγιστοποιείται η δράση της τόσο σε ένταση όσο και σε διάρκεια χρόνου (Ανδρικήκη., 2013).

Ένα σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης λαμβάνει χώρα όταν ένα υλικό συνδυάζεται με έναν ενεργό παράγοντα (π. χ. φάρμακο, βιοκτόνο ένωση) με τέτοιο τρόπο ώστε ο τελευταίος να αποδεσμεύεται από το υλικό με ένα προσχεδιασμένο και ελεγχόμενο τρόπο. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης, εκτός από τη δυνατότητα ελέγχου της συγκέντρωσης που αποδεσμεύεται παρατηρείται και η προστασία ευπαθών ουσιών (κυρίως για την περίπτωση φαρμάκων), η δυνατότητα στόχευσης, η μείωση προβλημάτων τοξικότητας κ.α.

Το σύστημα αποδέσμευσης όσον αφορά στη σύστασή του μπορεί να αποτελείται από βιοδιασπώμενα, μη βιοδιασπώμενα, διαλυτοποιήσιμα, βιοσυμβατά ή ανόργανα υλικά, ενώ η μορφή του ποικίλει από μικρο και νανο-σφαιρίδια, μέχρι ογκώδη εμφυτεύματα ή μεμβράνες. Σε όλες τις περιπτώσεις εμπλέκεται κάποιο φαινόμενο διάχυσης της δραστικής ουσίας από το πλέγμα που την εμπεριέχει. Ο μηχανισμός αυτός της απελευθέρωσης μπορεί να ελέγχεται από διάχυση οφειλόμενη στην μεταβαλλόμενη συγκέντρωση, μέσω διόγκωσης του πολυμερικού δικτύου ή μέσω αποικοδόμησης στην περίπτωση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερικών υλικών. Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης έχει εφαρμοστεί ευρέως σε διάφορους τομείς όπως η φαρμακευτική και ο τομέας των καλλυντικών, ενώ συναντάται και σε αρκετά καταναλωτικά προϊόντα, όπως είδη υγιεινής, συσκευασίες τροφίμων και είδη οικιακής χρήσης (Ανδρικήκη., 2013).

### **Μηχανισμοί απελευθέρωσης**

Τα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το μηχανισμό απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών από αυτά. Έτσι, υπάρχουν τα συστήματα στα οποία η αποδέσμευση γίνεται με διάχυση (diffusion-controlled systems), τα διογκώμενα ελεγχόμενα συστήματα (swelling – controlled systems) και τα χημικώς ελεγχόμενα συστήματα (chemically controlled systems) αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις αποδέσμευσης συμβαίνει συνδυασμός μηχανισμών (Ανδρικήκη., 2013).

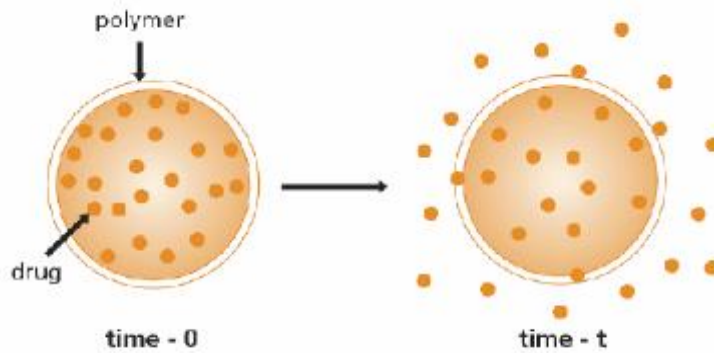
#### **➤ Συστήματα διάχυσης**

Τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης στα οποία ο κύριος μηχανισμός αποδέσμευσης είναι η διάχυση της δραστικής ουσίας από την πολυμερική μήτρα, η οποία αποτελεί τον υποδοχέα, έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών.

Στην βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί δύο τύποι τέτοιων συστημάτων, τα συστήματα μήτρας και τα συστήματα δεξαμενής. Η ενεργός ουσία και στους δύο αυτούς τύπους μπορεί να βρίσκεται είτε διαλυτοποιημένη είτε διασπαρμένη στην πολυμερική μήτρα. Η αποδέσμευση της ουσίας από την μήτρα στο εξωτερικό περιβάλλον, με διάχυση, πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια: (1) διάλυση της ενεργού ένωσης στην περιβάλλουσα μήτρα, (2) μοριακή διάχυση της ένωσης δια μέσου του πολυμερούς κατά μήκος της μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, (3) αποβολή της ένωσης από το πολυμερές και (4) διάχυση στο εξωτερικό περιβάλλον.

Στα συστήματα δεξαμενής, η δραστική ουσία η οποία μπορεί να είναι είτε σε στερεά κατάσταση, είτε σε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης που περιβάλλεται από μια μη αποικοδομήσιμη πολυμερική μεμβράνη. Το ποσό της ουσίας που αποδεσμεύεται συναρτήσει του χρόνου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την μεμβράνη και τα χαρακτηριστικά της (επιφάνεια, πάχος διαπερατότητα) (Σχήμα 2) (Ανδρικήκη., 2013).

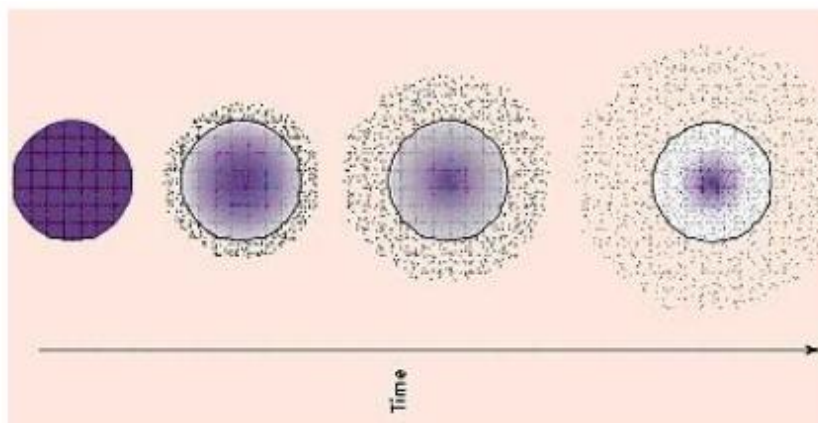




**Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της απελευθέρωσης μιας δραστικής ουσίας από ένα τυπικό σύστημα δεξαμενής (Ανδρικήκη., 2013).**

Από τη στιγμή που η πολυμερική μεμβράνη που χρησιμοποιείται ως περίβλημα της ουσίας, έχει ομοιόμορφο και μη μεταβλητό πάχος, ο ρυθμός αποδέσμευσης μπορεί να διατηρηθεί σταθερός.

Στα συστήματα μήτρας, το πολυμερές και ο ενεργός παράγοντας έχουν αναμιχθεί με τρόπο ώστε να δημιουργήσουν ένα ομογενές σύστημα. Ουσιαστικά, η ουσία βρίσκεται διεσπαρμένη ομογενώς στο πολυμερές. Η διάχυση πραγματοποιείται όταν η ουσία διαπερνά την πολυμερική μήτρα καταλήγοντας στον περιβάλλοντα χώρο. Σύμφωνα με την Ανδρικήκη (2013) ο ρυθμός αποδέσμευσης μιας ουσίας από την μήτρα στην οποία βρίσκεται ενσωματωμένη εξαρτάται από τον συντελεστή διάχυσης της ουσίας, την διαλυτότητα της στο πολυμερές και την αρχική συγκέντρωση της σε αυτό. Ένα τέτοιο σύστημα απεικονίζεται στο Σχήμα 3.



**Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της απελευθέρωσης μιας δραστικής ουσίας από συστήματα μήτρας (Ανδρικήκη., 2013).**



Αρχικά απομακρύνεται η ουσία που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια ενώ καθώς η αποδέσμευση συνεχίζεται, ο ρυθμός της συνήθως μειώνεται καθώς η στοιβάδα του πολυμερούς από την οποία η παραμένουσα ουσία θα πρέπει να αποδεσμευτεί, αυξάνεται. Έτσι, ο ενεργός παράγοντας έχει μια προοδευτικά μεγαλύτερη απόσταση να διανύσει, κάτι που απαιτεί και μεγαλύτερο χρόνο διάχυσης για την αποδέσμευση.

#### ➤ Διογκωμένα ελεγχόμενα συστήματα (swelling controlled systems)

Ένα σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης μπορεί επίσης να σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να αποδεσμεύσει τον ενεργό παράγοντα μόνο όταν βρεθεί στο κατάλληλο περιβάλλον. Στα συστήματα στα οποία ο μηχανισμός αποδέσμευσης στηρίζεται στην διόγκωση (swelling), τα πολυμερή απορροφούν υγρά και διογκώνονται. Η διόγκωση αυτή αυξάνει το περιεχόμενο του διαλύτη στο πολυμερές, κάτι που αναγκάζει την δραστική ένωση να αποδεσμευθεί. Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα υλικά αυτής της κατηγορίας είναι υδροπηκτές (hydrogels), που είναι πολυμερή τα οποία μπορούν να απορροφούν μεγάλες ποσότητες υγρών και σε καταστάσεις ισορροπίας αποτελούνται από 60-90% από υγρά και 10- 30 % από πολυμερές (Ανδρικήκη., 2013).

#### ➤ Χημικώς ελεγχόμενα συστήματα

Τα χημικώς ελεγχόμενα συστήματα στηρίζονται κυρίως σε βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή τα οποία διασπώνται ως αποτέλεσμα φυσικών βιολογικών διαδικασιών αποδεσμεύοντας έτσι την ενεργή ουσία. Τα συστήματα αυτά αποτελούν ένα μεγάλο τμήμα των πολυμερικών συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης κυρίως γιατί μπορούν να αποικοδομηθούν ενδογενώς. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται επίσης και τα πολυμερή στα οποία η δραστική ουσία αποδεσμεύεται λόγω μιας χημικής αντίδρασης (π.χ. υδρόλυση) (Ανδρικήκη., 2013).

#### **Παράγοντες που επηρεάζουν την αποδέσμευση**

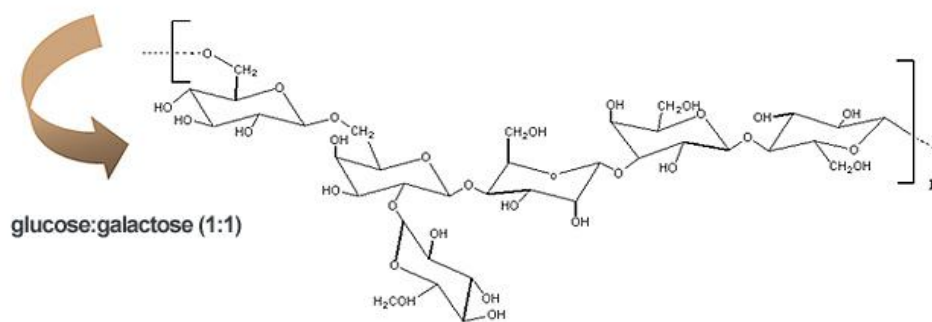
- ✓ Ο χρόνος επαφής
- ✓ Η επιφάνεια επαφής
- ✓ Η συγκέντρωση της ουσίας στο πολυμερές
- ✓ Η θερμοκρασία
- ✓ Η μοριακή δομή και οι ιδιότητες της ουσίας

- ✓ Το μοριακό βάρος της ουσίας
- ✓ Η δομή του πολυμερούς

## 2.2 Κεφίρανη

Η κεφίρανη, είναι ένας μικροβιακός εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης, που λαμβάνεται από την χλωρίδα των κόκκων κεφίρ, και σύμφωνα με τους (Ghasemlou et al., 2011; Piermaria et al., 2009) πιθανόν μελλοντικά να χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως παράγοντας υφής και πήξης καθώς βελτιώνει το ιξώδες και τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες των πηκτωμάτων όξινου γάλακτος, και η ίδια είναι επίσης σε θέση να σχηματίσει πηκτώματα σε χαμηλή θερμοκρασία με ενδιαφέρουσες ιξωδοελαστικές ιδιότητες (Ghasemlou et al., 2011; Piermaria et al., 2009).

Επίσης, είναι ένας υδατοδιαλυτός εξωπολυσακχαρίτης που παράγεται από τους *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefirgranum* και *Lactobacillus parakefir* που απομονώνεται από τους κόκκους κεφίρ και έχει μια επαναλαμβανόμενη δομή εξασακχαρίτη (hexasaccharide structure) με διακλάδωση [Glc-Gal-(-Glc)-Gal-Gal-Glc]<sub>n</sub>, (Σχήμα 4) (Uchida et al., 2010). Αυτό το πολυμερές αποτελείται από ίσες ποσότητες γλυκόζης και γαλακτόζης και το μοριακό της βάρος είναι περίπου  $7,6 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^6$  g / mol (Bader et al., 2010; Uchida et al., 2010) .



**Σχήμα 4. Χημική δομή κεφίρανης (Micheli et al., 1999)**

Επιπλέον, η κεφίρανη έχει πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων πολυσακχαριτών, όπως αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντινεοπλασματικές (αντικαρκινικές) ιδιότητες (Ghasemlou et al., 2011). Σε δοκιμές σε ζώα, η πρόσληψη κεφίρανης οδήγησε σε έντονη μείωση της υπέρτασης και των λιπιδίων του αίματος (blood fat). Ως εκ τούτου, προτάθηκε η εφαρμογή της κεφίρανης σε λειτουργικά τρόφιμα ( Bader et al., 2010).

### 3. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση σωματιδίων κεφιράνης και ο εγκλεισμός αλβουμίνης βοείου ορού και καζεϊνικού νατρίου στα σωματίδια αυτά. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών παραγόντων, όπως η μερική υδρόλυση της κεφιράνης, ο ρυθμός ροής αιθανόλης, η διατομή της βελόνας, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβουμίνης κ.α στον εγκλεισμό και στο μέγεθος των σωματιδίων. Τέλος, εξετάστηκε η απελευθέρωση της αλβουμίνης και του καζεϊνικού νατρίου από τα σωματίδια σε συνάρτηση με το χρόνο.

### 4. Πειραματικό Μέρος

#### 4.1 Υλικά

##### 4.1.1. Αντιδραστήρια

- Λυοφιλωμένη κεφιράνη υψηλής καθαρότητας περίπου 99% (Εξαρχόπουλος Στέλιος μη δημοσιευμένα δεδομένα)
- Χλωριούχο αργίλιο καθαρότητας 99% της εταιρίας Chem-Lab NV
- Αιθανόλη καθαρότητας 96.4%
- Λυοφιλωμένη σκόνη αλβουμίνης βοείου ορού (bovine serum albumin), της εταιρείας Sigma Aldrich, που φυλάσσεται στο ψυγείο (4°C).
- Καζεϊνικό νάτριο της εταιρίας Food Grade, προσφορά της ΜΕΒΓΑΛ
- Τριφθοροξικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας της εταιρίας Sigma Aldrich

##### 4.1.2. Όργανα

- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5418 της εταιρίας Eppendorf
- Υπερυπόκεντρος τύπου Evolution RC της εταιρίας Thermo Scientific
- Συσκευή προσδιορισμού μεγέθους σωματιδίων Mastersizer, τύπου Hydro 2000 της εταιρίας Malvern
- Συσκευή Brookhaven Z – potential
- Φασματοφωτόμετρο τύπου Ηελιος α, της εταιρίας Thermo Electron Corporation
- Κλίβανος τύπου Model 160 της εταιρίας Gallenkamp
- Αντλία με σύριγγα, της εταιρείας RAZEL Scientific Instruments
- Μεμβράνες διαπίδυσης CelluSep με Normal MWCO:3500
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Χαρακτηριστικά HPLC: Λογισμικό ParSEC Chromatography Software, ανιχνευτής πολλαπλών γωνιών σκέδασης Laser (MALS) της εταιρίας Brookhaven Instruments, δείκτης διάθλασης RI, θερμοκρασία στηλών και

ανιχνευτών 30 °C, παροχή 0,8 mL/min, κινητή φάση- νατραζίδιο 0,1 % υπερκάθαρο νερό, στήλες τύπου PL- aquagel- OH Mixed διαστάσεων 8µm, 300 x 7,5 mm της εταιρίας Varian.

## 4.2. Μέθοδοι ανάλυσης

### 4.2.1. Εγκλεισμός αλβουμίνης βοείου ορού σε σωματίδια κεφिरάνης

Η μέθοδος, που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή κεφिरάνης με υψηλό βαθμό καθαρότητας (περίπου 99%) , στηρίζεται στην κατακρήμιση των πρωτεϊνών με τριχλωροοξικό οξύ και στην καταβύθιση του πολυσακχαρίτη με αιθανόλη (Εξαρχόπουλος, μη δημοσιευμένα δεδομένα).

Για την σύνθεση σωματιδίων κεφिरάνης παρασκευάστηκαν 40 mL διάλυμα κεφिरάνης 1% w/v σε 5% w/v διάλυμα  $AlCl_3$  και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για 40 min στους 70°C ώστε να διαλυθεί η κεφिरάνη. Έπειτα το διάλυμα φιλτραρίστηκε με φίλτρο 1 µm και το φιλτραρισμένο διάλυμα τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης έτσι ώστε το διάλυμα να γίνει υδατικό μέσω της διαδικασίας της διαπίδυσης (dialysis). Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 5 L με απιονισμένο νερό και παρέμεινε υπό ανάδευση για περίπου 48 ώρες ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό pH, δηλαδή περίπου 7. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν η αλλαγή του απιονισμένου νερού ενώ η τελευταία αλλαγή γινόταν με υπερκάθαρο νερό και τέλος ακολουθούσε η μέτρηση του pH. Μετά τη διαπίδυση ο όγκος του διαλύματος μέσα στη μεμβράνη αυξήθηκε περίπου στο διπλάσιο επομένως το δείγμα μετά τη διαπίδυση είχε συγκέντρωση 0,5% w/v κεφिरάνη.

Στη συνέχεια, το υδατικό πλέον διάλυμα κεφिरάνης φιλτραρίστηκε ξανά με φίλτρο 1 µm. Το δείγμα διαιρέθηκε σε 2 ποτήρια ζέσεως από 20 mL στο καθένα. Στο ένα ποτήρι προστέθηκε αλβουμίνη βοείου ορού (BSA) , ενώ στο άλλο όχι. Τα 20 mL του κάθε ποτηριού διαιρέθηκαν σε 4 δείγματα με 5 mL διάλυμα το καθένα. Έπειτα, υπό ανάδευση στο κάθε δείγμα προστέθηκε με σταθερή ροή σταγόνα-σταγόνα αιθανόλη σε αναλογία 1:1 (αιθανόλη: υδατικό διάλυμα κεφिरάνης) με τη χρήση αντλίας σύριγγας για τη σύνθεση των σωματιδίων (Ma et al., 2008) . Ύστερα από το κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκαν 4 mL (σε 4 erpendorf από 1 mL το καθένα) στα 14000rcf για 10 min. Μετά τη φυγοκέντρωση μετρήθηκε η απορρόφηση των υπερκείμενων υγρών σε φασματοφωτόμετρο στα 280 nm, το μήκος κύματος που απορροφούν οι πρωτεΐνες.

Από την μέτρηση της απορρόφησης των υπερκείμενων υγρών υπολογίστηκε η ποσότητα της αλβουμίνης η οποία δεν είχε ενθυλακωθεί στα σωματίδια της κεφिरάνης με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας εγκλεισμού και του φορτίου. Επιπλέον, τα ιζήματα παρέμειναν

στον απαγωγό για 24 h ώστε να εξατμιστεί πλήρως το υγρό από τα υπερκείμενα και ζυγίστηκαν αφού προηγουμένως είχαν ζυγιστεί τα άδεια erpendorf.

Φορτίο αλβουμίνης: η ποσότητα της πρωτεΐνης που έχει ενθυλακωθεί

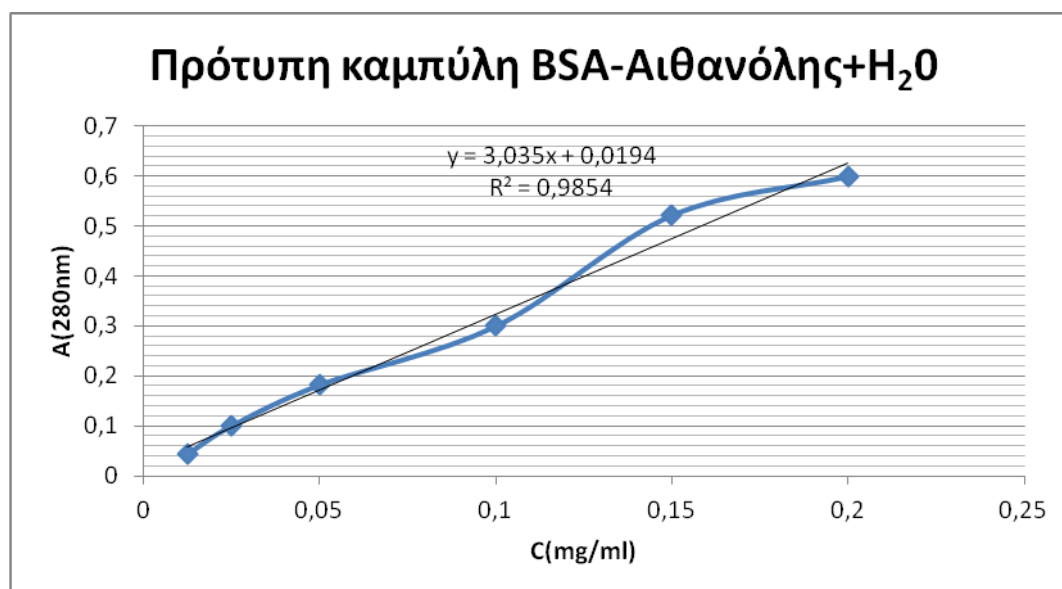
$$\text{Φορτίο} = \frac{\text{ενθυλακωμένη ουσία (mg)}}{\text{νανοσωματίδια (mg)}} * 100\%$$

Αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης: το ποσοστό της πρωτεΐνης που έχει ενθυλακωθεί

$$\text{Αποτελεσματικότητα} = \frac{\text{ενθυλακωμένη ουσία (mg)}}{\text{συνολικά mg ουσίας}} * 100\%$$

Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης αλβουμίνης -αιθανόλη:νερό

Σε αιθανόλη και νερό με αναλογία 1:1 διαλύθηκε αλβουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,0125- 0,025- 0,05- 0,05- 0,1- 0,15- 0,2 mg/mL) και στη συνέχεια μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων στα 280 nm.



#### 4.2.1.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης βοείου ορού

Παρασκευάστηκαν σωματίδια κεφίρανης σύμφωνα με το αρχικό πείραμα αλλά με διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβουμίνης ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν :

- Συγκέντρωση 0,05% w/v αλβουμίνης

- Συγκέντρωση 0,1% w/v αλβουμίνης
- Συγκέντρωση 0,2% w/v αλβουμίνης

#### **4.2.1.2 Επίδραση του ρυθμού παροχής αιθανόλης**

Για την μελέτη της επίδρασης του ρυθμού ροής της αιθανόλης παρασκευάστηκαν σωματίδια κεφिरάνης με 0,1% w/v αλβουμίνη σύμφωνα με το αρχικό πείραμα δυο φορές:

1. Με ρυθμό ροής 0,424mL/min που αντιστοιχεί σε σύριγγα των 5 mL
2. Με ρυθμό ροής 0,661mL/min που αντιστοιχεί σε σύριγγα των 10 mL

#### **4.2.1.3 Επίδραση της διατομής της βελόνας**

Για την μελέτη της επίδρασης της διατομής της βελόνας παρασκευάστηκαν σωματίδια κεφिरάνης με 0,1% w/v αλβουμίνη σύμφωνα με το αρχικό πείραμα δυο φορές:

1. Διατομή βελόνας 18G που αντιστοιχεί σε διατομή 1,2 mm
2. Διατομή βελόνας 21G που αντιστοιχεί σε διατομή 0,8 mm

#### **4.2.1.4 Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των σωματιδίων κεφिरάνης**

Για την μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις του z-δυναμικού στα διαλύματα:

- Διάλυμα κεφिरάνης 0,5% w/v (μετά από dialysis)
- Διάλυμα 0,1% αλβουμίνης w/v σε αιθανόλη/νερό με αναλογία 1:1
- Διάλυμα 0,1% αλβουμίνης w/v σε νερό
- Διάλυμα σωματιδίων κεφिरάνης χωρίς αλβουμίνη
- Διάλυμα σωματιδίων κεφिरάνης με 0,1% w/v αλβουμίνης

#### **4.2.1.5 Μελέτη απελευθέρωσης αλβουμίνης βόειου ορού από τα σωματίδια κεφिरάνης**

Τα σωματίδια κεφिरάνης με 0,1% w/v αλβουμίνη παρασκευάστηκαν όπως αναφέρθηκε στο αρχικό πείραμα. Μετά την προσθήκη αιθανόλης τα δείγματα

φυγοκεντρήθηκαν και στη συνέχεια από τα υπερκείμενα μετρήθηκε η απορρόφηση τους στο φασματοφωτόμετρο κατά τακτά χρονικά διαστήματα ( 0, 2, 6, 24, 48 h). Έτσι κάθε χρονική στιγμή επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία δηλαδή ακολουθούσε φυγοκέντρηση και μετά μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο για να εξεταστεί ο βαθμός απελευθέρωσης της αλβουμίνης βόειου ορού από τα σωματίδια κεφίρανης. Τα δείγματα παρέμειναν υπό σταθερή θερμοκρασία ( 37 °C) και υπό συνεχή ανάδευση καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος ( Liu et al., 2007).

#### **4.2.1.6 Μέθοδος εγκλεισμού αλβουμίνης βόειου ορού σε μερικώς υδρολυμένα σωματίδια κεφίρανης με τριφθοροξικό οξύ**

Αρχικά έλαβε χώρα η μερική υδρόλυση της κεφίρανης με 0,21% w/v τριφθοροξικού οξέος. Σύμφωνα με τους Ghasemlou et al., (2012) παρασκευάστηκε 30 mL διάλυμα 0,21% τριφθοροξικού οξέως και προστέθηκε 1% w/v κεφίρανη και υδρολύθηκε στους 80 ° C για 16 ώρες. Στη συνέχεια έγινε η φυγοκέντρηση του δείγματος σε υπερφυγόκεντρο στα 25000 g για 15 min και αμέσως μετά στο υπερκείμενο ακολουθήθηκε η διαδικασία της διαπίδυσης όπως περιγράφηκε στο αρχικό πείραμα. Ύστερα γίνονται οι απαραίτητες αλλαγές στο νερό μέχρι το pH του δείγματος να φτάσει στο επιθυμητό (  $\approx 7$  ). Κατόπιν το διάλυμα περάστηκε από φίλτρο 0,45  $\mu\text{m}$  και προσδιορίστηκε το μοριακό του βάρος με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης η οποία έδειξε ότι μειώθηκε από  $7 \times 10^5$  kDa σε  $7 \times 10^4$  kDa.

Μετάπειτα παρασκευάζονται τα σωματίδια κεφίρανης όπως το αρχικό πείραμα. Τα 30 mL διαλύματος χωρίζονται σε 6 ίσα δείγματα από τα οποία στα 3 δείγματα προστίθεται ποσότητα αλβουμίνης βόειου ορού. Στη συνέχεια σχηματίζονται τα σωματίδια κεφίρανης με την προσθήκη αιθανόλης σε αναλογία 1:1 με την αντλία σύριγγας και αμέσως μετά τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 14000 g για 10 min όπου χρησιμοποιούνται 4 επεντορφάκια του 1 mL για κάθε δείγμα.

Ακολούθησε απορρόφηση των υπερκειμένων στο φασματοφωτόμετρο στους 280 nm όπου εκεί απορροφούν οι πρωτεΐνες με σκοπό να προσδιοριστεί η ποσότητα της αλβουμίνης βόειου ορού που έχει εγκλειστεί στα σωματίδια κεφίρανης ενώ τα ιζήματα παρέμειναν για μέρα στον απαγωγό για να πλήρη ξήρανσή τους με σκοπό να υπολογιστεί το φορτίο των δειγμάτων. Η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού και το φορτίο αλβουμίνης υπολογίστηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω με την βοήθεια των πρότυπων καμπυλών.

#### **4.2.1.7 Εγκλεισμός καζεϊνικού νατρίου σε σωματίδια κεφίρανης**

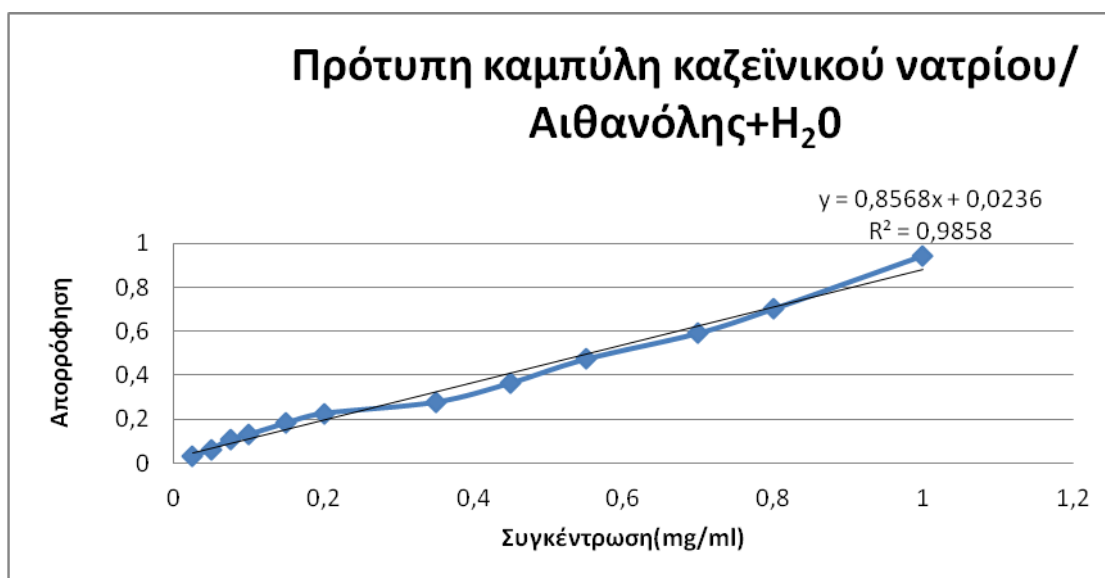
Για την σύνθεση σωματιδίων κεφίρανης παρασκευάστηκε 45mL διάλυμα κεφίρανης όπως περιγράφηκε στα αρχικό πείραμα. Το δείγμα διαιρέθηκε σε 2 ποτήρια ζέσεως, 15 mL στο ένα και 30 mL στο άλλο. Προηγουμένως, είχε παρασκευαστεί υδατικό διάλυμα καζεϊνικού νατρίου 0,25% w/v. Στο ποτήρι με διάλυμα κεφίρανης 15 mL

προστέθηκαν 15 mL καζεϊνικού νατρίου και στη συνέχεια το δείγμα μοιράστηκε ισομερώς σε 3 ποτήρια ζέσεως και τα υπόλοιπα 30 mL από το δεύτερο ποτήρι μοιράστηκαν και αυτά ισομερώς σε 3 ποτήρια. Έπειτα, υπό ανάδευση στο κάθε δείγμα προστέθηκε με σταθερή ροή σταγόνα-σταγόνα αιθανόλη σε αναλογία 1:1 (αιθανόλη: υδατικό διάλυμα κεφίρανης ή αιθανόλη: υδατικό διάλυμα κεφίρανης/διάλυμα καζεϊνικού νατρίου ) με τη χρήση αντλίας σύριγγας για τη σύνθεση των σωματιδίων (Ma et al., 2008). Ύστερα από το κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκαν 4 mL (σε 4 erpendorf από 1mL το καθένα) στα 14000 rcf για 10min. Μετά τη φυγοκέντρωση μετρήθηκε η απορρόφηση των υπερκείμενων υγρών σε φασματοφωτόμετρο στα 280nm, το μήκος κύματος που απορροφούν οι πρωτεΐνες.

Από την μέτρηση της απορρόφησης των υπερκείμενων υγρών υπολογίστηκε η ποσότητα του καζεϊνικού νατρίου το οποίο δεν είχε ενθυλακωθεί στα σωματίδια της κεφίρανης με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας εγκλεισμού και του φορτίου. Επιπλέον, τα ιζήματα παρέμειναν στον απαγωγό για 24h ώστε να εξατμιστεί πλήρως το υγρό από τα υπερκείμενα και ζυγίστηκαν αφού προηγουμένως είχαν ζυγιστεί τα άδεια erpendorf.

#### Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης καζεϊνικού νατρίου -αιθανόλη:νερό

Σε αιθανόλη και νερό με αναλογία 1:1 διαλύθηκε καζεϊνικό νάτριο σε διάφορες συγκεντρώσεις( 0,025- 0,05- 0,075- 0,1- 0,15- 0,2- 0,35- 0,45- 0,55- 0,7- 0,8- 1 mg/mL) και στη συνέχεια μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων στα 280 nm.





#### **4.2.1.8 Μελέτη απελευθέρωσης καζεϊνικού νατρίου από τα σωματίδια κεφιράνης**

Τα σωματίδια κεφιράνης με 0,25% w/v καζεϊνικό νάτριο παρασκευάστηκαν όπως αναφέρθηκε στο αρχικό πείραμα. Μετά την προσθήκη αιθανόλης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και στη συνέχεια από τα υπερκείμενα μετρήθηκε η απορρόφηση τους στο φασματοφωτόμετρο κατά τακτά χρονικά διαστήματα (0, 2, 6, 24, 48 h) . Έτσι κάθε χρονική στιγμή επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία δηλαδή ακολουθούσε φυγοκέντρηση και μετά μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο για να εξεταστεί ο βαθμός απελευθέρωσης του καζεϊνικού νατρίου από τα σωματίδια κεφιράνης. Τα δείγματα παρέμειναν υπό σταθερή θερμοκρασία (37 °C) και υπό συνεχή ανάδευση καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος (Liu et al., 2007) .

#### **4.2.1.9 Μέτρηση μεγέθους και δείκτης πολυδιασποράς σε σωματίδια κεφιράνης**

Αφού παρασκευάστηκαν τα σωματίδια κεφιράνης σύμφωνα με το αρχικό πείραμα, μετρήθηκε το μέγεθος τους στο Mastersizer και ο δείκτης πολυδιασποράς σε δείγματα με 0,1% w/v αλβουμίνης και χωρίς και με 0,25% w/v καζεϊνικό νάτριο και χωρίς. Τέλος μετρήθηκε το μέγεθος και ο δείκτης πολυδιασποράς σε μερικώς υδρολυμένα σωματίδια κεφιράνης με 0,1% w/v αλβουμίνη και χωρίς.

### **4.3. Στατιστική ανάλυση**

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε τόσο με την χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab 15, όσο και με το Microsoft Office (Excel). Με τη βοήθεια του Minitab 15 έγινε έλεγχος της υπόθεσης σύγκρισης δύο ανεξάρτητων δειγμάτων (2-sample t-test) , ο έλεγχος της υπόθεσης σύγκρισης δυο εξαρτημένων δειγμάτων (Paired t- test) και η ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα (ANOVA One-Way) , όπου κρίθηκε αναγκαίο για να ερμηνευθούν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων.

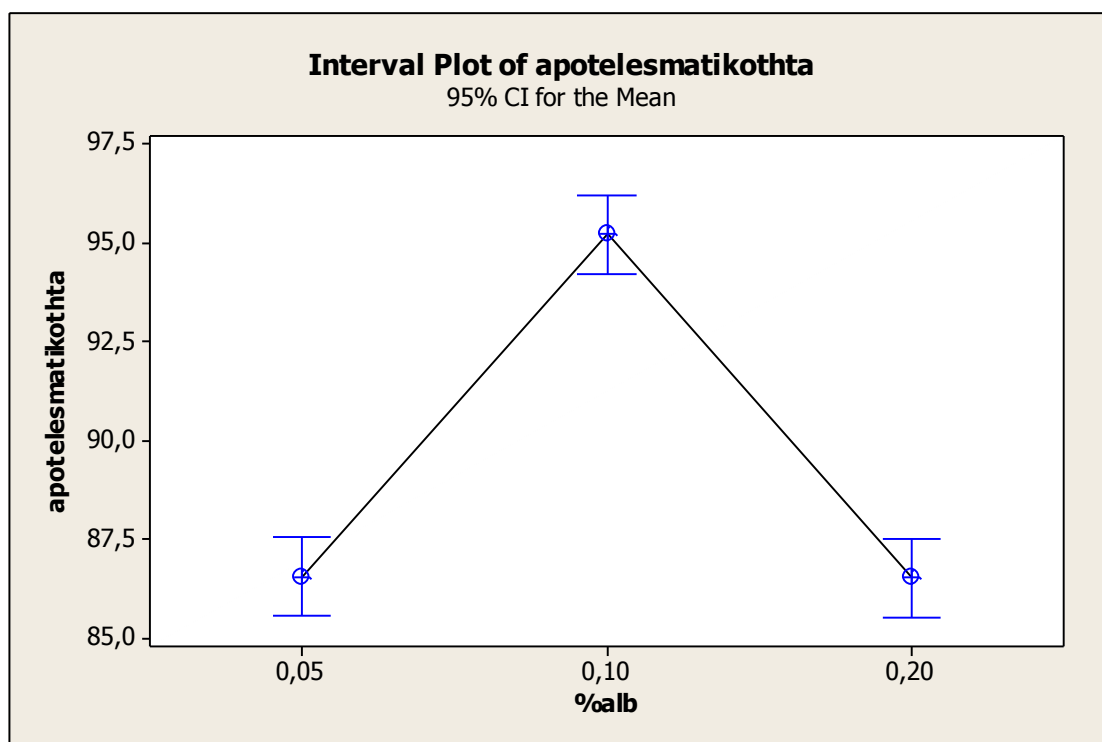
## **5. Αποτελέσματα -Συζήτηση**

### **5.1 Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο των σωματιδίων κεφιράνης**

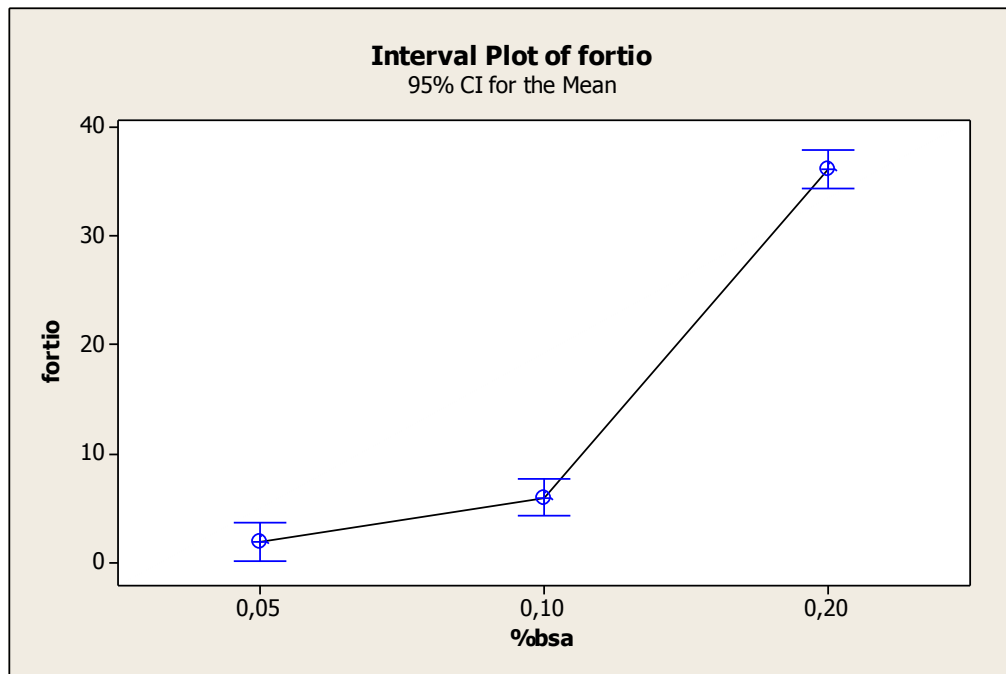
Στα σχήματα 5 και 6 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο των σωματιδίων κεφιράνης. Παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) (Παράρτημα 1) στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης μεταξύ της συγκέντρωσης αλβουμίνης 0,1% w/v και των συγκεντρώσεων 0.05% w/v και 0,2%w/v, οι οποίες δεν διαφέρουν μεταξύ τους. Επομένως, η καλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης

επιτυγχάνεται με συγκέντρωση αλβουμίνης 0,1% w/v. Σύμφωνα με τους Bourry et al., (1998) αυξάνοντας την συγκέντρωση της πρωτεΐνης θα έπρεπε να αυξηθεί και η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης το οποίο όμως δεν παρατηρήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα.

Όσον αφορά το φορτίο, η συγκέντρωση της αλβουμίνης έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ( $p < 0,05$ ) (Παράρτημα 1) στο φορτίο. Σύμφωνα με τους Kammona et al. (2011) το αναμενόμενο αποτέλεσμα θα ήταν όσο αυξάνεται η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αυξάνεται το φορτίο της αλβουμίνης, όπως και παρατηρείται στο σχήμα 6.



**Σχήμα 5. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης των σωματιδίων κεφίρανης**



**Σχήμα 6. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στο φορτίο των σωματιδίων κεφिरάνης**

## **5.2 Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφिरάνης**

Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται το μέγεθος και ο δείκτης πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφिरάνης χωρίς και με αλβουμίνη. Παρατηρείται ότι η προσθήκη της αλβουμίνης δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος των σωματιδίων ( $p > 0,05$ ) (Παράρτημα 2).

Επιπλέον, ο δείκτης πολυδιασποράς των σωματιδίων παρατηρείται ότι δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p > 0,05$ ) (Παράρτημα 2) στα σωματίδια κεφिरάνης με αλβουμίνης και χωρίς. Παρατηρείται ότι ο δείκτης πολυδιασποράς και των δυο δειγμάτων είναι μεγαλύτερος από το ένα, συνεπώς το εύρος της κατανομής των σωματιδίων είναι μεγάλο και αυτό οφείλεται στο ότι υπάρχουν πολλά και διάφορα μεγέθη σωματιδίων.

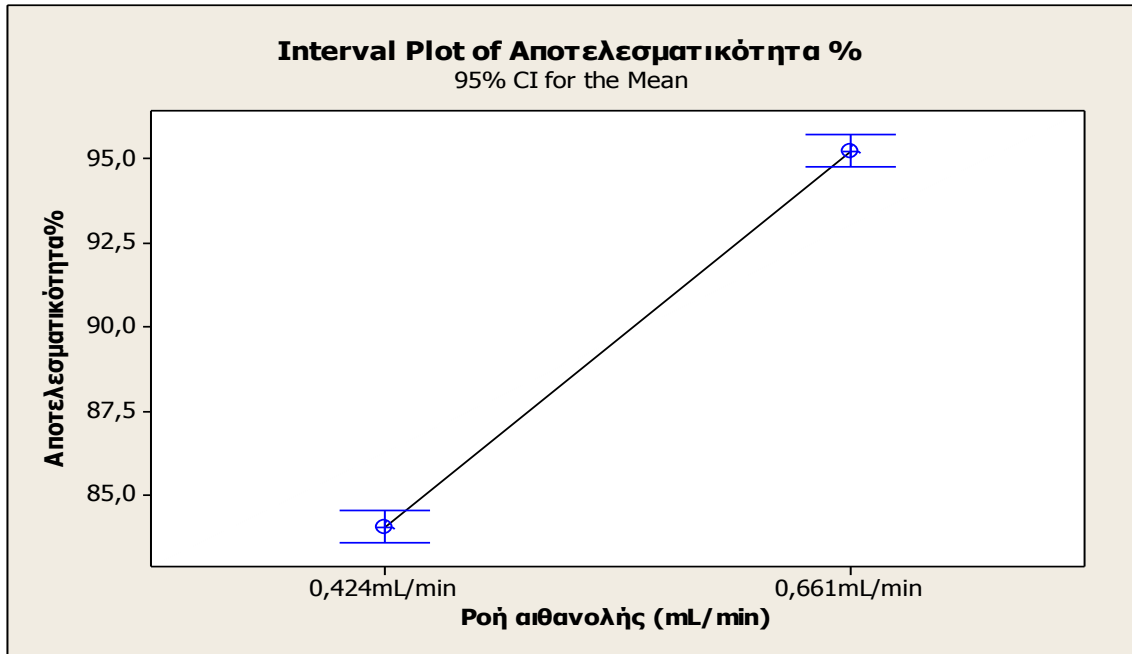
**Πίνακας 1. Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφιράνης**

Δείγμα	Μέγεθος (μm)	Δείκτης πολυδιασποράς
Σωματίδια χωρίς BSA	245.421 ± 156,342	2,658 ± 1,762
Σωματίδια με 0,1% BSA	570,286 ± 359,015	1,24 ± 1,359

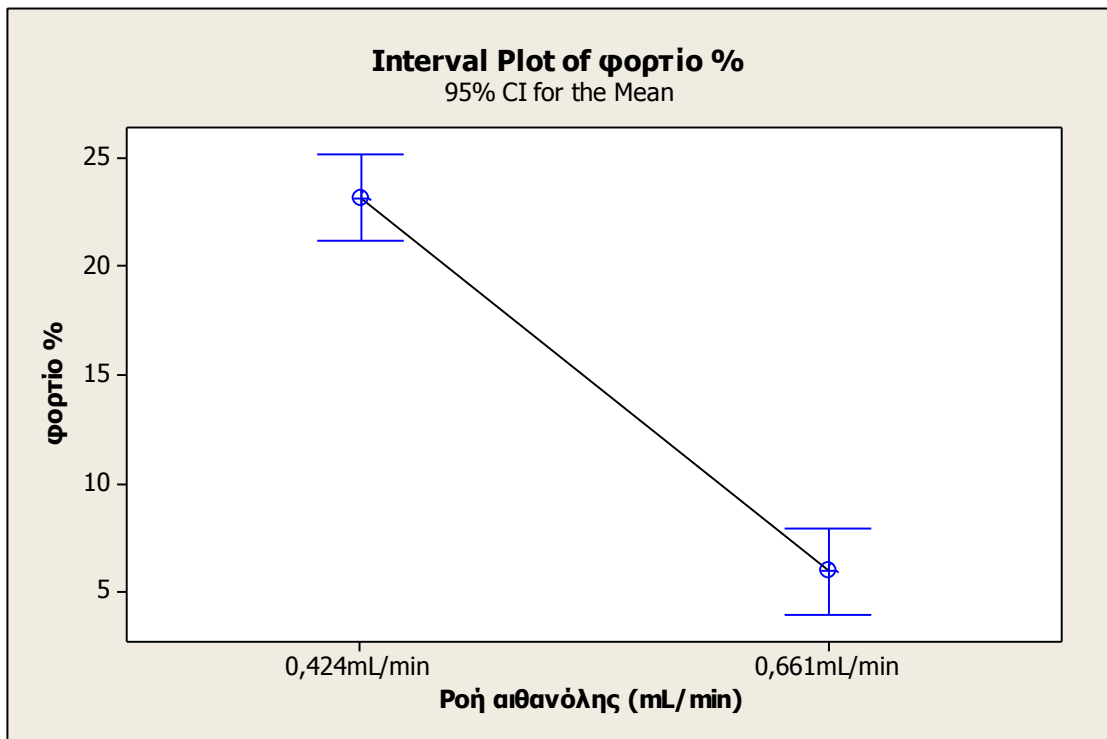
### **5.3 Επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο αλβουμίνης**

Στα σχήματα 7 και 8 φαίνεται η επίδραση του ρυθμού ροής της αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο αλβουμίνης. Φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) (Παράρτημα 3) στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο διαφορετικών ρυθμών ροής. Παρατηρείται ότι με την μείωση της ροής της αιθανόλης από 0,661 mL/min σε 0,424 mL/min μειώνεται η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης. Μικρότερη παροχή αιθανόλης σημαίνει ότι το διάλυμα γίνεται πιο ήπια αφιλόξενο για την κεφιράνη, άρα η κεφιράνη καταβυθίζεται λιγότερο απότομα και θα έπρεπε να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με τον μεγαλύτερο ρυθμο ροής αιθανόλης.

Επίσης παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) (Παράρτημα 3) στο φορτίο ανάμεσα στα δύο δείγματα και φαίνεται ότι μεγαλύτερο φορτίο υπάρχει όταν ο ρυθμός αιθανόλης μειώνεται το οποίο είναι και το αναμενόμενο.



**Σχήμα 7.** Επίδραση της ροής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης 0,1 %w/v αλβουμίνης

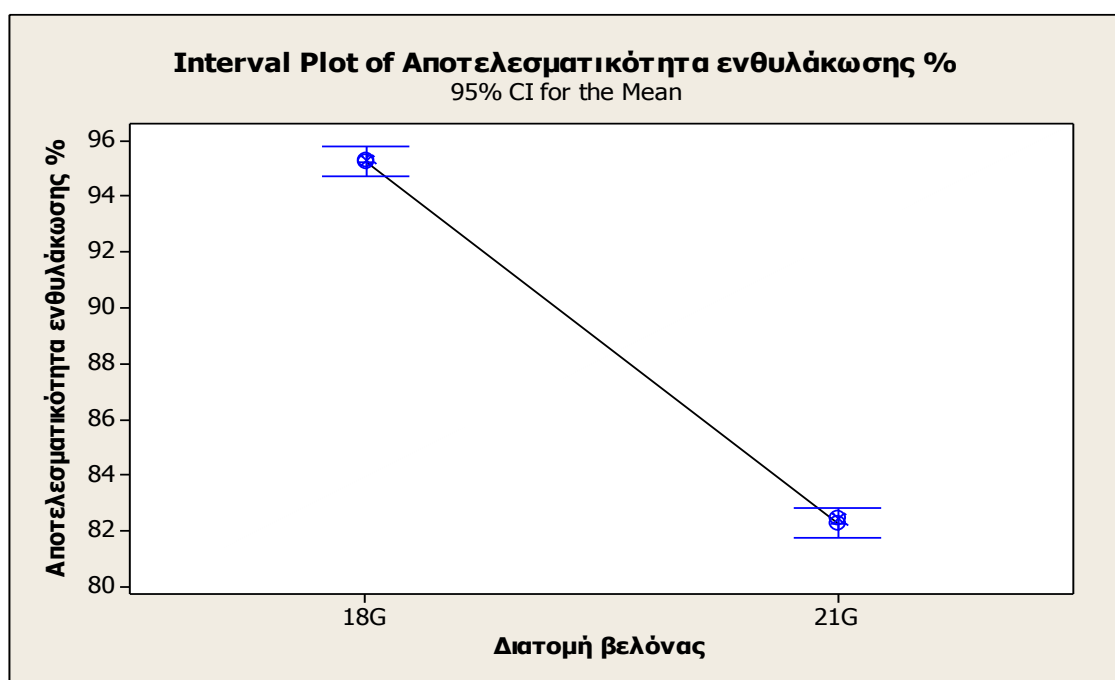


**Σχήμα 8.** Επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στο φορτίο με 0,1%w/v αλβουμίνης

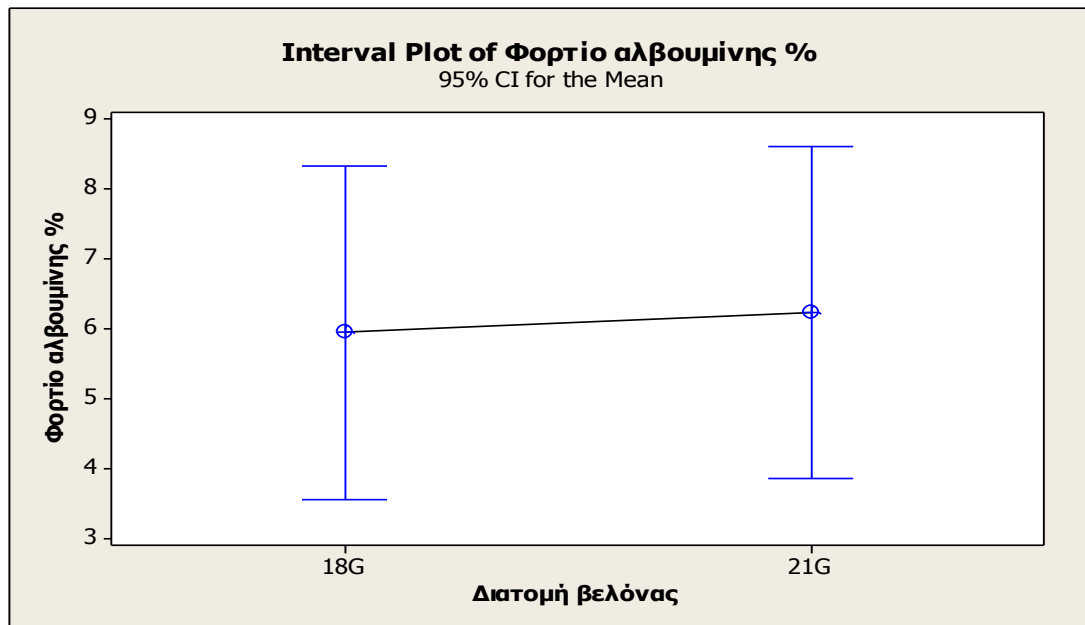
#### 5.4 Επίδραση της διατομής της βελόνας στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο αλβουμίνης.

Στο σχήμα 8 φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) ανάμεσα στα δύο δείγματα και παρατηρείται ότι μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης υπάρχει στο δείγμα με τη μεγαλύτερη διατομή βελόνας. Μεγαλύτερη διατομή βελόνας σημαίνει μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης και επομένως δεν μπορεί να γίνει πλήρης εγκλεισμός της αλβουμίνης, αυτό συνεπάγεται χαμηλή αποτελεσματικότητα κάτι το οποίο δεν παρατηρείται εδώ.

Ενώ αντίστοιχα στο σχήμα 9 παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p > 0,05$ ) στο φορτίο αλβουμίνης. Έτσι το φορτίο δείχνει να μην επηρεάζεται από την διατομή της βελόνας.



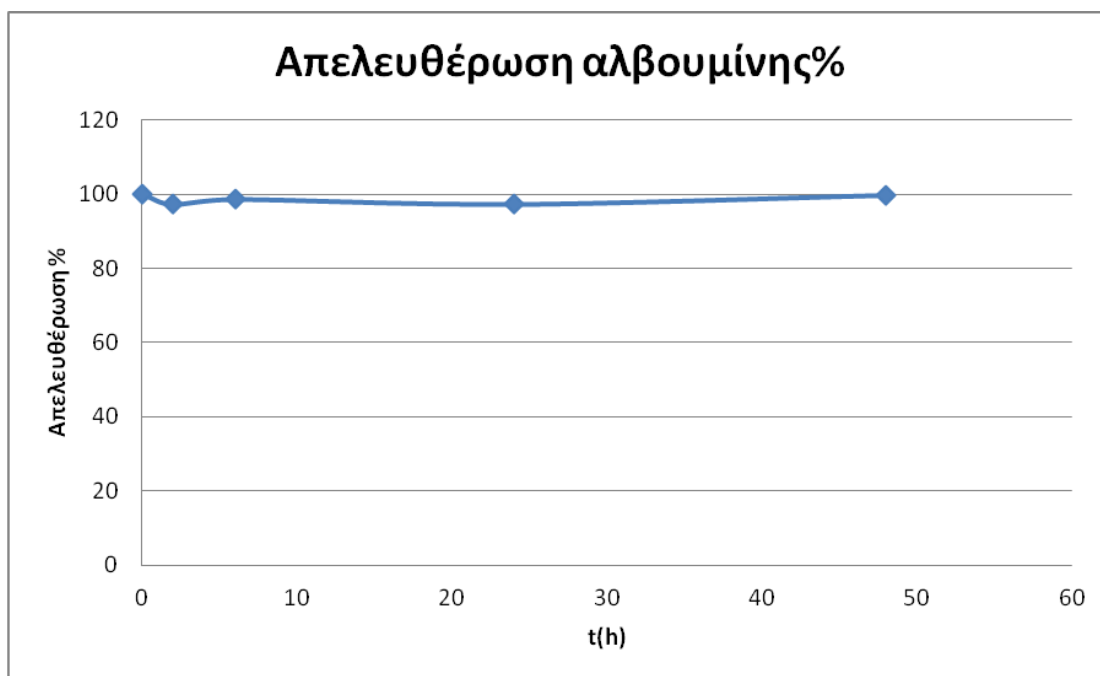
Σχήμα 8. Επίδραση της διατομής της βελόνας στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης



**Σχήμα 9. Επίδραση της διατομής της βελόνας στο φορτίο αλβουμίνης**

### **5.5 Μελέτη της απελευθέρωσης αλβουμίνης βόειου ορού από σωματίδια κεφιλάνης με την πάροδο του χρόνου**

Στο σχήμα 10 φαίνεται το ποσοστό της αλβουμίνης που απελευθερώνεται από τα σωματίδια κεφιλάνης με την πάροδο του χρόνου. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό απελευθέρωσης ( $p > 0,05$ ) (Παράρτημα 4) σε σχέση με την πάροδο του χρόνου και αυτό οφείλεται σύμφωνα με τους Yeo & Park (2003) στο ότι οι πολυσακχαρίτες με μικρό μοριακό βάρος έχουν μεγάλο βαθμό απελευθέρωσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μη απελευθέρωση ως τις 48h πιθανόν να οφείλεται στο υψηλό μοριακό βάρος της κεφιλάνης. Επίσης μπορεί να οφείλεται στο πολύ μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Mukai et al., 1990), η χρήση ενζύμων, όπως κυτταρινάσες (cellulase), γαλακτανάσες και  $\alpha$ -αμυλάσες επιταχύνει την απελευθέρωση της ενθυλακωμένης ουσίας διότι τα ένζυμα διασπούν το μόριο του πολυσακχαρίτη, επομένως η πιθανή αιτία της μη απελευθέρωσης είναι ότι δεν έγινε χρήση ενζύμων.



**Σχήμα 10. Ποσοστό απελευθέρωσης αλβουμίνης με την πάροδο του χρόνου**

### 5.6 Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου

Στο πίνακα 2 παρουσιάζεται η επίδραση του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των σωματιδίων κεφίρανης. Σύμφωνα με τον Γκοτζαμάνη (2007), οι τιμές z-δυναμικού που είναι μεγαλύτερες από 30 mV δείχνουν ότι τα διεσπαρμένα σωματίδια είναι πολύ σταθερά λόγω των αμοιβαίων ηλεκτροστατικών απώσεων, ενώ τιμές κοντά στο μηδέν έχουν ως αποτέλεσμα την ταχεία συσσωμάτωση και καταβύθιση των σωματιδίων.

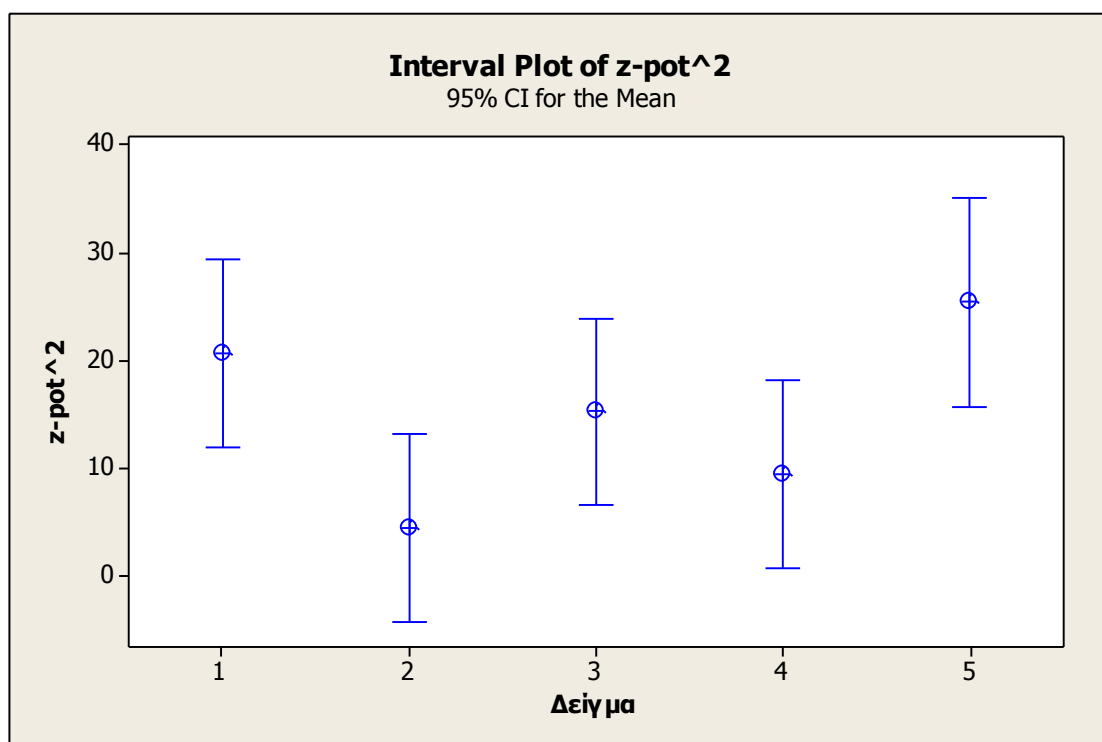
**Πίνακας 2. Τιμές ηλεκτρικού φορτίου**

Δείγμα	z-potential(mV)
1: Διάλυμα κεφίρανης 0,5% w/v(μετά από dialysis) , pH= 4,8	0,71 ± 5,02
2:Υδατικό διάλυμα 0,1% w/v αλβουμίνης, pH= 5,95	-0,62 ± 2,25
3:Διάλυμα 0,1% αλβουμίνη w/v σε νερό και αιθανόλη(1:1), pH= 6,2	-3,20 ± 3,51



4:σωματίδια κεφίρανης, pH= 3,9	1,57 ± 2,96
5:σωματίδια κεφίρανης με 0,1%w/v αλβουμίνη, pH= 3,8	4,98 ± 0,31

Από τη στατιστική ανάλυση παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ( $p < 0,05$ ) (Παράρτημα 5) και συγκεκριμένα διαφέρουν σημαντικά τα δείγματα 5 και 2 (Σχήμα 11). Πιθανόν αυτή η διαφορά να οφείλεται στο εγκλεισμό αλβουμίνης στα σωματίδια κεφίρανης.

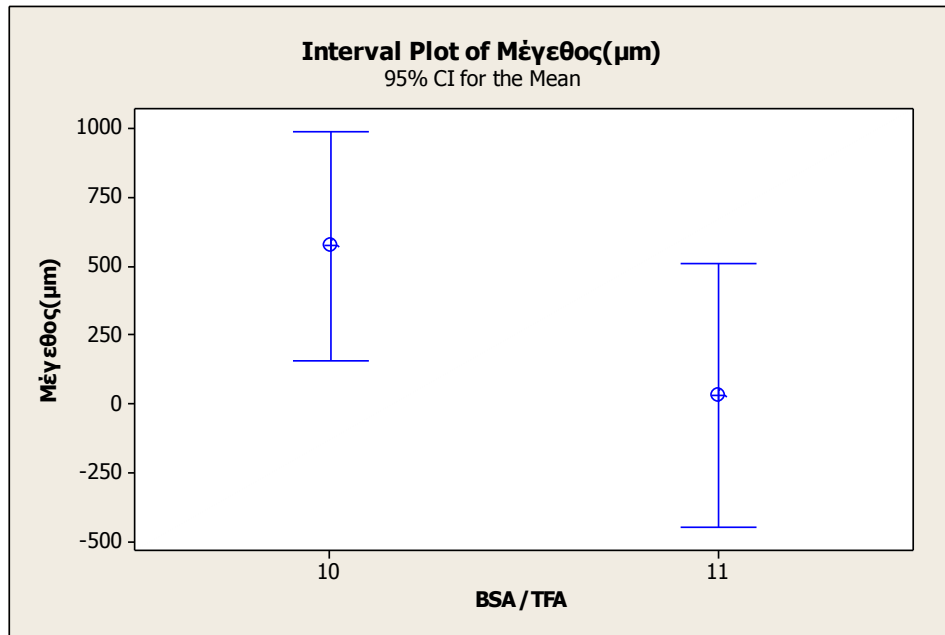


Σχήμα 11. Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου

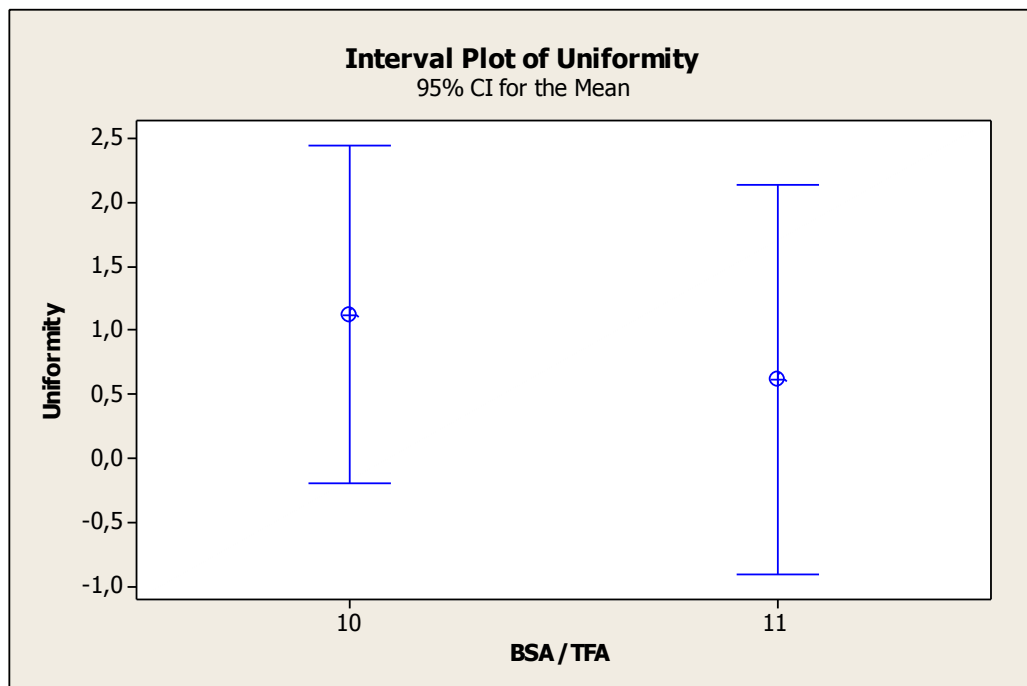
### 5.7 Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς σε σωματίδια κεφίρανης με αλβουμίνη

Στα σχήματα 12 και 13 παρουσιάζεται η επίδραση της μερικής υδρόλυσης των σωματιδίων κεφίρανης με 0,1% w/v αλβουμίνη στο μέγεθος των σωματιδίων και στο δείκτη πολυδιασποράς. Παρατηρείται (σχήμα 12) ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση ( $p < 0,05$ ) της μερικής υδρόλυσης στο μέγεθος των σωματιδίων με αλβουμίνη (Παράρτημα 8). Το μέσο μέγεθος των σωματιδίων χωρίς υδρόλυση ήταν 570,29 $\mu$ m, ενώ με υδρόλυση 30,86 $\mu$ m και αυτή η μείωση του μεγέθους οφείλεται

στην μερική υδρόλυση της κεφιράνης που επέφερε μείωση του μοριακού της βάρους δηλαδή από  $7 \cdot 10^5$  μειώθηκε σε  $7 \cdot 10^4$ . Αντίστοιχα στο σχήμα 13 παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση της μερικής υδρόλυσης στον δείκτη πολυδιασποράς στα σωματίδια με αλβουμίνη (Παράρτημα 8).



**Σχήμα 12.** Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο μέγεθος σε σωματίδια κεφιράνης με αλβουμίνη



### **Σχήμα 13. Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο δείκτη πολυδιασποράς σε σωματίδια κεφιράνης με αλβουμίνη**

#### **5.8 Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφιράνης μετά από μερική υδρόλυση**

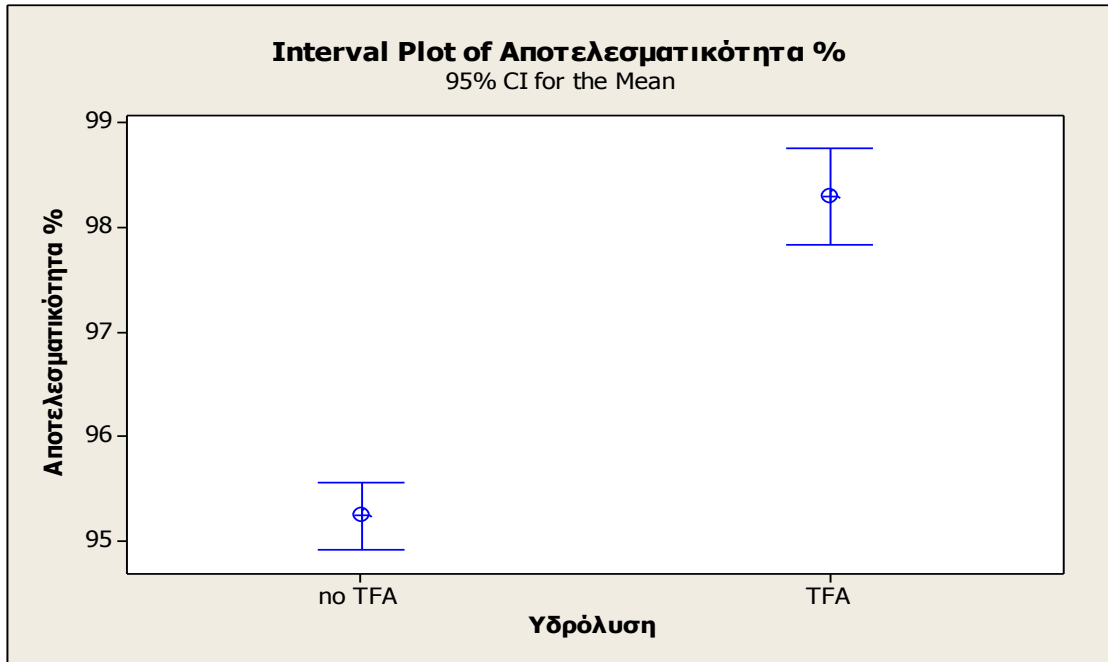
Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p > 0,05$ ) (Παράρτημα 7) στο μέγεθος των σωματιδίων κεφιράνης με αλβουμίνη και χωρίς αλβουμίνη. Το μέσο μέγεθος των σωματιδίων χωρίς αλβουμίνη ήταν 33,76  $\mu\text{m}$  ενώ το μέσο μέγεθος των σωματιδίων με αλβουμίνη ήταν 30,86  $\mu\text{m}$ .

Για το δείκτη πολυδιασποράς οι μέσοι δείκτες πολυδιασποράς που μετρήθηκαν ήταν 0,63 και 0,61 για σωματίδια κεφιράνης χωρίς αλβουμίνη και με αλβουμίνη αντίστοιχα. Ο δείκτης διασποράς και των δυο δειγμάτων είναι κοντά στο ένα συνεπώς το εύρος της κατανομής των σωματιδίων είναι μεγάλο.

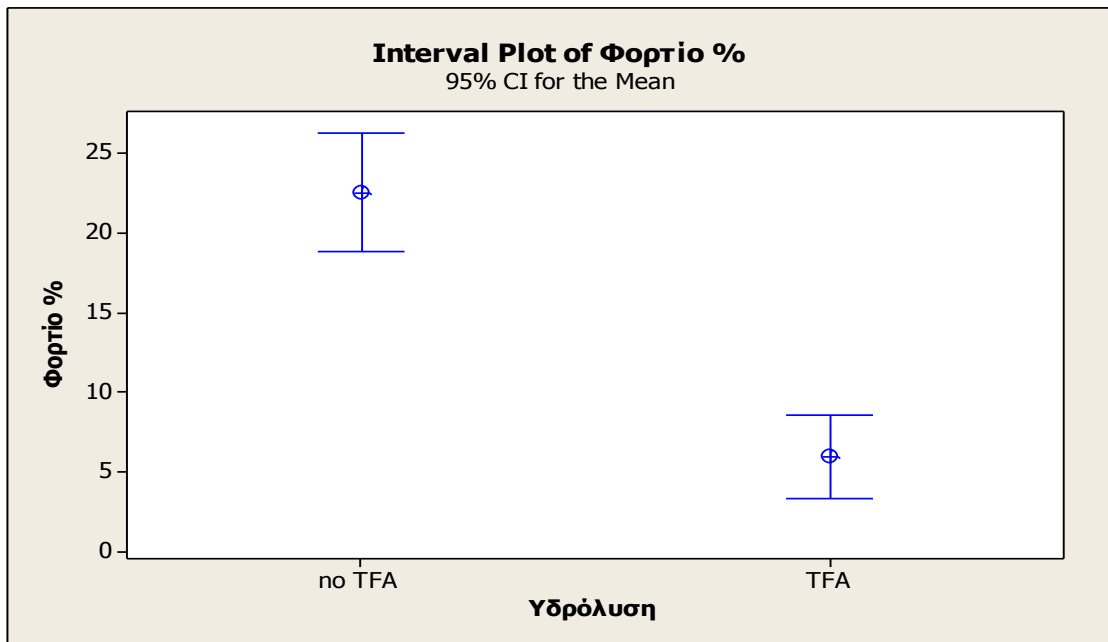
#### **5.9 Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης και στο φορτίο των σωματιδίων κεφιράνης**

Στα σχήματα 14 και 15 φαίνεται η επίδραση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης και του φορτίου στα σωματίδια κεφιράνης με μερική υδρόλυση και χωρίς. Παρατηρείται ότι στα δείγματα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) (Παράρτημα 6) και ότι η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης στα μερικώς υδρολυμένα σωματίδια κεφιράνης είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι στα μη υδρολυμένα (σχήμα 14). Σύμφωνα με τους Liu et al. (2007) αυτό οφείλεται στο ότι τα μερικώς υδρολυμένα σωματίδια έχουν μικρότερο μέγεθος, επομένως απορροφούν περισσότερη αλβουμίνη διότι έχουν μεγαλύτερη συνολική επιφάνεια.

Επιπλέον, παρατηρείται (σχήμα 15) ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) στο φορτίο των δυο δείγματα και μεγαλύτερο φορτίο παρουσιάζει το δείγμα που δεν έχει υποστεί υδρόλυση. Το αναμενόμενο θα ήταν τα μερικώς υδρολυμένα σωματίδια να είχαν μεγαλύτερο φορτίο διότι εγκλείουν μεγαλύτερη ποσότητα αλβουμίνης όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Liu et al., 2007).



Σχήμα 14. Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης στα σωματίδια κεφίρανης



Σχήμα 15. Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο φορτίο

### 5.10 Επίδραση της προσθήκης καζεϊνικού νατρίου στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης

Στον Πίνακα 3 φαίνεται η επίδραση της προσθήκης καζεϊνικού νατρίου στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι η προσθήκη καζεϊνικού νατρίου δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος των σωματιδίων κεφίρανης και στο δείκτη πολυδιασποράς ( $p>0,05$ ) (Παραρτήμα 9). Επομένως, η προσθήκη καζεϊνικού νατρίου δεν επηρεάζει το μέγεθος και τον δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων, όπως παρατηρήθηκε και στον εγκλεισμό της αλβουμίνης.

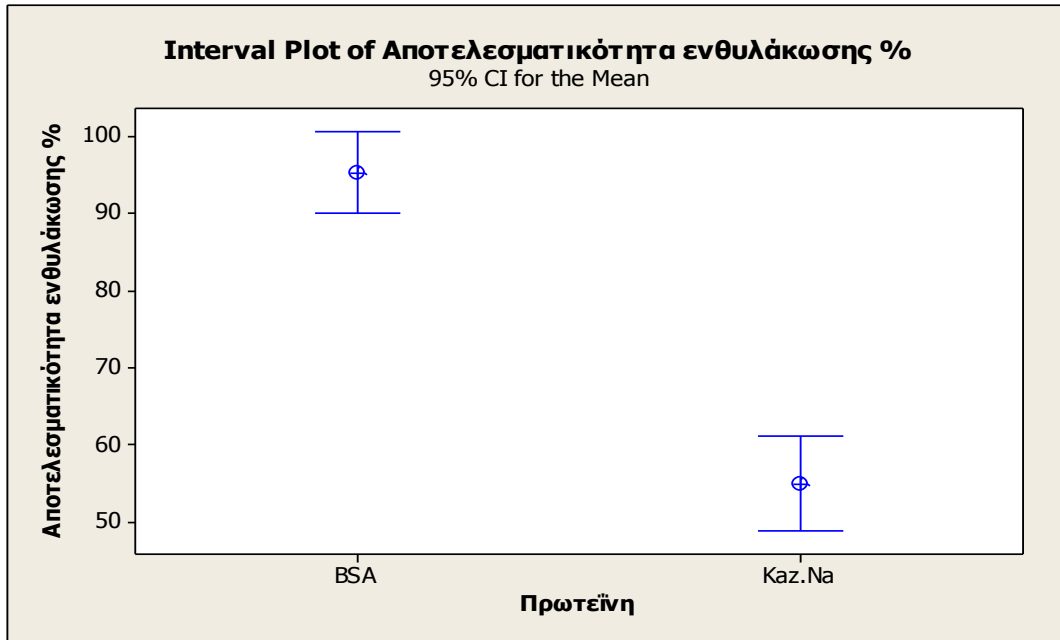
**Πίνακας 3. Επίδραση της προσθήκης καζεϊνικού νατρίου στο μέγεθος και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης**

Δείγμα	Μέγεθος(μm)	Δείκτης πολυδιασποράς
Σωματίδια χωρίς Καζ.Να	506,232 ± 277,604	0,659 ± 0,148
Σωματίδια με 0,25% Καζ.Να	380,983 ± 299,114	0,581 ± 0,059

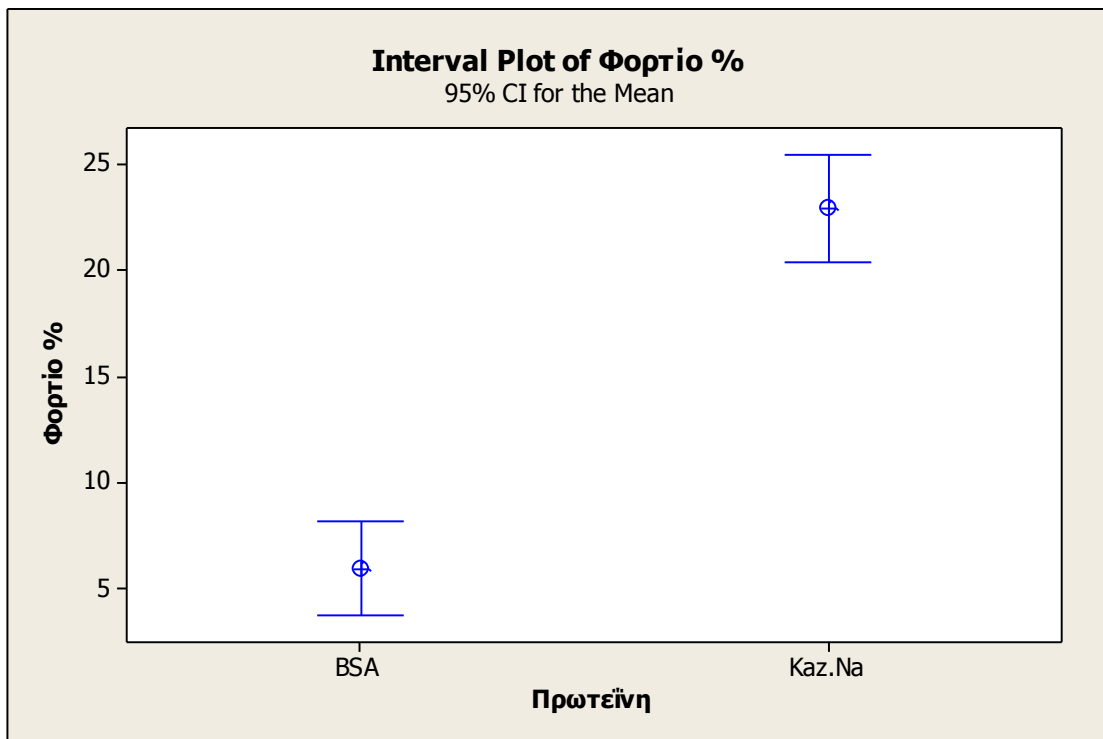
### 5.11 Επίδραση των διαφορετικών πρωτεϊνών στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο των σωματιδίων κεφίρανης

Στα σχήματα 16 και 17 παρατηρείται η επίδραση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης και του φορτίου στα σωματίδια κεφίρανης με 0,25 % w/v καζεϊνικό νάτριο και με 0,1 % w/v αλβουμίνη. Παρατηρείται (σχήμα 16) (Παράρτημα 11) ότι η αλβουμίνη έχει μεγαλύτερο βαθμό εγκλεισμού απ' ότι το καζεϊνικό νάτριο και αυτό πιθανόν οφείλεται στο μικρότερο μοριακό βάρος της αλβουμίνης σε σχέση με το καζεϊνικό νάτριο (Elfstrand et al., 2009). Επίσης, από τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών, περίπου 60 kDa για την αλβουμίνη και 2350 kDa για το καζεϊνικό νάτριο, προκύπτουν ότι παρόλο την κατά πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση του καζεϊνικού νατρίου (1M) από την συγκέντρωση της αλβουμίνης (0,002M), η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης είναι πολύ χαμηλή, επομένως θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η αλβουμίνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το μόριο της κεφίρανης.

Επιπλέον, παρατηρείται ότι η προσθήκη διαφορετικών πρωτεϊνών έχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο φορτίο ( $p<0,05$ ) (σχήμα 17) και ότι το δείγμα με το καζεϊνικό νάτριο έχει μεγαλύτερο φορτίο απ' ότι το δείγμα με αλβουμίνη που πιθανόν να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα.



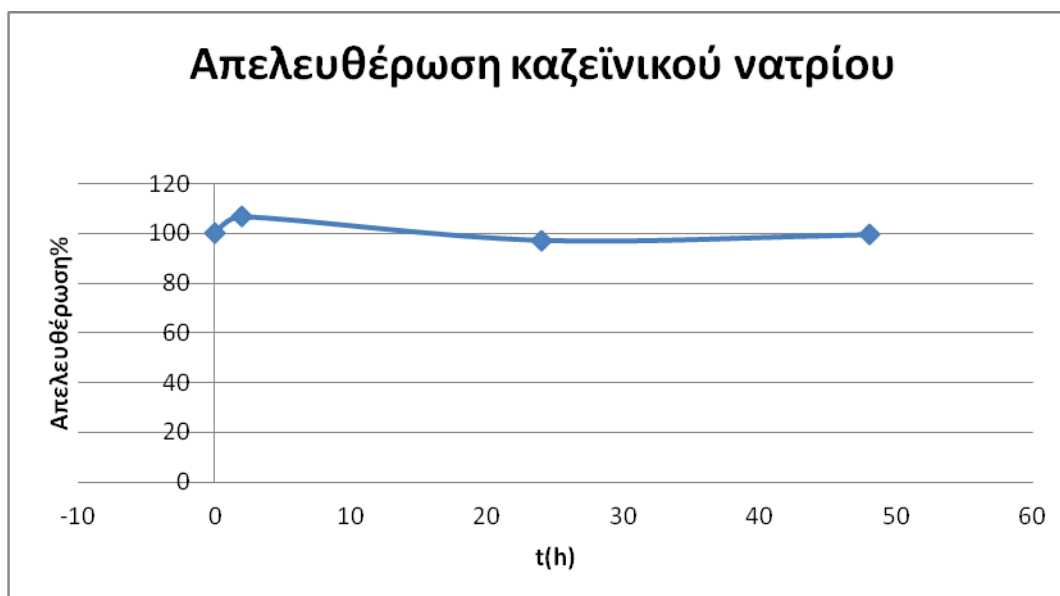
Σχήμα 16. Επίδραση των διαφορετικών πρωτεϊνών στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης



Σχήμα 17. Επίδραση των διαφορετικών πρωτεϊνών στο φορτίο

### 5.12 Μελέτη της απελευθέρωσης καζεϊνικού νατρίου από σωματίδια κεφιράνης με την πάροδο του χρόνου

Στο σχήμα 16 φαίνεται το ποσοστό του καζεϊνικού νατρίου που απελευθερώνεται από τα σωματίδια κεφιράνης με την πάροδο του χρόνου. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό απελευθέρωσης ( $p > 0,05$ ) (Παράρτημα 10) σε σχέση με την πάροδο του χρόνου και αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός στο υψηλό μοριακό βάρος της κεφιράνης (Yeo & Park 2003), στο μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων και στην έλλειψη ενζύμων κατά την απελευθέρωση όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.



Σχήμα 16. Ποσοστό απελευθέρωσης καζεϊνικού νατρίου με την πάροδο του χρόνου

## 6. Συμπεράσματα

- Η αλβουμίνη με συγκέντρωση 0,1% w/v επέδειξε την καλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης.
- Το μέγεθος και ο δείκτης πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφιράνης δεν επηρεάστηκε με την προσθήκη πρωτεϊνών.
- Η αύξηση της ροής της αιθανόλης επέφερε αύξηση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης αλλά μείωση του φορτίου.
- Η μείωση της διατομής της βελόνας είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης ενώ το φορτίο παρέμεινε σταθερό.
- Η μερική υδρόλυση επέφερε σημαντική μείωση στο μέγεθος των σωματιδίων και αύξηση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης αλβουμίνης.
- Η αλβουμίνη εμφάνισε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης στα σωματίδια από ότι το καζεϊνικό νάτριο.
- Στις ενθυλακωμένες πρωτεΐνες δεν παρατηρείται απελευθέρωση μέχρι τις 48h από τα σωματίδια κεφιράνης.
- Το χαμηλό z-δυναμικό έδειξε την τάση συσσωμάτωσης των σωματιδίων.



## 7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Μελέτη της απελευθέρωσης ουσιών από σωματίδια κεφίρανης με χρήση ενζύμων όπως κυτταρινάση (cellulase)
- Διερεύνηση άλλων μεθόδων σχηματισμού σωματιδίων κεφίρανης
- Μελέτη εγκλεισμού άλλων ουσιών, θρεπτικών συστατικών ή φαρμάκων σε σωματίδια κεφίρανης
- Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών (π.χ. χρόνος, θερμοκρασία, συγκέντρωση οξέος) της μερικής υδρόλυσης

## 8. Βιβλιογραφία

### Ξένη βιβλιογραφία:

- Arriola O. C., Rocha M. O. C., Hernandez A. B., Brauer J. M. E., & Jatomea M. P., (2013). Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential : development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of Science Food Agriculture*, **93**, 1525- 1536.
- Bader J., Mast-Gerlach E., Popovic´ M.K., Bajpai R. and Stahl U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* **109**, 371–387.
- Boury F., Marchais H., Proust J. E. and Benoit J. P. (1997). Bovine serum albumin release from poly(a-hydroxy acid) microspheres: effects of polymer molecular weight and surface properties. *Journal of controlled release*, **45**, 75-86.
- Elfstrand L., Eliassona A. C. and Wahlgren M. (2009). The Effect of Starch Material, Encapsulated Protein and Production Conditions on the Protein Release from Starch Microspheres. *Journal of Pharmaceutical sciences* , **98**, No.10, 3802-3815.
- Mehran Ghasemlou M., Khodaiyan F., Jahanbin K., Gharibzahedi S.M.T and Taheri S. (2012) Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry* **133**, 383–389
- Ghasemlou M., Khodaiyana F. and Oromiehieb A. (2011). Rheological and structural characterisation of film-forming solutions and biodegradable edible film made from kefir as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules* **49**, 814– 821.
- Kammona O., Alexopoulos A.H., Karakosta P., Kotti K., Karageorgiou V. & Kiparissides C. (2011). Nanocarrier Aided Nasal Vaccination: An Experimental and Computational Approach. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **50**, 590– 601.
- Li B., Wang L., Li D., Chiu Y. L., Zhang Z., Shi J., Chen X. D. and Mao Z.(2009). Physical properties and loading capacity of starch-based microparticles crosslinked with trisodium trimetaphosphate. *Journal of Food Engineering*, **92**, 255–260.

- Liu Z., Jiao Y., Liu F. and Zhang Z. (2007). Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 806-812.
- Liu C.S., Desai K. G. H., Meng X. H. and Chen X. G. (2007). Sweet Potato Starch Microparticles as Controlled Drug Release Carriers: Preparation and In Vitro Drug Release. *Drying Technology*, 25: 4, 689 - 693
- Micheli L., Uccelletti D., Palleschi S. and Creszenzi V. (1999). Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applications of microbiology and biotechnology*. **53**, 69- 74.
- Mukai T., Toba T., Itoh T., and Adach S. (1990). Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranofaciens* K. *Carbohydrate Research*, **204** , 227-232.
- Penich H & Penich C., (2011). Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Journal of Science Food Agriculture*, **60**: 883-889.
- Piermaria J.A., Pinotti A. and Garcia M.A., Abraham A.G. (2009). Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids* **23**, 684–690.
- Roco M. C., (1999). Nanoparticles and nanotechnology research. *Journal of nanoparticles research*, **1**, 1-6
- Tiyaboonchai W., (2003). Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Journal Naresuan University* 11(3), 51-66.
- Uchida M., Ishii I., Inoue C., Akisato Y., Watanabe K., Hosoyama S., Toida T., Ariyoshi N. and Kitada M. (2010). Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Journal of atherosclerosis and Thrombosis*, 19, No. 9, 980- 988.
- Vauthier C. & Bouchemal K. (2008). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*,26(5), 1025-158.
- Yeo Y and Park K. (2004). Control of Encapsulation Efficiency and Initial Burst in Polymeric Microparticle Systems. *Archives of Pharmaceutical Research*, **27**, No. 1, 1-12.

#### Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Ανδρικήκη Σ., (2013).Φασματοσκοπικός έλεγχος αποδέσμευσης (νανο)υλικών ενσωματωμένων σε βιοπολυμερή (Διατριβή Ειδικευσης).

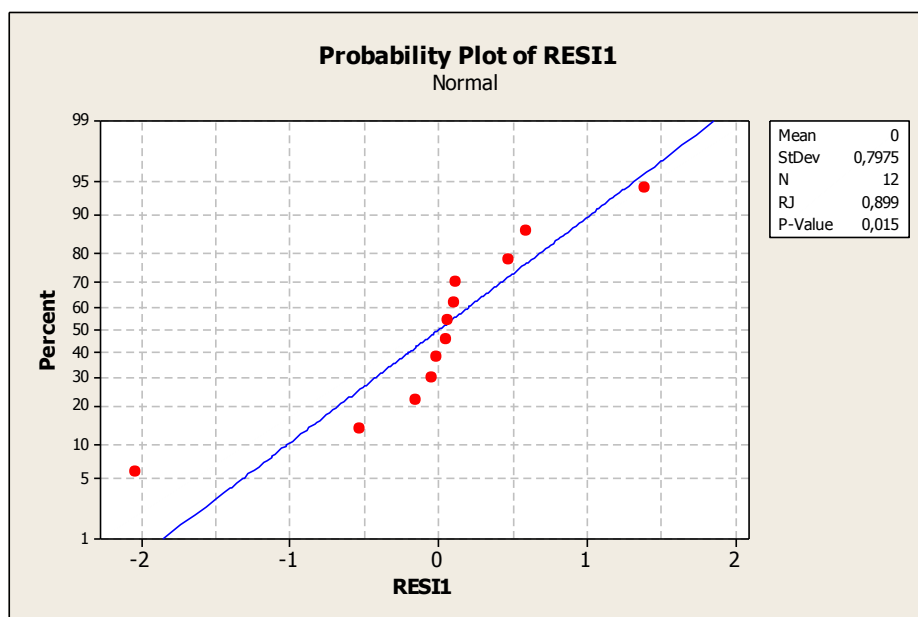
Πανεπιστήμιο Πατρών, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών.

- Γκοτζαμάνης Γ. (2007). Ανάπτυξη νέων ‘εμφυών’ κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές – στατιστικό συμπολυμερές (Διδακτορική Διατριβή). Πανεπιστήμιο Πατρών, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών.
- Εξαρχόπουλος Σ., μη δημοσιευμένα δεδομένα. Απομόνωση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός του πολυσακχαρίτη κεφιράνη (Διδακτορική Διατριβή).
- Τσακίρογλου Ε., (2013). Εφαρμογή της ενθυλάκωσης στην ανάπτυξη διατροφικών συμπληρωμάτων (Πτυχιακή Μελέτη). Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο , Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής.

## 9. Παραρτήματα

### Παράρτημα 1

Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης στα σωματίδια κεφιράνης



#### Test for Equal Variances: RESI1 versus % Αλβουμίνη

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

% Αλβουμίνη	N	Lower	StDev	Upper
0,05	4	0,740926	1,46564	7,97131
0,1	4	0,056893	0,11254	0,61209
0,2	4	0,209355	0,41413	2,25236

Bartlett's Test (Normal Distribution)  
Test statistic = 12,05; p-value = 0,002

Levene's Test (Any Continuous Distribution)  
Test statistic = 2,56; p-value = 0,131

Από το παραπάνω διάγραμμα και τον έλεγχο παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κανονική κατανομή στα υπολείμματα ( $p < 0,05$ ) και ισχύει η ομοιογένεια διακυμάνσεων ( $p > 0,05$ ) αντίστοιχα.

#### One-way ANOVA: Αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης versus % Αλβουμίνη

Source	DF	SS	MS	F	P
% Αλβουμίνη	2	201,638	100,819	129,68	0,000
Error	9	6,997	0,777		
Total	11	208,635			

S = 0,8817 R-Sq = 96,65% R-Sq(adj) = 95,90%

Individual 95% CIs For Mean Based on  
Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
0,05	4	86,544	1,466	84,612	88,476
0,10	4	95,232	0,113	95,008	95,456
0,20	4	86,530	0,414	85,702	87,358

Pooled StDev = 0,882

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of % Αλβουμίνη

Individual confidence level = 97,91%

% Αλβουμίνη = 0,05 subtracted from:

% Αλβουμίνη	Lower	Center	Upper	CI Lower	CI Upper
0,10	6,947	8,689	10,430	6,947	10,430
0,20	-1,755	-0,014	1,727	-1,755	1,727

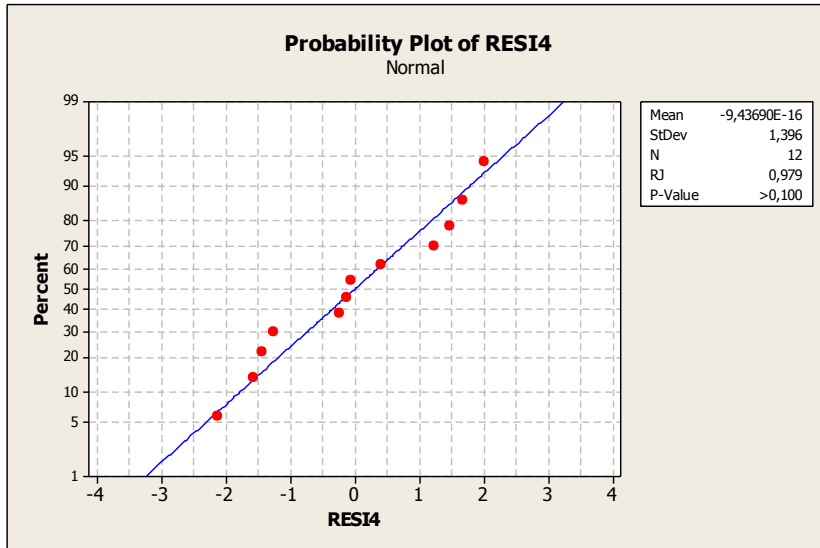
% Αλβουμίνη = 0,10 subtracted from:

% Αλβουμίνη	Lower	Center	Upper	CI Lower	CI Upper
0,20	-10,444	-8,703	-6,961	-10,444	-6,961

$p < 0.05$  υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα μεταξύ της συγκέντρωσης αλβουμίνης 0,1% και των συγκεντρώσεων 0.05% και 0,2%, οι οποίες δεν διαφέρουν μεταξύ τους.

0,1% BSA      0,05% BSA    0,2% BSA

Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης και στο φορτίο των σωματιδίων κεφίρανης



### Test for Equal Variances: RESI4 versus %bsa

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

%bsa	N	Lower	StDev	Upper
0,05	4	0,14480	0,28643	1,5578
0,1	4	1,08663	2,14949	11,6906
0,2	4	0,79002	1,56275	8,4995

Bartlett's Test (Normal Distribution)  
Test statistic = 7,00; p-value = 0,030

Levene's Test (Any Continuous Distribution)  
Test statistic = 64,81; p-value = 0,000

Από το παραπάνω διάγραμμα και έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή και ομοιογένεια διακυμάνσεων ( $p > 0,05$ ).

### One-way ANOVA: fortio versus %bsa

Source	DF	SS	MS	F	P
%bsa	2	2818,56	1409,28	591,76	0,000
Error	9	21,43	2,38		
Total	11	2840,00			

S = 1,543    R-Sq = 99,25%    R-Sq(adj) = 99,08%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI
0,05	4	1,818	0,286	(-*-)
0,10	4	5,942	2,149	(-**-)
0,20	4	36,194	1,563	(-**-)

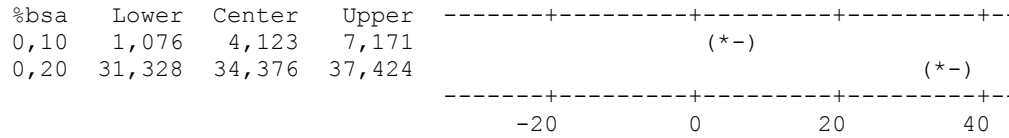
Pooled StDev = 1,543

$P < 0,05$  επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο φορτίο μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων αλβουμίνης .

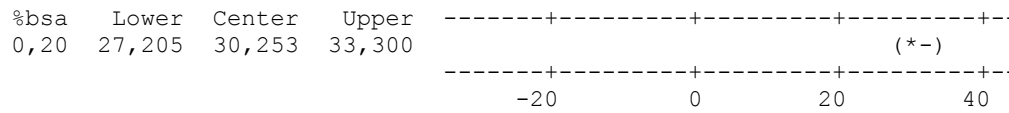
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of %bsa

Individual confidence level = 97,91%

%bsa = 0,05 subtracted from:

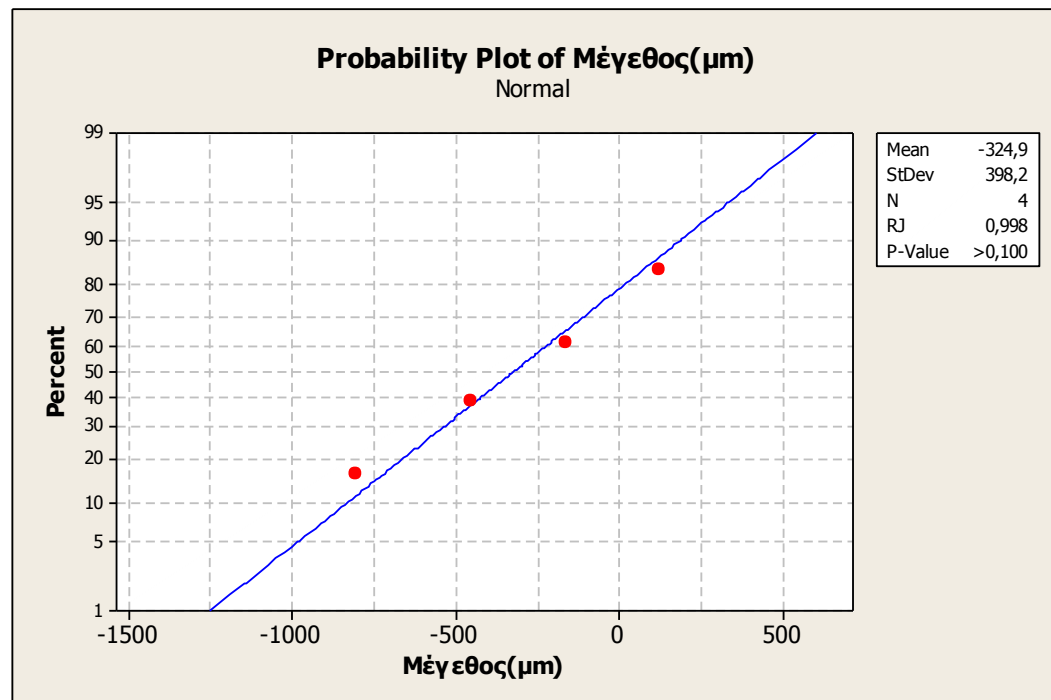


%bsa = 0,10 subtracted from:



## Παράρτημα 2

Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος των σωματιδίων κεφίρανης



Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στο δείγμα επειδή  $p > 0,05$ .

**Paired T-Test and CI: no bsa; bsa**



Paired T for no bsa - bsa

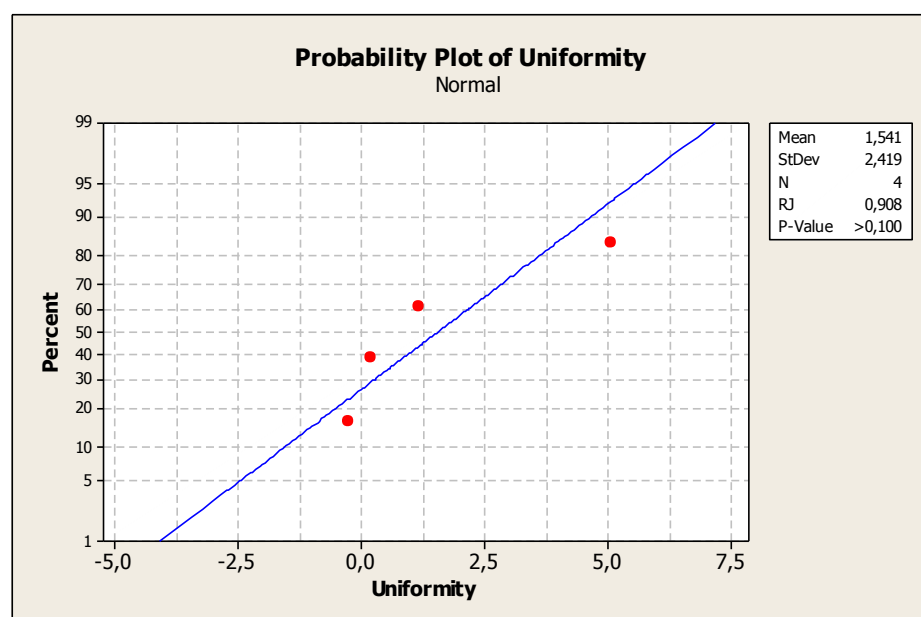
	N	Mean	StDev	SE Mean
no bsa	4	245	181	90
bsa	4	570	415	207
Difference	4	-325	398	199

95% CI for mean difference: (-958; 309)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -1,63 P-Value = 0,201

Παρατηρείται ότι η προσθήκη αλβουμίνης δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος των σωματιδίων κεφίρανης καθώς το  $p > 0,05$ .

### Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης



Υπάρχει κανονική κατανομή στη στήλη της διαφοράς ( $p > 0,05$ )

### **Paired T-Test and CI: 0%; 1%**

Paired T for 0% - 1%

	N	Mean	StDev	SE Mean
0%	4	2,66	2,03	1,02
1%	4	1,12	1,32	0,66
Difference	4	1,54	2,42	1,21

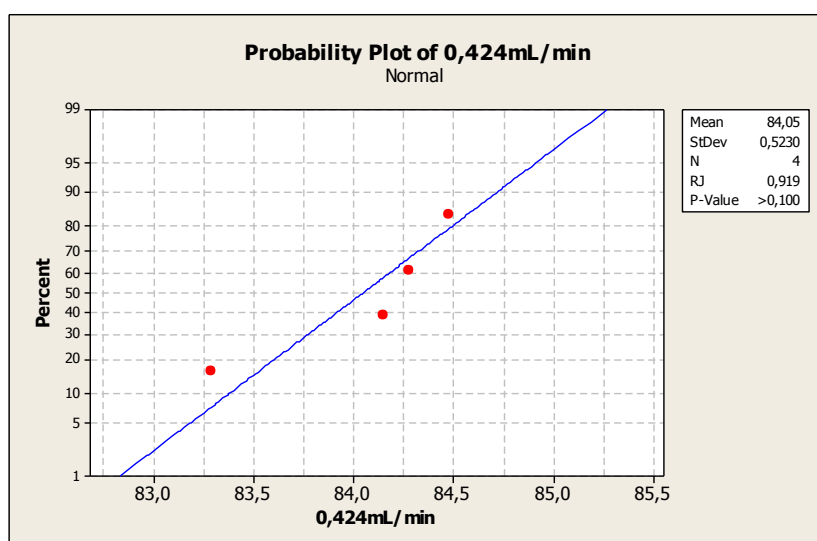
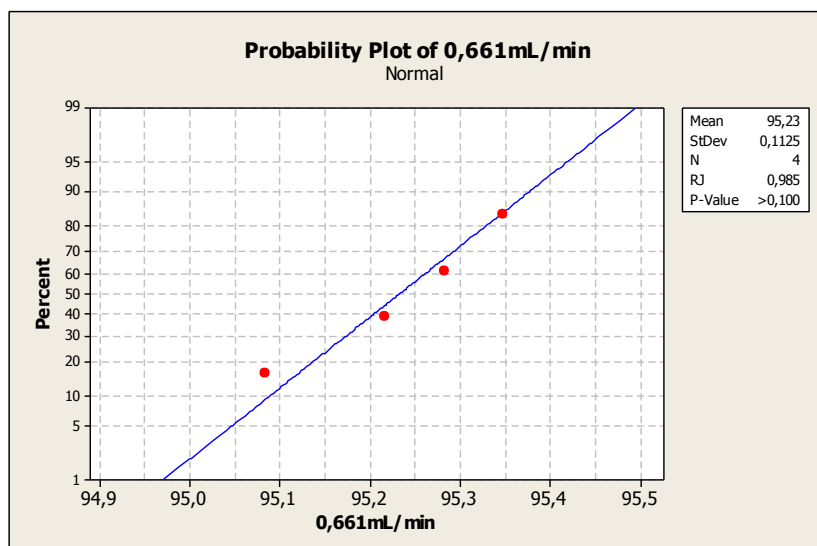
95% CI for mean difference: (-2,31; 5,39)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1,27 P-Value = 0,293

$P > 0,05$  επομένως η προσθήκη αλβουμίνης δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης.

### **Παράρτημα 3**

## Επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης



### Test for Equal Variances: Αποτελεσματικότητα versus Ρυθμός ροής

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Ρυθμός ροής	N	Lower	StDev	Upper
0,424mL/min	4	0,274891	0,523048	2,47715
0,661mL/min	4	0,059147	0,112542	0,53300

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 21,60; p-value = 0,031

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 1,45; p-value = 0,275

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα καθώς  $p > 0,05$  ενώ δεν υπάρχει ομοιογένεια διακυμάνσεων στα δείγματα διότι  $p = 0,031 < 0,05$

## Two-Sample T-Test and CI: Αποτελεσματικότητα; Ρυθμός ροής

Two-sample T for Αποτελεσματικότητα

Ρυθμός ροής	N	Mean	StDev	SE Mean
0,424mL/min	4	84,046	0,523	0,26
0,661mL/min	4	95,232	0,113	0,056

Difference = mu (0,424mL/min) - mu (0,661mL/min)

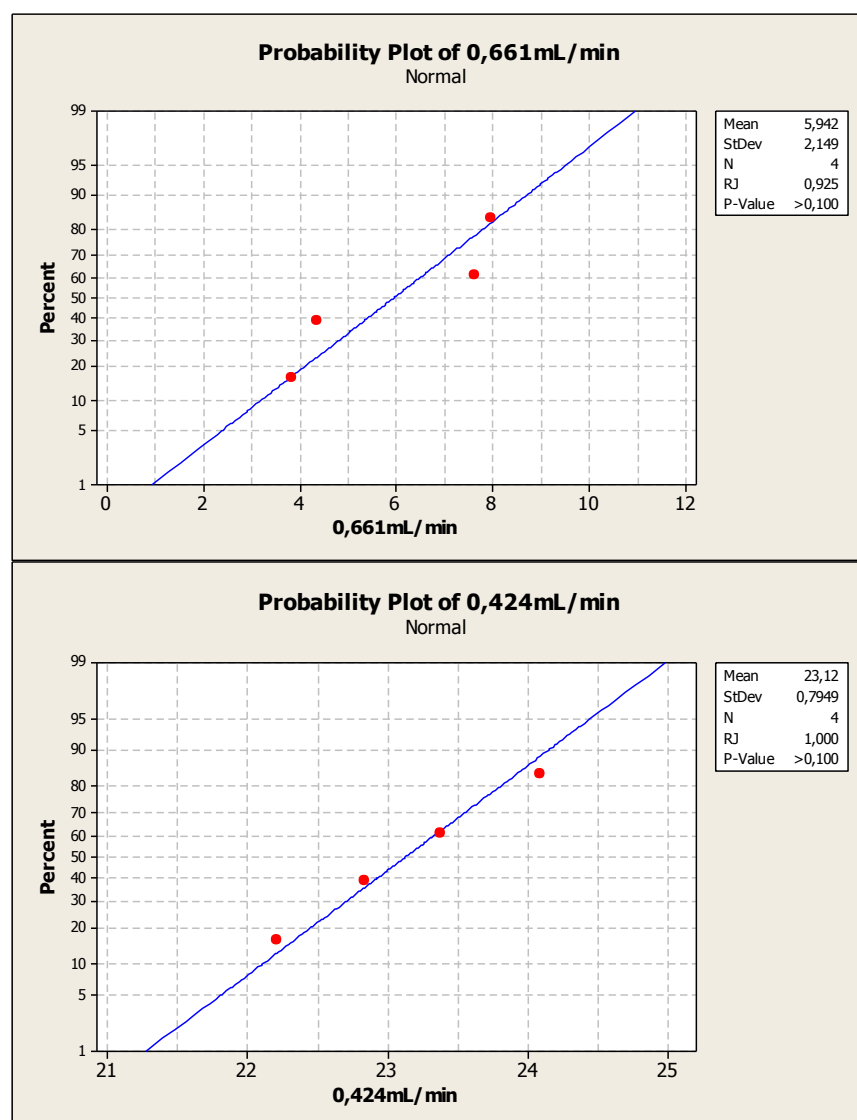
Estimate for difference: -11,186

95% CI for difference: (-12,037; -10,335)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -41,82 P-Value = 0,000 DF = 3

$p < 0,05$  επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο διαφορετικών ροών αιθανόλης

Επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στο φορτίο με 0,1 % αλβουμίνης



## Test for Equal Variances: Φορτίο versus Ρυθμός ροής

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Ρυθμός ροής	N	Lower	StDev	Upper
0,424mL/min	4	0,41774	0,79485	3,7644
0,661mL/min	4	1,12968	2,14949	10,1799

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 0,14; p-value = 0,136

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 28,38; p-value = 0,002

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα καθώς  $p > 0,05$  και υπάρχει ομοιογένεια διακυμάνσεων στα δείγματα διότι  $p = 0,136 > 0,05$

## Two-Sample T-Test and CI: Φορτίο; Ρυθμός ροής

Two-sample T for Φορτίο

Ρυθμός ροής	N	Mean	StDev	SE Mean
0,424mL/min	4	23,123	0,795	0,40
0,661mL/min	4	5,94	2,15	1,1

Difference = mu (0,424mL/min) - mu (0,661mL/min)

Estimate for difference: 17,18

95% CI for difference: (14,38; 19,99)

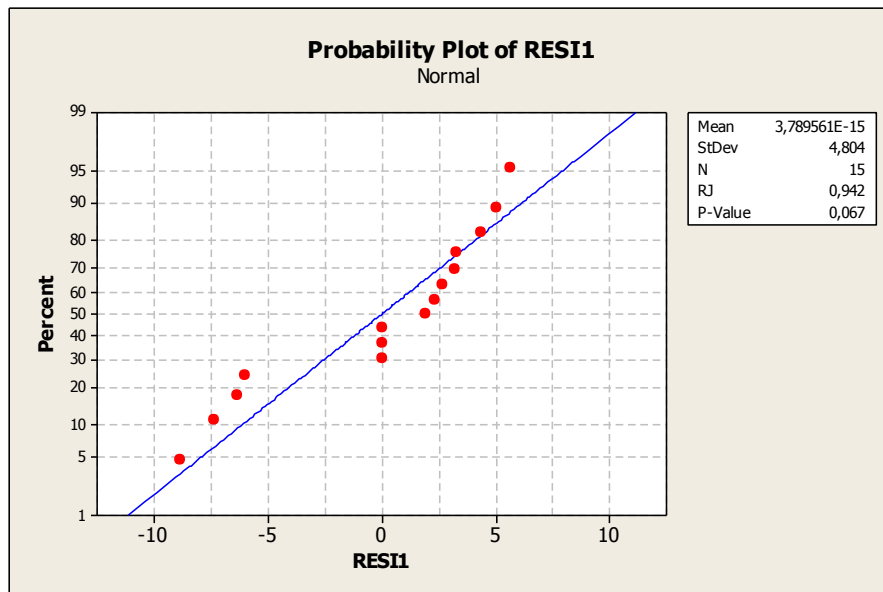
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 14,99 P-Value = 0,000 DF = 6

Both use Pooled StDev = 1,6205

$p < 0,05$  επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο φορτίο μεταξύ των δύο διαφορετικών ροών αιθανόλης.

## Παράρτημα 4

### Απελευθέρωση αλβουμίνης από τα σωματίδια κεφίρανης



### Test for Equal Variances: RESI1 versus t(h)

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

t(h)	N	Lower	StDev	Upper
0	3	*	0,00000	*
2	3	2,31036	5,20481	65,7331
6	3	2,49224	5,61456	70,9081
24	3	3,44989	7,77196	98,1545
48	3	2,89460	6,52099	82,3556

Bartlett's Test (Normal Distribution)  
Test statistic = 0,32; p-value = 0,956

Levene's Test (Any Continuous Distribution)  
Test statistic = 0,48; p-value = 0,748

Από το παραπάνω διάγραμμα και έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή και ομοιογένεια, ( $p > 0,05$ ) αντίστοιχα.

### General Linear Model: Απελευθέρωση%bsa versus t(h)

Factor	Type	Levels	Values
t(h)	fixed	5	0; 2; 6; 24; 48

Analysis of Variance for Απελευθέρωση%bsa, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
t(h)	4	18,93	18,93	4,73	0,15	0,960
Error	10	323,08	323,08	32,31		
Total	14	342,01				

S = 5,68401    R-Sq = 5,53%    R-Sq(adj) = 0,00%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

t (h)	N	Mean	Grouping
0	3	100,00	A
48	3	99,67	A
6	3	98,63	A
24	3	97,37	A
2	3	97,30	A

Means that do not share a letter are significantly different.

$p > 0,05$  επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και δεν υπάρχει διαφορά στο ποσοστό απελευθέρωσης με την πάροδο του χρόνου.

#### Tukey Simultaneous Tests

Response Variable Απελευθέρωση%bsa

All Pairwise Comparisons among Levels of t (h)

t(h) = 0 subtracted from:

t (h)	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
2	-2,700	4,641	-0,5818	0,9748
6	-1,367	4,641	-0,2945	0,9981
24	-2,633	4,641	-0,5674	0,9770
48	-0,333	4,641	-0,0718	1,0000

t(h) = 2 subtracted from:

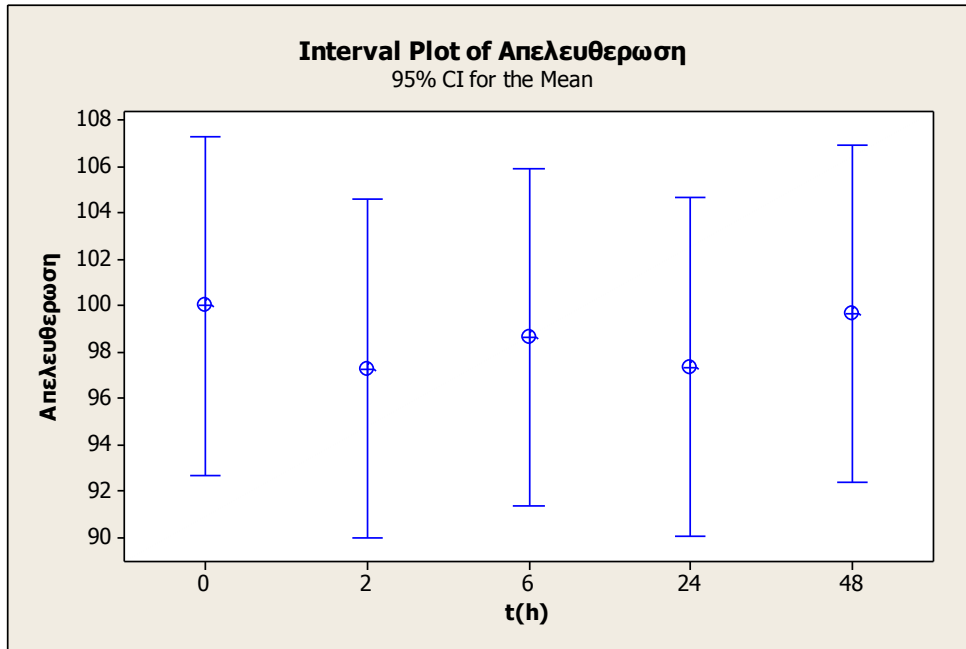
t (h)	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
6	1,33333	4,641	0,28730	0,9982
24	0,06667	4,641	0,01436	1,0000
48	2,36667	4,641	0,50995	0,9844

t(h) = 6 subtracted from:

t (h)	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
24	-1,267	4,641	-0,2729	0,9986
48	1,033	4,641	0,2227	0,9994

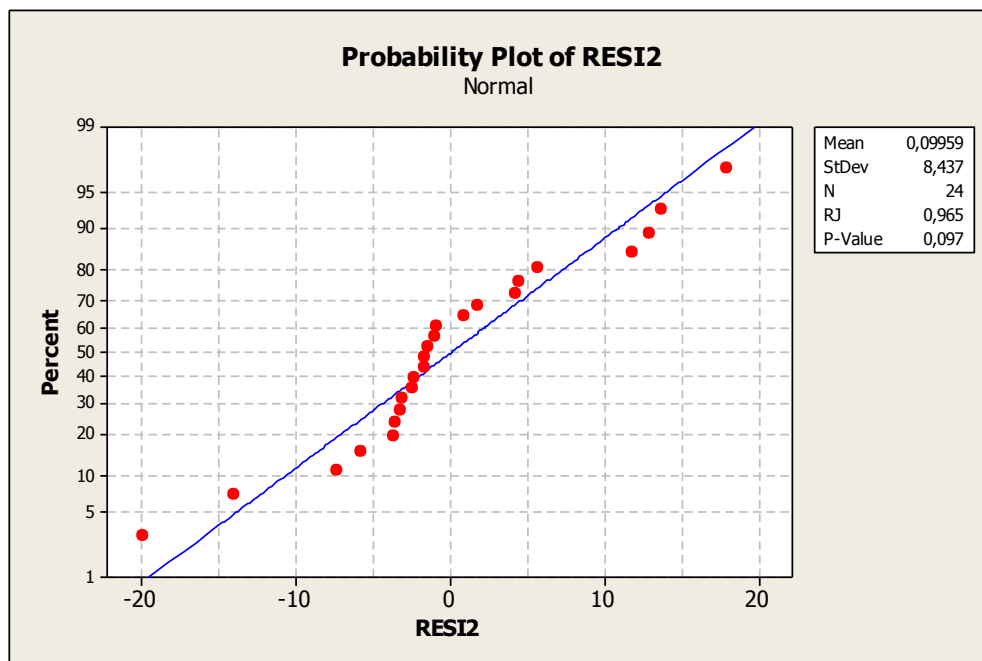
t(h) = 24 subtracted from:

t (h)	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
48	2,300	4,641	0,4956	0,9860



## Παράρτημα 5

Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των σωματιδίων κεφίρανης



**Test for Equal Variances: z-pot<sup>2</sup> versus Δείγμα**

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Δείγμα	N	Lower	StDev	Upper
1	5	7,13497	13,7523	60,4549
2	5	3,47152	6,6912	29,4143
3	5	5,25870	10,1359	44,5572
4	5	4,16026	8,0187	35,2500

5 4 1,58198 3,2726 21,1655

Bartlett's Test (Normal Distribution)  
Test statistic = 5,59; p-value = 0,232

Levene's Test (Any Continuous Distribution)  
Test statistic = 0,76; p-value = 0,564

## General Linear Model: z-pot<sup>2</sup> versus Δείγμα

Factor Type Levels Values  
Δείγμα fixed 5 1; 2; 3; 4; 5

Analysis of Variance for z-pot<sup>2</sup>, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Δείγμα	4	1303,13	1303,13	325,78	3,78	0,020
Error	19	1635,86	1635,86	86,10		
Total	23	2939,00				

S = 9,27890 R-Sq = 44,34% R-Sq(adj) = 32,62%

Unusual Observations for z-pot<sup>2</sup>

Obs	z-pot <sup>2</sup>	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
2	0,7569	20,6286	4,1497	-19,8717	-2,39 R
5	38,5641	20,6286	4,1497	17,9355	2,16 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

Δείγμα	N	Mean	Grouping
5	4	25,455	A
1	5	20,629	A B
3	5	15,253	A B
4	5	9,461	A B
2	5	4,442	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous Tests

Response Variable z-pot<sup>2</sup>

All Pairwise Comparisons among Levels of Δείγμα

Δείγμα = 1 subtracted from:

Δείγμα	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
2	-16,19	5,868	-2,758	0,0817
3	-5,38	5,868	-0,916	0,8873
4	-11,17	5,868	-1,903	0,3492
5	4,83	6,224	0,775	0,9346

Δείγμα = 2 subtracted from:

Δείγμα	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
--------	---------------------	------------------	---------	------------------



3	10,811	5,868	1,8422	0,3799
4	5,018	5,868	0,8551	0,9095
5	21,013	6,224	3,3758	0,0234

Δείγμα = 3 subtracted from:

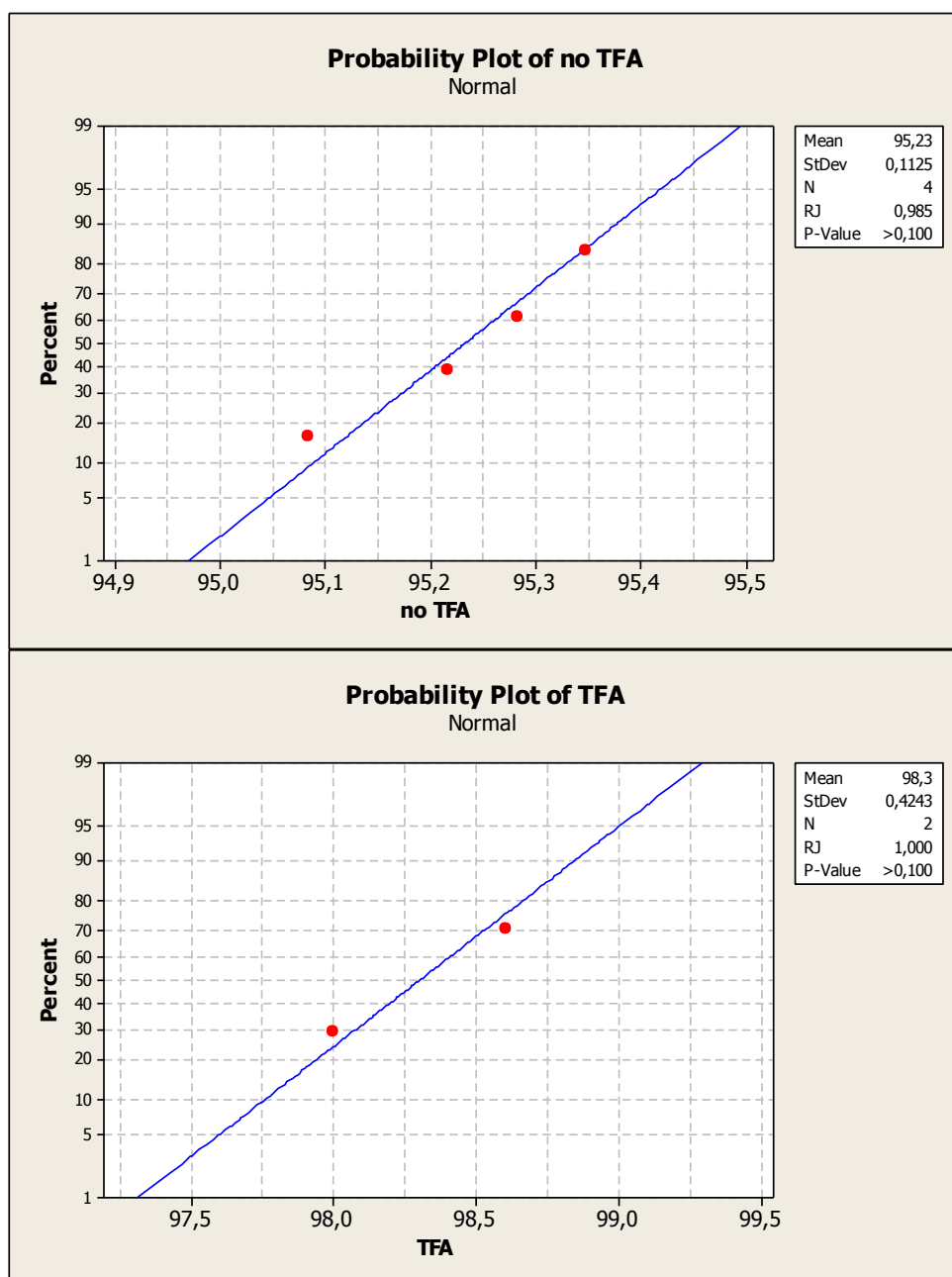
Δείγμα	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
4	-5,793	5,868	-0,9871	0,8578
5	10,202	6,224	1,6390	0,4922

Δείγμα = 4 subtracted from:

Δείγμα	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
5	15,99	6,224	2,570	0,1166

## Παράρτημα 6

Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης στα σωματίδια κεφίρανης



### Test for Equal Variances: Αποτελεσματικότητα versus Υδρόλυση

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Υδρόλυση	N	Lower	StDev	Upper
no TFA	4	0,059147	0,112542	0,5330
TFA	2	0,169862	0,424264	27,0800

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 0,07; p-value = 0,065

Levene's Test (Any Continuous Distribution)  
Test statistic = 21,15; p-value = 0,010

Από τα παραπάνω διαγράμματα και τον έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα και ομοιογένεια διακυμάνσεων, αντίστοιχα διότι  $p > 0,05$ .

### Two-Sample T-Test and CI: Αποτελεσματικότητα; Υδρόλυση

Two-sample T for Αποτελεσματικότητα

Υδρόλυση	N	Mean	StDev	SE Mean
no TFA	4	95,232	0,113	0,056
TFA	2	98,300	0,424	0,30

Difference = mu (no TFA) - mu (TFA)

Estimate for difference: -3,068

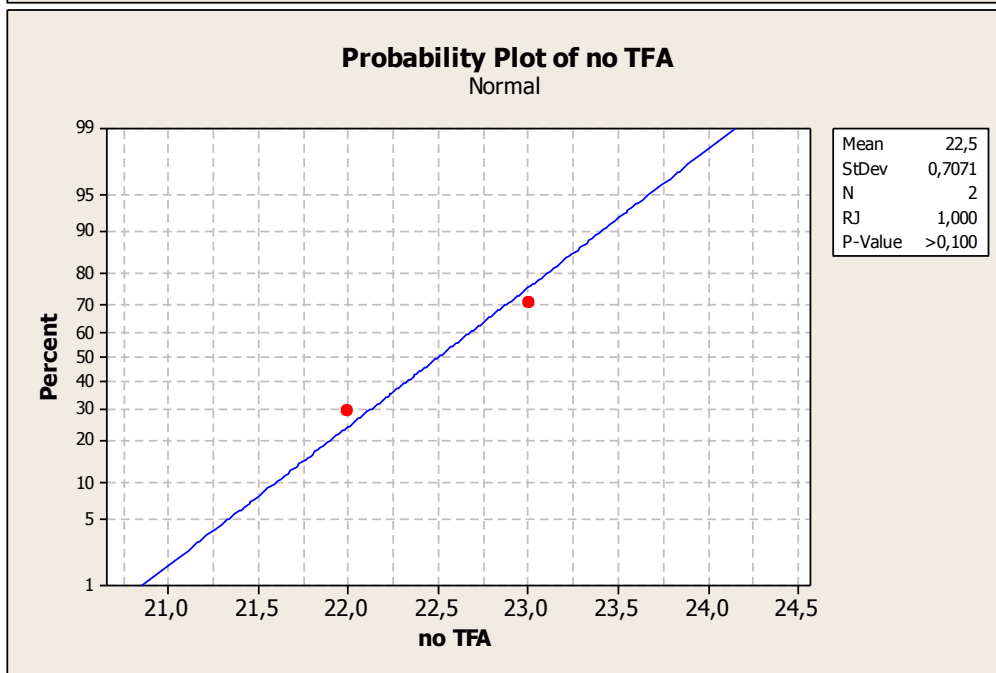
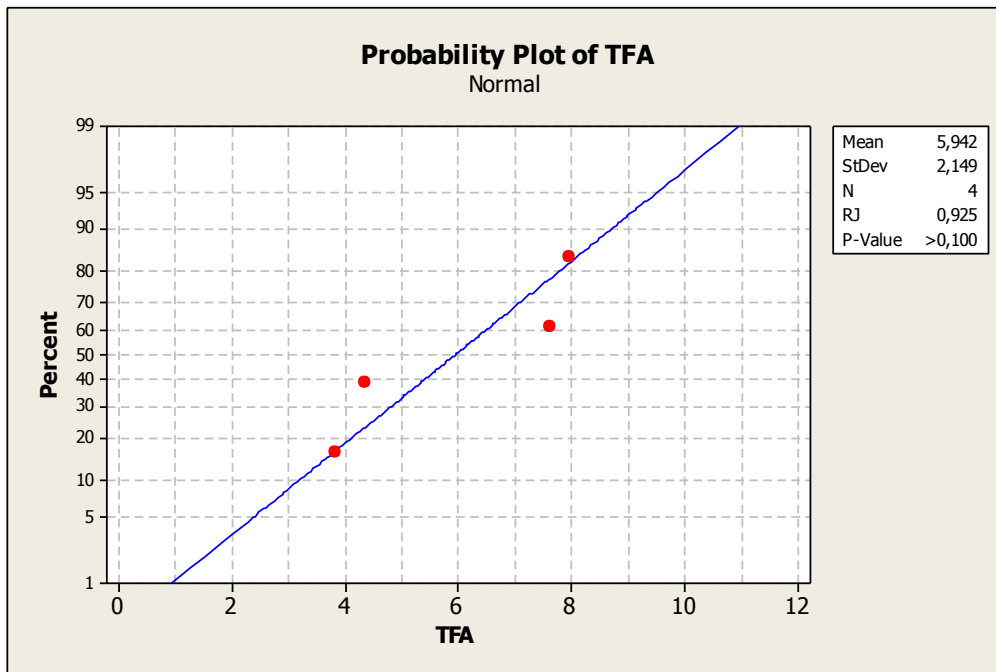
95% CI for difference: (-3,629; -2,506)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -15,17 P-Value = 0,000 DF = 4

Both use Pooled StDev = 0,2335

$p < 0,05$  επομένως είναι στατιστικά σημαντική η επίδραση της μερικής υδρόλυσης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης.

Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο φορτίο αλβουμίνης στα σωματίδια κεφίρανης



## Test for Equal Variances: Φορτίο versus Υδρόλυση

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Υδρόλυση	N	Lower	StDev	Upper
no TFA	2	0,28310	0,70711	45,1333
TFA	4	1,12968	2,14949	10,1799

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 0,11; p-value = 0,472

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 45,68; p-value = 0,002

Από τα παραπάνω διαγράμματα και τον έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα και ομοιογένεια διακυμάνσεων, αντίστοιχα διότι  $p > 0,05$ .

### Two-Sample T-Test and CI: Φορτίο; Υδρόλυση

Two-sample T for Φορτίο

Υδρόλυση	N	Mean	StDev	SE Mean
no TFA	2	22,500	0,707	0,50
TFA	4	5,94	2,15	1,1

Difference = mu (no TFA) - mu (TFA)

Estimate for difference: 16,56

95% CI for difference: (12,00; 21,11)

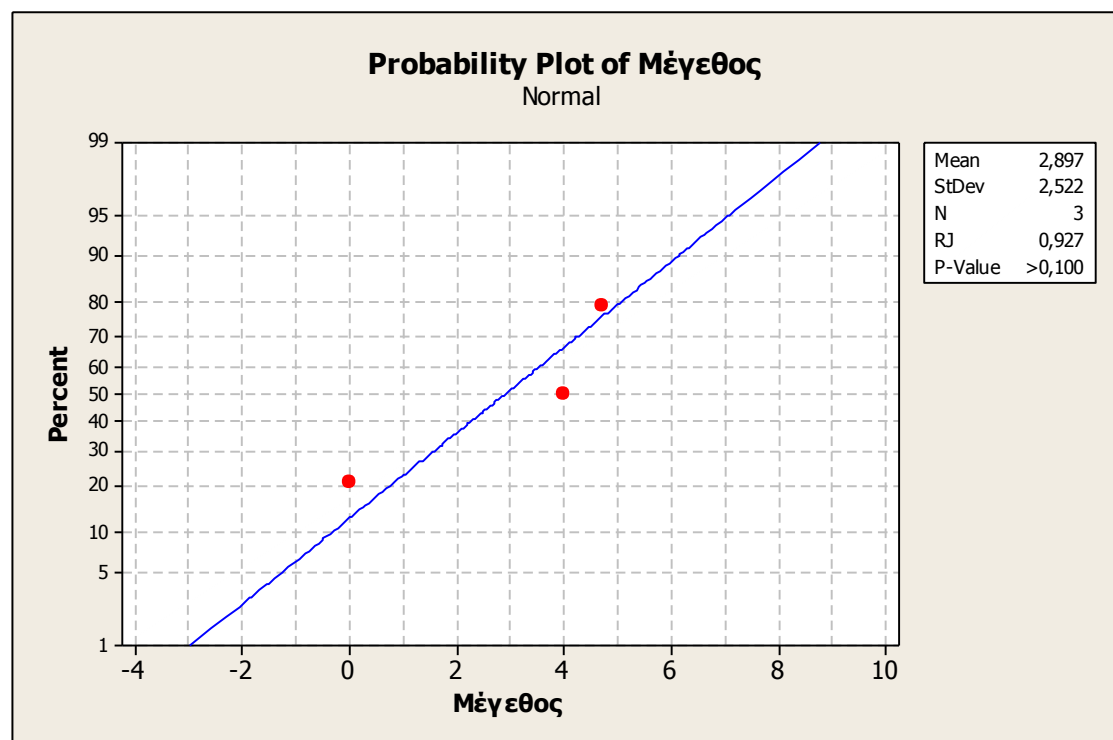
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 10,09 P-Value = 0,001 DF = 4

Both use Pooled StDev = 1,8948

$p < 0,05$  επομένως είναι στατιστικά σημαντική η επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο φορτίο

### Παράρτημα 7

Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος των σωματιδίων κεφίρανης μετά από μερική υδρόλυση



### Paired T-Test and CI: Χωρίς BSA/TFA; Με BSA/TFA

Paired T for Χωρίς BSA/TFA - Με BSA/TFA

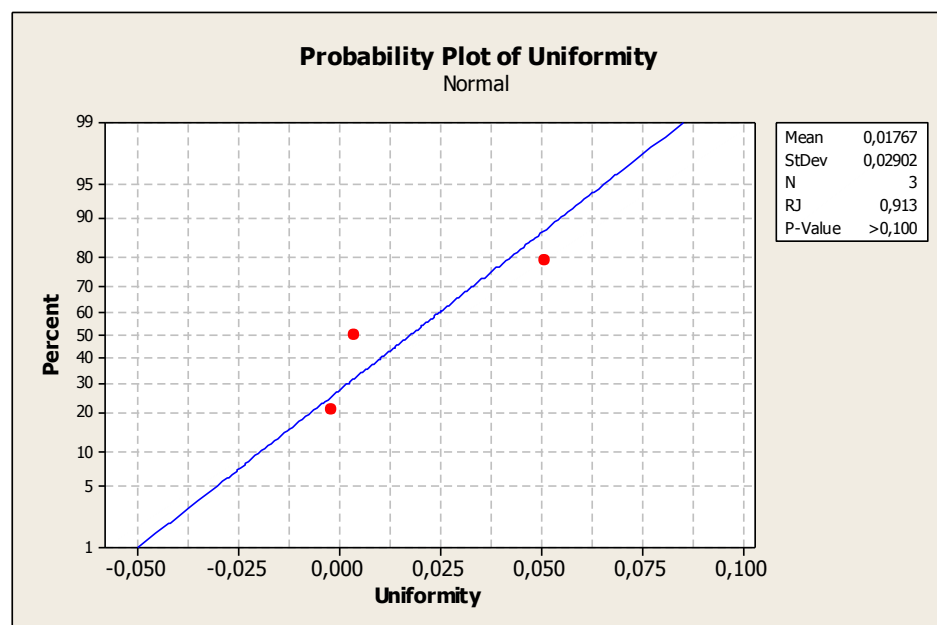
	N	Mean	StDev	SE Mean
Χωρίς BSA/TFA	3	33,76	1,68	0,97
Με BSA/TFA	3	30,86	3,53	2,04
Difference	3	2,90	2,52	1,46

95% CI for mean difference: (-3,37; 9,16)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1,99 P-Value = 0,185

$p > 0,05$  επομένως η προσθήκη αλβουμίνης στα σωματίδια κεφίρανης δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος των μερικώς υδρολυμένων σωματιδίων.

Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης μετά από μερική υδρόλυση



### Paired T-Test and CI: 0%alb/tfa; 1%alb/tfa

Paired T for 0%alb/tfa - 1%alb/tfa

	N	Mean	StDev	SE Mean
0%alb/tfa	3	0,6343	0,0057	0,0033
1%alb/tfa	3	0,6167	0,0344	0,0199
Difference	3	0,0177	0,0290	0,0168

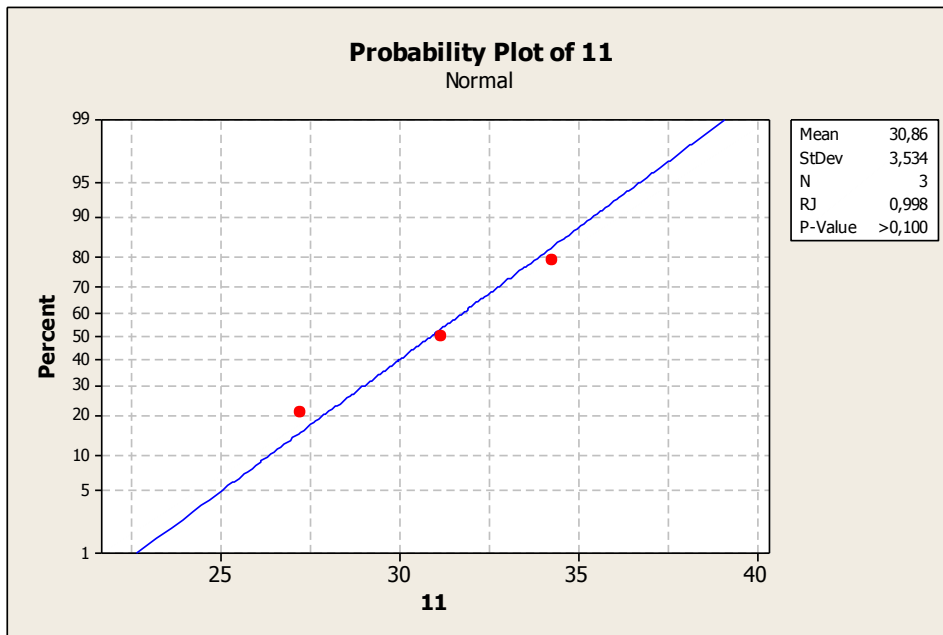
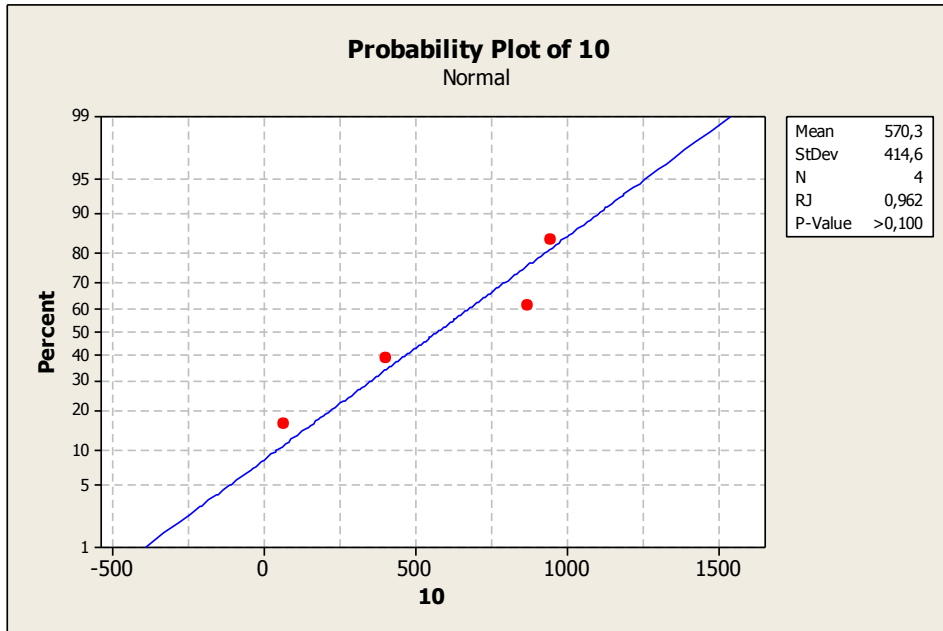
95% CI for mean difference: (-0,0544; 0,0898)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1,05 P-Value = 0,402

$p > 0,05$  επομένως η προσθήκη αλβουμίνης δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στον δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων.

## Παράρτημα 8

Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο μέγεθος στα σωματίδια κεφίρανης με αλβουμίνη



**Test for Equal Variances: Μέγεθος(μm) versus BSA/TFA**

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

BSA/TFA	N	Lower	StDev	Upper
10	4	217,872	414,555	1963,32
11	3	1,688	3,534	31,51

F-Test (Normal Distribution)  
Test statistic = 13761,86; p-value = 0,000

Levene's Test (Any Continuous Distribution)  
Test statistic = 12,48; p-value = 0,017

Από τα παραπάνω διαγράμματα και τον έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα ( $p > 0,05$ ), αλλά δεν υπάρχει ομοιογένεια διακυμάνσεων ( $p < 0,05$ ).

### Two-Sample T-Test and CI: 10; 11

Two-sample T for 10 vs 11

	N	Mean	StDev	SE Mean
10	4	570	415	207
11	3	30,86	3,53	2,0

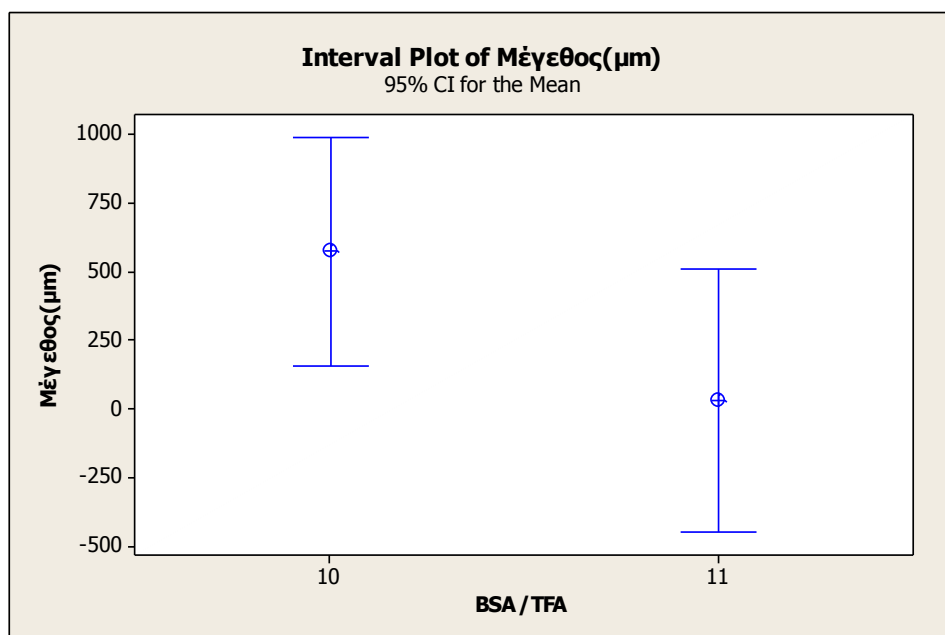
Difference =  $\mu$  (10) -  $\mu$  (11)

Estimate for difference: 539

95% lower bound for difference: 52

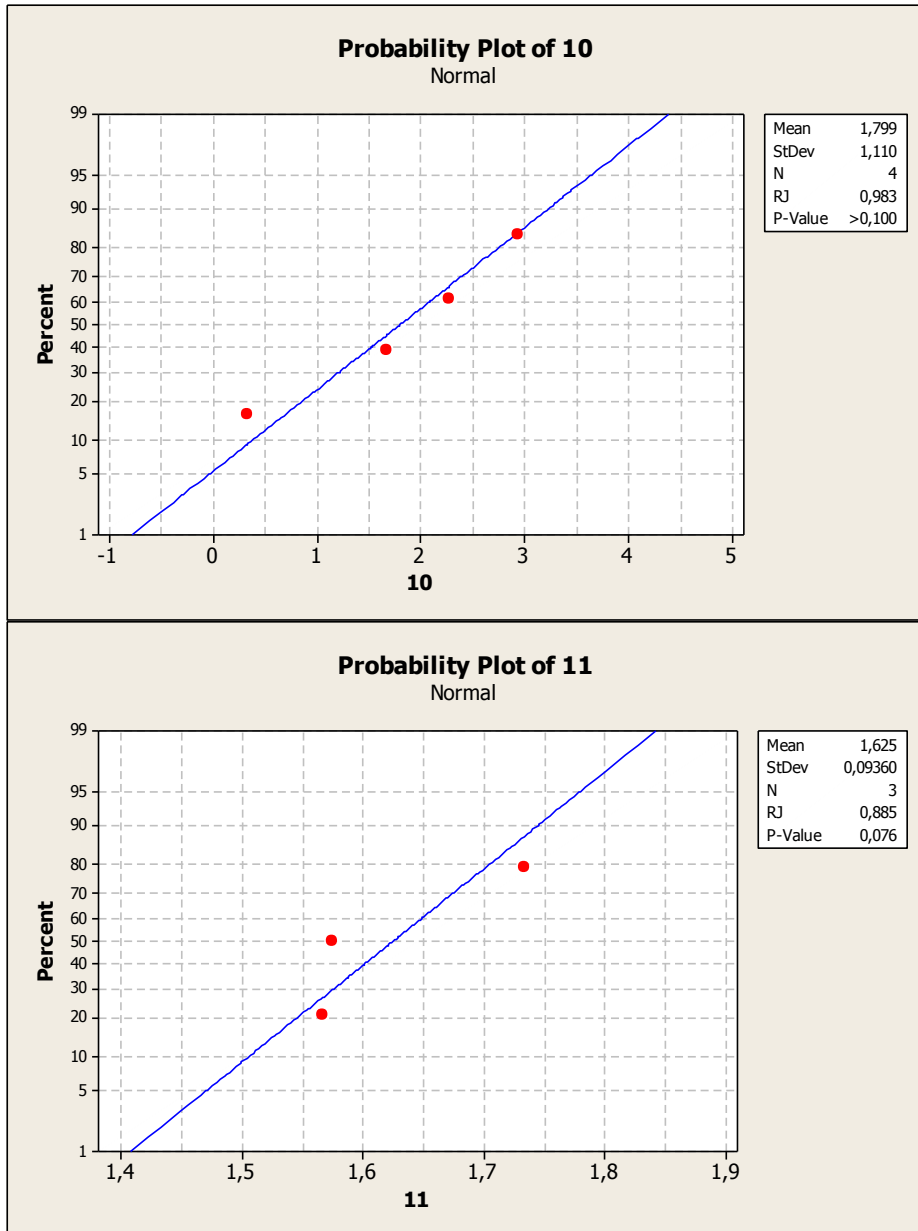
T-Test of difference = 0 (vs >): T-Value = 2,60 P-Value = 0,040 DF = 3

$P < 0,05$  επομένως η μερική υδρόλυση έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος των σωματιδίων κεφίρανης με αλβουμίνη.



Επίδραση της μερικής υδρόλυσης στο δείκτη πολυδιασποράς σε σωματίδια κεφίρανης με αλβουμίνη





### Test for Equal Variances: Uniformity versus BSA/TFA

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

BSA/TFA	N	Lower	StDev	Upper
10	4	0,693339	1,31925	6,24794
11	3	0,016426	0,03439	0,30658

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 1472,02; p-value = 0,001

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 0,94; p-value = 0,377

Από τα παραπάνω διαγράμματα και τον έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα ( $p > 0,05$ ), αλλά δεν υπάρχει ομοιογένεια διακυμάνσεων ( $p < 0,05$ ).

### Two-Sample T-Test and CI: Uniformity; BSA/TFA

Two-sample T for Uniformity

BSA/TFA	N	Mean	StDev	SE Mean
10	4	1,12	1,32	0,66
11	3	0,6167	0,0344	0,020

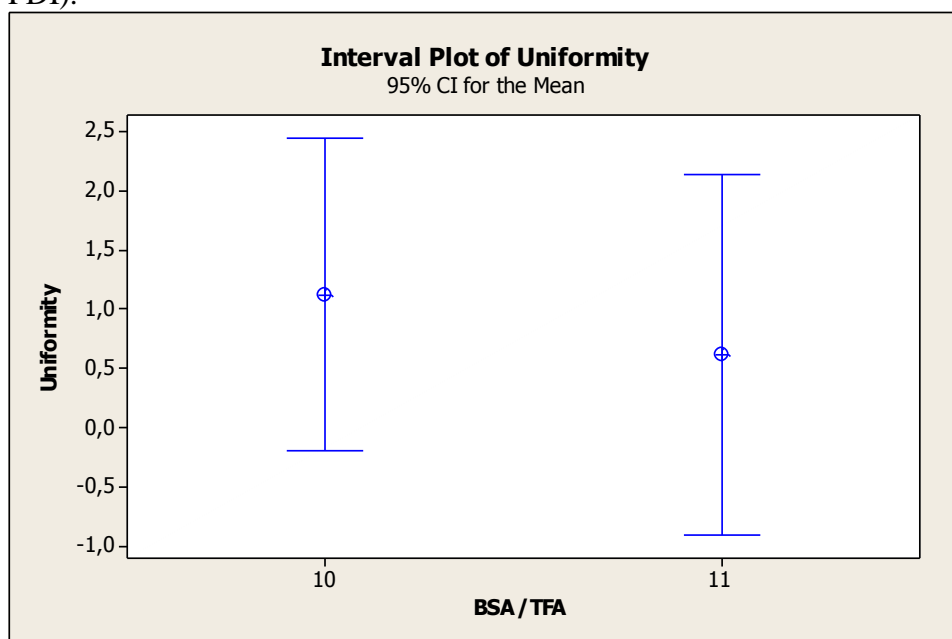
Difference =  $\mu$  (10) -  $\mu$  (11)

Estimate for difference: 0,501

95% lower bound for difference: -1,052

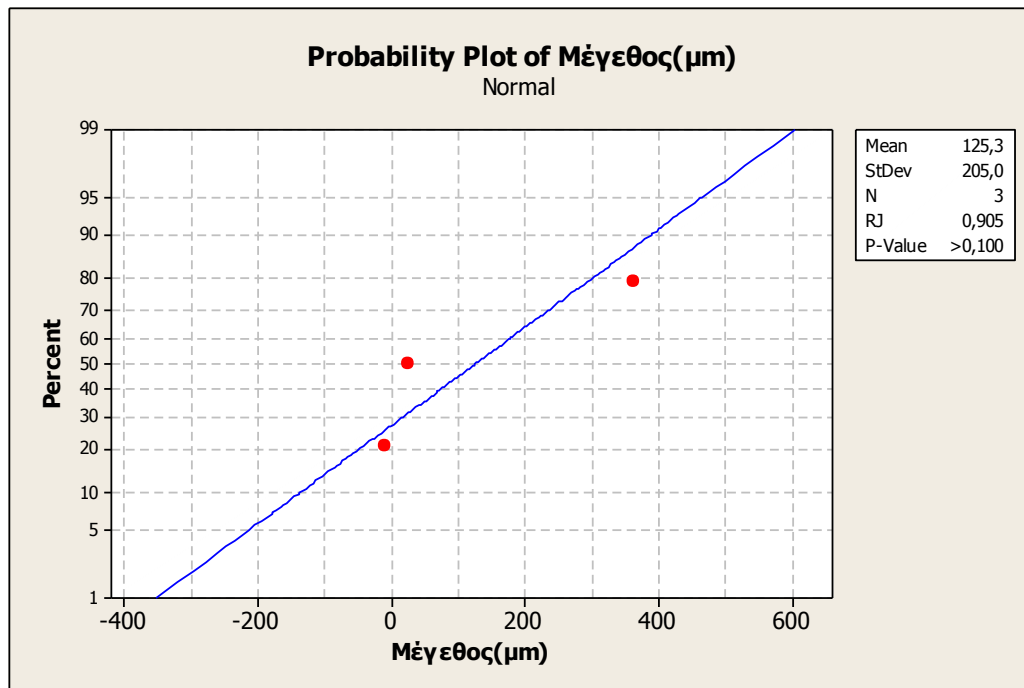
T-Test of difference = 0 (vs >): T-Value = 0,76 P-Value = 0,252 DF = 3

$p > 0,05$  επομένως η επίδραση της μερικής υδρόλυσης στα σωματίδια κεφिरάνης με αλβουμίνη δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον δείκτη πολυδιασποράς (PDI).



### Παράρτημα 9

Επίδραση της προσθήκης καζεϊνικού νατρίου και στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφिरάνης



Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στο δείγματα ( $p > 0,05$ ).

#### Paired T-Test and CI: 0% kaz. Na; 0,25% kaz

Paired T for 0% kaz. Na - 0,25% kaz

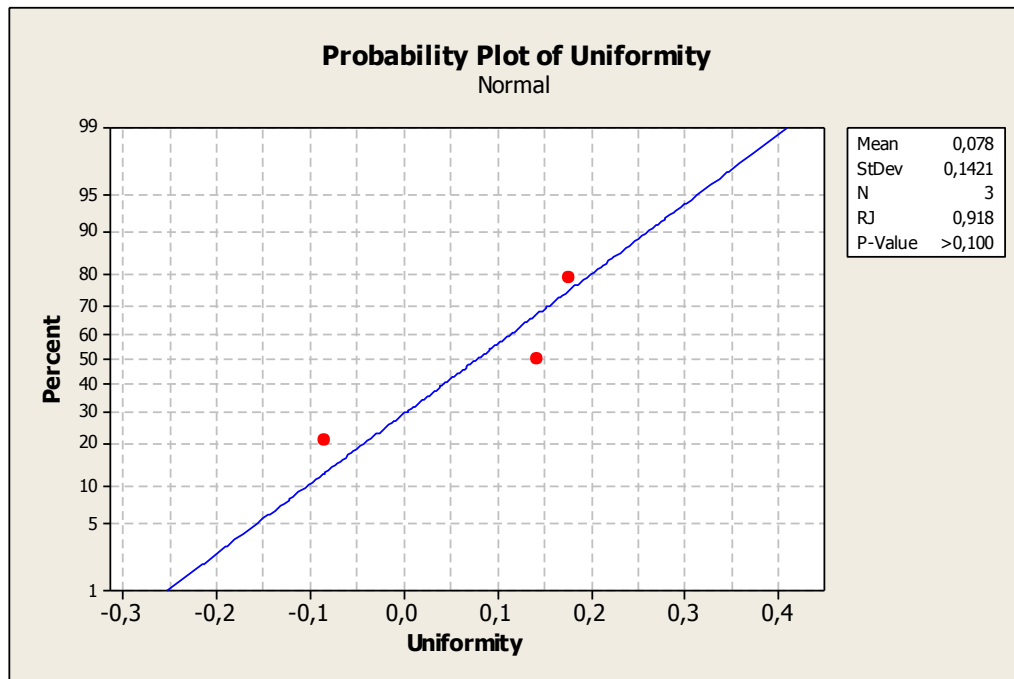
	N	Mean	StDev	SE Mean
0% kaz. Na	3	506	340	196
0,25% kaz	3	381	366	211
Difference	3	125	205	118

95% CI for mean difference: (-384; 634)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1,06 P-Value = 0,401

$p > 0,05$  επομένως η επίδραση της προσθήκης καζεϊνικού νατρίου δεν επέφερε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέγεθος των σωματιδίων.

Επίδραση της προσθήκης καζεϊνικού νατρίου στο δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων κεφίρανης



Στο διάγραμμα παρατηρείται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στο δείγμα ( $p > 0,05$ ).

### Paired T-Test and CI: 0%καζ; 0,25%καζ

Paired T for 0%καζ - 0,25%καζ

	N	Mean	StDev	SE Mean
0%καζ	3	0,659	0,182	0,105
0,25%καζ	3	0,581	0,073	0,042
Difference	3	0,0780	0,1421	0,0821

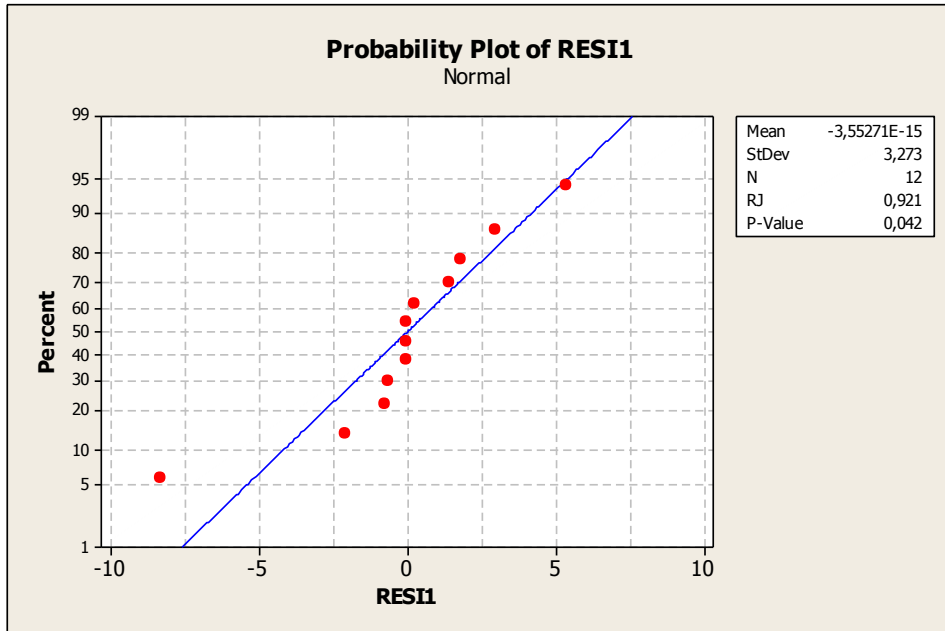
95% CI for mean difference: (-0,2751; 0,4311)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 0,95 P-Value = 0,442

$p > 0,05$  επομένως η προσθήκη καζεϊνικού νατρίου δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο δείκτη πολυδιασποράς.

### Παράρτημα 10

Απελευθέρωση καζεϊνικού νατρίου από τα σωματίδια κεφειράνης



### Test for Equal Variances: RESI1 versus t(h)

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

t(h)	N	Lower	StDev	Upper
0	3	*	0,00000	*
2	3	3,34362	7,31596	79,9750
24	3	0,56777	1,24231	13,5804
48	3	0,89598	1,96044	21,4307

Bartlett's Test (Normal Distribution)  
Test statistic = 5,19; p-value = 0,075

Levene's Test (Any Continuous Distribution)  
Test statistic = 1,28; p-value = 0,347

Από το παραπάνω διάγραμμα κα έλεγχο παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κανονική κατανομή ( $p < 0,05$ ) και υπάρχει ομοιογένεια ( $p > 0,05$ ), αντίστοιχα.

### One-way ANOVA: Απελευθέρωση versus t(h)

Source	DF	SS	MS	F	P
t(h)	3	152,0	50,7	3,44	0,072
Error	8	117,8	14,7		
Total	11	269,8			

S = 3,838 R-Sq = 56,33% R-Sq(adj) = 39,95%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0	3	100,00	0,00
2	3	106,63	7,32
24	3	97,07	1,24
48	3	99,37	1,96

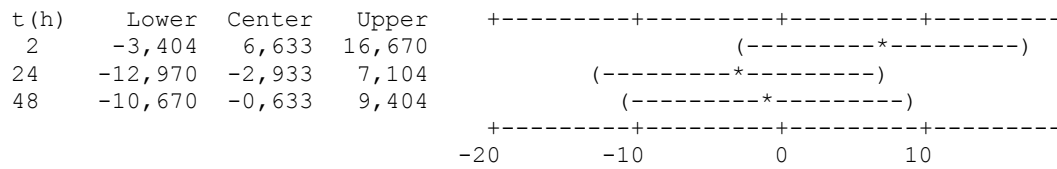
Pooled StDev = 3,84

$P > 0,05$  επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό απελευθέρωσης του καζείνικου νατρίου από τα σωματίδια κεφίρανης με την πάροδο του χρόνου όπως φαίνεται και από τον έλεγχο του Tukey.

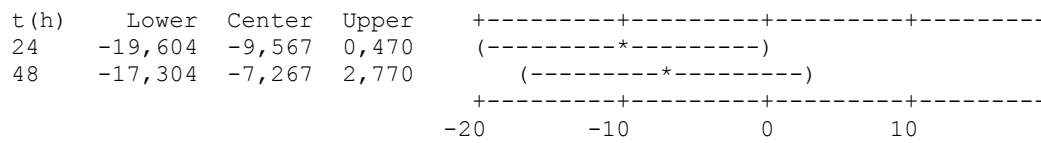
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of t(h)

Individual confidence level = 98,74%

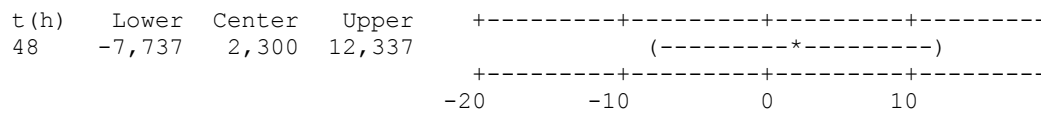
t(h) = 0 subtracted from:



t(h) = 2 subtracted from:

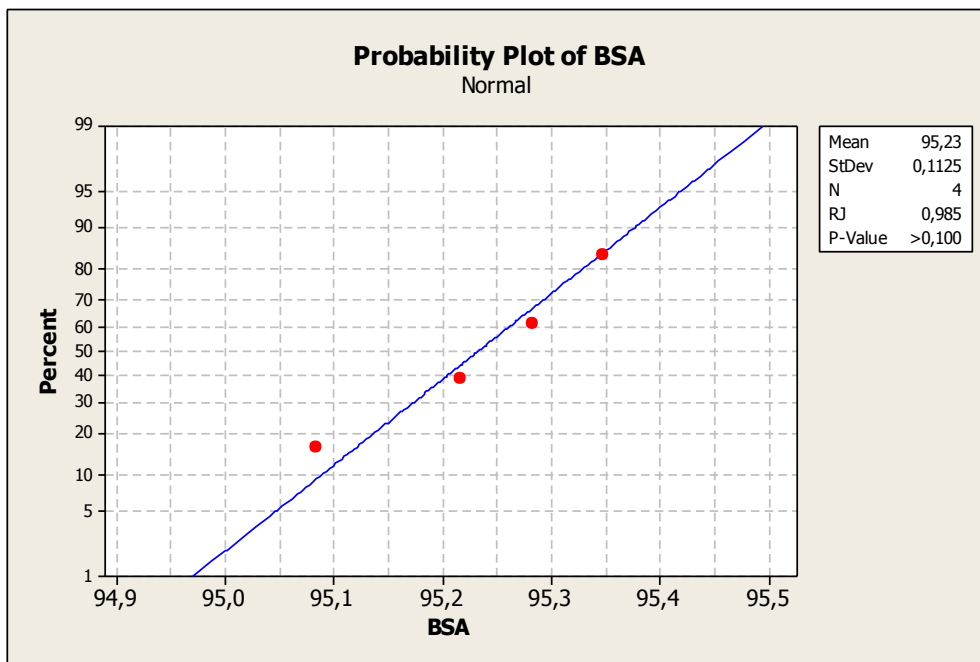
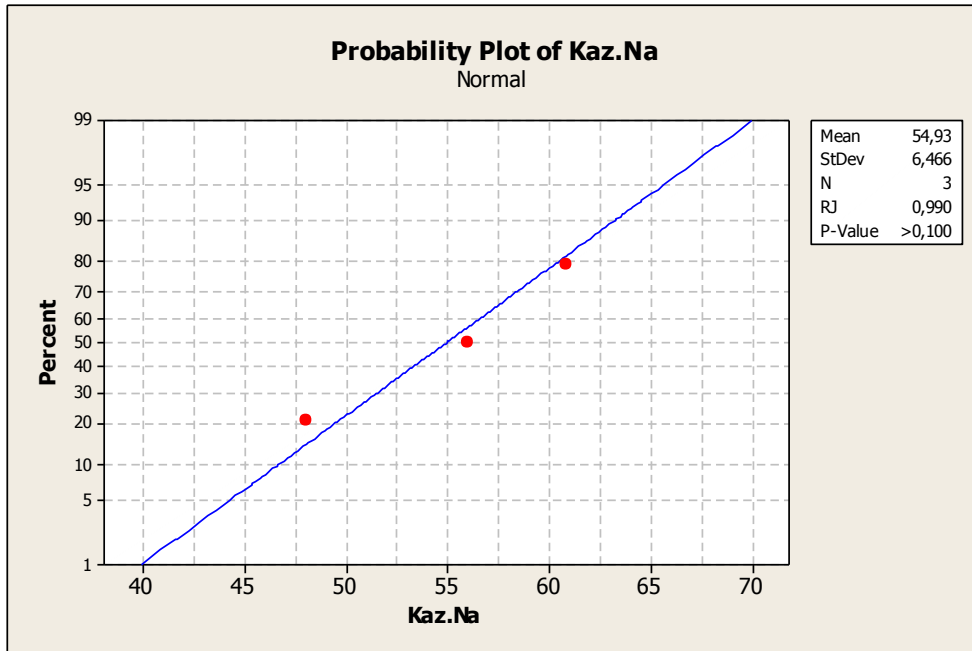


t(h) = 24 subtracted from:



## Παράρτημα 11

### 5. Επίδραση της πρωτεΐνης στην αποτελεσματικότητα ενθουλάκωσης



### Test for Equal Variances: Αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης versus Πρωτεΐνη

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Πρωτεΐνη	N	Lower	StDev	Upper
BSA	4	0,05915	0,11254	0,5330
Kaz.Na	3	3,08901	6,46632	57,6551

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 0,00; p-value = 0,000

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 4,63; p-value = 0,084

Από το παραπάνω διάγραμμα και έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα καθώς  $p > 0,05$ , αλλά δεν υπάρχει ομοιογένεια διακυμάνσεων διότι  $p < 0,05$ .

## Two-Sample T-Test and CI: Αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης; Πρωτεΐνη

Two-sample T for Αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης

Πρωτεΐνη	N	Mean	StDev	SE Mean
BSA	4	95,232	0,113	0,056
Kaz.Na	3	54,93	6,47	3,7

Difference = mu (BSA) - mu (Kaz.Na)

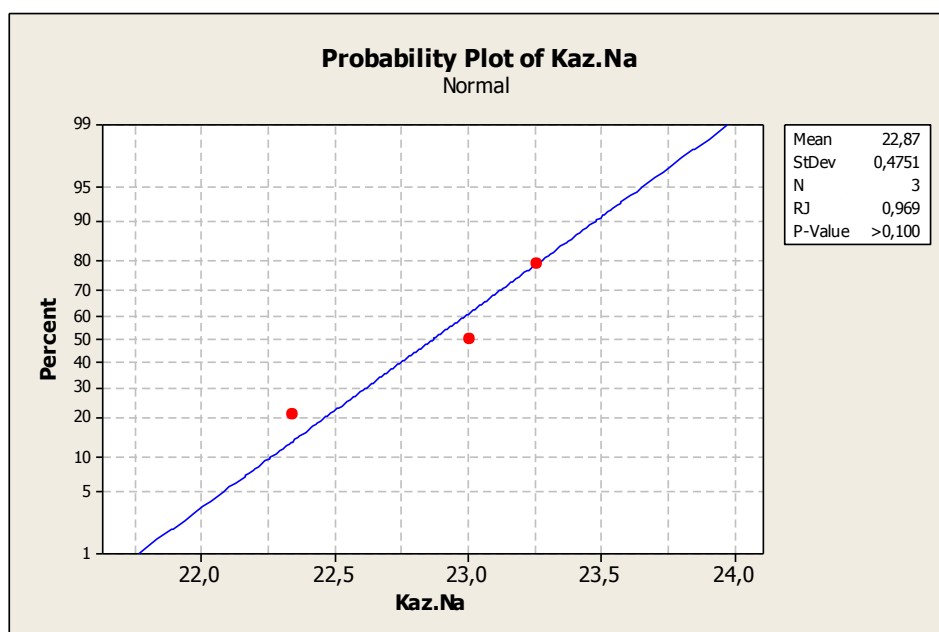
Estimate for difference: 40,30

95% CI for difference: (24,23; 56,36)

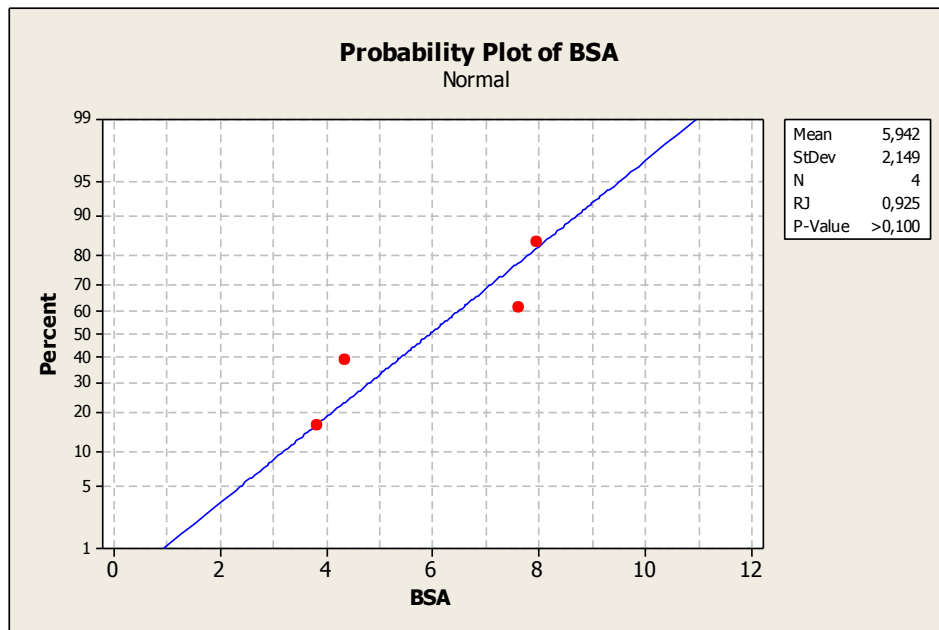
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 10,79 P-Value = 0,008 DF = 2

$p < 0,05$  επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο διαφορετικών πρωτεϊνών.

### Επίδραση των διαφορετικών πρωτεϊνών στο φορτίο







### Test for Equal Variances: Φορτίο versus Πρωτεΐνη

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Πρωτεΐνη	N	Lower	StDev	Upper
BSA	4	1,12968	2,14949	10,1799
Kaz.Na	3	0,22695	0,47507	4,2359

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 20,47; p-value = 0,094

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 46,68; p-value = 0,001

Από τα παραπάνω διαγράμματα και τον έλεγχο φαίνεται ότι υπάρχει κανονική κατανομή στα δείγματα και ομοιογένεια διακυμάνσεων αντίστοιχα διότι  $p > 0,05$ .

### Two-Sample T-Test and CI: Φορτίο; Πρωτεΐνη

Two-sample T for Φορτίο

Πρωτεΐνη	N	Mean	StDev	SE Mean
BSA	4	5,94	2,15	1,1
Kaz.Na	3	22,869	0,475	0,27

Difference =  $\mu$  (BSA) -  $\mu$  (Kaz.Na)

Estimate for difference: -16,93

95% CI for difference: (-20,25; -13,61)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -13,10 P-Value = 0,000 DF = 5

Both use Pooled StDev = 1,6919

$p < 0,05$  επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο φορτίο μεταξύ των δύο πρωτεϊνών