



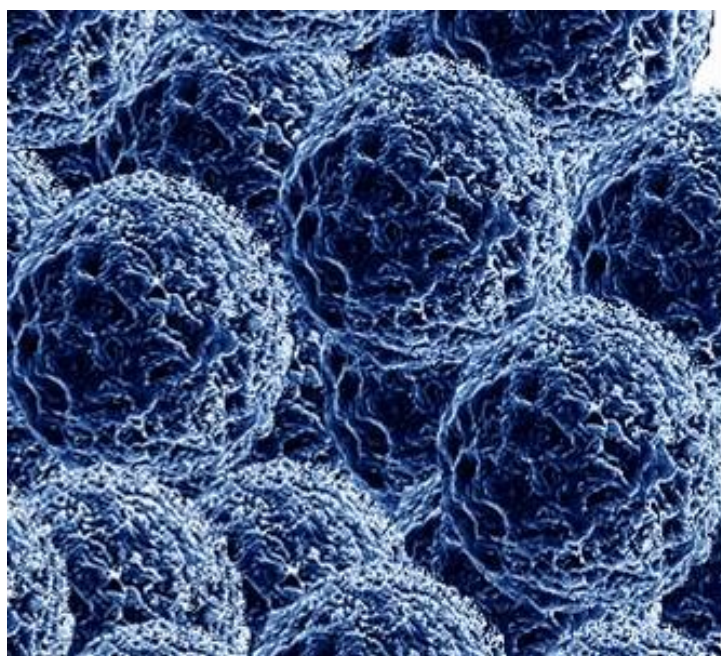
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εγκλεισμός αλβουμίνης βοείου ορού σε σωματίδια αμύλου



Επιμέλεια

Ζιώγα Μάρθα

Χρυσανθοπούλου Φωτεινή

Επίβλεψη

Καραγεωργίου Βασίλειος

Θεσσαλονίκη 2014

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εγκλεισμός αλβουμίνης βοείου ορού σε σωματίδια αμύλου

Όνοματεπώνυμο: Ζιώγα Μάρθα
Χρυσανθοπούλου Φωτεινή

Επίβλεψη: Καραγεωργίου Βασίλειος

Εξεταστές: Παπαγεωργίου Μαρία
Ριτζούλης Χρήστος

Θεσσαλονίκη 2014

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο εγκλεισμός αλβουμίνης βοείου ορού σε νανοσωματίδια αμύλου και αξιολογήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στο φορτίο και στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, η επίδραση της ταχύτητας και του ρυθμού παροχής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, η επίδραση προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς παρατηρήθηκε ακόμη η μελέτη του μαγνητικού φορτίου των νανοσωματιδίων και η μελέτη απελευθέρωσης της αλβουμίνης από τα νανοσωματίδια.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι όταν αυξάνεται η συγκέντρωση αλβουμίνης επιφέρει μείωση του φορτίου ενώ η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αυξάνεται εξίσου. Επίσης ελέγχοντας την ταχύτητα ροής της αιθανόλης μέσω βελόνων διαφορετικής διατομής έγινε αντιληπτό ότι η βελόνα μικρότερης διατομής επιφέρει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης. Διαπιστώθηκε ακόμη ότι ο ρυθμός παροχής της αιθανόλης δεν επιφέρει καμία σπουδαία αλλαγή στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
1. Εισαγωγή.....	6
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	7
2.1. Νανοενθυλάκωση/εγκλεισμός ουσιών.....	7
2.1.1. Τεχνικές νανοενθυλάκωσης.....	7
2.1.2. Χρήσεις νανοενθυλάκωσης.....	10
2.1.3. Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στα τρόφιμα.....	11
2.1.4. Κίνδυνοι νανοτεχνολογίας.....	14
2.2. Άμυλο.....	15
2.2.1. Παρασκευή νανοσωματιδίων αμύλου.....	16
2.2.2. Απελευθέρωση ουσιών από νανοσωματίδια αμύλου.....	18
2.2.3. Επίδραση αμυλασών.....	18
2.3. Αλβουμίνη.....	19
3. Σκοπός της εργασίας.....	20
4. Πειραματικό μέρος.....	20
4.1. Υλικά.....	20
4.1.1. Αντιδραστήρια.....	20
4.1.2. Όργανα.....	20
4.2. Μέθοδοι ανάλυσης.....	21
4.2.1. Μέθοδος εγκλεισμού αλβουμίνης βόειου ορού σε νανοσωματίδια αμύλου.....	21
4.2.1.1. Επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης.....	24
4.2.1.2. Επίδραση του μεγέθους της σταγόνας αιθανόλης.....	24
4.2.1.4. Μελέτη της απελευθέρωσης αλβουμίνης από νανοσωματίδια αμύλου.....	25
4.2.1.5. Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στον δείκτη πολυδιασποράς (pdI) των νανοσωματιδίων.....	25
4.2.1.6. Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αμύλου.....	26
4.3. Στατιστική ανάλυση.....	26
5. Αποτελέσματα – συζήτηση.....	26
5.1. Επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο αλβουμίνης.....	26
5.2. Επίδραση του μεγέθους της σταγόνας αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης.....	30
5.3. Επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης.....	32

5.4. Μελέτη της απελευθέρωσης αλβουμίνης από νανοσωματίδια αμύλου κατά την πάροδο του χρόνου	34
5.5. Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στον δείκτη πολυδιασποράς (pdI) των νανοσωματιδίων	37
5.6. Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αμύλου	38
6. Συμπεράσματα.....	40
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	41
Βιβλιογραφία	42
Παράρτημα 1.....	44
Παράρτημα 2	46
Παράρτημα 3	48
Παράρτημα 4	50
Παράρτημα 5	52
Παράρτημα 6	54
Παράρτημα 7	56

1. Εισαγωγή

Ο όρος νανοτεχνολογία αναφέρεται σε τεχνολογίες όπου η ύλη επεξεργάζεται σε κλίμακα ατόμου και μορίου για να δημιουργήσει νέα υλικά και διαδικασίες. Οι αλλαγές που επέρχονται στις μοριακές ιδιότητες ενός υλικού στη νανοκλίμακα ενισχύουν εξαιρετικά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Από μια γενική άποψη οι περισσότερες από τις εφαρμογές της νανοτεχνολογίας αφορούν σε μεγέθη μικρότερα από τα 300 nm. Το πρόθεμα “νανο” που όπως είναι γνωστό προέρχεται από την ελληνική λέξη νάνος, σημαίνει 10^{-9} , δηλαδή 0,000000001.

Το άμυλο είναι ένα φυσικό, βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο πολυμερές, που παράγεται από πολλά φυτά ως πηγή αποθηκευμένης ενέργειας, ενώ είναι το δεύτερο πιο άφθονο υλικό βιομάζας στη φύση.

Η νανοενθυλάκωση είναι η επικάλυψη ή παγίδευση ενός καθαρού υλικού ή ενός μίγματος σε ένα άλλο υλικό. Το επικαλυμμένο ή παγιδευμένο υλικό είναι συνήθως ένα υγρό αλλά μπορεί να είναι και στερεό ή αέριο. Η ενθυλάκωση μπορεί να επιτευχθεί με πολλές τεχνικές, και έχοντας διάφορους σκοπούς.

Τα νανοσωματίδια αμύλου είναι μια κατάλληλη μορφή για ενθυλάκωση πρωτεϊνών, ενώ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η απελευθέρωση ουσιών από αυτά.

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν ο εγκλεισμός ουσιών σε νανοσωματίδια αμύλου, καθώς και η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων. Η ουσία που χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο ήταν η αλβουμίνη βόειου ορού. Μελετήθηκε, ακόμη, η απελευθέρωση αλβουμίνης από τα νανοσωματίδια αμύλου με την πάροδο του χρόνου, παρουσία και απουσία αμυλάσης.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1. Νανοενθυλάκωση/εγκλεισμός ουσιών

Η νανοεπιστήμη είναι ένας αναδυόμενος τομέας της επιστήμης που έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει ριζικά νέα προϊόντα και διαδικασίες. Ο τομέας των νανοεπιστημών πλαισιώνεται από ιδέες, οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα να γίνονται ευκολότερα κατανοητές οι αλληλεπιδράσεις και οι συγκροτημένες συμπεριφορές των συστατικών των τροφίμων που επηρεάζουν την δομή, τη ρεολογία και τις λειτουργικές ιδιότητες των τροφίμων σε μακροσκοπική κλίμακα. Οι πρόοδοι στις μεθόδους για την παραγωγή νανοδομημένων υλικών, σε συνδυασμό με την κατάλληλη στρατηγική διαμόρφωσης, έχουν κάνει δυνατή την παραγωγή και τη σταθεροποίηση νανοσωματιδίων που έχουν δυνητικές εφαρμογές στα τρόφιμα και στις συναφείς βιομηχανίες (Sanguansri & Augustin, 2006).

Η νανοενθυλάκωση είναι η επικάλυψη ή παγίδευση ενός καθαρού υλικού ή ενός μίγματος σε ένα άλλο υλικό. Το επικαλυμμένο ή παγιδευμένο υλικό είναι συνήθως ένα υγρό αλλά μπορεί να είναι και στερεό ή αέριο. Αυτό το υλικό είναι επίσης γνωστό ως υλικό του πυρήνα. Το υλικό επικάλυψης μπορεί επίσης να ονομαστεί κάψουλα, υλικό τοιχώματος, μεμβράνη, φορέας ή κέλυφος. Αυτό μπορεί να κατασκευάζεται από σάκχαρα, κόμμεα, πρωτεΐνες, φυσικούς και τροποποιημένους πολυσακχαρίτες, λιπίδια και συνθετικά πολυμερή (Gibbs et al., 1999). Ουσιαστικά, με τη νανοτεχνολογία επιδρούμε στο εξωτερικό τοίχωμα της νανοκάψουλας και ελέγχουμε την απελευθέρωση των εμπεριεχομένων ουσιών (encapsulating control) (Nordman, 2009).

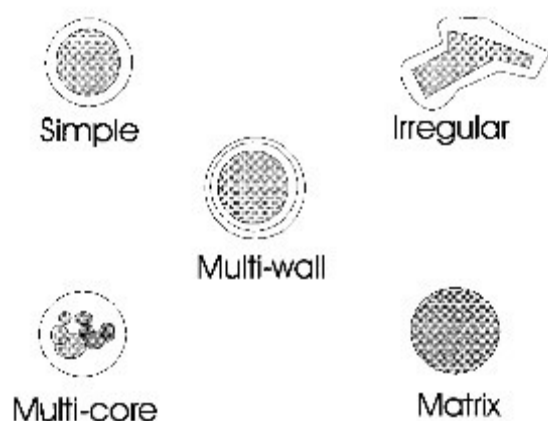
Ο σκοπός της ενθυλάκωσης είναι να προστατεύει τα περιεχόμενά της από το περιβάλλον, το οποίο μπορεί να είναι καταστροφικό, συνήθως λόγω υγρασίας και τη θερμότητας ενώ επιτρέπει μικρά μόρια να περάσουν εντός και εκτός της μεμβράνης. Επιπλέον πλεονεκτήματα της ενθυλάκωσης είναι η βελτίωση των ρεολογικών ιδιοτήτων και του ευκολότερου χειρισμού (Gibbs et al., 1999).

2.1.1. Τεχνικές νανοενθυλάκωσης

Η ενθυλάκωση μπορεί να επιτευχθεί με ποικίλους τρόπους, όπως:

1. Απλή επίστρωση μεμβράνης
2. Δημιουργία τοιχώματος ή μεμβράνης σφαιρικού ή ακανόνιστου σχήματος
3. Δομή πολλαπλών τοιχωμάτων με τοιχώματα από τις ίδιες ή ποικίλες συνθέσεις

4. Πολυάριθμοι πυρήνες εντός των ίδιων τοιχώματων
5. Μήτρας



Σχήμα 1. Νανοσωματίδια με τη χρήση διάφορων τεχνικών (Gibbs et al., 1999).

Οι μικροκάψουλες μπορούν να βελτιώσουν τη διατροφή δεδομένου ότι η εκτεταμένη αποθήκευση πολλών προϊόντων μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της θρεπτικής τους αξίας επιτρέποντας την προσθήκη ευαίσθητων στην οξείδωση βιταμίνες, ανόργανα άλατα και πρωτεΐνες σε διάφορα προϊόντα (Gibbs et al., 1999).

Σε γενικές γραμμές, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση, αποτελούνται από τρία βήματα:

1. τον σχηματισμό του τείχους γύρω από το υλικό
2. την εξασφάλιση ότι δεν θα συμβεί διαρροή
3. τη διασφάλιση ότι τα ανεπιθύμητα υλικά θα παραμείνουν έξω.

Αυτές οι τεχνικές ενθυλάκωσης περιλαμβάνουν:

1. Ξήρανση εκνέφωσης: Είναι μια κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ξήρανση υγρής τροφοδοσίας με τη χρήση θερμού αερίου. Η υγρή τροφοδοσία αντλείται διαμέσου ενός ατομοποιητή και στη συνέχεια εισέρχεται με τη μορφή μικρών σωματιδίων στον κύριο θάλαμο ξήρανσης. Συνήθως χρησιμοποιείται αέρας ως θερμό αέριο, αλλά στην περίπτωση που επεξεργάζονται ευαίσθητα υλικά, απαιτείται ξήρανση απουσία οξυγόνου και συνεπώς χρησιμοποιείται άζωτο (Li, 2009).

2. Ψύξη με ψεκασμό: Όπως και στην ξήρανση εκνέφωσης, το υλικό του πυρήνα γαλακτωματοποιείται σε ένα υλικό τοιχώματος και στη συνέχεια ατομοποιείται σε διεσπαρμένα σταγονίδια τα οποία αμέσως αναμιγνύονται με ένα μέσο ψύξης και ακολούθως στερεοποιείται σε μορφή σκόνης (Li, 2009).

3. Εξώθηση: Γίνεται μίξη των υλικών σε μία θερμοκρασία πάνω από 100° C, στη συνέχεια συμπιέζονται μέσα από ένα ή περισσότερα μικρής διατομής, στόμια και τέλος κρύνουν για να σχηματιστεί ένα γυαλί όπου ο δραστικός παράγοντας έχει σχετικά μικρή κινητικότητα (Zuidam & Shimoni, 2010).

4. Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη: Αποτελείται από ένα στρώμα αιωρούμενων στερεών σωματιδίων που διοχετεύεται σε ένα ρεύμα αερίου, συνήθως αέρα, και ένα υγρό επικάλυψης ψεκάζεται στην επιφάνεια κάθε ξεχωριστού σωματιδίου. Τα πρώτα επικαλυπτόμενα σωματίδια περικλείονται σε μία ζώνη όπου το μέσο επικάλυψης ξηραίνεται είτε με εξάτμιση διαλύτη είτε με ψύξη. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η εφαρμογή ενός ομοιόμορφου στρώματος υλικών κελύφους σε στερεά σωματίδια. (Li, 2009).

5. Παγίδευση σε λιποσώμα: Ενεργές λειτουργικές ουσίες εγκλείονται σε μήτρες λιπιδιακής βάσης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση δύο κύριων τεχνολογιών, την επικάλυψη θερμής τήξης ρευστοποιημένης κλίνης και λυοφιλίωσης. Οι ενεργές ουσίες μπορούν να παγιδευτούν καλύτερα μέσω ανάμειξης τους με έναν φορέα λίπους/κηρού που ακολουθείται από ψεκασμό παγώματος (Lakkis, 2007).

6. Συσσωμάτωση: Είναι μια διεργασία διαχωρισμού οι οποία περιλαμβάνει δυο υγρές φάσεις σε ένα κολλοειδές σύστημα. Ξεκινάει με ένα υδατικό κολλοειδές διάλυμα σε έναν κατάλληλο διαλύτη. Ανάλογα με τη φύση του κολλοειδούς όταν κάποιες περιβαλλοντικές συνθήκες αλλάζουν, όπως το pH, η διαλυτότητα του κολλοειδούς μειώνεται και ένα μεγάλο μέρος του κολλοειδούς μπορεί να διαχωριστεί σε μια νέα φάση (Li, 2009).

7. Ενσωμάτωση σε συμπλόκα: Είναι μια διεργασία με την οποία σχηματίζεται ένα σύμπλοκο πολύ-ηλεκτρολύτη. Απαιτεί την ανάμειξη των δύο κολλοειδών σε μια τιμή pH στην οποία το ένα είναι αρνητικά φορτισμένο και το άλλο θετικά φορτισμένο, οδηγώντας σε διαχωρισμό των φάσεων και το σχηματισμό των εγκλεισμένων στερεών σωματιδίων ή υγρών σταγονιδίων (Li, 2009).

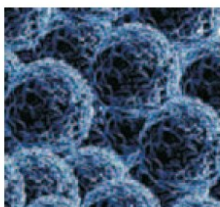
8. Αιώρηση με περιστροφή ή φυγοκέντρωση: Η φυγοκέντρωση είναι ακόμη μία τεχνική διαχωρισμού με ευρεία εφαρμογή, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες πρωτεΐνες ή DNA έχουν εγκλωβιστεί στα λιποσώματα ή το εγκλωβισμένο υλικό είναι γνωστό ότι σχηματίζει μεγάλα συσσωμάτωμα. Σε περιπτώσεις όπου η εγκλωβισμένη ουσία είναι σε υψηλή συγκέντρωση είτε όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα ενώσεων υψηλού MB σε συγκεντρώσεις ισοοσμωτικές με φυσιολογικό

ορό, η πυκνότητα του μέσου εναιώρησης μπορεί να πλησιάσει ή να υπερβεί αυτή του λιπιδίου και να καταστήσει αδύνατη την καταβύθιση. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με διάλυση των λιποσωμάτων σε ένα μέσο πολύ χαμηλότερης πυκνότητας, ώστε τα λιποσώματα να καταβυθιστούν (Zuidam & Shimoni, 2010).

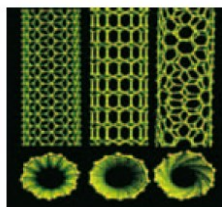
2.1.2. Χρήσεις νανοενθυλάκωσης

Η νανοενθυλάκωση είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ιατρική και κτηνιατρική γιατί μπορεί να επιτρέψει σε διάφορους παράγοντες (παρασιτοκτόνα, εμβόλια, κτηνιατρικά φάρμακα) να ελευθερωθούν, να απορροφηθούν και να δράσουν σε συγκεκριμένη περιοχή του οργανισμού, όχι μόνο με την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών αλλά και μετά από δική μας παρέμβαση. Η απελευθέρωση του περιεχομένου τους μπορεί να γίνει αργά ή γρήγορα (slow or quick release), σε υγρό περιβάλλον (moisture release), σε θερμό περιβάλλον (heat release), σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον (pH release), με υπέρηχους (ultrasound release), με μαγνητικό πεδίο που δρα σε σωματίδιο που έχει τοποθετηθεί μέσα στη νανοκάψουλα (magnetic release), με τη μεταφορά ενός μικρού κλώνου/ακολουθία ξένου DNA σε ένα νέο κύτταρο όπου μετά την απελευθέρωσή του, η κυτταρική μηχανή δεσμεύεται στην παραγωγή ειδικής πρωτεΐνης (DNA nanocapsule), όπως γίνεται στα εμβόλια (Weiss et al., 2006).

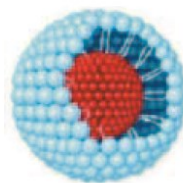
Τα νανοσωματίδια και οι νανοσωλήνες είναι κατασκευασμένα από άτομα άνθρακα ή πυριτίου, από κεραμικό ή πολυμερές υλικό αλλά και από φυσικά συστατικά, τα οποία στη συνέχεια διασπώνται μέσα στον οργανισμό. Στα νανομυκίλλια, η εξωτερική τους στιβάδα είναι υδατοδιαλυτή και περικλείει στο εσωτερικό της χημικές ουσίες (Gibbs et al., 1999).



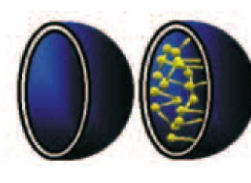
Νανοσωματίδια (nanoparticles)



Νανοσωλήνας (nanotube)



Νανομυκίλλιο (nanomicelle)



Νανοκάψουλα (nanocapsule)

Σχήμα 2. Τύποι νανοενθυλάκωσης (Gibbs et al., 1999).

2.1.3. Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στα τρόφιμα

Στην επεξεργασία τροφίμων, χρησιμοποιούνται νανοκάψουλες για τη χορήγηση ενισχυτικών του αρώματος, για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας συστατικών, για τη διάχυση φυτοστεροειδών σε αντικατάσταση της χοληστερόλης του κρέατος, για βελτίωση του ιξώδους και ως ζελατινοποιητικοί παράγοντες. Νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται για την επιλεκτική σύνδεση και απομάκρυνση χημικών ή παθογόνων από τα τρόφιμα και νανογαλακτώματα για την καλύτερη διάθεση και διασπορά των θρεπτικών συστατικών (Weiss et al., 2006).

Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στα τρόφιμα επιτυγχάνεται με δύο τρόπους, είτε την «bottom up» προσέγγιση, είτε την «top down». Η «top down» προσέγγιση επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της φυσικής επεξεργασίας των υλικών τροφίμων, όπως η άλεση. Για παράδειγμα, η τεχνολογία ξηρής άλεσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απόκτηση αλεύρου σίτου προσιτού μεγέθους που έχει υψηλή ικανότητα δέσμευσης νερού. Αντίθετα, η αυτό-συναρμολόγηση και η αυτό-οργάνωση είναι έννοιες που προέρχονται από τη βιολογία που ενέπνευσε η «bottom up» νανοτεχνολογία τροφίμων. Η αναδίπλωση σφαιρικών πρωτεϊνών και συσσωματωμένων πρωτεϊνών είναι παράδειγμα της αυτοοργάνωσης δομών που δημιουργούν σταθερές οντότητες. Η αυτοοργάνωση της κλίμακας νανομέτρου μπορεί να επιτευχθεί με τον καθορισμό μιας ισορροπίας μεταξύ των διαφόρων μη ομοιοπολικών δυνάμεων (Bouwmeester et al., 2009).

Μερικές από τις εφαρμογές – τεχνικές top-down για δημιουργία νανοσωματιδίων, είναι:

1. Ξηρή άλεση
2. Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και μικρορευστοποίηση
3. Γαλακτωματοποίηση με υπερήχους
4. μεμβράνη γαλακτωματοποίηση
5. Υπερκρίσιμα ρευστά
6. Ηλεκτρικός ομοαξονικός εξωθητήρας

Ενώ μερικές από τις εφαρμογές – τεχνικές bottom-up για δημιουργία νανοσωματιδίων, είναι:

1. Αυτό-συναρμολογούμενα πολυμερή
2. Γαλακτώματα

(Sanguansri & Augustin, 2006)

Στη συσκευασία τροφίμων, χρησιμοποιούνται νανοαισθητήρες για τον έλεγχο θερμοκρασίας, υγρασίας, χρόνου, νανοστιβάδες ως υλικά φραγμού στην παρεμπόδιση της καταστροφής και απορρόφησης του οξυγόνου, νανοστιβάδες ελαφρότερες, σκληρότερες και θερμοανθεκτικές, ηλεκτροχημικοί νανοαισθητήρες για την ανίχνευση του αιθυλενίου καθώς και αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές επικαλύψεις επιφανειών με νανοσωματίδια από ασήμι, μαγνήσιο, ψευδάργυρο (Weiss et al., 2006).

Για την ανίχνευση των παθογόνων μικροβίων στα τρόφιμα (π.χ. *E. coli* και *Listeria*), σε νανοσωματίδια πυριτίου μιας ειδικής συσκευής τοποθετούνται δείγματα DNA τα οποία όταν έρχονται σε επαφή με το DNA της *E. coli* ή της *Listeria*, παράγεται φθορισμός οπότε και ανιχνεύουμε τον παθογόνο παράγοντα. Άλλη μια εφαρμογή των νανοσωματιδίων είναι η ενίσχυση του αρώματος των τροφίμων με ειδικά νανοσωματίδια στα οποία εγκυστεύονται χημικές ουσίες που θα απελευθερωθούν στο τρόφιμο, προσδίδοντας άρωμα ή συντηρητικές ουσίες που θα επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής του, όπως στο λάδι με ωμέγα-3 λιπαρά ή σε ποτά και αναψυκτικά (Zuidam & Shimoni, 2010).

Οι νανοκάψουλες μπορεί να απελευθερώσουν στο νέο περιβάλλον όπου θα φθάσουν (π.χ. πεπτικό σύστημα) θρεπτικές ή φαρμακευτικές ουσίες επιτρέποντας την άμεση και πιο αποτελεσματική δράση τους. Τα νανοσωματίδια μπορεί να έχουν και αυξημένες αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες, όπως είναι τα νανοσωματίδια από ασήμι, τα οποία όταν μετατρέπονται σε νανομόρια ενισχύονται σημαντικά οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του ασημιού λόγω της νέας τεράστιας επιφάνειάς του. Παράδειγμα αποτελεί η συντήρηση της φράουλας, για την οποία ορισμένοι καλλιεργητές ήδη τα χρησιμοποιούν για να διατηρήσουν το προϊόν τους για περισσότερο χρόνο και χωρίς μυκητιακή ανάπτυξη.

Όσον αφορά στη συσκευασία, η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας αποτελεί μια ακόμα σημαντική εξέλιξη που έχει σκοπό τον έλεγχο και την προστασία του τροφίμων. Είναι η ονομαζόμενη “ηλεκτρονική γλώσσα”, ένας νέος τύπος συσκευασίας με ενσωματωμένους ειδικούς νανοαισθητήρες, οι οποίοι ανιχνεύουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς ή τις χημικές ουσίες που παράγονται καθώς το τρόφιμο αλλοιώνεται με αποτέλεσμα να παράγεται φθορισμός, χρώμα ή ακόμα να απελευθερώνονται συντηρητικές ουσίες (release on command) (Weiss et al., 2006).

Οι μεγάλες βιομηχανίες τροφίμων ήδη έχουν αρχίσει την ενημέρωση του κοινού για τις έξυπνες συσκευασίες (smart packaging), τα κατ' απαίτηση για τα

συντηρητικά (on demand preservatives) και τα διαδραστικά τρόφιμα (interactive food) με τα οποία οι καταναλωτές θα έχουν τη δυνατότητα να τα τροποποιούν ανάλογα με τις ανάγκες τους ή τις γευστικές τους προτιμήσεις.

Τα μέσα οξύνισης προστίθενται στην επεξεργασία ως βοηθήματα συντήρησης και τροποποιητές γεύσης. Αφού αλληλεπιδρούν με κόμμεα, άμυλα, πρωτεΐνες και πηκτίνες, μπορούν να αναπτύξουν ένα ευρύ φάσμα υφών. Η ενθυλάκωση αυτών των παραγόντων μπορεί να αυξήσει τη διάρκεια ζωής των γεύσεων των εσπεριδοειδών, των τροφίμων που περιέχουν άμυλο και την πρόληψη της απώλειας της γεύσης και του χρώματος μετά την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους (Gibbs et al., 1999).

Το φουμαρικό, το κιτρικό, το γαλακτικό και το ασκορβικό οξύ είναι μερικές από τις ουσίες που έχουν ήδη εγκλειστεί. Το ασκορβικό οξύ προστίθεται στο ψωμί για να βελτιώσει την ποιότητα του. Η εγκλεισμένη μορφή του μπορεί να προστατεύσει αυτό το οξύ από το νερό και το οξυγόνο που προκαλεί υποβάθμιση στο ψωμί (Gibbs et al., 1999).

Το κιτρικό οξύ προστίθεται στο τσάι για την αύξηση της δριμύτητας αλλά μπορεί να αντιδράσει με τις τανίνες και να είναι η αιτία αποχρωματισμού για το σακουλάκι. Με την ενθυλάκωση μπορεί να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα, διατηρώντας παράλληλα τη λειτουργία του κιτρικού οξέος (Gibbs et al., 1999).

Σε αλλαντικά, όπως το πεπερόνι, το σκληρό σαλάμι και τα καπνιστά λουκάνικα, το γαλακτικό και το κιτρικό οξύ ενισχύουν τις γεύσεις τους. Συνήθως αυτό επιτυγχάνεται με ζυμώσεις το οποίο είναι δύσκολο να ελεγχθεί. Η απευθείας προσθήκη δεν είναι επιλογή, δεδομένου ότι τα οξέα αντιδρούν με τα τρόφιμα. Μια εναλλακτική λύση είναι να χρησιμοποιηθούν εγκλισμένα οξέα.

Το πλεονέκτημα της ενθυλάκωσης χλωριούχου νατρίου με μερικώς υδρογονωμένο φυτικό έλαιο είναι η αύξηση της ικανότητας του να ρέει και να μειώνει τη συσσώρευση και τη συσσωμάτωση. Το χλωριούχο νάτριο μειώνει την υποβάθμιση του χρώματος, το τάγγισμα, και βοηθά στον έλεγχο της απορρόφησης του νερού και της ανάπτυξης της μαγιάς. Εφαρμόζεται ιδιαίτερα για ζύμες, για κουλούρια και για κονιοποιημένα κρέατα (Gibbs et al., 1999).

Όπως φαίνεται, η νανοτεχνολογία θα μας παρέχει ασφαλέστερα, υγιεινότερα, θρεπτικότερα και νοστιμότερα τρόφιμα με ένα κόστος παραγωγής μειωμένο, καθώς οι τεχνικές θα γίνονται πιο αποδοτικές με τη χρησιμοποίηση λιγότερης ενέργειας, νερού και χημικών ουσιών παράγοντας λιγότερα απόβλητα. Αν και στην αγορά σήμερα υπάρχουν λίγα προϊόντα διατροφής που ενσωματώνουν τη νανοτεχνολογία,

οι πιο εντυπωσιακές νέες εφαρμογές βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, όπως τα διαδραστικά τρόφιμα με νέα συστήματα τα οποία διαθέτουν ενισχυμένες λειτουργικές ιδιότητες (Weiss et al., 2006).

2.1.4. Κίνδυνοι νανοτεχνολογίας

Αν και η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας γίνεται με ταχείς ρυθμούς, το στάδιο το οποίο βρίσκεται ακόμη είναι σχετικά πρώιμο σε παγκόσμια κλίμακα, με αποτέλεσμα τα προϊόντα στην αγορά να είναι ελάχιστα σε σχέση με έρευνες που διεξάγονται και η γνώση των κινδύνων που πιθανώς ενέχουν τα υλικά και τα προϊόντα τους να είναι περιορισμένη. Ωστόσο, η προβλεπόμενη ανάπτυξη και ευρεία χρήση των νανοτεχνολογιών και των εφαρμογών τους αναμένεται να οδηγήσουν στην ανάδειξη μιας σειράς κοινωνικών, ηθικών και δεοντολογικών ζητημάτων, που μέχρι στιγμής δεν έχουν ληφθεί σοβαρά υπόψη.

Αναμφισβήτητα η αντιμετώπιση των κοινωνικών και ηθικών θεμάτων που απορρέουν από την χρήση και τις εφαρμογές των νανοτεχνολογιών αποτελεί μια πρόκληση. Η τεχνολογία αυτή βρίσκεται σε εμβρυικό στάδιο ανάπτυξης και οι μελλοντικές εφαρμογές είναι αμέτρητες, πολυποικίλες και πολύ θεωρητικές. Οι περισσότερες εφαρμογές απέχουν αρκετά από την πραγματοποίησή τους και σε ορισμένες περιπτώσεις, η ανάλυση των κοινωνικών και ηθικών διαστάσεών τους έχουν προσδώσει αξιοπιστία σε προχωρημένα και υπερβολικά σενάρια, τα οποία αποπροσανατολίζουν το ευρύ κοινό (Nordman, 2009). Βέβαια, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη μελέτη αυτών των διαστάσεων, ώστε να διασφαλιστεί η υπεύθυνη ανάπτυξη των νανοτεχνολογιών.

Οι άμεσες ανησυχίες για τα νανοπροϊόντα πρώτης γενιάς, αφορούν κυρίως σε επιδράσεις στο περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ενώ ορισμένοι τομείς που έχουν εγείρει κοινωνικές και ηθικές ανησυχίες για το μέλλον είναι (Allhoff et al., 2007):

- Ισότητα και νανοδιαχωρισμός
- Νανοϊατρική
- Ιδιωτικότητα
- Χρηματοδότηση της έρευνας και προτεραιότητες
- Στρατιωτικές εφαρμογές
- Νομοθεσία

Οι μέθοδοι εκτίμησης κινδύνου που υπάρχουν για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων έχουν περιορισμούς όταν εφαρμόζονται για δείγματα τροφίμων. Νέες μεθοδολογίες χρειάζονται επείγοντως (4). Η γνώση για την διαθεσιμότητα τροφίμων που κατά την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκε η νανοτεχνολογία είναι περιορισμένη και έτσι η έκθεση του ανθρώπου σε τέτοιου είδους τρόφιμα είναι περιορισμένη. Οι πληροφορίες για την έκταση της μετανάστευσης νανοσωματιδίων από υλικά και αντικείμενα που προορίζονται για επαφή με τρόφιμα και κατά την παραγωγή τους χρησιμοποιήθηκε η νανοτεχνολογία είναι και αυτή περιορισμένη, όπως και οι τοξικολογικές τους επιδράσεις. Δεν υπάρχει αρκετή γνώση για την πιθανότητα πρόσθετων τοξικών επιδράσεων από την ταυτόχρονη έκθεση σε διαφορετικά νανοσωματίδια.

Η έλλειψη λεπτομερών τοξικολογικών δεδομένων, σε συνδυασμό με στοιχεία που δείχνουν ότι ορισμένα νανοσωματίδια έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν ζημιά μας αναγκάζει να κάνουμε χρήση της αρχής της προφύλαξης για ορισμένες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στον τομέα των τροφίμων (Nordman, 2009).

2.2. Άμυλο

Κατά τα τελευταία χρόνια, η χρήση των πολυσακχαριτών για την παρασκευή νανοσωματιδίων έχει αυξηθεί σημαντικά. Οι πολυσακχαρίτες έχουν πολλές λειτουργίες αναγνώρισης, καθώς και την παροχή ουδέτερων επικαλυμμάτων με χαμηλή επιφανειακή ενέργεια, αποτρέποντας έτσι την μη ειδική προσρόφηση των πρωτεϊνών. Από την άλλη πλευρά, η υψηλή ποσότητα των υδροξυλομάδων στο σώμα των πολυσακχαριτών επιτρέπει την ενσωμάτωση των διαφορετικών ειδικών συνδετήρων προς δημιουργία πολυλειτουργικών κolloειδών συστημάτων (Santander-Ortega et al., 2010).

Το άμυλο έχει μια ενδιαφέρουσα δυνατότητα, η οποία είναι μέχρι στιγμής σχετικά ανεξερεύνητη. Αποτελεί ένα βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο, μη τοξικό πολυμερές και υπάρχει άφθονο στη φύση ως ο κύριος πολυσακχαρίτης αποθήκευσης σε ανώτερα φυτά. Ωστόσο, παρόλο που εμφανίζει αυτές τις ιδιότητες, μερικά προβλήματα μπορούν να προκύψουν. Η υδρόφιλη φύση του αμύλου είναι ένα σημαντικό εμπόδιο που περιορίζει σημαντικά την δημιουργία των νανοσωματιδίων με βάση το άμυλο. Μια καλή εναλλακτική λύση για την επίλυση αυτού του προβλήματος είναι η προσθήκη υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων στην υδρόφιλη ραχοκοκαλιά του αμύλου. Ωστόσο, ένας σημαντικός περιορισμός συνήθως που

προκύπτει από τη χρήση αυτών των παράγωγων υδρόφοβων πολυσακχαριτών για την παρασκευή νανοσωματιδίων, είναι η ανάγκη να απασχολούν οργανικούς διαλύτες, όπως διχλωρομεθάνιο ή διμεθυλοσουλφοξείδιο, με σημαντική τοξικολογικούς και άλλους κινδύνους για την ασφάλεια (Santander-Ortega et al., 2010).

Το άμυλο είναι ένα δυνητικά χρήσιμο πολυμερές για το θερμοπλαστικά βιοαποικοδομήσιμα υλικά, λόγω του χαμηλού κόστους του, της διαθεσιμότητάς του και της παραγωγής του από ανανεώσιμες πηγές. Ωστόσο, η χρήση του αμύλου ως ένα υλικό χρήσιμο για τη βιομηχανία έχει αμφισβητηθεί από ορισμένους περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλής αντίστασης στην υγρασία, της κακής επεξεργασιμότητας (λόγω υψηλού ιξώδους), και της ασυμβατότητας με κάποια υδρόφοβα πολυμερή (Simi & Abraham, 2007).

2.2.1. Παρασκευή νανοσωματιδίων αμύλου

Τα νανοσωματίδια είναι στερεά, κολλοειδή σωματίδια που αποτελούνται από μακρομοριακές ουσίες που ποικίλουν σε μέγεθος από 10 έως 1000 nm. Η ουσία διαλύεται, παγιδεύεται, προσροφάται, προσκολλημένη ή εγκλεισμένη εντός της μήτρας των νανοσωματιδίων. Η μήτρα των νανοσωματιδίων μπορεί να είναι από βιοαποικοδομήσιμα υλικά όπως τα πολυμερή ή πρωτεΐνες. Ανάλογα με τη μέθοδο που παρασκευάζονται, τα νανοσωματίδια μπορούν να ληφθούν με διαφορετικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά απελευθέρωσης για τους εγκλεισμένους θεραπευτικούς παράγοντες (Simi & Abraham, 2007).

Η χρήση των φορέων σε νάνο-κλίμακα για την προστασία και την ελεγχόμενη απελευθέρωση των θρεπτικών και των βιοενεργών συστατικών των τροφίμων είναι μια αναπτυσσόμενη περιοχή ενδιαφέροντος για την επιστήμη των τροφίμων. Οι λόγοι για αυτό είναι ότι τα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να ενσωματωθούν σε τρόφιμα εύκολα χωρίς καθίζηση, χωρίς να γίνονται αντιληπτοί από τον καταναλωτή, ή / και με ενισχυμένη βιοδιαθεσιμότητα (Nordman, 2009).

Η παρασκευή των νανοσωματιδίων μπορεί να βασίζεται σε συρρικνούμενες κάψουλες που παρασκευάζονται με "κλασικές" τεχνολογίες ή με τη χρήση νέων τεχνικών (Zuidam & Shimoni, 2010).

Οι υπάρχουσες διεργασίες για την παρασκευή νανοσωματιδίων αμύλου είναι:

- η καθίζηση άμορφου αμύλου: Σε αυτή τη διεργασία το μέσο καθίζησης που χρησιμοποιείται είναι η αιθανόλη, ώστε να καθιζάνουν τα νανοσωματίδια από

το διάλυμα αμύλου. Συγκεκριμένα, σε μία πρόσφατη έρευνα, αναμίχθηκε φυσικό άμυλο με νερό, ζελατινοποιήθηκε και στη συνέχεια, έγινε προσθήκη αιθανόλης με ελεγχόμενη παροχή και υπό ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντριση και το υλικό που καθίζανε οδηγήθηκε προς ξήρανση ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη και η περίσσεια νερού. Τα νανοσωματίδια που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ενός βιο-νανο-σύνθετου. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία για την παραγωγή νανοσωματιδίων αμύλου δεν επιτρέπει την παραγωγή νανο-κρυστάλλων (Le Corre et al., 2010).

- ο συνδυασμός σχηματισμού συμπλόκου και ενζυμικής υδρόλυσης, αποδίδοντας νανο-κρυστάλλους: Μετά από πολλές προσπάθειες και μελέτες εναλλακτικών τρόπων παρασκευής νανοσωματιδίων αμύλου, προτάθηκε μια διαδικασία μέσω σχηματισμού συμπλόκου με άλλα συστατικά με τη χρήση n-βουτανόλης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε διάλυση αμύλου σε υδατικό διάλυμα κατά τη διάρκεια θέρμανσης και ανάδευσης. Έπειτα, ακολούθησε διήθηση και το άμυλο που καθίζανε ήταν 6,78% του αρχικού ποσού. Ο σχηματισμός συμπλόκων περιλάμβανε περισσότερη αμυλόζη και ελάχιστη αμυλοπηκτίνη. Ακολούθησε φυγοκέντριση και το υλικό που καθίζανε περιείχε ένα μεγάλο ποσοστό άμορφης μήτρας, οπότε ακολούθησε επιλεκτική απομάκρυνσή του με ενζυμική υδρόλυση. Το μεγαλύτερο μέρος του αμύλου υδρολύθηκε (85-90%) και αυτό είχε ως αποτέλεσμα η απόδοση των νανοσωματιδίων να είναι εξαιρετικά χαμηλή. Τέλος, τα νανοσωματίδια αμύλου εμφάνισαν σφαιρικό/ωοειδές σχήμα, με διάμετρο 10-20 nm (Le Corre et al., 2010).
- μικρο-ρευστοποίηση: Στην αντίστοιχη μελέτη, μία ποσότητα πολτού αμυλόζης από άμυλο καλαμποκιού ακολούθησε τη διαδικασία της μικρο-ρευστοποίησης με 30 επαναλήψεις, έτσι ώστε το μέγεθος των σωματιδίων των ληφθέντων δειγμάτων ήταν κάτω από 100 nm και το εναιώρημα που είχε τη μορφή πηκτής παρέμεινε σταθερό για περισσότερο από ένα μήνα. Η θερμική σταθερότητα δεν επηρεάστηκε, ενώ δεν υπήρχε ούτε χημική ούτε θερμική υποβάθμιση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, και συνεπώς η αναφερόμενη απόδοση ήταν σχεδόν 100%. Ωστόσο, τα προκύπτοντα κολλοειδή σύμπλοκα αμύλου αποκτήθηκαν από διάσπαση τόσο άμορφων όσο και κρυσταλλικών δομών, καθιστώντας ένα πρότυπο άμορφης περίθλασης μετά από 10 περάσματα (Le Corre et al., 2010).

2.2.2. Απελευθέρωση ουσιών από νανοσωματίδια αμύλου

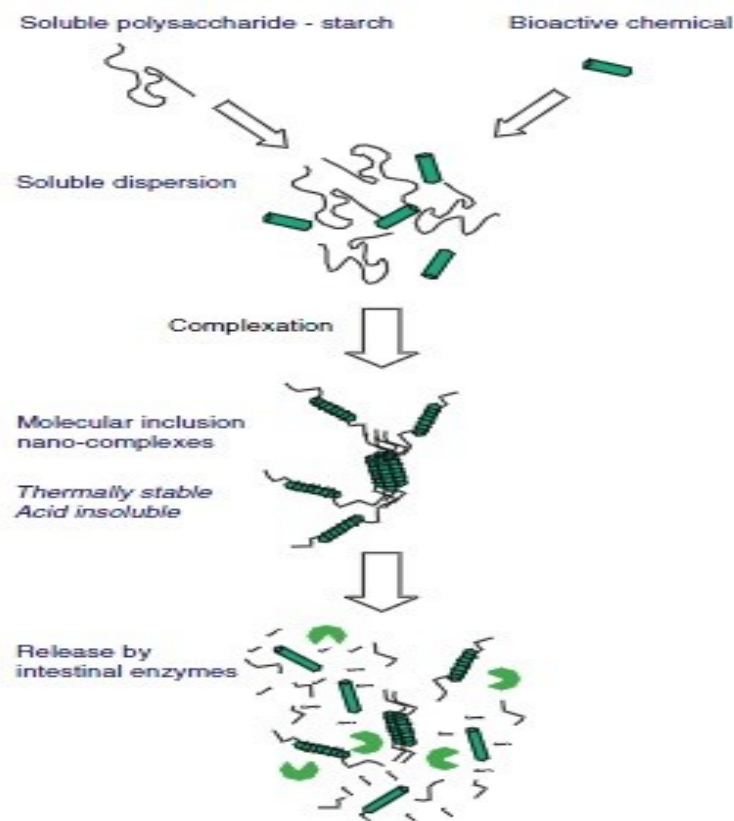
Η απελευθέρωση των συστατικών μπορεί να είναι διαχυτικά ελεγχόμενη είτε από το τοίχωμα της κάψουλας ή από μία μεμβράνη που καλύπτει το τοίχωμα. Το πρώτο ονομάζεται «ελεγχόμενη μήτρα» και το δεύτερο «ελεγχόμενη μεμβράνη». Η διαπερατότητα μέσα από τη μήτρα και η διαλυτότητα του συστατικού του τοιχώματος της κάψουλας επηρεάζει το ρυθμό διάχυσης. Σε γενικές γραμμές, η ένωση που διαχέεται πρέπει να είναι διαλυτή στη μήτρα. Ωστόσο, αυτό δεν είναι απαραίτητως η περίπτωση, αφού η πίεση ατμών μιας πτητικής ουσίας σε κάθε πλευρά της μήτρας μπορεί να γίνει η κύρια κινητήρια δύναμη που επηρεάζει τη διάχυση (Gibbs et al., 1999).

2.2.3. Επίδραση αμυλάσων

Το ένζυμο α-αμυλάση είναι παρόν σε οτιδήποτε στη φύση. Σε πολλά ζώα το ένζυμο εκκρίνεται από το σάλιο και από το πάγκρεας. Το πάγκρεας πολλών ζώων πλημμυρίζει το φαγητό με αμυλάση για να προκαλέσει υδρόλυση του αμύλου, οπότε οποιαδήποτε γλυκόζη παράγεται να μπορεί να απορροφηθεί στο λεπτό έντερο άμεσα. Τα ένζυμα συνεχίζουν τη διαδικασία της πέψης της γλυκόζης, η οποία σταδιακά απορροφάται.

Τόσο η παγκρεατική όσο και η αμυλάση των σιελογόνων αδένων, έχουν παρόμοιες λειτουργίες. Και τα δυο ένζυμα ενεργοποιούνται σε ένα ελαφρώς όξινο pH και μπορούν να διασπάσουν το άμυλο πολύ γρήγορα, καθώς έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε οποιοδήποτε μέρος του υποστρώματος. Στους ανθρώπους η πέψη του αμύλου γίνεται σε δύο διαφορετικά ξεχωριστά στάδια. Αρχικά, η σιελική αμυλάση προκαλεί μερική διάσπαση στα πολυμερή αμύλου. Στη συνέχεια, όταν το μίγμα φτάσει στο λεπτό έντερο, τότε υδρολύεται εκτενώς σε μικρότερα κομμάτια ολιγοσακχαριτών, όπως η γλυκόζη. Η διαφορά της λειτουργίας των αμυλάσων μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική θέση ενεργοποίησης των δυο ενζύμων.

Η ποσότητα της φυσικής υδρόλυσης αμύλου με αμυλάσες έχει αναφερθεί ότι είναι αντιστρόφως ανάλογη με την περιεκτικότητα σε αμυλόζη, όπου άμυλα με μεγάλη περιεκτικότητα σε αμυλόζη είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά το οποίο ταιριάζει με τη γενικά αποδεκτή άποψη ότι η αμυλόζη αντιπροσωπεύει μία άμορφη μορφή αμύλου (Tester et al., 2004).



Σχήμα 3. Απελευθέρωση ουσιών από τα νανοσωματίδια αμύλου (Tester et al., 2004).

2.3. Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) είναι ένα συστατικό πρωτεΐνης ορού γάλακτος και αίματος. Οι φυσικοχημικές και δομικές ιδιότητες της έχουν χαρακτηριστεί καλές, καθιστώντας την ένα επιθυμητό πρότυπο σύστημα για έρευνες που σχετίζονται με τα τρόφιμα (Savadkoochia et al., 2013).

Η BSA ανήκει στην τάξη των πρωτεϊνών του ορού που ονομάζονται αλβουμίνες, οι οποίες αποτελούν περίπου το 50-55% των πρωτεϊνών του πλάσματος και είναι οι πιο σταθερές και διαλυτές πρωτεΐνες στο πλάσμα. Χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια που ασχολούνται με ανοσοαναλύσεις, κυρίως λόγω της διαθεσιμότητάς της, της διαλυτότητάς της και των πολυάριθμων λειτουργικών ομάδων που μπορούν να συνδεθούν με αυτήν (Savadkoochia et al., 2013).

Έχει υψηλή περιεκτικότητα στη δομή της α-έλικας η οποία είναι επωφελής κατά τη μελέτη των επιπτώσεων των διαδικασιών ενθυλάκωσης για δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών. Ο βόειος ορός αλβουμίνης χρησιμοποιείται επίσης για την καλλιέργεια κυττάρων για να διευκολυνθεί η αύξηση της κυτταρικής ανάπτυξης και

της παραγωγικότητας για πάνω από όλα- την υγεία των κυττάρων. Γνωστό ως μια πολύ σταθερή ουσία, δεν επηρεάζει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτές τις βιοχημικές αντιδράσεις. Η BSA σταματά επίσης τη μετάδοση των ενζύμων σε εργαστηριακό εξοπλισμό, όπως απολήξεις, σωλήνες αντίδρασης και άλλα σκεύη (Savadkoochia et al., 2013).

Τα χαρακτηριστικά των σωματιδίων (μέγεθος και σχήματος) της σκόνης της πρωτεΐνης είναι σημαντικά για την επιτυχία υψηλότερης αποτελεσματικότητας εγκλεισμού σε κάψουλα. Όσο μικρότερα είναι τα σωματίδια, τόσο υψηλότερη είναι η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού τους. Ωστόσο, οι διεργασίες που χρησιμοποιούν στερεά σωματίδια BSA σε σκόνη που λαμβάνονται με μεθόδους ξήρανσης, με ψεκασμό και καθίζηση διαλύτη, δεν έχουν οποιαδήποτε επίδραση στην διαδικασία ενθυλάκωσης (Savadkoochia et al., 2013).

3. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εγκλεισμός ουσιών σε νανοσωματίδια αμύλου, καθώς και η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων. Η ουσία που χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο ήταν η αλβουμίνη βόειου ορού. Μελετήθηκε, ακόμη, η απελευθέρωση αλβουμίνης από τα νανοσωματίδια αμύλου με την πάροδο του χρόνου, παρουσία και απουσία αμυλάσης.

4. Πειραματικό μέρος

4.1. Υλικά

4.1.1. Αντιδραστήρια

- Αιθανόλη καθαρότητας 96.4%
- Καυστικό κάλιο 0.1 M, της εταιρείας SIGMA-ALDRICH
- Άμυλο από πατάτα, της εταιρείας SIGMA-ALDRICH
- α-Αμυλάση από *Bacillus licheniformis*, της εταιρείας SIGMA-ALDRICH
- Λυοφιλωμένη σκόνη αλβουμίνης βοείου ορού (bovine serum albumin), της εταιρείας SIGMA-ALDRICH, που φυλάσσεται στο ψυγείο (4 °C).

4.1.2. Όργανα

- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5418 της εταιρείας Eppendorf
- Συσκευή προσδιορισμού μεγέθους σωματιδίων με δυναμική σκέδαση φωτός Zetasizer της εταιρείας Malvern
- Συσκευή Brookhaven Z – potential

- Φασματοφωτόμετρο τύπου Ηελιος α, της εταιρίας Thermo Electron Corporation
- Συσκευή υπερήχων Ultrasonic Processor τύπου UP100H της εταιρίας Hielscher
- Αντλία με σύριγγα, της εταιρείας RAZEL Scientific Instruments

4.2. Μέθοδοι ανάλυσης

4.2.1. Μέθοδος εγκλεισμού αλβουμίνης βόειου ορού σε νανοσωματίδια αμύλου

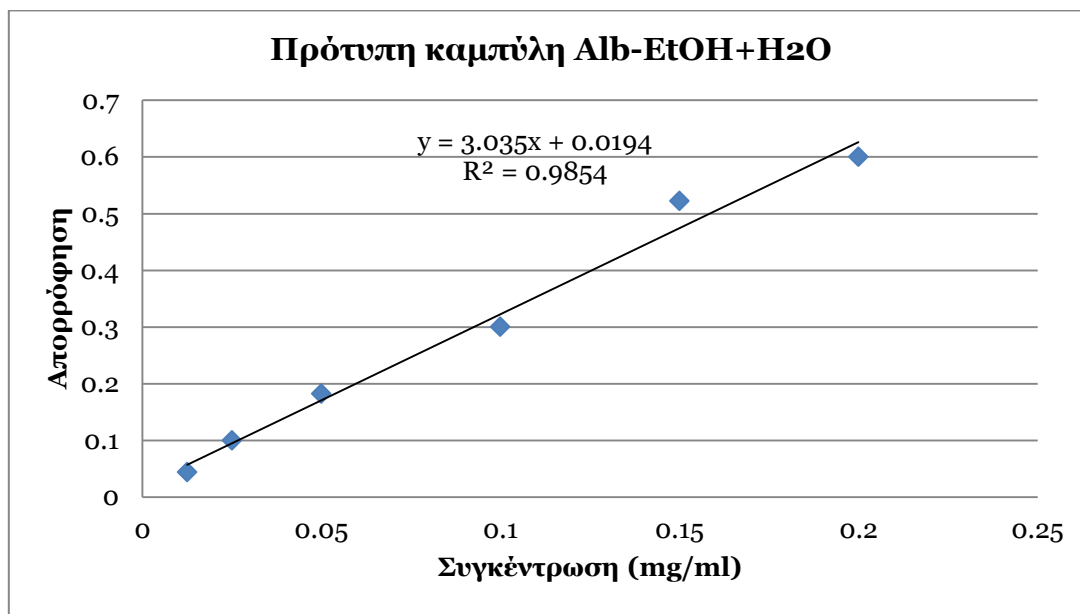
Για την παρασκευή νανοσωματιδίων αμύλου αναμείχθηκαν 0,3 g αμύλου με 50 ml KOH σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml κατά τη διάρκεια θέρμανσης στους 90°C για περίπου 3 ώρες, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του αμύλου. Αφού κρύωσε το δείγμα, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα με φίλτρα του 1μm και το φιλτραρισμένο διάλυμα τοποθετήθηκε σε μεμβράνη για να ακολουθήσει η διαδικασία της διαπήδησης (dialysis). Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως των τεσσάρων λίτρων με απιονισμένο νερό. Πραγματοποιήθηκε αλλαγή του νερού και μέτρηση του pH μετά από 1 ώρα, 2 ώρες και 24 ώρες. Η πτώση του pH στο επιθυμητό (~7) επιτεύχθηκε περίπου στις 24 ώρες.

Ακολούθησε επαναφιλτράρισμα του δείγματος αμέσως μετά από τη διαπήδηση. Έπειτα έγινε διαχωρισμός του δείγματος σε 25 και 25 ml, ενώ στο ένα μέρος προστέθηκε ποσότητα αλβουμίνης βόειου ορού και το άλλο έμεινε ως έχει. Αυτά τα 25 ml χωρίστηκαν σε 4 δείγματα ίσων ποσοτήτων και ακολούθησε η διαδικασία δημιουργίας νανοσωματιδίων με προσθήκη ίσης ποσότητας αιθανόλης με τη χρήση αντλίας. Μετέπειτα έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων (4 επεντορφ για κάθε ένα από τα δείγματα) στις 14000 rpm για 10 min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου υγρού των δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο, στα 280 nm όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες, ενώ τα ιζήματα έμειναν σε απαγωγό για μία ημέρα μέχρι να εξατμιστεί πλήρως το εναπομένον υγρό.

Στα ξηρά πλέον ιζήματα έγινε προσθήκη 0.1M KOH και διάλυση του ιζήματος με τη χρήση συσκευής υπερήχων. Τέλος μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των διαλυμένων ιζημάτων με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 280 nm.

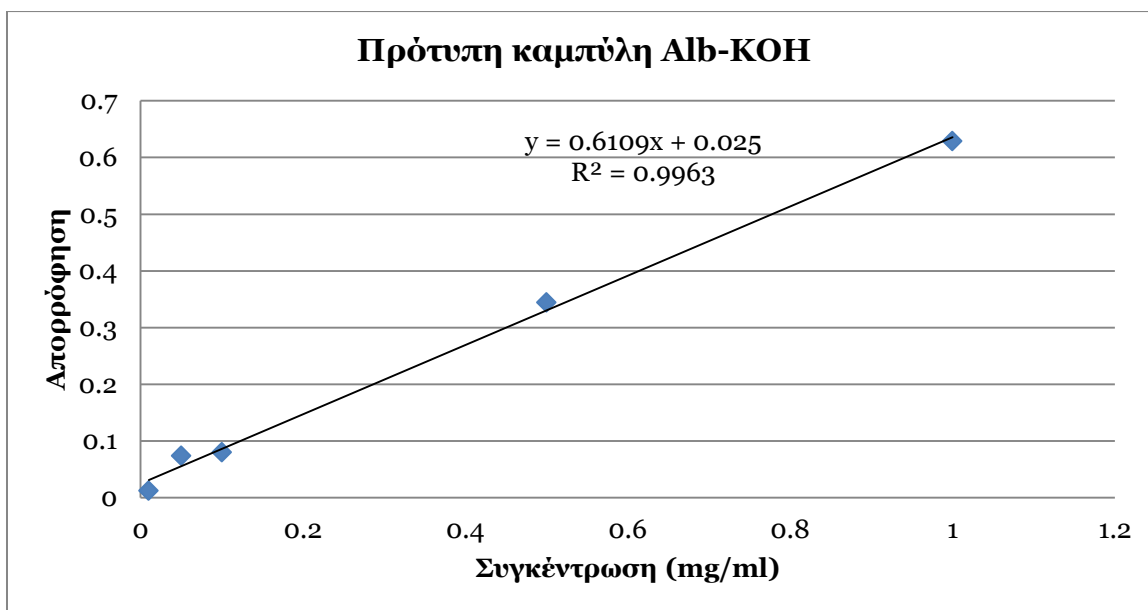
Για τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων, του φορτίου αλβουμίνης και της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης, χρειάστηκε να γίνει κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης. Για την κατασκευή της διαλύθηκε αλβουμίνη βόειου ορού,

σε διαλύτη αιθανόλη/νερό αναλογίας 1:1, σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/ml). Στη συνέχεια έγινε μέτρηση των διαλυμάτων στο φασματοφωτόμετρο Ηελιος α στα 280nm, ώστε να ληφθούν οι τιμές απορρόφησης τους. Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε από τα παραπάνω αποτελέσματα δίνεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4. Απορρόφηση αλβουμίνης ως συνάρτηση της συγκέντρωσής της σε αιθανόλη νερό.

Επίσης η αντίστοιχη διαδικασία έγινε και για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης για την μέτρηση του φορτίου αλβουμίνης και της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης από τη μέθοδο με τα ιζήματα. Για την κατασκευή της διαλύθηκε αλβουμίνη βόειου ορού, σε διαλύτη 0.1M KOH, σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) και έγινε μέτρηση των διαλυμάτων στο φασματοφωτόμετρο Ηελιος α στα 280nm, ώστε να ληφθούν οι τιμές απορρόφησης τους. Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε από τα παραπάνω αποτελέσματα δίνεται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5. Απορρόφηση αλβουμίνης ως συνάρτηση της συγκέντρωσής της σε καυστικό κάλιο.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας που αναφέρθηκε αρχικά, λαμβάνοντας από κάθε μέτρηση μια νέα τιμή απορρόφησης του υπερκειμένου και του ιζήματος, έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης της αλβουμίνης με την χρήση της εξίσωσης που προκύπτει από την αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκαν τελικά τα αποτελέσματα για το φορτίο και την αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης.

Με τον όρο «φορτίο αλβουμίνης» εννοείται η ποσότητα της πρωτεΐνης που έχει εγκλειστεί σε 100 g νανοσωματιδίων αμύλου, ενώ με τον όρο «αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης» εννοείται ο λόγος της ποσότητας της πρωτεΐνης που εγκλείστηκε προς τη συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

$$\text{Φορτίο} = \frac{\text{g ενθυλακωμένης ουσίας}}{\text{g νανοσωματιδίων}} * 100$$

και

$$\text{Αποτελεσματικότητα} = \frac{\text{g ενθυλακωμένης ουσίας}}{\text{g αρχικής χρησιμοποιούμενης ποσότητας ουσίας}} * 100$$

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αμύλου σύμφωνα με την αρχική μέθοδο, όμως αυτή τη φορά έγινε μέτρηση μεγεθών των νανοσωματιδίων αμύλου, με την εγκλεισμένη αλβουμίνη, και του δείκτη πολυδιασποράς της, στη συσκευή

προσδιορισμού μεγέθους σωματιδίων με δυναμική σκέδαση φωτός Zetasizer. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε χωρίς να προηγηθεί φυγοκέντρωση, δηλαδή αμέσως μετά την προσθήκη των αιθανόλης, η οποία έγινε σταγόνα-σταγόνα με τη χρήση αντλίας ίδιων συνθηκών (βελόνας διατομής 1,2mm και 18 G) μέσα στο δείγμα.

4.2.1.1. Επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης

Για την μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα και στο φορτίο της, επαναλήφθηκε το πείραμα με τρεις παραλλαγές:

- Στην πρώτη, η συγκέντρωση αλβουμίνης ήταν 0.1%
- Στη δεύτερη, η συγκέντρωση αλβουμίνης ήταν 0.05%
- Στη τρίτη, η συγκέντρωση αλβουμίνης ήταν 0.01%

Επιπλέον, η επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης ελέγχθηκε με 2 τρόπους, με τη μέτρηση της απορρόφησης των υπερκειμένων υγρών μετά τη φυγοκέντρωση και με τη μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμένων ιζημάτων σε 0.1M KOH.

4.2.1.2. Επίδραση του μεγέθους της σταγόνας αιθανόλης

Για την μελέτη της επίδρασης του μεγέθους της σταγόνας αιθανόλης (διατομή βελόνας), στην αποτελεσματικότητα της αλβουμίνης, επαναλήφθηκε το πείραμα με δύο παραλλαγές:

- Χρήση βελόνας 18g, που αντιστοιχεί σε διατομή 1.2mm
- Χρήση βελόνας 21g, που αντιστοιχεί σε διατομή 0.8mm

Επιπλέον, η επίδραση του μεγέθους της σταγόνας αιθανόλης ελέγχθηκε με 2 τρόπους, με τη μέτρηση της απορρόφησης των υπερκειμένων υγρών μετά τη φυγοκέντρωση και με τη μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμένων ιζημάτων σε 0.1M KOH.

4.2.1.3. Επίδραση του ρυθμού παροχής αιθανόλης

Για την μελέτη της επίδρασης της παροχής αιθανόλης από την αντλία, στην αποτελεσματικότητα της αλβουμίνης, επαναλήφθηκε το πείραμα με δύο παραλλαγές:

- Χρήση σύριγγας 5ml, που αντιστοιχεί σε παροχή 0.424 ml/min
- Χρήση σύριγγας 10ml, που αντιστοιχεί σε παροχή 0.661 ml/min

Επιπλέον, η επίδραση του ρυθμού παροχής αιθανόλης ελέγχθηκε με 2 τρόπους, με τη μέτρηση της απορρόφησης των υπερκειμένων υγρών μετά τη φυγοκέντριση και με τη μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμένων ιζημάτων σε 0.1M KOH.

4.2.1.4. Μελέτη της απελευθέρωσης αλβουμίνης από νανοσωματίδια αμύλου

Παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αμύλου σύμφωνα με την μέθοδο του αρχικού πειράματος. Αφού έγινε η προσθήκη αιθανόλης και η φυγοκέντριση, έγινε η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (πρώτη μέτρηση σε 0h), όπως αναφέρθηκε αρχικά. Έπειτα, μετά από καθορισμένα χρονικά διαστήματα (2, 4, 6, 24, 48h) επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία, δηλαδή φυγοκέντριση και μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο, έτσι ώστε να εξεταστεί ο βαθμός απελευθέρωσης της αλβουμίνης από το εσωτερικό των νανοσωματιδίων με την πάροδο του χρόνου. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος τα δείγματα βρισκόταν υπό σταθερή θερμοκρασία (37°C) και υπό συνεχή ανάδευση.

Ακόμη παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αμύλου, σύμφωνα με την μέθοδο του αρχικού πειράματος και μετά την πρώτη μέτρηση (0h) έγινε προσθήκη 50μL αμυλάσης / ml διασποράς νανοσωματιδίων. Η διαδικασία συνεχίστηκε όπως και προηγουμένως, μετρώντας μετά από 2, 4, 6, 24, 48h, ώστε να εξετασθεί ο βαθμός απελευθέρωσης της αλβουμίνης από το εσωτερικό των νανοσωματιδίων με την πάροδο του χρόνου, αυτή τη φορά παρουσία αμυλάσης. Οι συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας ήταν οι ίδιες.

Η προσθήκη αμυλάσης έγινε έχοντας ως σκοπό την προσομοίωση του πεπτικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού, και για να εξεταστεί αν επηρεάζει τον ρυθμό απελευθέρωσης καζεϊνικού νατρίου από τα νανοσωματίδια αμύλου.

4.2.1.5. Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στον δείκτη πολυδιασποράς (pDI) των νανοσωματιδίων

Για τη μελέτη της επίδρασης της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στον δείκτη πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων, έγιναν μετρήσεις σε δείγματα που περιείχαν 0.05% συγκέντρωση αλβουμίνης και σε δείγματα που δεν περιείχαν καθόλου αλβουμίνη.

4.2.1.6. Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αμύλου

Για τη μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αμύλου, έγιναν μετρήσεις του ζ-δυναμικού σε 5 διαλύματα:

- Διάλυμα αμύλου (0.6%) μετά από διαπήδηση
- Διάλυμα αλβουμίνης σε νερό (0.01%)
- Διάλυμα αλβουμίνης (0.01%) σε αιθανόλη-νερό με αναλογία 1:1
- Διάλυμα σωματιδίων αμύλου χωρίς αλβουμίνη
- Διάλυμα σωματιδίων αμύλου με αλβουμίνη

4.3. Στατιστική ανάλυση

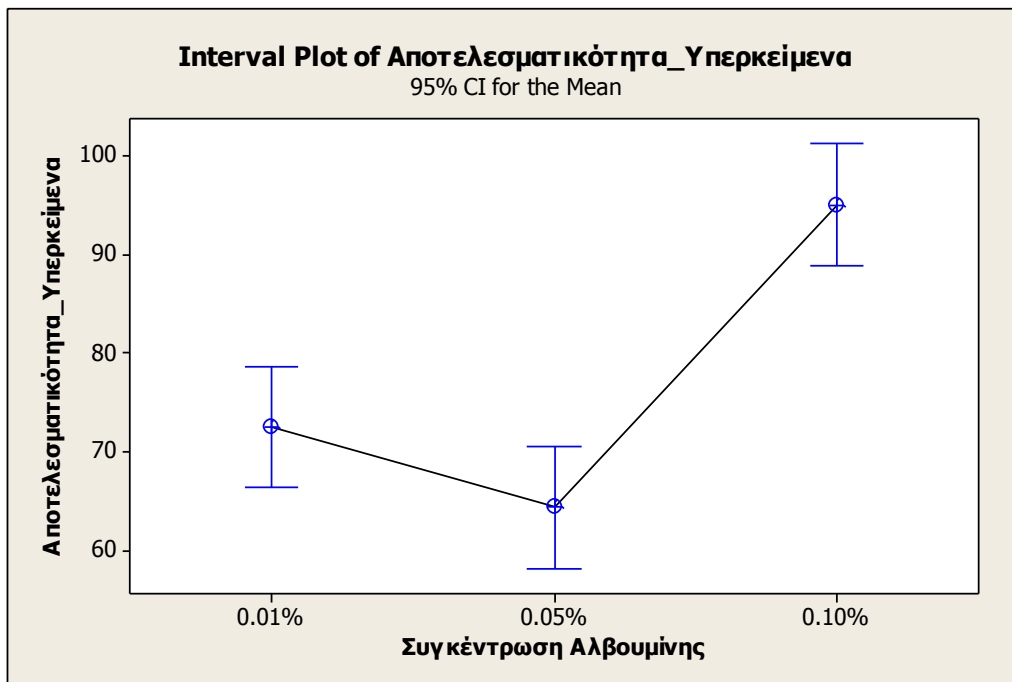
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε τόσο με την χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab 16, όσο και με το Microsoft Office (Excel). Με τη βοήθεια του Minitab 16 έγινε έλεγχος της υπόθεσης σύγκρισης δύο ανεξάρτητων δειγμάτων (2-sample t-test) και ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα (ANOVA One-Way) και δύο παραγόντων (ANOVA Two-Way), όπου κρίθηκε αναγκαίο για να ερμηνευθούν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων.

5. Αποτελέσματα – συζήτηση

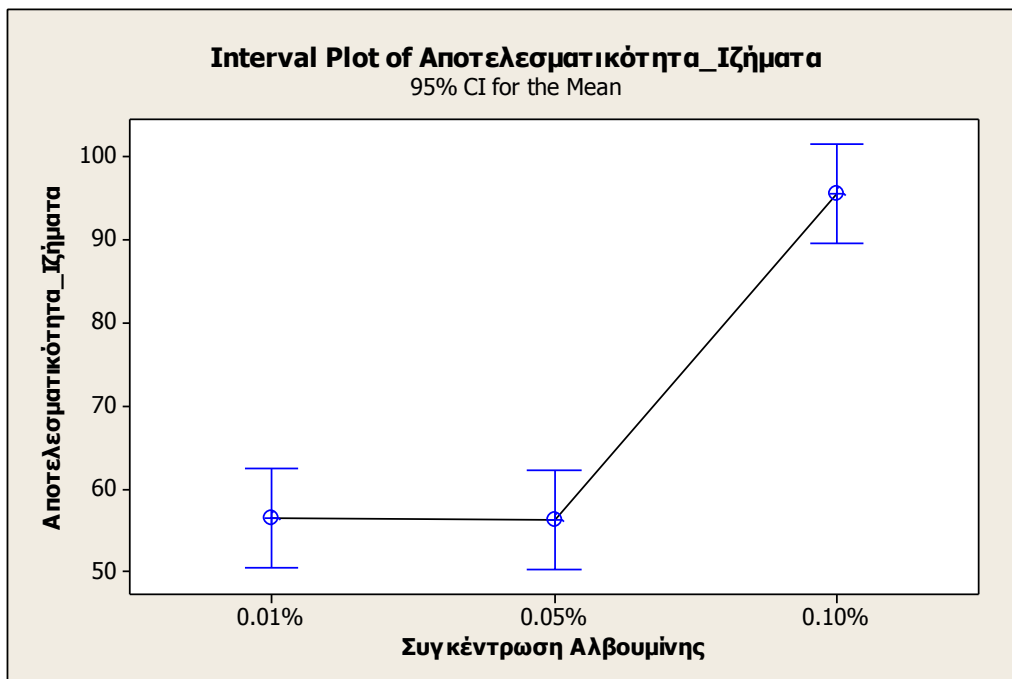
5.1. Επίδραση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης και στο φορτίο αλβουμίνης

Στα Σχήματα 6 και 7 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, από μετρήσεις της απορρόφησης των υπερκειμένων υγρών και των διαλυμένων ιζημάτων. Παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) (Παράρτημα 2) στην αποτελεσματικότητα μεταξύ της συγκέντρωσης αλβουμίνης 0.1% και των συγκεντρώσεων 0.05% και 0.01%, οι οποίες δεν διαφέρουν μεταξύ τους. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της αλβουμίνης στο διάλυμα, τόσο μικρότερη είναι και η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης. Αυτό δείχνει ότι όταν προστίθεται μικρή ποσότητα αλβουμίνης, ενθυλακώνεται λιγότερη αλβουμίνη, εφόσον η

αναλογία μεταξύ αυτής και των διαθέσιμων νανοσωματιδίων είναι μικρότερη. Αντίθετα, όταν προστίθεται μεγάλη ποσότητα αλβουμίνης, ενθυλακώνεται περισσότερη καθώς υπάρχει μεγαλύτερη διαθέσιμη ποσότητα αυτής για ενθυλάκωση.

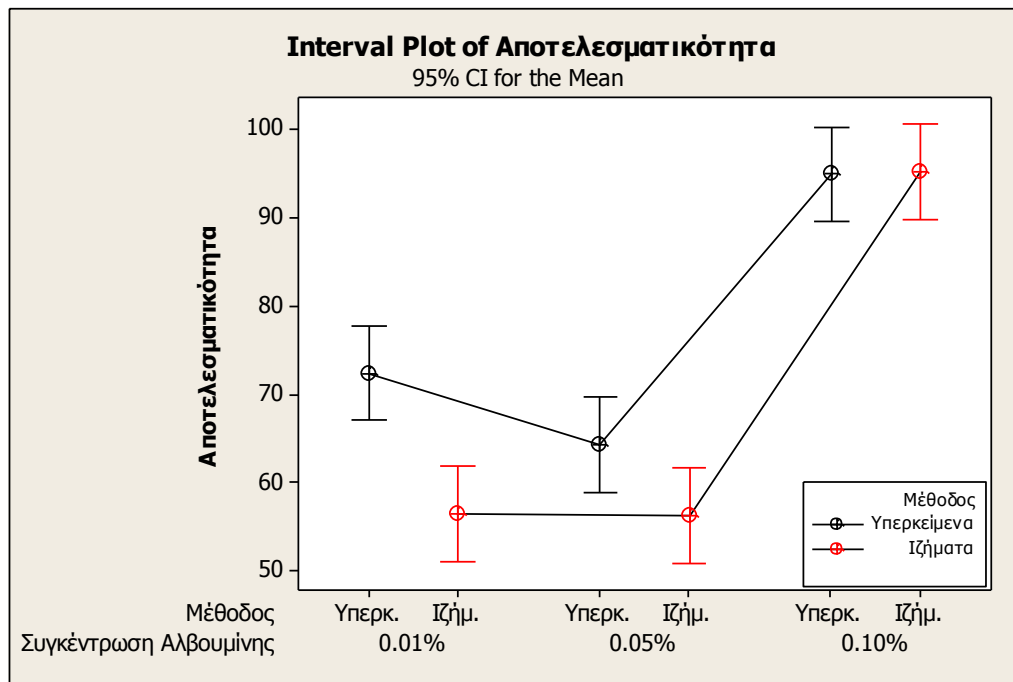


Σχήμα 6. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των υπερκείμενων υγρών.



Σχήμα 7. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των ιζημάτων.

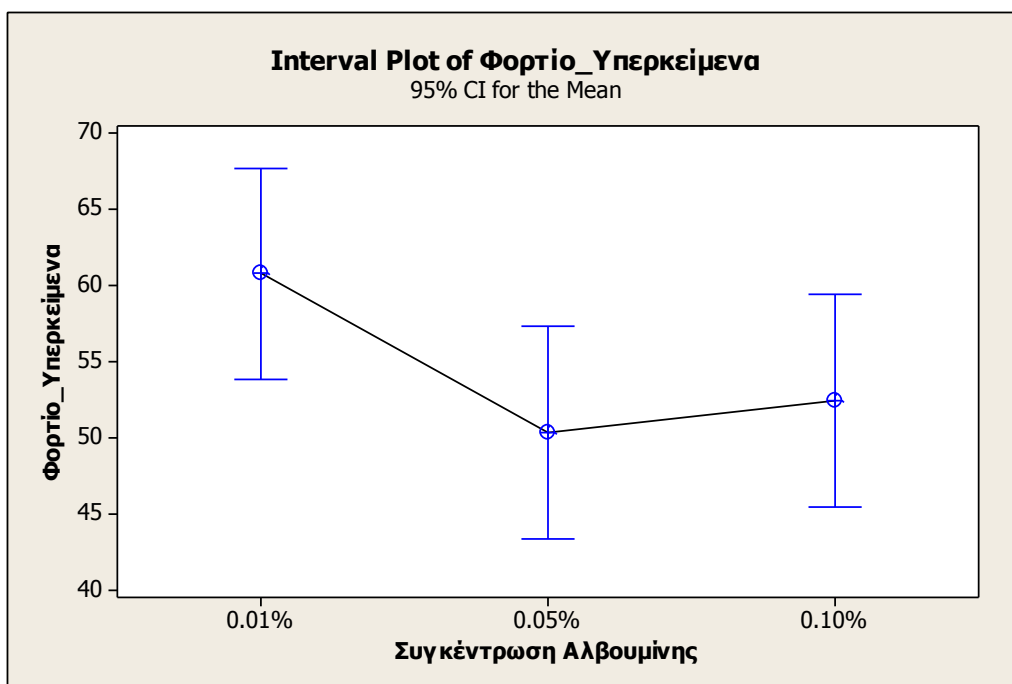
Στο Σχήμα 8 παρατηρείται ότι η αποτελεσματικότητα στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά είναι μεγαλύτερη απ'ό,τι στη μέθοδο με τα ιζήματα όσον αφορά στις συγκεντρώσεις 0.01% και 0.05%, ενώ στη συγκέντρωση 0.1% δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.



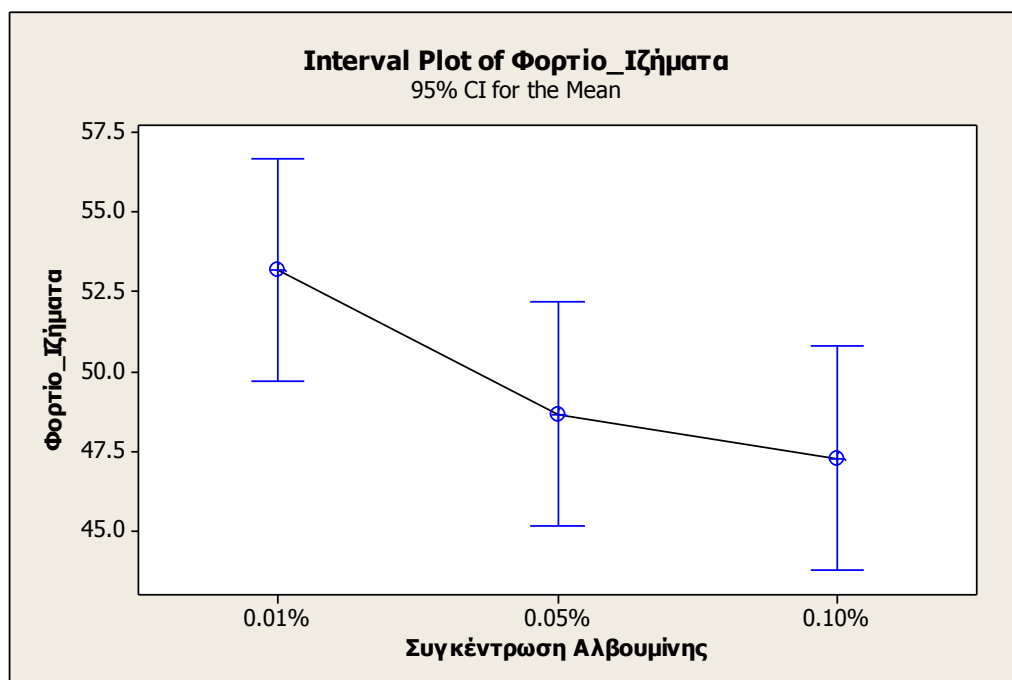
Σχήμα 8. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των υπερκειμένων υγρών και τη μέθοδο των ιζημάτων.

Στα Σχήματα 9 και 10 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στο φορτίο της, από μετρήσεις της απορρόφησης των υπερκειμένων υγρών και των διαλυμένων ιζημάτων. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0.05$) (Παράρτημα 1) μεταξύ των συγκεντρώσεων αλβουμίνης. Το αναμενόμενο θα ήταν, όσο περισσότερη αλβουμίνη προστίθεται, τόσο μεγαλύτερο να είναι το φορτίο, αλλά δεν παρατηρείται τέτοια τάση, ούτε στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά ούτε σε αυτή με τα ιζήματα.

Ακόμη, σύμφωνα με τους Kammona et al. (2011) το λογικό αποτέλεσμα θα ήταν όσο μειώνεται το φορτίο αλβουμίνης να μειώνεται και η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης. Αλλά όπως φαίνεται στα παρακάτω Σχήματα σε αυτή την περίπτωση δεν ισχύει κάτι τέτοιο.

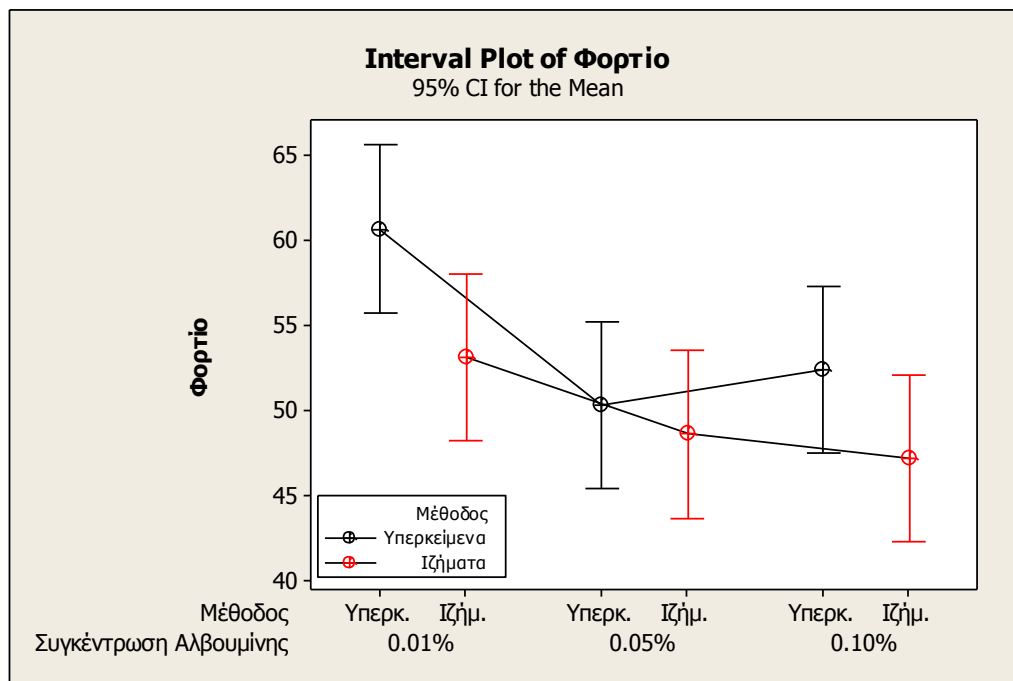


Σχήμα 9. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στο φορτίο με τη μέθοδο των υπερκείμενων υγρών.



Σχήμα 10. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στο φορτίο με τη μέθοδο των ιζημάτων.

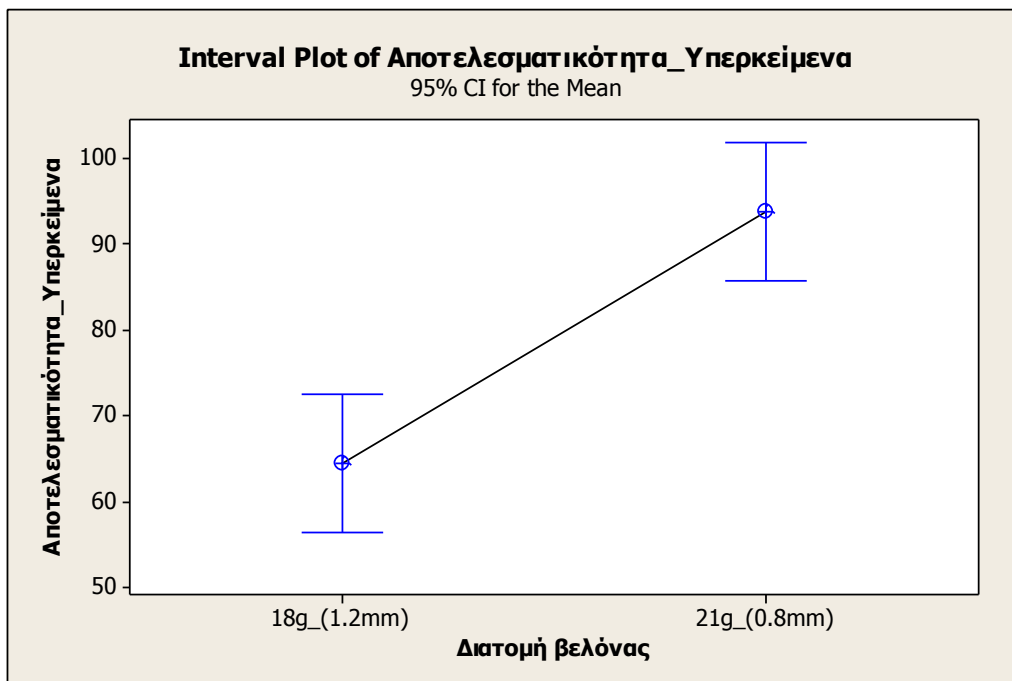
Στο Σχήμα 11 παρατηρείται ότι το φορτίο της αλβουμίνης στις συγκεντρώσεις 0.01% και 0.1% παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων, ενώ στη συγκέντρωση 0.05% δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.



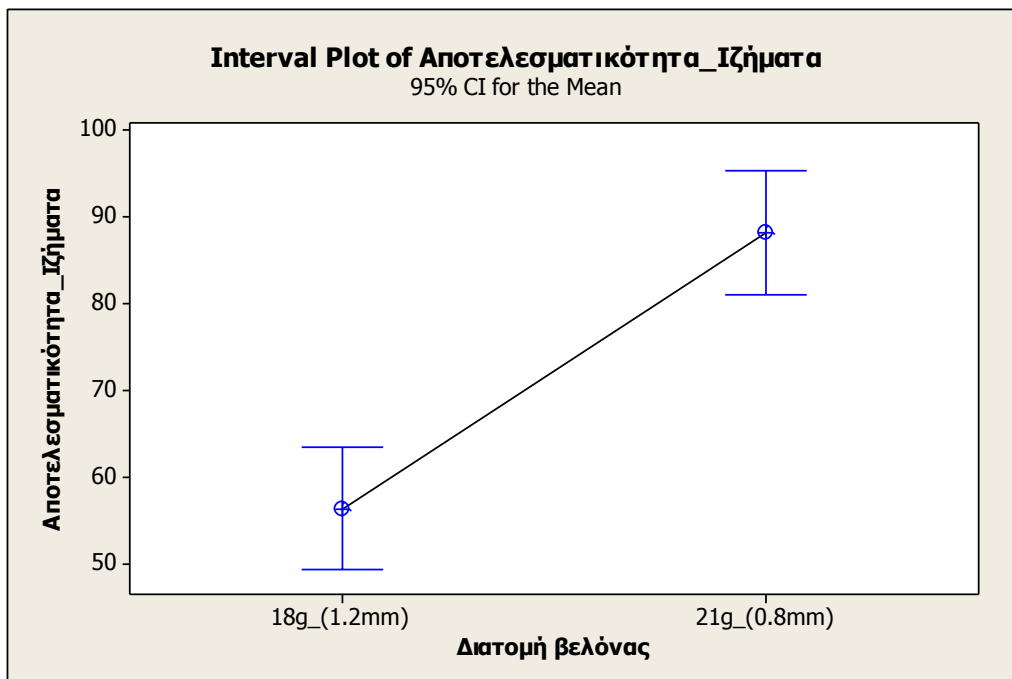
Σχήμα 11. Επίδραση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στο φορτίο με τη μέθοδο των υπερκείμενων υγρών και τη μέθοδο των ιζημάτων.

5.2. Επίδραση του μεγέθους της σταγόνας αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης

Στα Σχήματα 12 και 13 παρουσιάζεται η επίδραση του μεγέθους της σταγόνας αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, από μετρήσεις της απορρόφησης των υπερκείμενων υγρών και των διαλυμένων ιζημάτων. Παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) (Παράρτημα 3) στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο διαφορετικών διατομών βελόνας, τόσο στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά όσο και στη μέθοδο των ιζημάτων. Συγκεκριμένα, όταν η διατομή της βελόνας είναι μικρότερη, η αποτελεσματικότητα βελτιώνεται σημαντικά, ενώ αντίθετα όταν η διατομή της βελόνας είναι μεγάλη, η αποτελεσματικότητα είναι μικρότερη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όταν προστίθεται μεγάλη ποσότητα αιθανόλης στο διάλυμα αμύλου, δεν προλαβαίνει να γίνει πλήρης εγκλεισμός της αλβουμίνης και έτσι η αποτελεσματικότητα εμφανίζεται μειωμένη.

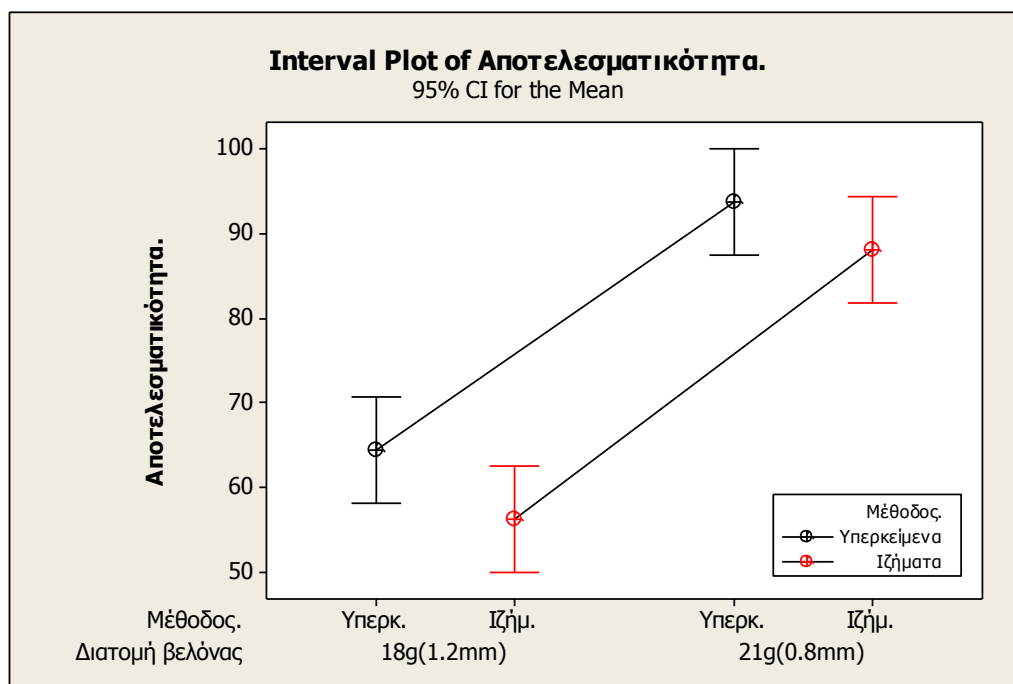


Σχήμα 12. Επίδραση της διατομής της βελόνας στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των υπερκείμενων υγρών.



Σχήμα 13. Επίδραση της διατομής της βελόνας στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των ιζημάτων.

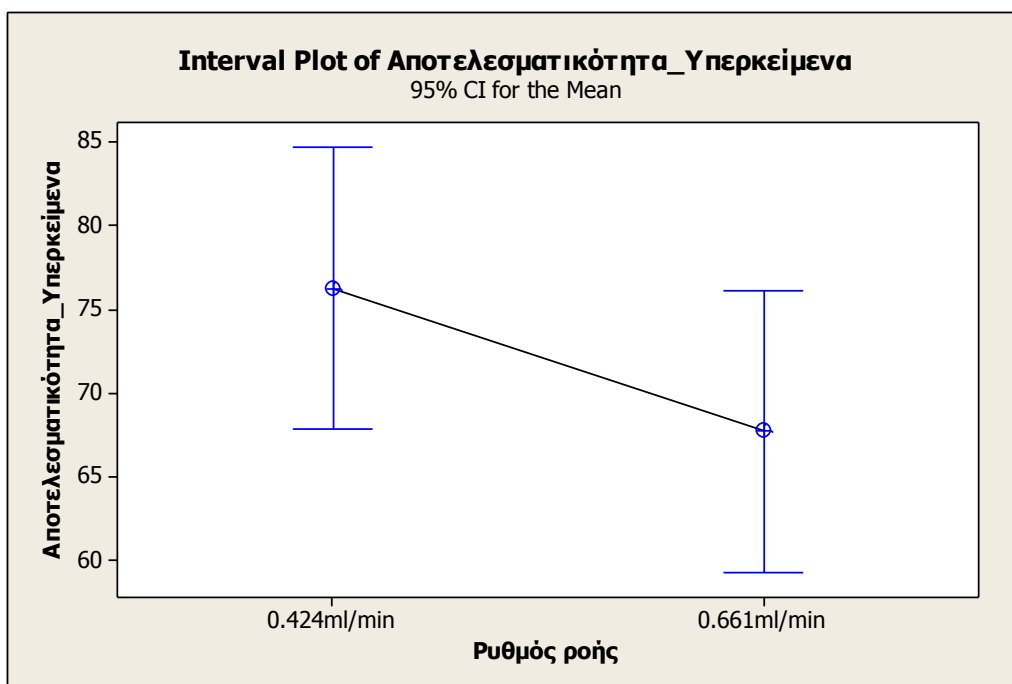
Στο Σχήμα 14 παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο μεθόδων, όσον αφορά στη χρήση βελόνας με διατομή 18g, ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο μεθόδων με χρήση βελόνας διατομής 21g.



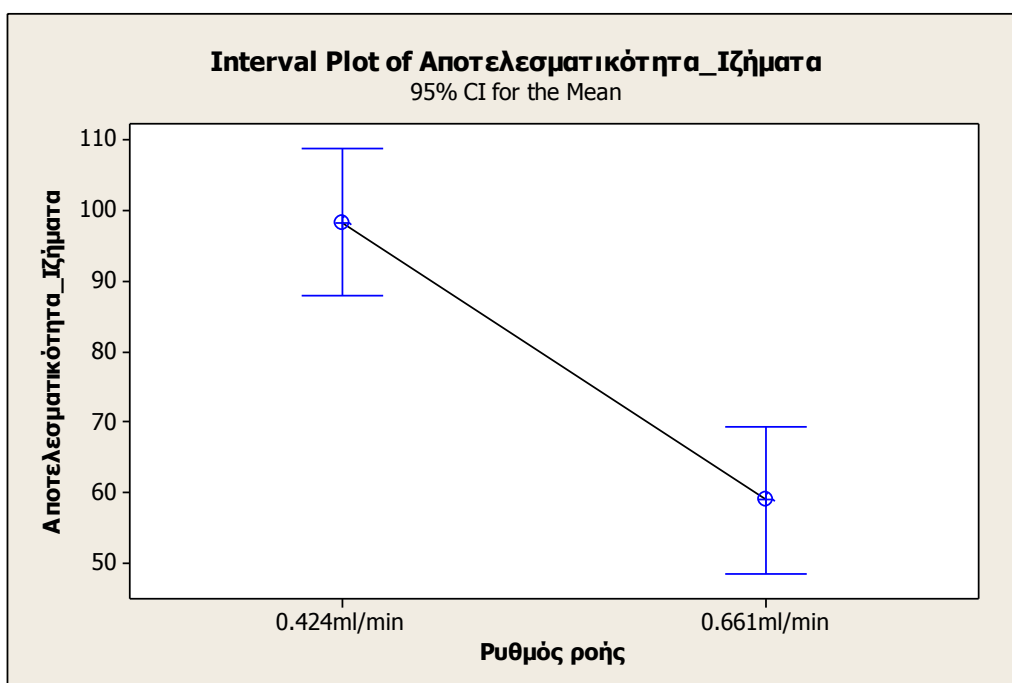
Σχήμα 14. Επίδραση της διατομής της βελόνας στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των υπερκείμενων υγρών και τη μέθοδο των ιζημάτων.

5.3. Επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης αλβουμίνης

Στα Σχήματα 15 και 16 παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμού ροής αιθανόλης στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, από μετρήσεις της απορρόφησης των υπερκείμενων υγρών και των διαλυμένων ιζημάτων. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0.05$) (Παράρτημα 4) στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο διαφορετικών ρυθμών ροής, τόσο στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά όσο και στη μέθοδο των ιζημάτων. Συνεπώς, η μεταβολή του ρυθμού ροής δεν επιφέρει αλλαγή στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης της αλβουμίνης.

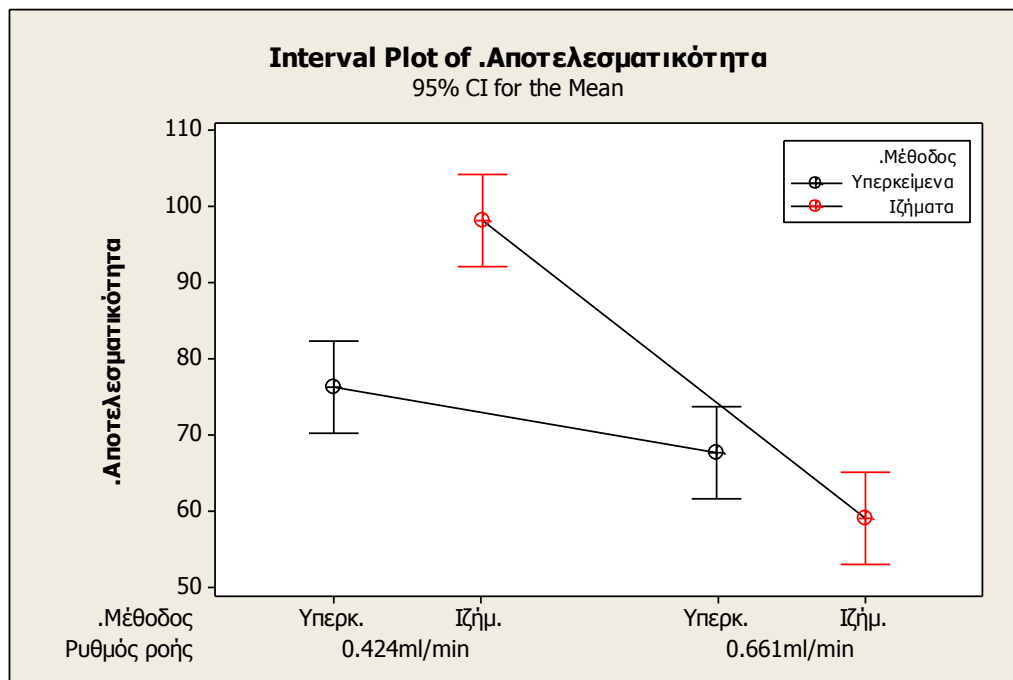


Σχήμα 15. Επίδραση του ρυθμού ροής στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των υπερκείμενων υγρών.



Σχήμα 16. Επίδραση του ρυθμού ροής στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης με τη μέθοδο των ιζημάτων.

Στο Σχήμα 17 παρατηρείται ότι η αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο μεθόδων διαφέρει τόσο κατά την παροχή αιθανόλης με 0.424 ml/min, όσο και κατά την παροχή 0.661 ml/min.



Σχήμα 17. Επίδραση του ρυθμού ροής στην αποτελεσματικότητα με τη μέθοδο των υπερκείμενων υγρών και τη μέθοδο των ιζημάτων.

5.4. Μελέτη της απελευθέρωσης αλβουμίνης από νανοσωματίδια αμύλου κατά την πάροδο του χρόνου

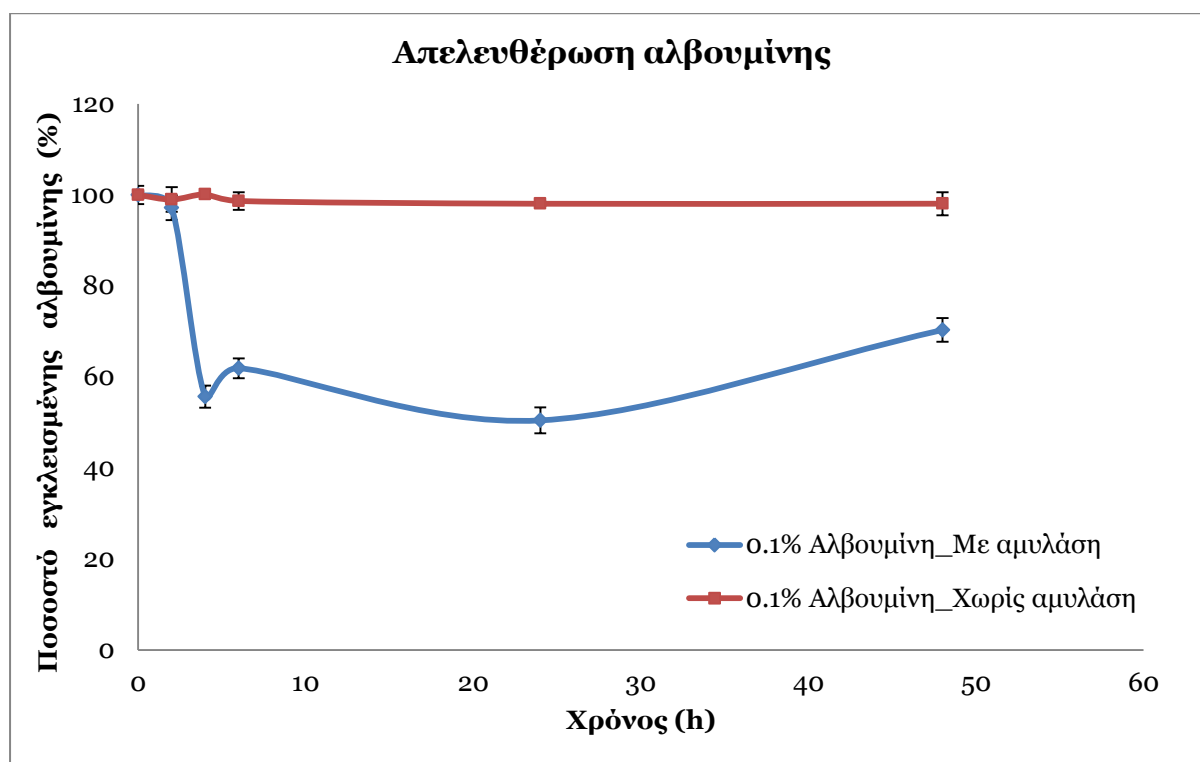
Στα Σχήματα 18, 19 και 20 παρουσιάζεται η μεταβολή του ποσοστού εγκλεισμένης αλβουμίνης κατά την πάροδο του χρόνου παρουσία και απουσία αμύλας, στις συγκεντρώσεις αλβουμίνης 0.1%, 0.05% και 0.01%. Στο Σχήμα 18 και 20 παρατηρείται ότι κατά την απελευθέρωση η οποία γίνεται απουσία αμύλας δεν υπάρχει σημαντική μείωση της εγκλεισμένης αλβουμίνης σε σχέση με τον χρόνο, ενώ κατά την απελευθέρωση παρουσία αμύλας, υπάρχει σημαντική μείωση της εγκλεισμένης αλβουμίνης με την πάροδο του χρόνου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αμύλα καταστρέφει τη δομή των νανοσωματιδίων αμύλου και κατά συνέπεια η αλβουμίνη απελευθερώνεται πιο εύκολα και γρήγορα από αυτά.

Μετά την πάροδο των 6 ωρών παρατηρείται ότι το ποσοστό εγκλεισμένης αλβουμίνης από το δείγμα με αμύλα αυξάνεται και τείνει να πλησιάσει το ποσοστό του δείγματος χωρίς αμύλα. Για το αποτέλεσμα αυτό θα πρέπει να διερευνηθεί αν

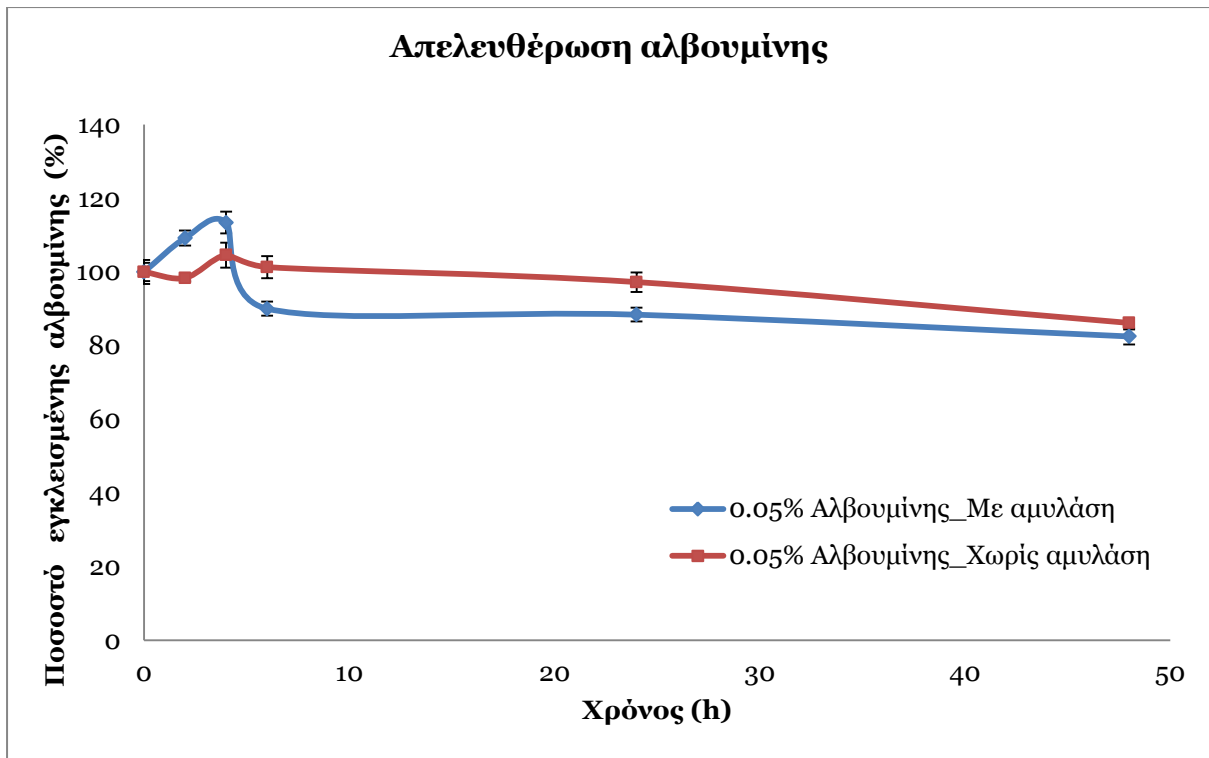
προκύπτουν κάποια προϊόντα από την ενζυμική αντίδραση, τα οποία δίνουν απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος με την αλβουμίνη.

Στο Σχήμα 19 που παρουσιάζεται η εγκλεισμένη αλβουμίνη από δείγματα με συγκέντρωση 0.05%, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο ρυθμών απελευθέρωσης, αν και είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) (Παράρτημα 7) στις 6 και 24 ώρες, ενώ στατιστικά μη σημαντική ($p > 0.05$) στις 48 ώρες.

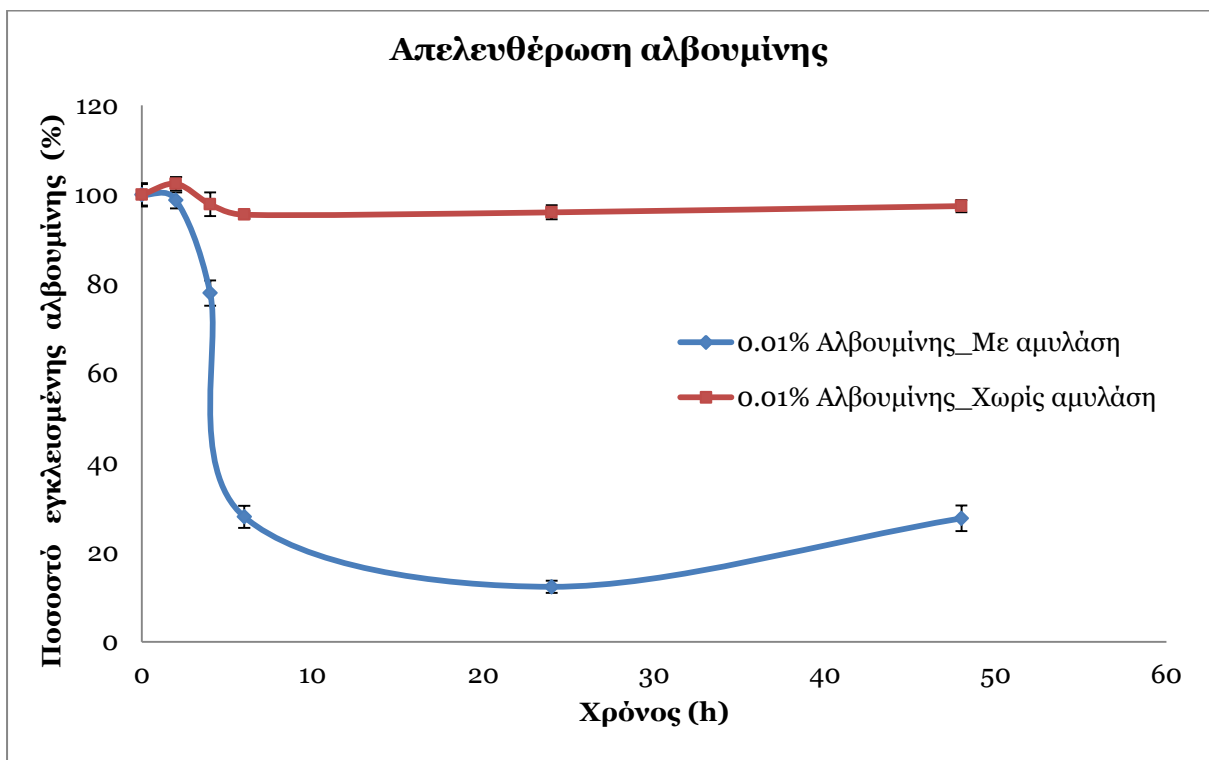
Επίσης, παρατηρείται ότι οι ρυθμοί απελευθέρωσης των δειγμάτων με αμυλάση που αφορούν στις συγκεντρώσεις αλβουμίνης 0.1% και 0.01%, είναι πολύ γρηγορότεροι κατά το διάστημα 0 – 6 ωρών σε σχέση με τον ρυθμό στη συγκέντρωση αλβουμίνης 0.05%.



Σχήμα 18. Μεταβολή του ποσοστού εγκλεισμένης αλβουμίνης σε νανοσωματίδια αμύλου σε συνάρτηση με τον χρόνο, με και χωρίς προσθήκη αμυλάσης, για συγκέντρωση αλβουμίνης 0.1%.



Σχήμα 19. Μεταβολή του ποσοστού εγκλεισμένης αλβουμίνης σε νανοσωματίδια αμύλου σε συνάρτηση με τον χρόνο, με και χωρίς προσθήκη αμυλάσης, για συγκέντρωση αλβουμίνης 0.05%.

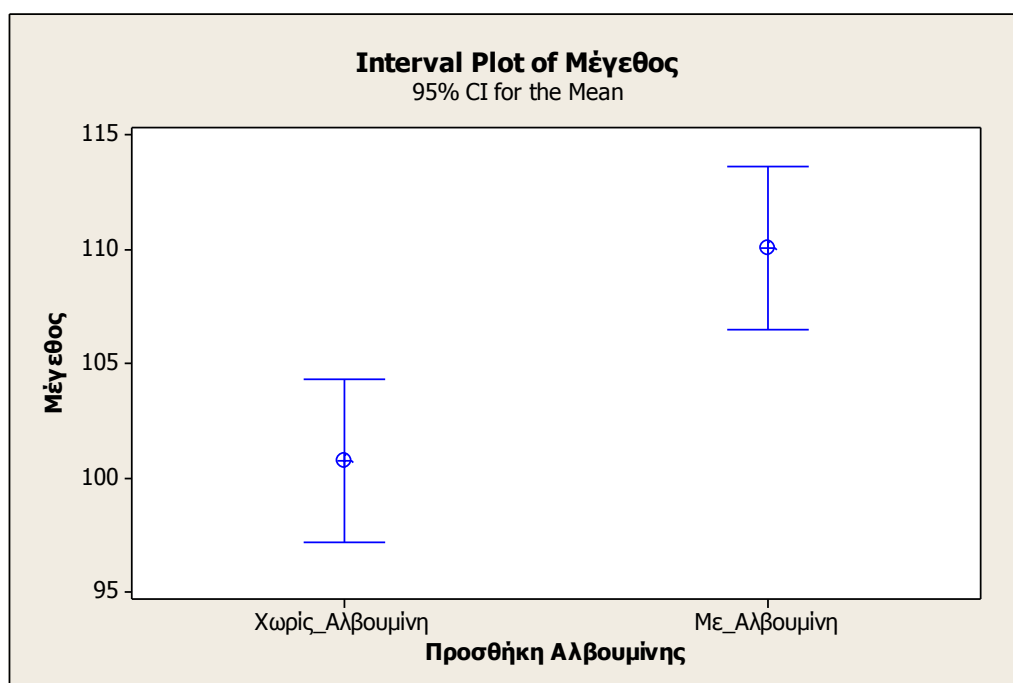


Σχήμα 20. Μεταβολή του ποσοστού εγκλεισμένης αλβουμίνης σε νανοσωματίδια αμύλου σε συνάρτηση με τον χρόνο, με και χωρίς προσθήκη αμυλάσης, για συγκέντρωση αλβουμίνης 0.01%.

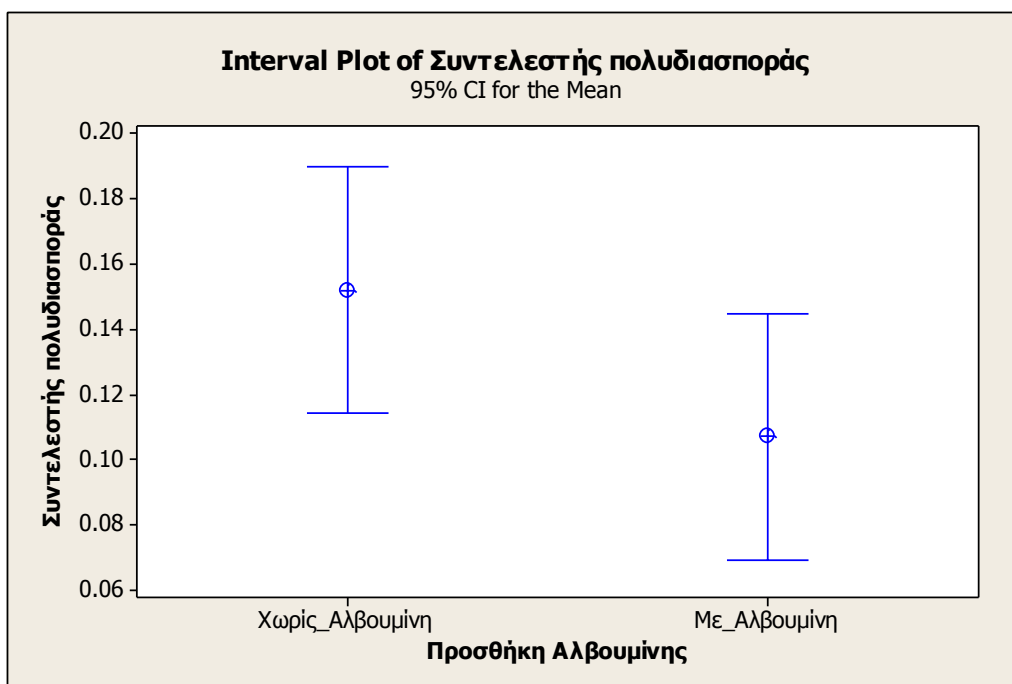
5.5. Επίδραση της προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στον δείκτη πολυδιασποράς (pdI) των νανοσωματιδίων

Στο Σχήμα 21 παρουσιάζεται η επίδραση προσθήκης αλβουμίνης στο μέγεθος και στον δείκτη πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων, από μετρήσεις που προήλθαν μετά τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων και πριν από τη φυγοκέντριση των δειγμάτων. Παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) (Παράρτημα 5) στο μέγεθος των νανοσωματιδίων παρουσία και απουσία αλβουμίνης. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια που περιέχουν αλβουμίνη είναι μεγαλύτερα από τα σωματίδια χωρίς αλβουμίνη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα νανοσωματίδια με αλβουμίνη εγκλείεται η ουσία και έτσι αυξάνεται ελαφρά το μέγεθός τους.

Στο Σχήμα 22 παρουσιάζονται οι δείκτες πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων παρουσία και απουσία αλβουμίνης και παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p > 0.05$) (Παράρτημα 5). Παρατηρείται επίσης ότι ο δείκτης πολυδιασποράς αμφότερων των δειγμάτων είναι κοντά στο μηδέν, συνεπώς το εύρος της κατανομής των νανοσωματιδίων είναι μικρό.



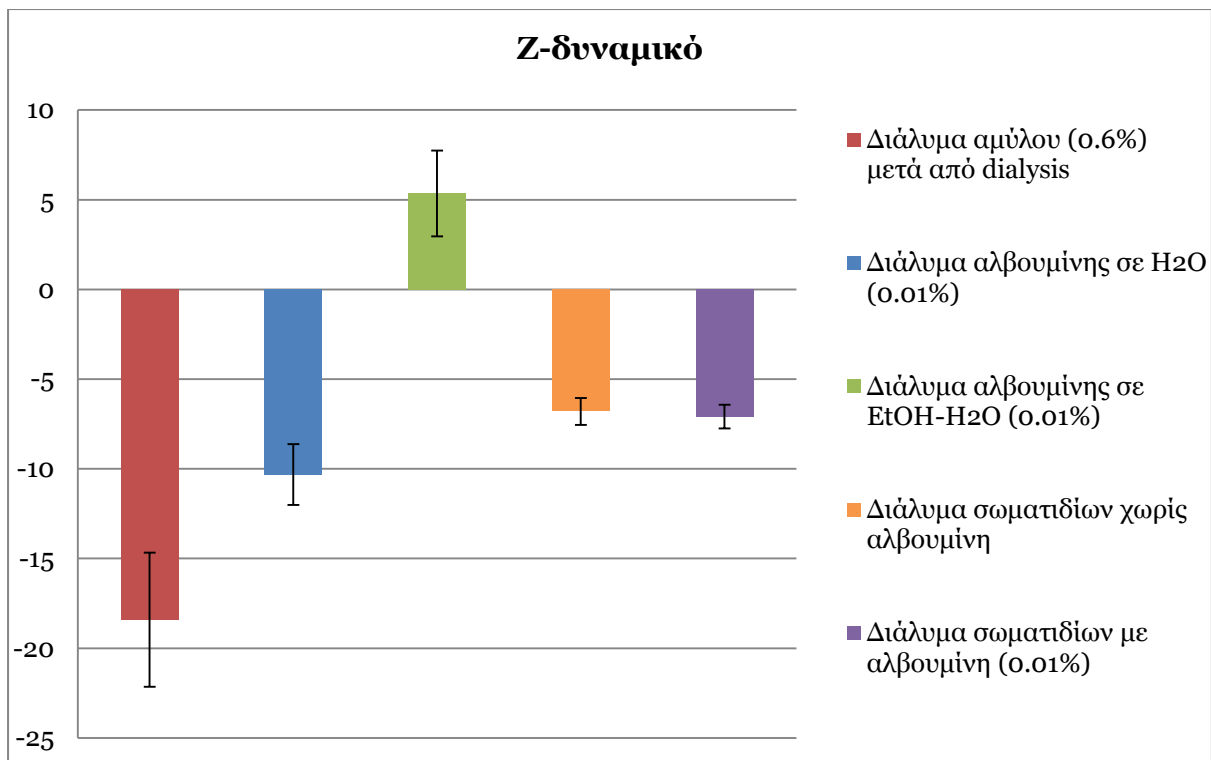
Σχήμα 21. Επίδραση του εγκλεισμού αλβουμίνης στο μέγεθος των νανοσωματιδίων.



Σχήμα 22. Επίδραση του εγκλεισμού αλβουμίνης στο δείκτη πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων.

5.6. Μελέτη του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αμύλου

Στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται η επίδραση του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αμύλου. Όπως φαίνεται, ο εγκλεισμός της αλβουμίνης δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ζ-δυναμικό των σωματιδίων (Παράρτημα 6). Όσο μεγαλύτερο είναι το ζ-δυναμικό, τόσο περισσότερο φορτίο έχουν τα σωματίδια και κατά συνέπεια, αυτό τα εμποδίζει να συσσωματωθούν. Αν τα σωματίδια είναι σχεδόν ουδέτερα, τότε έχουν τάση συσσωμάτωσης και αύξησης του μεγέθους τους. Τέλος, η συμπεριφορά της κάθε ουσίας εξαρτάται από το διαλύτη στον οποίο βρίσκεται, άρα εδώ φαίνεται ότι η αιθανόλη επιδρά στα νανοσωματίδια αμύλου και τους προσδίδει θετικό φορτίο.



Σχήμα 23. Επίδραση του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αμύλου.

6. Συμπεράσματα

- ✓ Η αύξηση της συγκέντρωσης αλβουμίνης προκαλεί αύξηση της αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης, τόσο στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά όσο και σε αυτή με τα ιζήματα.
- ✓ Η συγκέντρωση αλβουμίνης δεν επιφέρει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στο φορτίο της αλβουμίνης, τόσο στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά όσο και σε αυτή με τα ιζήματα.
- ✓ Η διατομή της βελόνας επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης και συγκεκριμένα, η μικρή διατομή (0.8 mm) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποτελεσματικότητας, ενώ η μεγάλη διατομή φέρνει το αντίθετο αποτέλεσμα, τόσο στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά όσο και σε αυτή με τα ιζήματα.
- ✓ Ο ρυθμός ροής δεν επιφέρει στατιστικά σημαντική αλλαγή στην αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, τόσο στη μέθοδο με τα υπερκείμενα υγρά όσο και σε αυτή με τα ιζήματα.
- ✓ Η προσθήκη αμυλάσης συμβάλει στο γρηγορότερο ρυθμό απελευθέρωσης αλβουμίνης από τα νανοσωματίδια αμύλου, σε σχέση με αυτόν απουσίας αμυλάσης.
- ✓ Ο εγκλεισμός αλβουμίνης επηρεάζει το μέγεθος των νανοσωματιδίων αμύλου και συγκεκριμένα το αυξάνει, αλλά δεν επηρεάζει τον δείκτη πολυδιασποράς.
- ✓ Ο εγκλεισμός της αλβουμίνης δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αμύλου.

7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Μελέτη εγκλεισμού άλλων ουσιών, θρεπτικών συστατικών ή φαρμάκων σε νανοσωματίδια αμύλου.
- Αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης αλβουμίνης, πέρα από τα όρια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.
- Μελέτη του ρυθμού απελευθέρωσης αλβουμίνης με την προσθήκη αμυλάσης, σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.
- Διερεύνηση αν κατά την προσθήκη αμυλάσης, με την πάροδο του χρόνου προκύπτουν κάποια προϊόντα, τα οποία απορροφούν στο μήκος κύματος των πρωτεϊνών.
- Προσθήκης άλλης ουσίας, η οποία θα προσομοιάζει το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου, ώστε να μελετηθεί ο ρυθμός απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ουσίας.

Βιβλιογραφία

Allhoff, F., Lin, P., Moor, J., Weckert, J. (2007). Nanoethics: The Ethical and Social Implications of Nanotechnology.

Bouwmeester H., Dekkers S., Noordam M.Y., Hagens W.I., Bulder A.S., Heer C., ten Voorde S.E.C.G., Wijnhoven S.W.P., Marvin H.J.P. & Sips A.J.A.M. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **53**, 52–62.

Gibbs B.F., Kermasha S., Alli I, Mulligan C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **50**, 213–224.

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.

Lakkis J.M. (2007). Encapsulation and controlled release technologies in food systems, 1st edition, (Ed. Lakkis J.E.), pp. 1-9, Blackwell Publishing, USA.

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

Li Y.O. (2009). Development of microencapsulation-based technologies for micronutrient fortification in staple foods for developing countries. pp. 20-29, *Dissertation, Graduate Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry*, University of Toronto, Toronto, Canada.

Nordman, A. (2009). Future and Present. Basic Ethical concepts. The Ethics Portfolio. *Technical University Darmstadt for NanoCap*.

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

Savadkoochia S., Bannikovaa A., Kasapis S. (2013). Structural behaviour in condensed bovine serum albumin systems following application of high pressure, *Food Chemistry*, **150**, 469 – 476.

Simi C. K. & Abraham T. A. (2007). Hydrophobic grafted and cross-linked starch nanoparticles for drug delivery, **30**,. 173 – 180.

Tester R. F., Karkalas J., Qi X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture, *Journal of Cereal Science*, **39**, (2), 151 – 165.

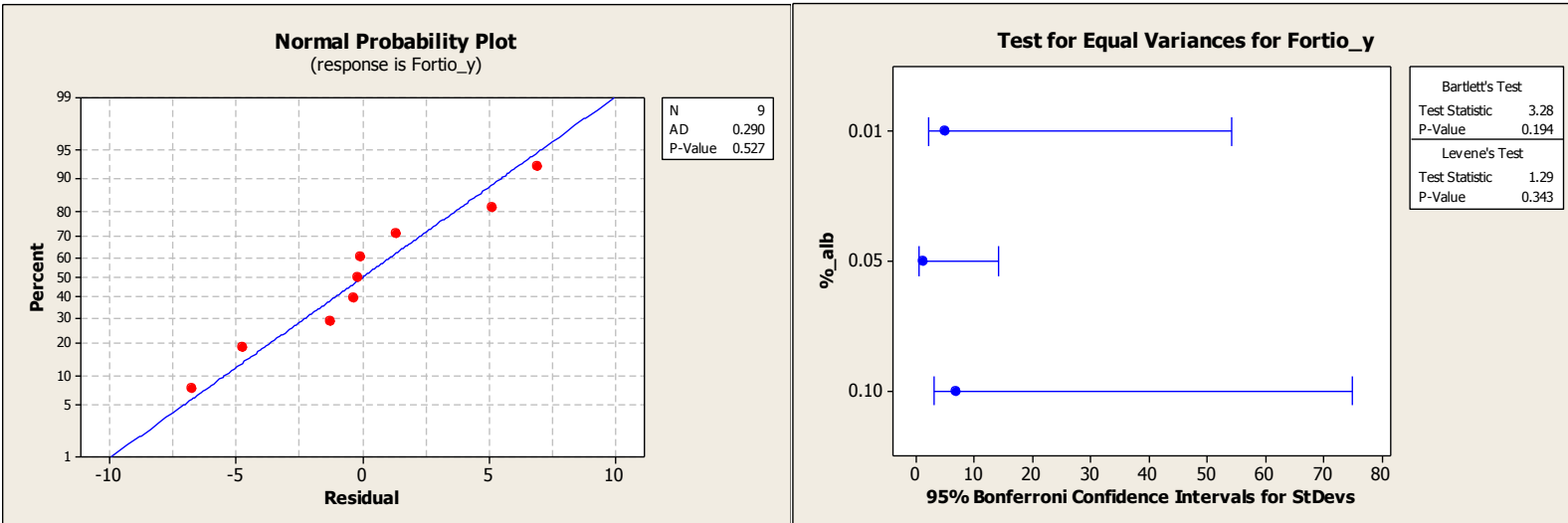
Weiss J., Takhiston P, McClements D. J. (2006). Functional Materials in Food Nanotechnology, *Journal of Food Science*, **71**.

Zuidam N.J. and Nedović V.A. (2010), Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them, *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*.

Παράρτημα 1

Φορτίο (υπερκείμενα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Fortio_y versus %_alb

Source	DF	SS	MS	F	P
%_alb	2	181.5	90.7	3.72	0.089
Error	6	146.5	24.4		
Total	8	327.9			

S = 4.941 R-Sq = 55.33% R-Sq(adj) = 40.44%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0.01	3	60.767	4.960
0.05	3	50.367	1.301
0.10	3	52.467	6.852

Pooled StDev = 4.941

Grouping Information Using Tukey Method

%_alb	N	Mean	Grouping
0.01	3	60.767	A
0.10	3	52.467	A
0.05	3	50.367	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

All Pairwise Comparisons among Levels of %_alb

Individual confidence level = 97.80%

%_alb = 0.01 subtracted from:

%_alb	Lower	Center	Upper
0.05	-22.781	-10.400	1.981
0.10	-20.681	-8.300	4.081

%_alb = 0.05 subtracted from:

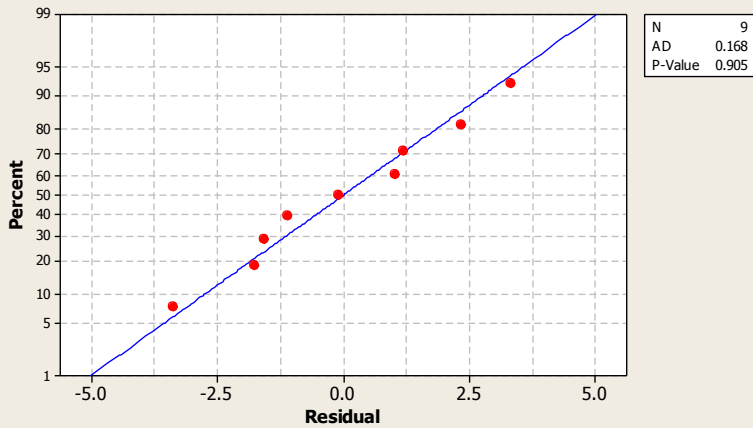
%_alb	Lower	Center	Upper
0.10	-10.281	2.100	14.481

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μεγαλύτερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι δεν διαφέρουν μεταξύ τους, αφού όπως φαίνεται και από τον έλεγχο Tukey όλα τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

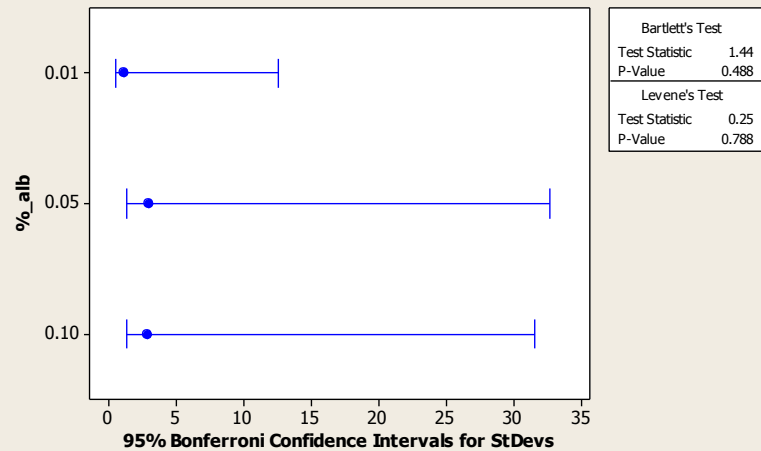
Φορτίο (ιζήματα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.

Normal Probability Plot
(response is Fortio_i)



Test for Equal Variances for Fortio_i



One-way ANOVA: Fortio_i versus %_alb

Source	DF	SS	MS	F	P
%_alb	2	57.72	28.86	4.66	0.060
Error	6	37.19	6.20		
Total	8	94.91			

S = 2.490 R-Sq = 60.81% R-Sq(adj) = 47.75%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0.01	3	53.200	1.153
0.05	3	48.667	2.987
0.10	3	47.267	2.888

Pooled StDev = 2.490

Grouping Information Using Tukey Method

%_alb	N	Mean	Grouping
0.01	3	53.200	A
0.05	3	48.667	A
0.10	3	47.267	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

All Pairwise Comparisons among Levels of %_alb

Individual confidence level = 97.80%

%_alb = 0.01 subtracted from:

%_alb	Lower	Center	Upper
0.05	-10.772	-4.533	1.705
0.10	-12.172	-5.933	0.305

%_alb = 0.05 subtracted from:

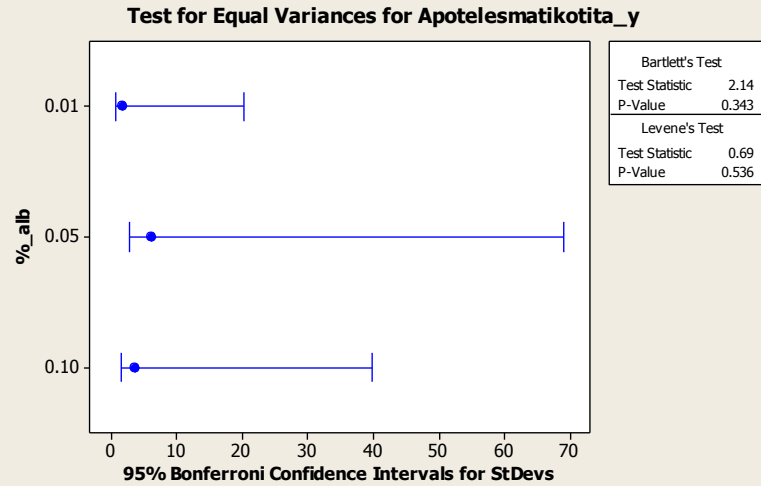
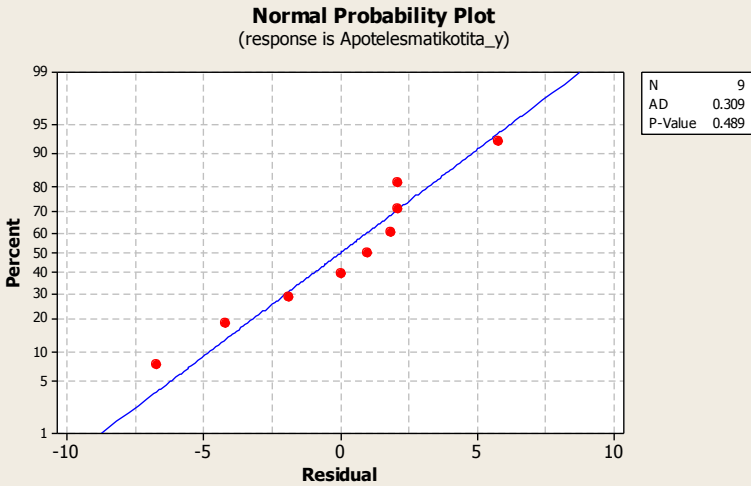
%_alb	Lower	Center	Upper
0.10	-7.639	-1.400	4.839

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μεγαλύτερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι δεν διαφέρουν μεταξύ τους, αφού όπως φαίνεται και από τον έλεγχο Tukey όλα τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Παράρτημα 2

Αποτελεσματικότητα σε σχέση με % Αλβ (υπερκειμένα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_y versus %_alb

Source	DF	SS	MS	F	P
%_alb	2	1514.3	757.2	40.26	0.000
Error	6	112.8	18.8		
Total	8	1627.2			

S = 4.337 R-Sq = 93.07% R-Sq(adj) = 90.75%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0.01	3	72.47	1.85
0.05	3	64.33	6.31
0.10	3	95.00	3.64

Pooled StDev = 4.34

Grouping Information Using Tukey Method

%_alb	N	Mean	Grouping
0.10	3	95.000	A
0.01	3	72.467	B
0.05	3	64.333	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

All Pairwise Comparisons among Levels of %_alb

Individual confidence level = 97.80%

%_alb = 0.01 subtracted from:

%_alb	Lower	Center	Upper
0.05	-18.999	-8.133	2.733
0.10	11.667	22.533	33.399

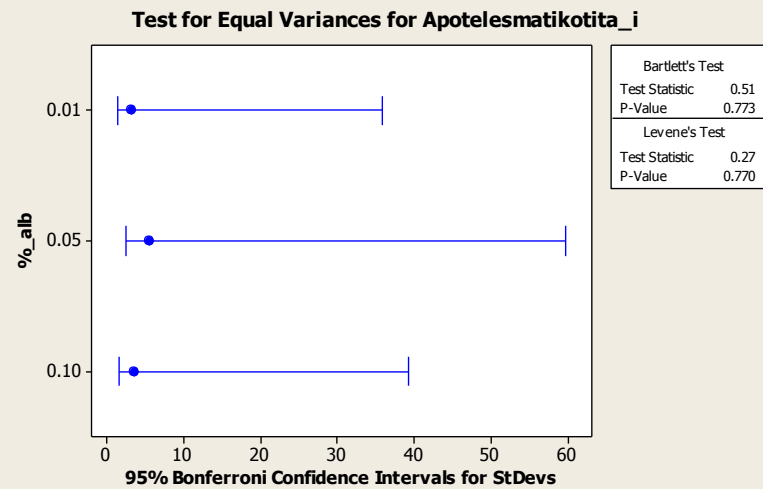
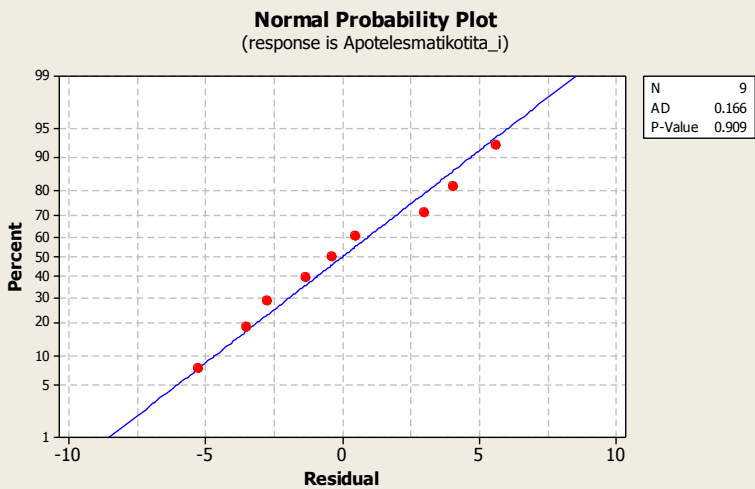
%_alb = 0.05 subtracted from:

%_alb	Lower	Center	Upper
0.10	19.801	30.667	41.533

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι ίδιοι μεταξύ τους είναι της συγκέντρωσης 0.01% και 0.05% αβουμίνης, αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Αποτελεσματικότητα σε σχέση με % Αλβ (ιζήματα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_i versus %_alb

Source	DF	SS	MS	F	P
%_alb	2	3034.3	1517.1	85.16	0.000
Error	6	106.9	17.8		
Total	8	3141.2			

S = 4.221 R-Sq = 96.60% R-Sq(adj) = 95.46%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0.01	3	56.50	3.28
0.05	3	56.27	5.46
0.10	3	95.33	3.59

Pooled StDev = 4.22

Grouping Information Using Tukey Method

%_alb	N	Mean	Grouping
0.10	3	95.333	A
0.01	3	56.500	B
0.05	3	56.267	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

All Pairwise Comparisons among Levels of %_alb

Individual confidence level = 97.80%

%_alb = 0.01 subtracted from:

%_alb	Lower	Center	Upper
0.05	-10.810	-0.233	10.343
0.10	28.257	38.833	49.410

%_alb = 0.05 subtracted from:

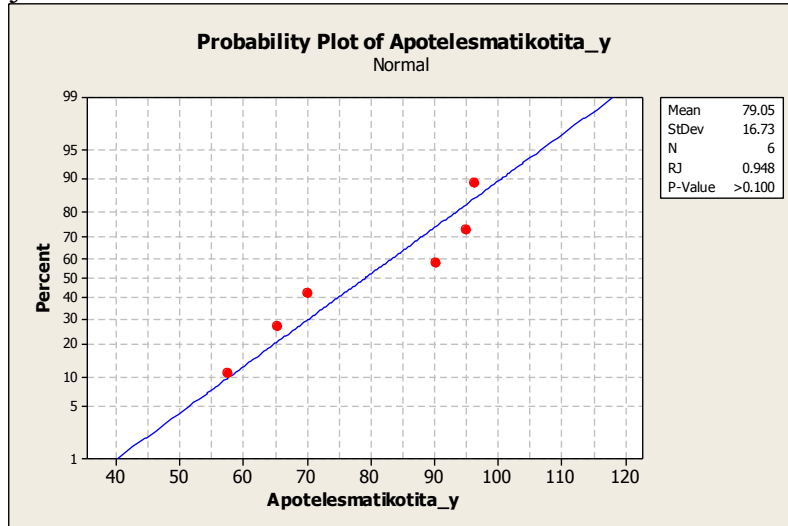
%_alb	Lower	Center	Upper
0.10	28.490	39.067	49.643

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι ίδιοι μεταξύ τους είναι της συγκέντρωσης 0.01% και 0.05% αλβουμίνης, αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Παράρτημα 3

Αποτελεσματικότητα σε σχέση με διατομή βελόνας (υπερκείμενα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τον παρακάτω έλεγχο και το παρακάτω διάγραμμα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05 και στις δύο περιπτώσεις.



Test and CI for Two Variances: Apotelesmatikotita_y vs Diatomi

Method
 Null hypothesis $\text{Sigma}(18) / \text{Sigma}(21) = 1$
 Alternative hypothesis $\text{Sigma}(18) / \text{Sigma}(21) \text{ not} = 1$
 Significance level $\text{Alpha} = 0.05$

Statistics

Diatomi	N	StDev	Variance
18	3	6.306	39.763
21	3	3.232	10.443

Ratio of standard deviations = 1.951
 Ratio of variances = 3.808

95% Confidence Intervals

Distribution of Data	CI for StDev Ratio	CI for Variance Ratio
Normal	(0.312, 12.186)	(0.098, 148.494)
Continuous	(*, *)	(*, *)

Tests

Method	DF1	DF2	Test Statistic	Test
				P-Value
F Test (normal)	2	2	3.81	0.416
Levene's Test (any continuous)	1	4	0.63	0.472

Two-Sample T-Test and CI: Apotelesmatikotita_y, Diatomi

Two-sample T for Apotelesmatikotita_y

Diatomi	N	Mean	StDev	SE Mean
18	3	64.33	6.31	3.6
21	3	93.77	3.23	1.9

Difference = $\mu(18) - \mu(21)$

Estimate for difference: -29.43

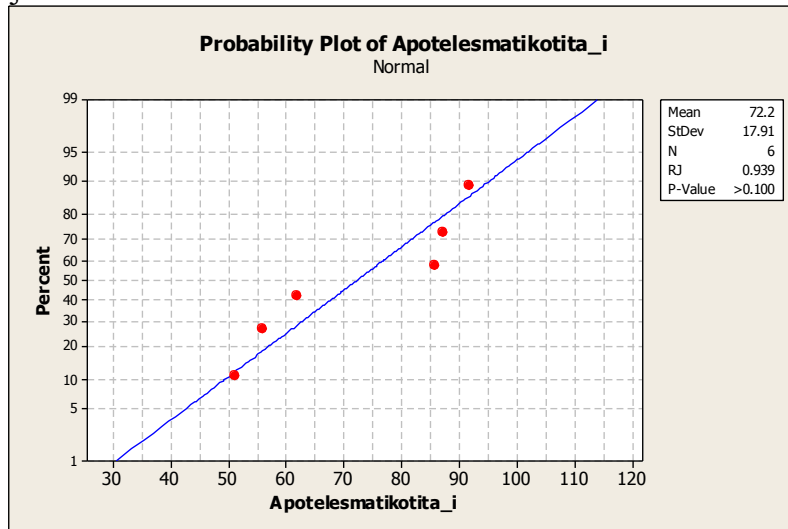
95% CI for difference: (-47.04, -11.83)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -7.19 P-Value = 0.019 DF = 2

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους.

Αποτελεσματικότητα σε σχέση με διατομή βελόνας (ιζήματα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τον παρακάτω έλεγχο και το παρακάτω διάγραμμα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05 και στις δύο περιπτώσεις.



Test and CI for Two Variances: Apotelesmatikotita_i vs Diatomi

Method

Null hypothesis $\text{Sigma}(18) / \text{Sigma}(21) = 1$
 Alternative hypothesis $\text{Sigma}(18) / \text{Sigma}(21) \text{ not} = 1$
 Significance level $\text{Alpha} = 0.05$

Statistics

Diatomi	N	StDev	Variance
18	3	5.459	29.803
21	3	3.179	10.103

Ratio of standard deviations = 1.718

Ratio of variances = 2.950

95% Confidence Intervals

Distribution of Data	CI for StDev Ratio	CI for Variance Ratio
Normal	(0.275, 10.726)	(0.076, 115.044)
Continuous	(*, *)	(*, *)

Tests

Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value
F Test (normal)	2	2	2.95	0.506
Levene's Test (any continuous)	1	4	0.49	0.523

Two-Sample T-Test and CI: Apotelesmatikotita_i, Diatomi

Two-sample T for Apotelesmatikotita_i

Diatomi	N	Mean	StDev	SE Mean
18	3	56.27	5.46	3.2
21	3	88.13	3.18	1.8

Difference = $\mu(18) - \mu(21)$

Estimate for difference: -31.87

95% CI for difference: (-43.47, -20.26)

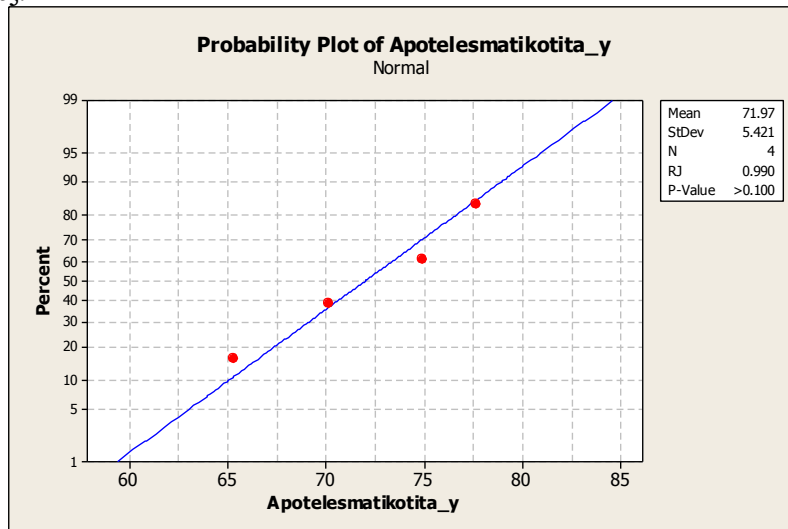
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -8.74 P-Value = 0.003 DF = 3

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους.

Παράρτημα 4

Αποτελεσματικότητα σε σχέση με την παροχή της αντλίας (υπερκειμένα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τον παρακάτω έλεγχο και το παρακάτω διάγραμμα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05 και στις δύο περιπτώσεις.



Test and CI for Two Variances: Apotelesmatikotita_y vs Rythmos

Method

Null hypothesis $\text{Sigma}(5) / \text{Sigma}(10) = 1$
Alternative hypothesis $\text{Sigma}(5) / \text{Sigma}(10) \text{ not} = 1$
Significance level $\text{Alpha} = 0.05$

Statistics

Rythmos	N	StDev	Variance
5	2	1.923	3.699
10	2	3.394	11.520

Ratio of standard deviations = 0.567

Ratio of variances = 0.321

95% Confidence Intervals

Distribution of Data	CI for StDev Ratio	CI for Variance Ratio
Normal	(0.022, 14.423)	(0.000, 208.012)
Continuous	(0.567, 0.567)	(0.321, 0.321)

Tests

Method	DF1	DF2	Test Statistic	P-Value
F Test (normal)	1	1	0.32	0.656
Levene's Test (any continuous)	1	2	*	*

Two-Sample T-Test and CI: Apotelesmatikotita_y, Rythmos

Two-sample T for Apotelesmatikotita_y

Rythmos	N	Mean	StDev	SE Mean
5	2	76.24	1.92	1.4
10	2	67.70	3.39	2.4

Difference = $\mu(5) - \mu(10)$

Estimate for difference: 8.54

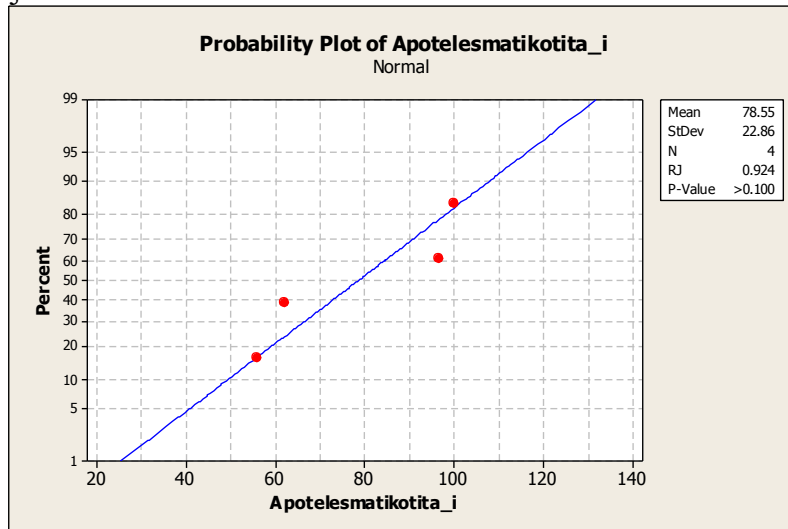
95% CI for difference: (-26.51, 43.59)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 3.10 P-Value = 0.199 DF = 1

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μεγαλύτερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι είναι ίσοι μεταξύ τους.

Αποτελεσματικότητα σε σχέση με την παροχή της αντλίας (ιζήματα)

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τον παρακάτω έλεγχο και το παρακάτω διάγραμμα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05 και στις δύο περιπτώσεις.



Test and CI for Two Variances: Apotelesmatikotita_i vs Rythmos

Method

Null hypothesis $\text{Sigma}(5) / \text{Sigma}(10) = 1$
Alternative hypothesis $\text{Sigma}(5) / \text{Sigma}(10) \text{ not} = 1$
Significance level $\text{Alpha} = 0.05$

Statistics

Rythmos	N	StDev	Variance
5	2	2.263	5.120
10	2	4.243	18.000

Ratio of standard deviations = 0.533

Ratio of variances = 0.284

95% Confidence Intervals

Distribution	CI for StDev	CI for Variance Ratio
of Data	Ratio	
Normal	(0.021, 13.574)	(0.000, 184.260)
Continuous	(0.533, 0.533)	(0.284, 0.284)

Tests

Method	DF1	DF2	Test Statistic	P-Value
F Test (normal)	1	1	0.28	0.624
Levene's Test (any continuous)	1	2	*	*

Two-Sample T-Test and CI: Apotelesmatikotita_i, Rythmos

Two-sample T for Apotelesmatikotita_i

Rythmos	N	Mean	StDev	SE Mean
5	2	98.20	2.26	1.6
10	2	58.90	4.24	3.0

Difference = $\mu(5) - \mu(10)$

Estimate for difference: 39.30

95% CI for difference: (-3.90, 82.50)

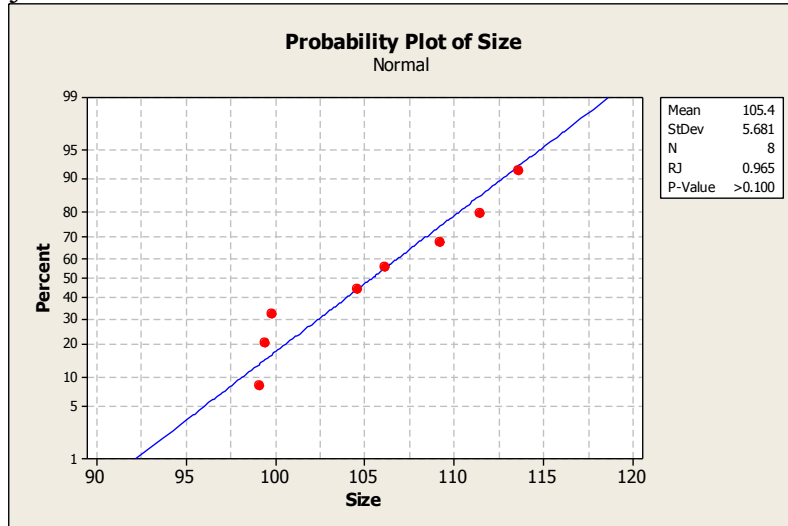
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 11.56 P-Value = 0.055 DF = 1

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μεγαλύτερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι είναι ίσοι μεταξύ τους.

Παράρτημα 5

Μέγεθος σωματιδίων

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τον παρακάτω έλεγχο και το παρακάτω διάγραμμα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05 και στις δύο περιπτώσεις.



Test and CI for Two Variances: Size vs Alb

Method
 Null hypothesis $\Sigma(1) / \Sigma(2) = 1$
 Alternative hypothesis $\Sigma(1) / \Sigma(2) \text{ not } = 1$
 Significance level $\text{Alpha} = 0.05$

Statistics

Alb	N	StDev	Variance
1	4	2.600	6.761
2	4	3.201	10.249

Ratio of standard deviations = 0.812
 Ratio of variances = 0.660
 95% Confidence Intervals

Distribution of Data	CI for StDev Ratio	CI for Variance Ratio
Normal	(0.207, 3.191)	(0.043, 10.185)
Continuous	(*, 4.005)	(*, 16.043)

Tests

Method	DF1	DF2	Test Statistic	P-Value
F Test (normal)	3	3	0.66	0.741
Levene's Test (any continuous)	1	6	0.44	0.531

Two-Sample T-Test and CI: Size, Alb

Two-sample T for Size

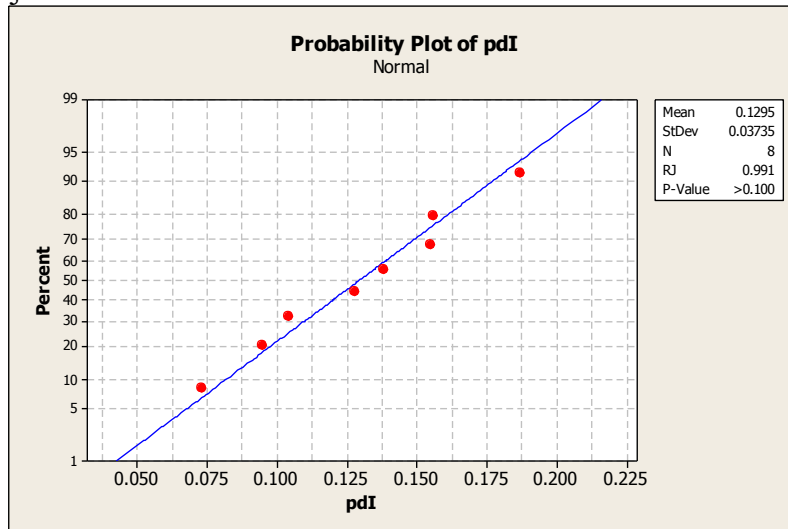
Alb	N	Mean	StDev	SE Mean
1	4	100.72	2.60	1.3
2	4	110.08	3.20	1.6

Difference = $\mu(1) - \mu(2)$
 Estimate for difference: -9.35
 95% CI for difference: (-14.65, -4.05)
 T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -4.53 P-Value = 0.006 DF = 5

Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους.

Δείκτης πολυδιασποράς

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τον παρακάτω έλεγχο και το παρακάτω διάγραμμα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05 και στις δύο περιπτώσεις.



Test and CI for Two Variances: pdI vs Alb

Method

Null hypothesis $\text{Sigma}(1) / \text{Sigma}(2) = 1$
Alternative hypothesis $\text{Sigma}(1) / \text{Sigma}(2) \text{ not} = 1$
Significance level $\text{Alpha} = 0.05$

Statistics

Alb	N	StDev	Variance
1	4	0.026	0.001
2	4	0.035	0.001

Ratio of standard deviations = 0.735

Ratio of variances = 0.541

95% Confidence Intervals

Distribution of Data	CI for StDev Ratio		CI for Variance Ratio	
	Lower	Upper	Lower	Upper
Normal	0.187	2.889	0.035	8.348
Continuous	0.023	*	0.001	*

Tests

Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value
F Test (normal)	3	3	0.54	0.626
Levene's Test (any continuous)	1	6	0.08	0.791

Two-Sample T-Test and CI: pdI, Alb

Two-sample T for pdI

Alb	N	Mean	StDev	SE Mean
1	4	0.1520	0.0259	0.013
2	4	0.1070	0.0352	0.018

Difference = $\mu(1) - \mu(2)$

Estimate for difference: 0.0450

95% CI for difference: (-0.0111, 0.1011)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 2.06 P-Value = 0.094 DF = 5

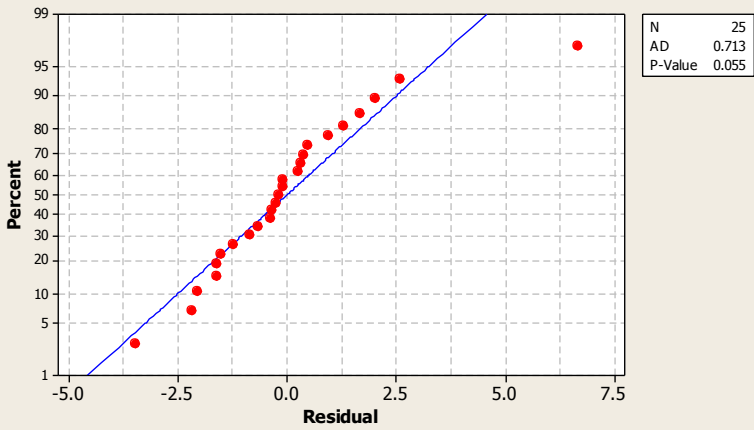
Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μεγαλύτερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι είναι ίσοι μεταξύ τους.

Παράρτημα 6

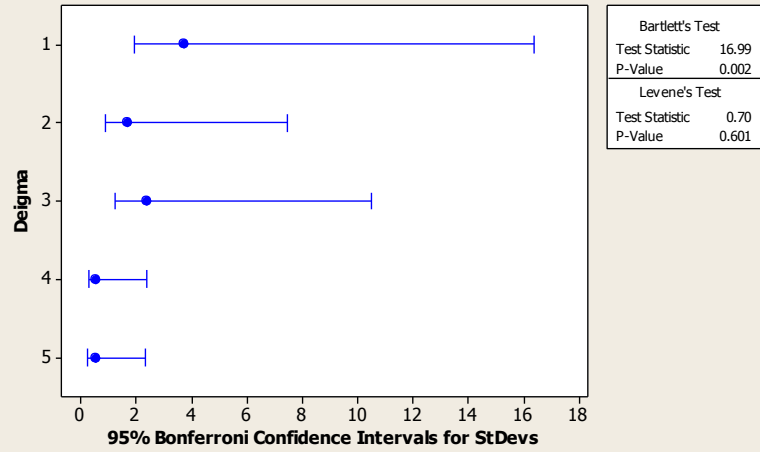
Z-δυναμικό

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.

Normal Probability Plot
(response is Z-potential)



Test for Equal Variances for Z-potential

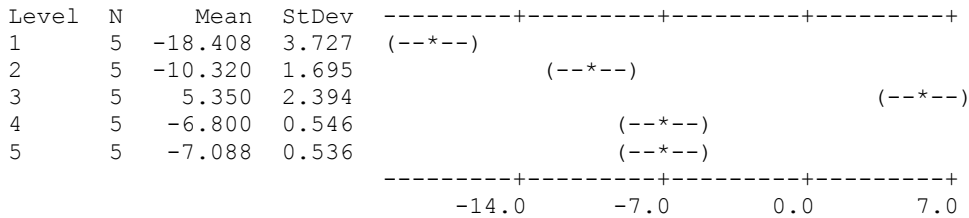


One-way ANOVA: Z-potential versus Deigma

Source	DF	SS	MS	F	P
Deigma	4	1463.55	365.89	79.27	0.000
Error	20	92.32	4.62		
Total	24	1555.86			

S = 2.148 R-Sq = 94.07% R-Sq(adj) = 92.88%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev



Pooled StDev = 2.148

Grouping Information Using Tukey Method

Deigma	N	Mean	Grouping
3	5	5.350	A
4	5	-6.800	B
5	5	-7.088	B
2	5	-10.320	B
1	5	-18.408	C

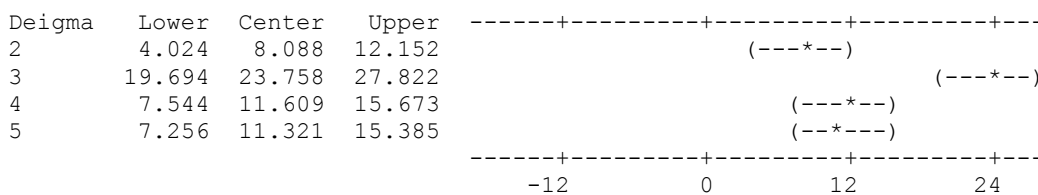
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

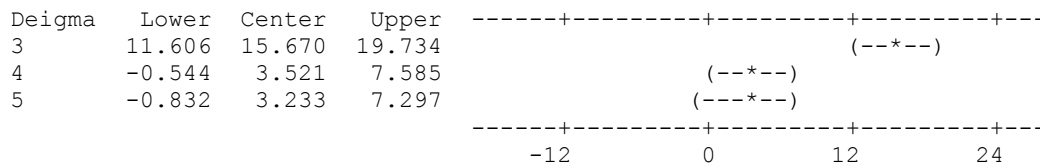
All Pairwise Comparisons among Levels of Deigma

Individual confidence level = 99.28%

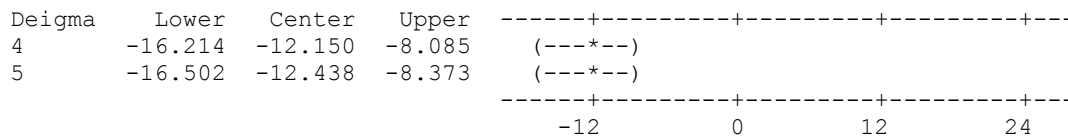
Deigma = 1 subtracted from:



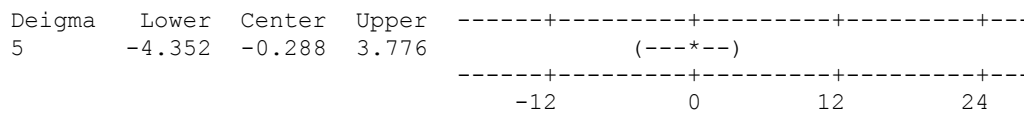
Deigma = 2 subtracted from:



Deigma = 3 subtracted from:



Deigma = 4 subtracted from:

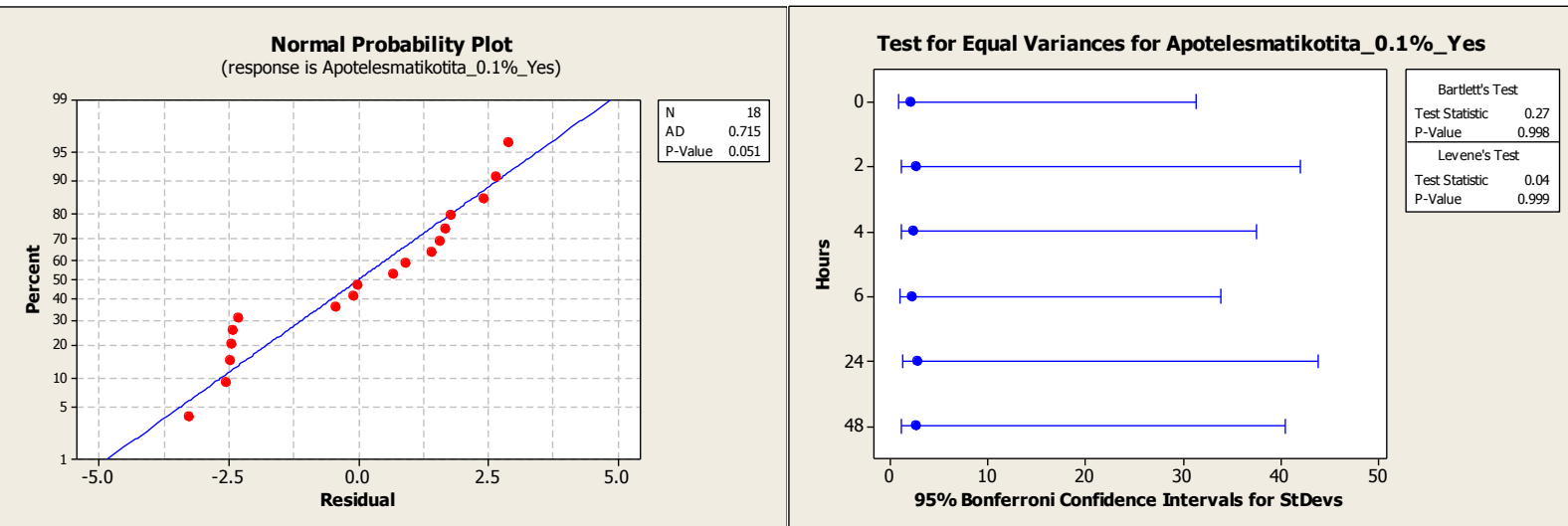


Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι ίδιοι μεταξύ τους είναι των διαλυμάτων αλβουμίνης σε νερό (2), ναοσωματιδίων χωρίς αλβουμίνη (4) και ναοσωματιδίων με αλβουμίνη (5), αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Παράρτημα 7

Απελευθέρωση (υπερκείμενα) 0.1% Αλβ Αμυλάση

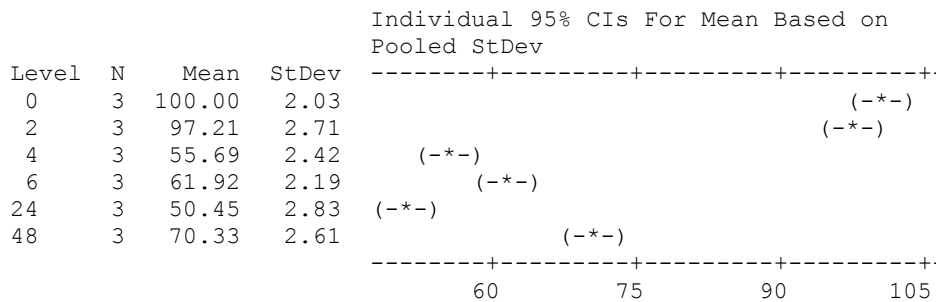
Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_0.1%_Yes versus Hours

Source	DF	SS	MS	F	P
Hours	5	6755.40	1351.08	219.43	0.000
Error	12	73.89	6.16		
Total	17	6829.28			

S = 2.481 R-Sq = 98.92% R-Sq(adj) = 98.47%



Pooled StDev = 2.48

Grouping Information Using Tukey Method

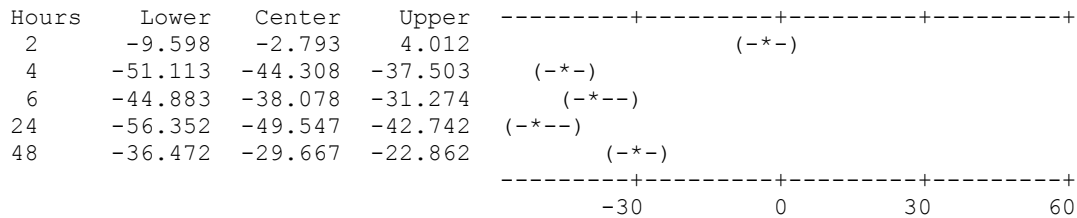
Hours	N	Mean	Grouping
0	3	100.000	A
2	3	97.207	A
48	3	70.333	B
6	3	61.922	C
4	3	55.692	C D
24	3	50.453	D

Means that do not share a letter are significantly different.

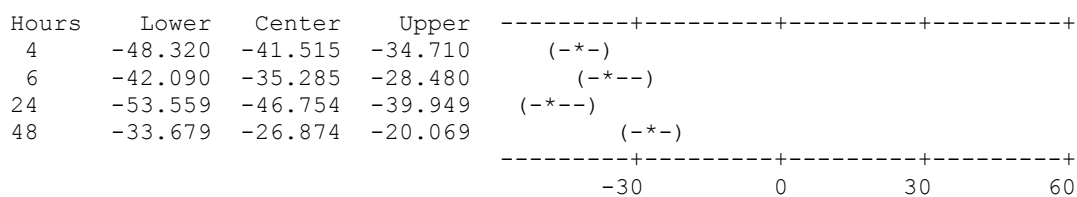
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Hours

Individual confidence level = 99.43%

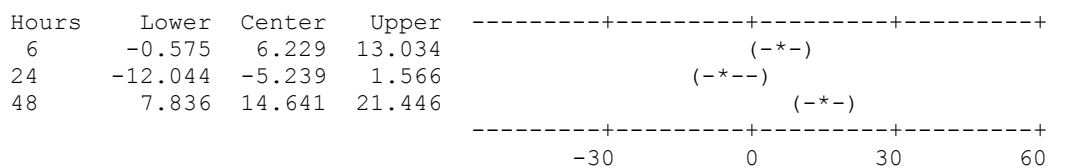
Hours = 0 subtracted from:



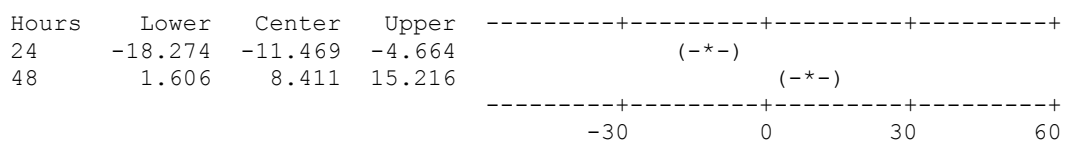
Hours = 2 subtracted from:



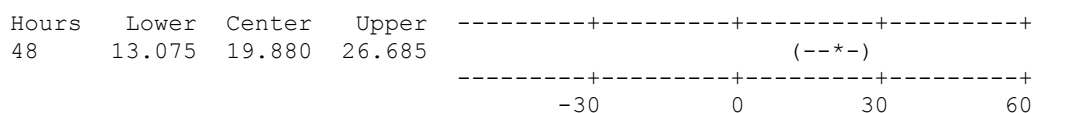
Hours = 4 subtracted from:



Hours = 6 subtracted from:



Hours = 24 subtracted from:

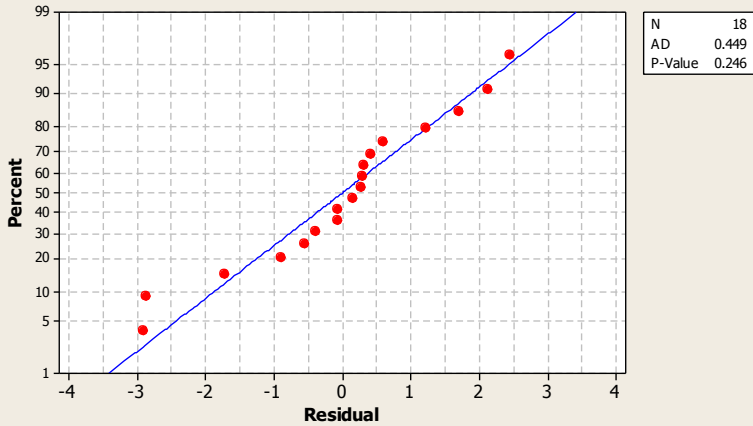


Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι ίδιοι μεταξύ τους είναι στις ώρες 0, 2, 4, 6, 24, αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

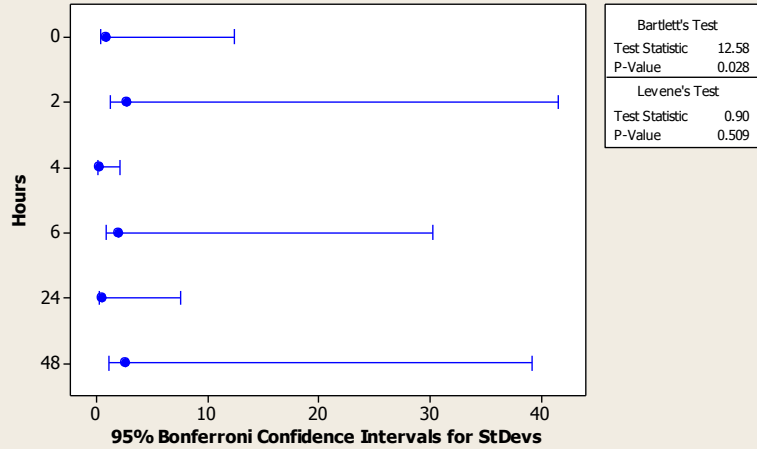
Απελευθέρωση (υπερκείμενα) 0.1% Αλβ Χωρίς Αμυλάση

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.

Normal Probability Plot
(response is Apotelesmatikotita_0.1%_No)



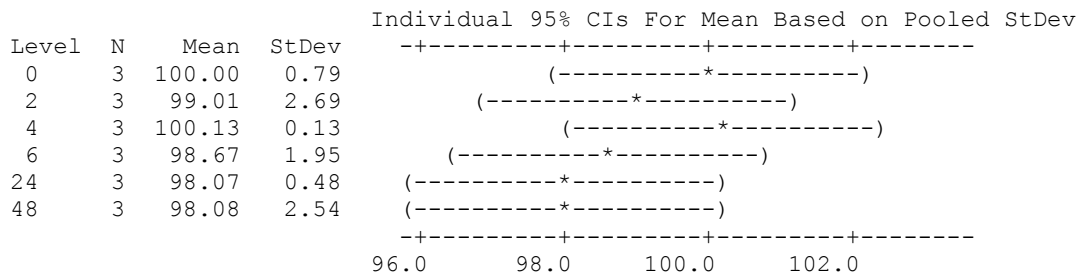
Test for Equal Variances for Apotelesmatikotita_0.1%_No



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_0.1%_No versus Hours

Source	DF	SS	MS	F	P
Hours	5	12.26	2.45	0.80	0.570
Error	12	36.70	3.06		
Total	17	48.96			

S = 1.749 R-Sq = 25.03% R-Sq(adj) = 0.00%

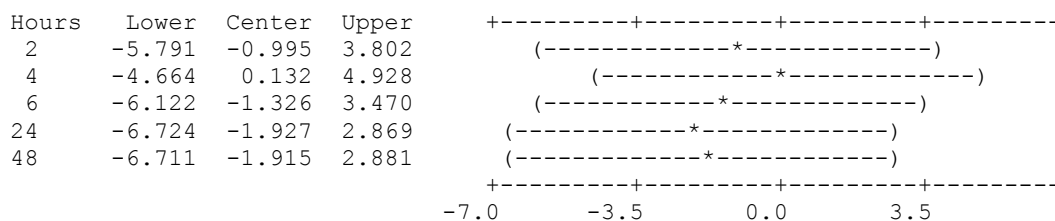


Pooled StDev = 1.75
Grouping Information Using Tukey Method

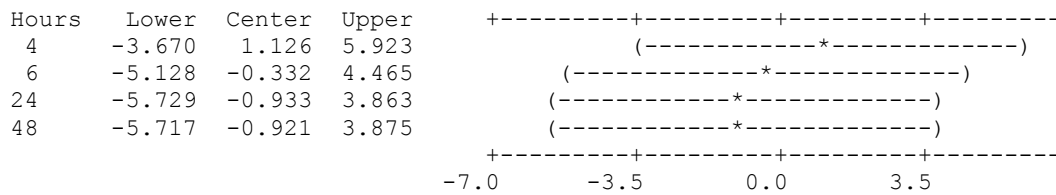
Hours	N	Mean	Grouping
4	3	100.132	A
0	3	100.000	A
2	3	99.005	A
6	3	98.674	A
48	3	98.085	A
24	3	98.073	A

Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Hours

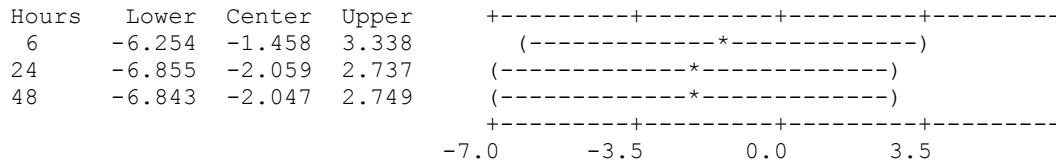
Individual confidence level = 99.43%
Hours = 0 subtracted from:



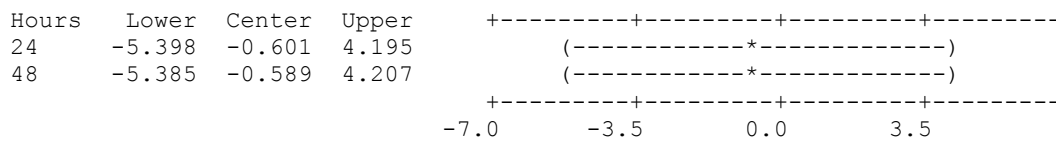
Hours = 2 subtracted from:



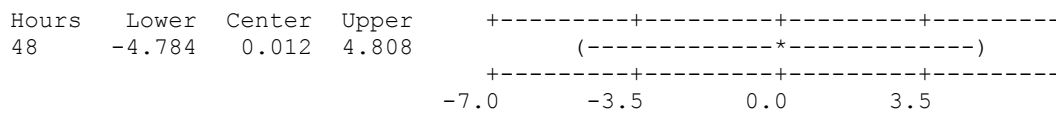
Hours = 4 subtracted from:



Hours = 6 subtracted from:



Hours = 24 subtracted from:



Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μεγαλύτερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι είναι ίδιοι μεταξύ τους, γεγονός φαίνεται και από τον έλεγχο Tukey όπου τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Στις 48 ώρες

Two-Sample T-Test and CI: 48_0.1%, H_48_0.1%

Two-sample T for 48_0.1%

H_48_0.1%	N	Mean	StDev	SE Mean
1	3	70.33	2.61	1.5
2	3	98.08	2.54	1.5

Difference = μ (1) - μ (2)

Estimate for difference: -27.75

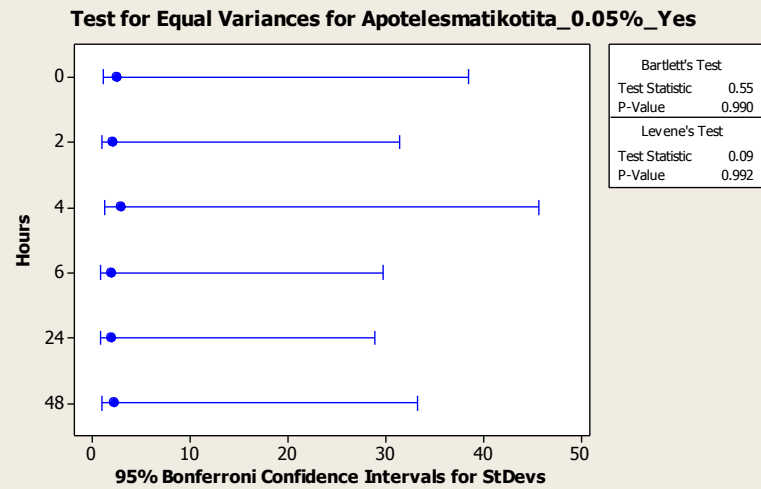
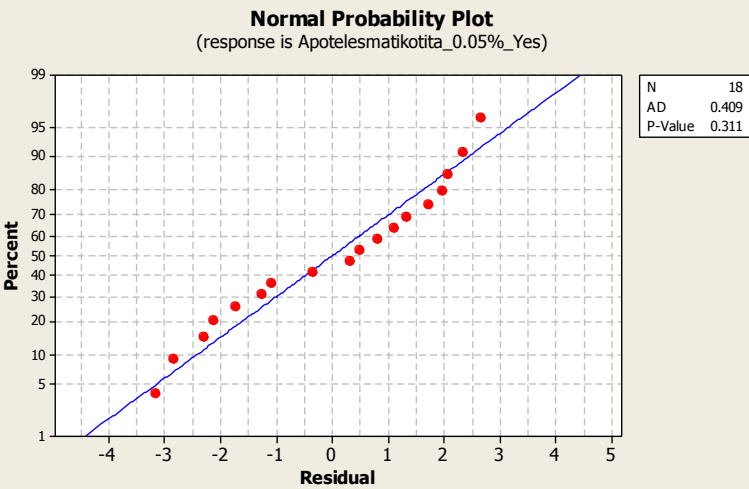
95% CI for difference: (-34.44, -21.06)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -13.20 P-Value = 0.001 DF = 3

Στις 48 ώρες, οι μέσοι όροι έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, εφόσον η τιμή p είναι μικρότερη από 0.05.

Απελευθέρωση (υπερκείμενα) 0.05% Αλβ Αμυλάση

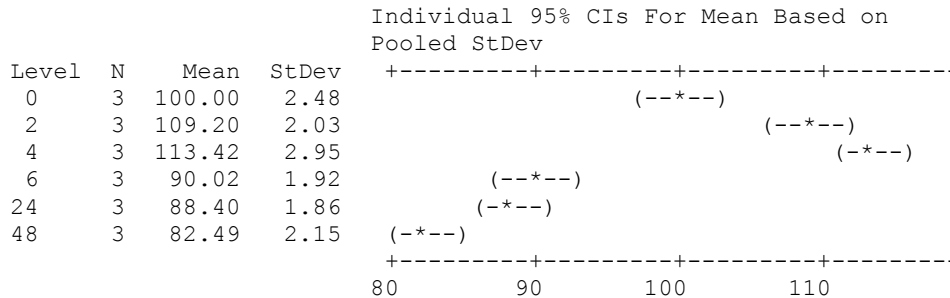
Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_0.05%_Yes versus Hours

Source	DF	SS	MS	F	P
Hours	5	2281.05	456.21	88.93	0.000
Error	12	61.56	5.13		
Total	17	2342.61			

S = 2.265 R-Sq = 97.37% R-Sq(adj) = 96.28%



Pooled StDev = 2.26

Grouping Information Using Tukey Method

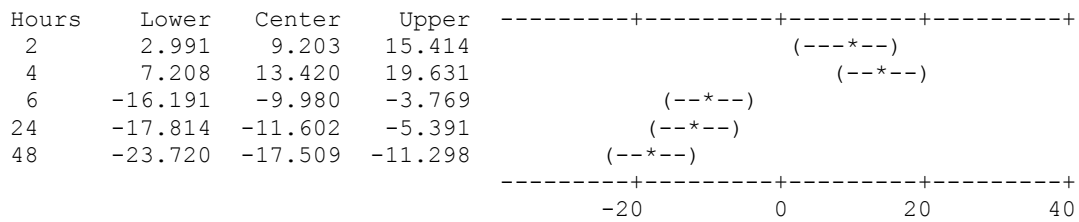
Hours	N	Mean	Grouping
4	3	113.420	A
2	3	109.203	A
0	3	100.000	B
6	3	90.020	C
24	3	88.398	C D
48	3	82.491	D

Means that do not share a letter are significantly different.

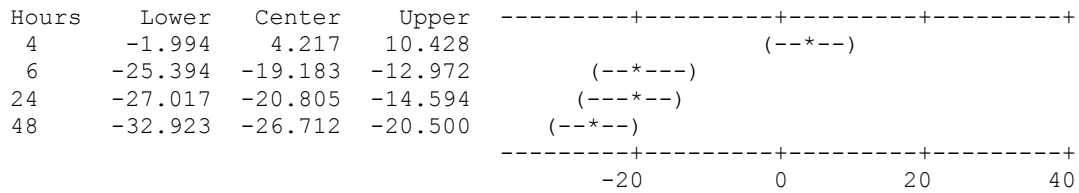
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Hours

Individual confidence level = 99.43%

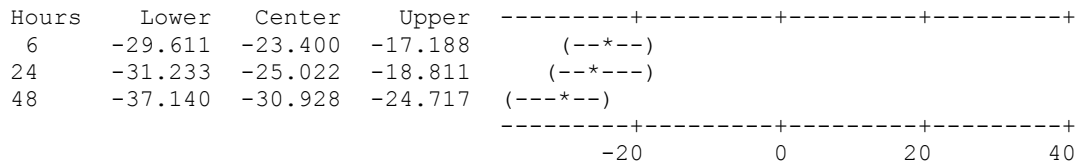
Hours = 0 subtracted from:



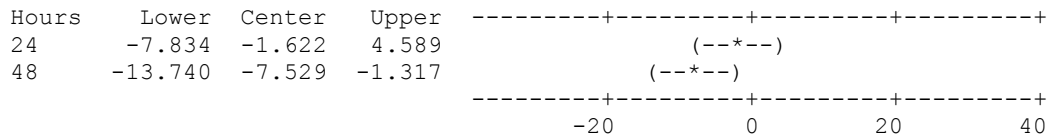
Hours = 2 subtracted from:



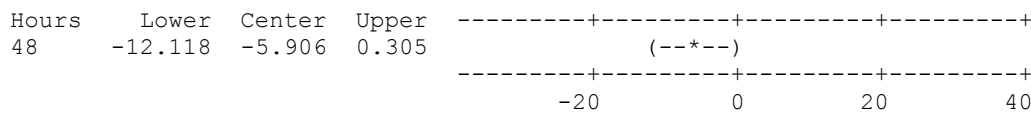
Hours = 4 subtracted from:



Hours = 6 subtracted from:



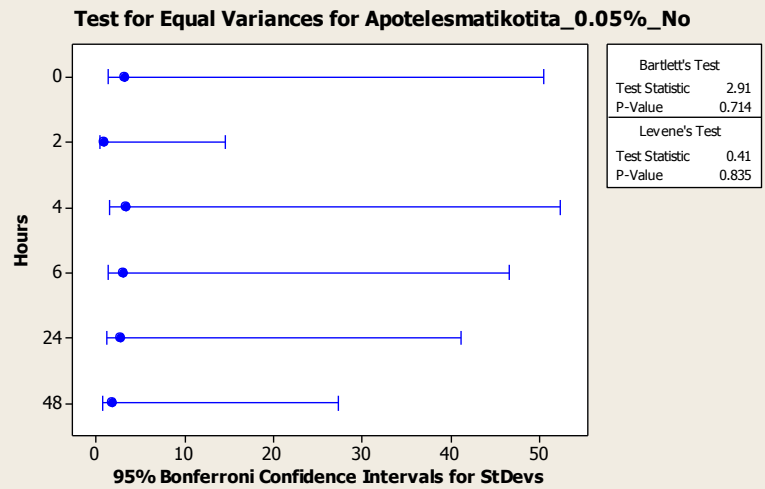
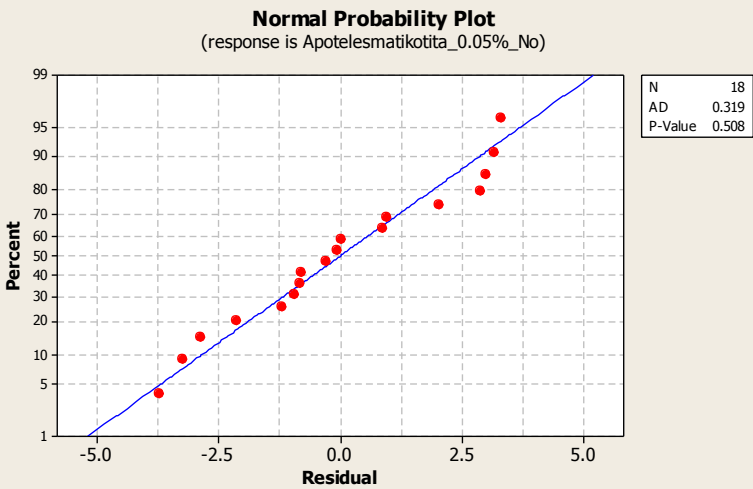
Hours = 24 subtracted from:



Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι ίδιοι μεταξύ τους είναι στις ώρες 2, 4, 6, 24, 48, αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Απελευθέρωση (υπερκείμενα) 0.05% Αλβ Χωρίς Αμυλάση

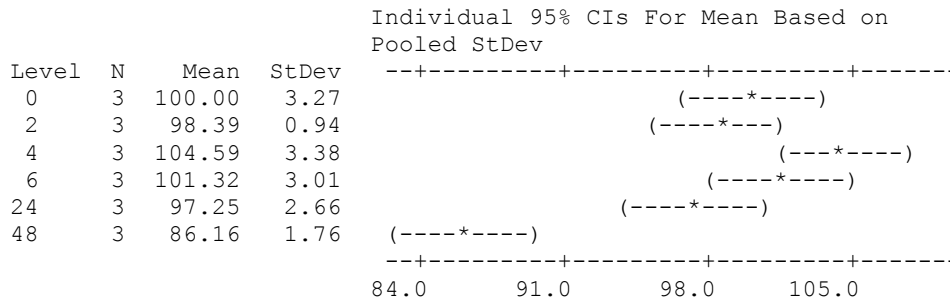
Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_0.05%_No versus Hours

Source	DF	SS	MS	F	P
Hours	5	597.92	119.58	17.00	0.000
Error	12	84.43	7.04		
Total	17	682.35			

S = 2.653 R-Sq = 87.63% R-Sq(adj) = 82.47%



Pooled StDev = 2.65

Grouping Information Using Tukey Method

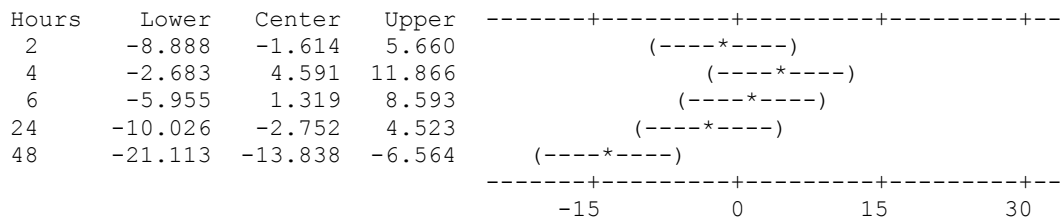
Hours	N	Mean	Grouping
4	3	104.591	A
6	3	101.319	A B
0	3	100.000	A B
2	3	98.386	A B
24	3	97.248	B
48	3	86.162	C

Means that do not share a letter are significantly different.

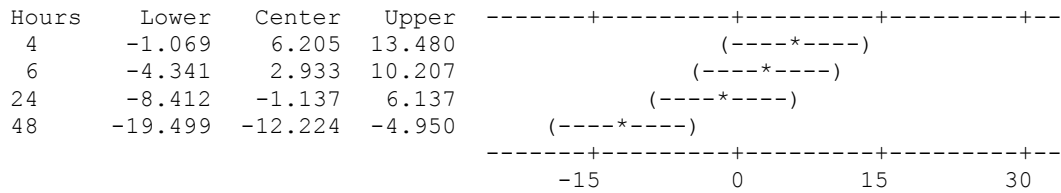
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Hours

Individual confidence level = 99.43%

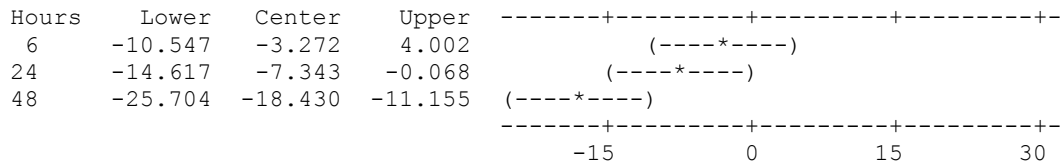
Hours = 0 subtracted from:



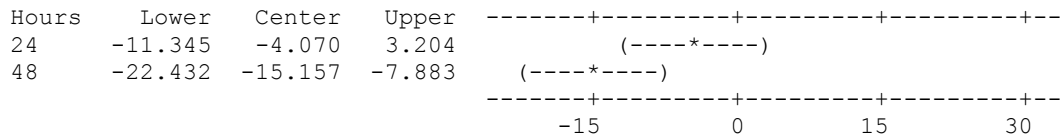
Hours = 2 subtracted from:



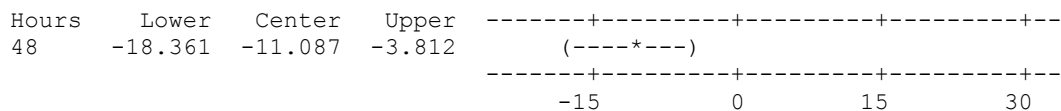
Hours = 4 subtracted from:



Hours = 6 subtracted from:



Hours = 24 subtracted from:



Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι ίδιοι μεταξύ τους είναι στις ώρες 0, 2, 4, 6, 24, αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Στις 6 ώρες

Two-Sample T-Test and CI: 6_0.05%, H_6_0.05%

Two-sample T for 6_0.05%

H_6_0.05%	N	Mean	StDev	SE Mean
1	3	90.02	1.92	1.1
2	3	101.32	3.01	1.7

Difference = mu (1) - mu (2)
Estimate for difference: -11.30

95% CI for difference: (-17.86, -4.74)
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -5.48 P-Value = 0.012 DF = 3

Στις 6 ώρες, οι μέσοι όροι έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, εφόσον η τιμή p είναι μικρότερη από 0.05.

Στις 24 ώρες

Two-Sample T-Test and CI: 24_0.05%, H_6_0.05%

Two-sample T for 24_0.05%

H_6_0.05%	N	Mean	StDev	SE Mean
1	3	88.40	1.86	1.1
2	3	97.25	2.66	1.5

Difference = mu (1) - mu (2)
Estimate for difference: -8.85
95% CI for difference: (-14.81, -2.89)
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -4.72 P-Value = 0.018 DF = 3

Στις 24 ώρες, οι μέσοι όροι έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, εφόσον η τιμή p είναι μικρότερη από 0.05.

Στις 48 ώρες

Two-Sample T-Test and CI: 48_0.05%, H_6_0.05%

Two-sample T for 48_0.05%

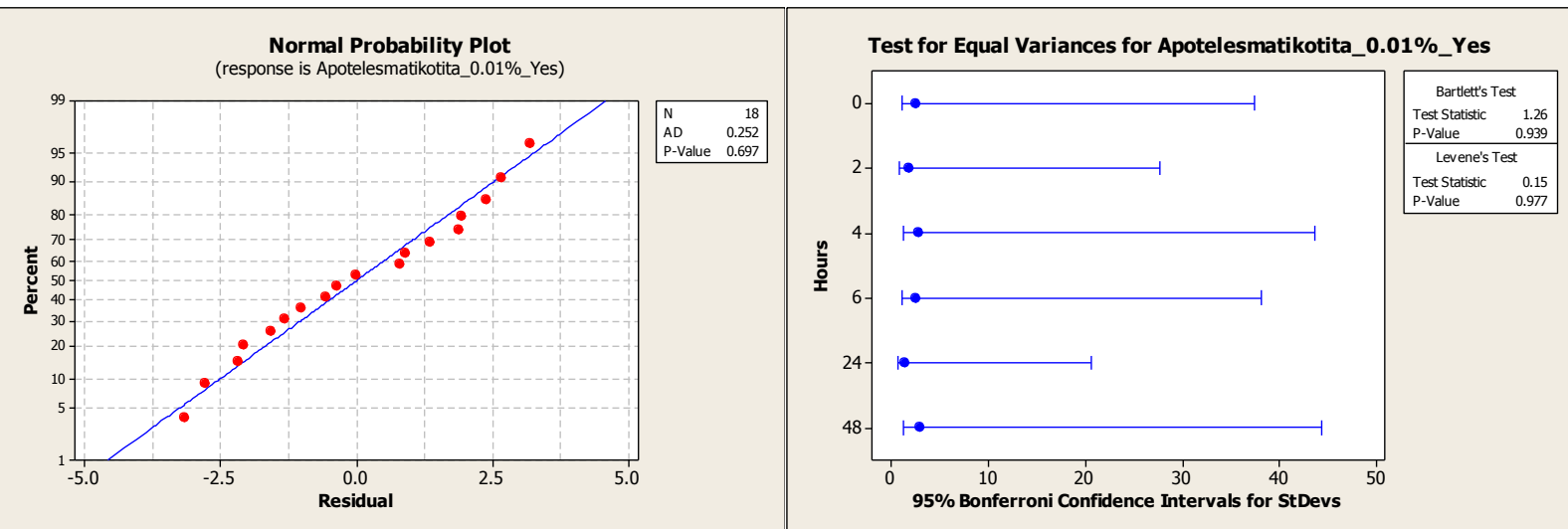
H_6_0.05%	N	Mean	StDev	SE Mean
1	3	82.49	2.15	1.2
2	3	86.16	1.76	1.0

Difference = mu (1) - mu (2)
Estimate for difference: -3.67
95% CI for difference: (-8.78, 1.44)
T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -2.29 P-Value = 0.106 DF = 3

Στις 48 ώρες, οι μέσοι όροι δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.

Απελευθέρωση (υπερκείμενα) 0.01% Αλβ Αμυλάση

Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_0.01%_Yes versus Hours

Source	DF	SS	MS	F	P
Hours	5	23222.54	4644.51	843.74	0.000
Error	12	66.06	5.50		
Total	17	23288.59			

S = 2.346 R-Sq = 99.72% R-Sq(adj) = 99.60%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
0	3	100.00	2.42	(*)
2	3	98.76	1.78	(-*)
4	3	77.99	2.82	(*)
6	3	27.93	2.46	(*)
24	3	12.29	1.33	(*)
48	3	27.61	2.86	(*)

Pooled StDev = 2.35

Grouping Information Using Tukey Method

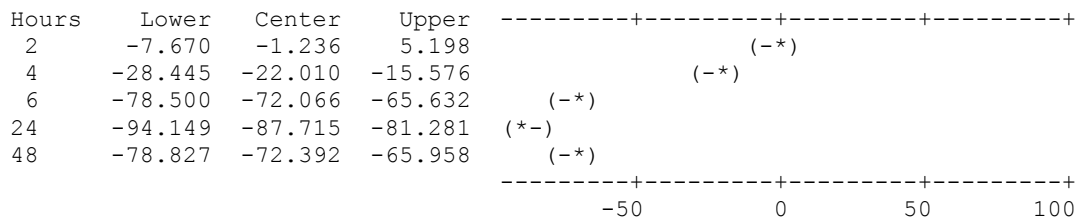
Hours	N	Mean	Grouping
0	3	100.000	A
2	3	98.764	A
4	3	77.990	B
6	3	27.934	C
48	3	27.608	C
24	3	12.285	D

Means that do not share a letter are significantly different.

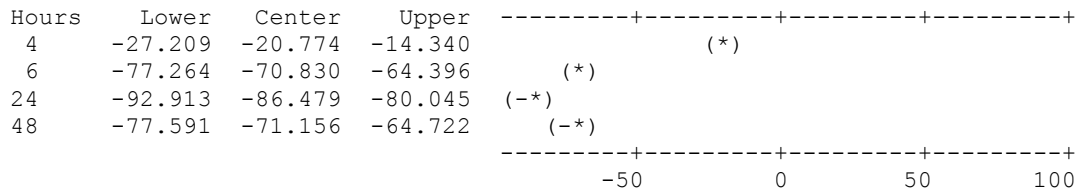
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Hours

Individual confidence level = 99.43%

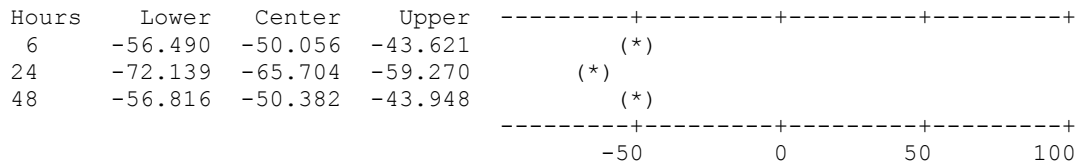
Hours = 0 subtracted from:



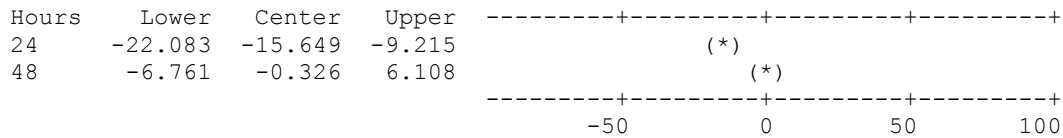
Hours = 2 subtracted from:



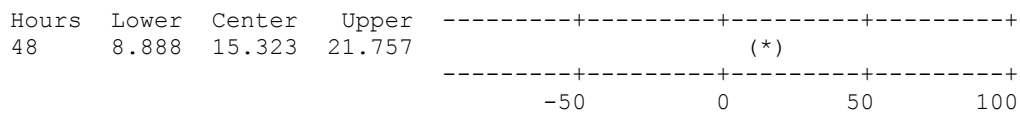
Hours = 4 subtracted from:



Hours = 6 subtracted from:



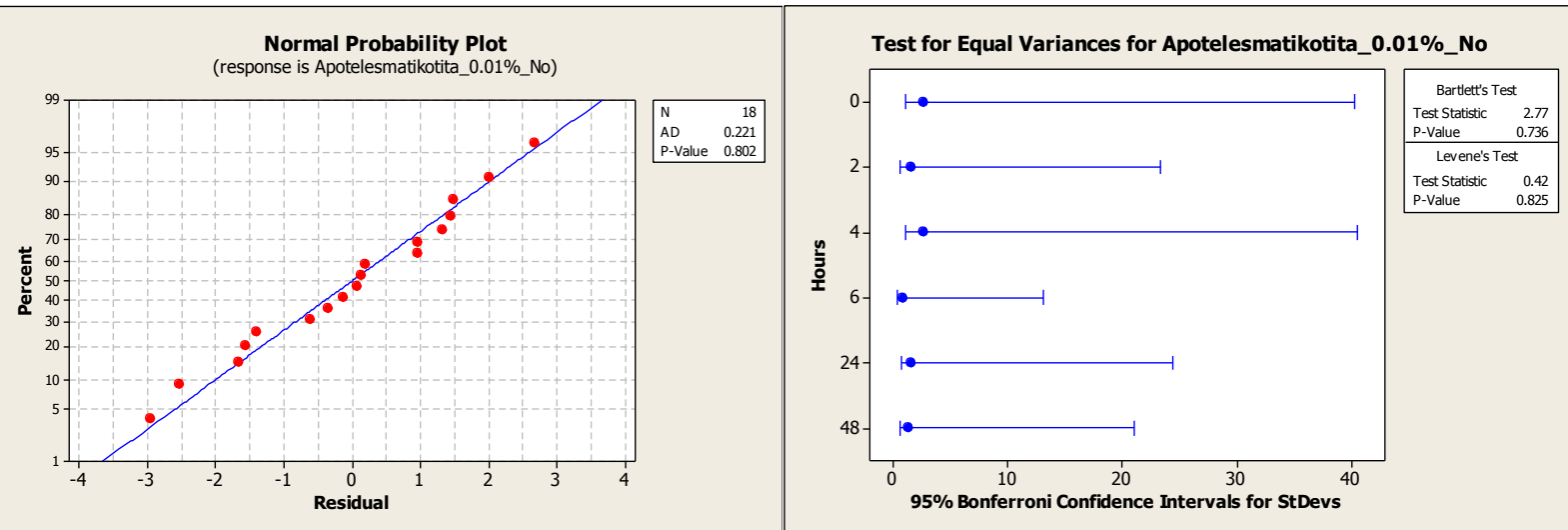
Hours = 24 subtracted from:



Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι ίδιοι μεταξύ τους είναι στις ώρες 0, 2, 6, 48, αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης επικαλύπτονται.

Απελευθέρωση (υπερκείμενα) 0.01% Αλβ Χωρίς Αμυλάση

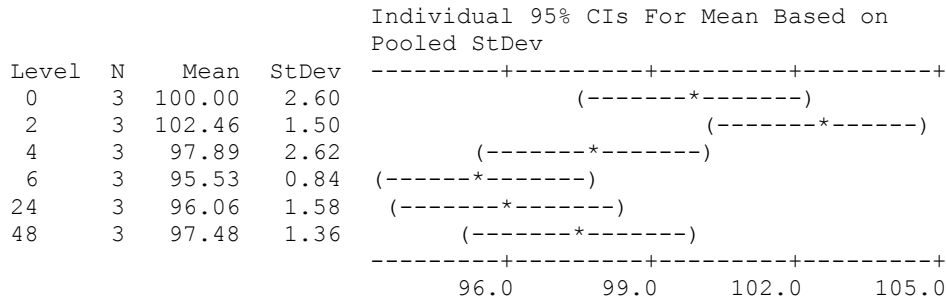
Υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια των στοιχείων, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, εφόσον η τιμή p είναι μεγαλύτερη από 0.05.



One-way ANOVA: Apotelesmatikotita_0.01%_No versus Hours

Source	DF	SS	MS	F	P
Hours	5	101.01	20.20	5.79	0.006
Error	12	41.89	3.49		
Total	17	142.90			

S = 1.868 R-Sq = 70.68% R-Sq(adj) = 58.47%



Pooled StDev = 1.87

Grouping Information Using Tukey Method

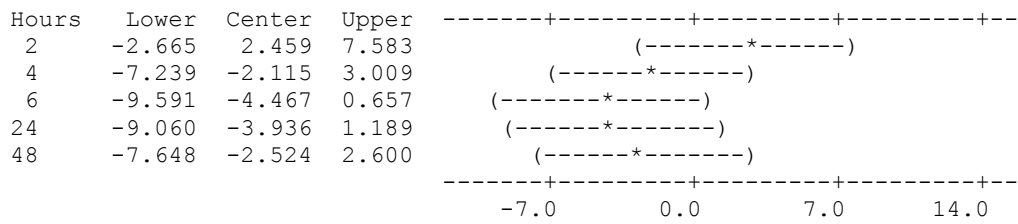
Hours	N	Mean	Grouping
2	3	102.459	A
0	3	100.000	A B
4	3	97.885	A B
48	3	97.476	A B
24	3	96.064	B
6	3	95.533	B

Means that do not share a letter are significantly different.

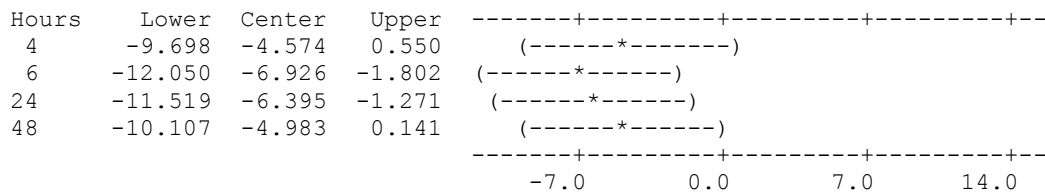
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Hours

Individual confidence level = 99.43%

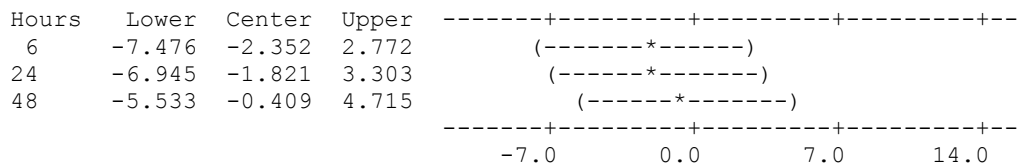
Hours = 0 subtracted from:



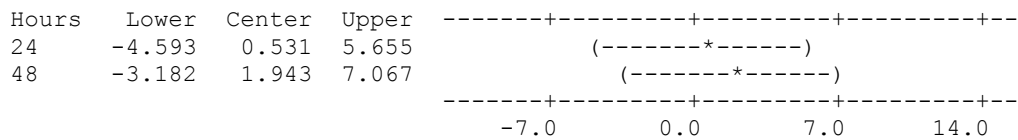
Hours = 2 subtracted from:



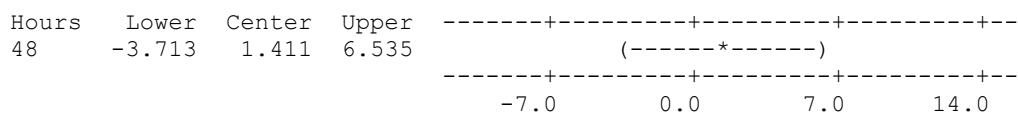
Hours = 4 subtracted from:



Hours = 6 subtracted from:



Hours = 24 subtracted from:



Εφόσον η τιμή p του ελέγχου είναι μικρότερη από 0.05, τότε οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι που είναι διαφορετικοί μεταξύ τους είναι στις ώρες 2, 6, 24, αφού όπως φαίνεται από τον έλεγχο Tukey τα όρια εμπιστοσύνης δεν επικαλύπτονται.