

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Αλληλεπιδράσεις μεταξύ Πολυσακχαριτών που Έχουν Εκχυλιστεί  
από Φυτά και Γαστρικής Βλέννας Χοίρων.**

**Interactions between Plant Extract Polysaccharides and Porcine  
Gastric Mucin**

**ΚΟΥΤΟΓΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ  
ΜΕΚΙΚΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ**

**ΑΤΕΙΘ 2012**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους καθηγητές μας κ. Ριζούλη Χρήστο και τον κ. Καραγεωργίου Βασίλη για την πολύτιμη βοήθεια τους στην ολοκλήρωση της πτυχιακής μας εργασίας.

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μυξίνης από το γαστρικό σύστημα των χοίρων (PGM) και του HBSS (hot buffer soluble solids) από σαλέπι. Το HBSS είναι ένας πολυσακχαρίτης που εκχυλίζεται από σαλέπι. Σε μίγματα υδατικών διαλυμάτων HBSS-PGM σε αναλογία 1:1 δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ηλεκτροστατικών συμπλόκων σε pH 3 και 7 εξαιτίας απωστικών δυνάμεων. Τα ίδια μίγματα χρησιμοποιήθηκαν και για την σταθεροποίηση γαλακτωμάτων δεκαεξανίου σε νερό με κλάσμα μάζας  $\phi = 0.3$ . Σε pH 3 τα γαλακτώματα που περιείχαν PGM παρουσίασαν κροκίδωση αμέσως μετά την παρασκευή τους ενώ το γαλάκτωμα που περιείχε μόνο HBSS ήταν σταθερό. Αντίθετα σε pH 7 δεν δημιουργήθηκε σταθερό γαλάκτωμα. Τέλος υδατικά διαλύματα HBSS μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα τους για σχηματισμό πηκτής με την εφαρμογή κύκλων ψύξης-απόψυξης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση και το είδος του άλατος της σειράς Hofmeister, το pH και τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη. Μια γενική τάση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι γενικά δεν επιτεύχθηκε η πήξη των διαλυμάτων, εκτός από μία περίπτωση (4% κ.β. HBSS, pH = 7 παρουσία 1 M  $K_2SO_4$ ) όπου μακροσκοπικά τα δείγματα φαίνονταν πηγμένα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από ρεολογικές μετρήσεις.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	6
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση .....	8
2.1. Αλληλεπιδράσεις πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα .....	8
2.2. Γαλακτώματα .....	12
2.3. Γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές.....	13
2.4. Σύμπλοκα πρωτεϊνών- πολυσακχαριτών .....	16
2.5. Μυξίνη.....	16
2.6. HBSS από σαλέπι.....	18
2.7. Μηχανική ιστών.....	18
2.8. Οι υδροπηκτές και οι εφαρμογές τους.....	20
2.9. Μελέτη ενυδάτωσης.....	24
2.10. Γλυκομαννάνη.....	25
2.11. Πηκτές πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών.....	26
2.12. Επίδραση ειδικών ιόντων σε πηκτώματα πρωτεΐνης σπόρου.....	31
4.1. Υλικά και μέθοδοι .....	34
4.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια.....	34
4.1.2 Όργανα .....	34
4.2. Μέθοδοι.....	35
4.2.1. Εκχύλιση HBSS από σαλέπι.....	35
4.2.2. Αλληλεπιδράσεις HBSS – PGM σε υδατικά διαλύματα.....	35
4.2.3. Προετοιμασία γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό.....	36
4.2.4. Πηκτές.....	36
5. Αποτελέσματα .....	38
5.1 Αλληλεπιδράσεις διαλυμάτων HBSS-PGM .....	38
5.2. Γαλακτώματα λαδιού σε νερό.....	41
5.3 Πηκτές .....	48
6. Συμπεράσματα .....	53
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	54

8. Βιβλιογραφία ..... 55

## 1.Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες είναι φυσικά βιοπολυμερή που χρησιμοποιούνται ως λειτουργικά συστατικά. Μίγματα πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών βρίσκουν πολλές τεχνολογικές εφαρμογές στα τρόφιμα, στα φάρμακα και στα καλλυντικά (Patino & Pilosof, 2011). Οι ιδιότητες ενός τροφίμου επηρεάζονται άμεσα από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών.

Από την ανάμειξη ενός πολυσακχαρίτη και μιας πρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα μπορούν να παρατηρηθούν τα εξής φαινόμενα: η παρουσία ελκτικών δυνάμεων οδηγεί στον σχηματισμό διαλυτών ή αδιάλυτων συμπλόκων ενώ απωστικών δυνάμεων στο διαχωρισμό δύο διακριτών φάσεων, το τελευταίο φαινόμενο είναι γνωστό ως θερμοδυναμική ασυμβατότητα (Patino & Pilosof, 2011). Πρόσφατα έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με την ανάμειξη πολυσακχαριτών με πρωτεΐνες λόγω της εξαιρετικής γαλακτωματοποιητικής ικανότητας των συμπλόκων τους (Boyer et al., 2011).

Μίγματα βιοπολυμερών παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό γαλακτωμάτων στη βιομηχανία τροφίμων. Οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές ενώ οι πολυσακχαρίτες ως σταθεροποιητές λόγω της ικανότητας τους να αυξάνουν το ιξώδες της συνεχούς φάσης. Κάποιοι πολυσακχαρίτες είναι γνωστό ότι προσροφόνται σε διεπιφάνειες. Επιπλέον η ικανότητα τους να συγκρατούν μεγάλη ποσότητα νερού τους καθιστά ικανούς να δημιουργούν υδροπηκτές (Laplante et al., 2005).

Ο σχηματισμός μιας πηκτής μπορεί να γίνει με θέρμανση ή ψύξη του υδατικού διαλύματος του πολυσακχαρίτη. Η υδροπηκτική είναι ένα διασυνδεδεμένο τρισδιάστατο δίκτυο και η δομή της εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτη όπως και οι φυσικοχημικές της ιδιότητες. Οι πηκτές βρίσκουν πολλές εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων, στην μεταφορά φαρμάκων και στην βιοϊατρική (Lozinsky et al., 2008).

Το HBSS (hot buffer soluble solids) είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από το σαλέπι. Κύρια συστατικά των πολυσακχαριτών από σαλέπι είναι οι γλυκομαννάνες, το άμυλο και πρωτεΐνες σε διάφορες συγκεντρώσεις (Georgiadis et al., 2012). Η μυξίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στη βλέννα που καλύπτει τα επιθηλιακά όργανα (Shi et al., 1999). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των αλληλεπιδράσεων του HBSS με την PGM (pig gastric mucin) σε υδατικά διαλύματα

και γαλακτώματα σε συνάρτηση με το pH καθώς και η ικανότητα του πολυσακχαρίτη να σχηματίζει πηκτή κάτω από συνθήκες ψύξης-απόψυξης.

## 2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1. Αλληλεπιδράσεις πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα

Οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες είναι κύρια συστατικά των τροφίμων τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως και σε άλλες βιομηχανίες γιατί παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες και μπορούν να αντικαταστήσουν τα συνθετικά πολυμερή. Γι' αυτό το λόγο έχει γίνει εκτεταμένη μελέτη της συμπεριφοράς των υδατικών τους διαλυμάτων.

Από την ανάμειξη ενός διαλύματος πρωτεΐνης με ένα διάλυμα πολυσακχαρίτη μπορούν να προκύψουν τα εξής φαινόμενα, είτε δημιουργία συμπλόκων είτε η ασυμβατότητα μεταξύ των μακρομορίων. Οι ελκτικές ή απωστικές δυνάμεις μεταξύ των διαφορετικών μακρομορίων είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την ύπαρξη του ενός ή του άλλου φαινομένου (Tolstoguzov, 2003).

Αρχικά σε πολύ αραιά διαλύματα το μίγμα παραμένει σταθερό λόγω της εντροπίας ανάμιξης και έτσι τα μόρια πρωτεΐνης και του πολυσακχαρίτη είναι συνδιαλυτά. Με την αύξηση της συγκέντρωσης των βιοπολυμερών υπάρχει πιθανότητα σύνδεσης του πολυσακχαρίτη με την πρωτεΐνη ή διαχωρισμός τους. Ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των πολυμερών οδηγούν στην δημιουργία συμπλόκων, διαλυτών ή αδιάλυτων (Rodriguez Patino & Pilosof, 2011). Αλυσίδες που φέρουν αντίθετο φορτίο εξουδετερώνουν η μια την άλλη με αποτέλεσμα την μείωση του συνολικού φορτίου και της υδροφιλικότητας (Tolstoguzov, 2003). Κατά τη δημιουργία των αδιάλυτων συμπλόκων γίνεται διαχωρισμός των φάσεων. Τα αρχικά μακρομοριακά σύμπλοκα που σχηματίζονται είναι διαλυτά και στη συνέχεια αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα το σχηματισμό ουδέτερων κροκιδωμάτων που περιέχουν και τα δυο πολυμερή. Τα κροκιδώματα κατακάθονται και έτσι το μίγμα διαχωρίζεται σε δύο φάσεις, μια πλούσια σε διαλύτη και μια πλούσια σε βιοπολυμερή. Η σύνδεση ενός πολυσακχαρίτη με μια πρωτεΐνη γίνεται μέσω ιοντικών δεσμών, δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Rodriguez Patino & Pilosof, 2011).

Ο σχηματισμός αυτών των συμπλόκων εξαρτάται από το pH καθώς σε τιμές πάνω από το ισοηλεκτρικό τους σημείο οι πρωτεΐνες φορτίζονται αρνητικά καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο αν θα σχηματιστούν ή όχι τα σύμπλοκα. Επιπλέον σε χαμηλό pH τα αδιάλυτα σύμπλοκα εμπλουτίζονται σε ανιονικό πολυσακχαρίτη ενώ περίσσεια του ενός πολυμερούς παραμένει εν διαλύσει μετά την κατακρήμνιση τους. Το pH επιδρά επίσης



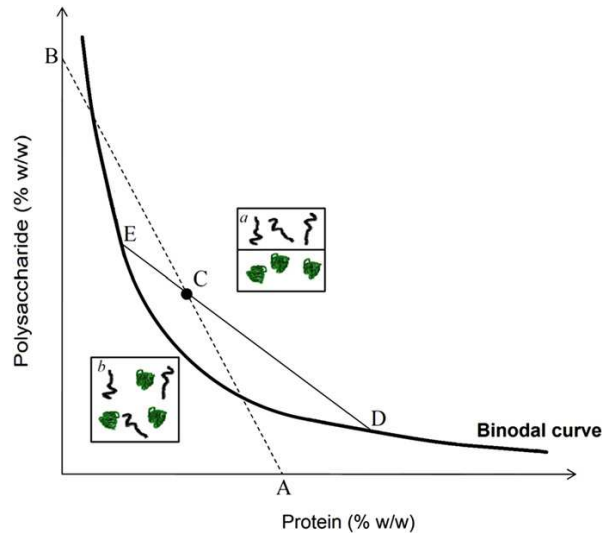
και στην στοιχειομετρία ενός ηλεκτροστατικού συμπλόκου γιατί εξαρτάται από αυτό η διαμόρφωση του συνολικού φορτίου των μακρομορίων. Η ακαμψία ενός πολυσακχαρίτη και το σφαιρικό σχήμα μιας πρωτεΐνης εμποδίζουν τις αντίθετα φορτισμένες ομάδες τους να έρθουν σε επαφή. Αντίθετα πρωτεΐνες που δεν έχουν αναδιπλωμένη δομή έρχονται ευκολότερα σε επαφή με τους πολυσακχαρίτες διαφορετικού φορτίου (Tolstoguzov, 2003) .

Η ιονική ισχύς μπορεί να καθορίσει το σχηματισμό συμπλόκων γιατί η παρουσία ιόντων επηρεάζει με τη σειρά της το φορτίο ενός πολυμερούς. Η μεταβολή της ιονικής ισχύος επιδρά στο σύστημα αλλάζοντας το pH στο οποίο αρχίζει ο σχηματισμός των διαλυτών συμπλόκων. Έχει μελετηθεί η επίδραση της ιονικής ισχύος και στο pH στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός φάσεων κατά τη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνών ορού γάλακτος και κόμμεως γκουάρ με χρήση χλωριούχου νατρίου. Τα ιόντα στο διάλυμα κάλυψαν το φορτίο των πολυμερών με αποτέλεσμα την μείωση των αλληλεπιδράσεων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σύμπλεξη. Με αυτόν τον τρόπο η αλληλεπίδραση έγινε σε μικρότερο pH όπου η πρωτεΐνη είναι φορτισμένη θετικά (Weinbreck et al., 2003). Οι Weinbreck et al. (2004) έδειξαν ότι το pH και η ιονική ισχύς παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ηλεκτροστατικών συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνών ορού γάλακτος και καραγεννάνης. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της θολερότητας σε pH 5.5-5.2, άρα και δημιουργία συμπλόκων, ενώ σε τιμές μικρότερες από 5.5-5.2 υπήρξε κατακάθιση. Επιπλέον μικρή προσθήκη χλωριούχου νατρίου ευνόησε το σχηματισμό συμπλόκων ενώ αντίθετα υψηλή ιονική ισχύς ήταν απαγορευτική για το σχηματισμό τους.

Η χιτοζάνη δημιουργεί αδιάλυτα σύμπλοκα με την β-λακτογλοβουλίνη σε pH 6 όπου η πρωτεΐνη είναι αρνητικά φορτισμένη γιατί βρίσκεται πάνω από το ισοηλεκτρικό της σημείο ενώ η χιτοζάνη είναι θετικά φορτισμένη. Η δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων μεταξύ β-λακτογλοβουλίνης και χιτοζάνης επιβεβαιώνεται από την αύξηση της θολερότητας καθώς τα σύμπλοκα σκεδάζουν το φως ενώ τα διαλυτά μίγματα των βιοπολυμερών είναι διαυγή. Απουσία χιτοζάνης η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της β-λακτογλοβουλίνης ήταν αρνητική σε pH 6 αλλά έγινε λιγότερο αρνητική και έπειτα θετική με την αύξηση της συγκέντρωσης χιτοζάνης. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι σχηματίστηκε ηλεκτροστατικό σύμπλοκο (Guzey & McClements, 2006).

Η παρουσία απωστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τμημάτων των μακρομορίων σε ένα διάλυμα οδηγεί στον αμοιβαίο αποκλεισμό του κάθε διαλυμένου πολυμερούς από μια κοντινή περιοχή του άλλου πολυμερούς. Σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις βιοπολυμερών οι ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των διαφορετικών μορίων προκαλούν αυθόρμητο διαχωρισμό του μίγματος σε δύο διακριτές φάσεις. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται θερμοδυναμική ασυμβατότητα. Το αν ένα μίγμα βιοπολυμερών θα διαχωριστεί καθορίζεται από το αν η ελεύθερη ενέργεια της ανάμιξης είναι θετική ή αρνητική. Όταν η ενέργεια είναι θετική το μίγμα έχει την τάση να διαχωρίζεται σε δύο φάσεις (Frith, 2010). Η ασυμβατότητα παρουσιάζεται κυρίως σε τιμές pH μεγαλύτερες από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης και σε υψηλές τιμές ιονικής ισχύος. Ο διαχωρισμός των φάσεων σε ένα τέτοιο μίγμα εμφανίζεται μετά από μια κρίσιμη συγκέντρωση, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες συνυπάρχουν σε μια φάση (Rodriguez Patino & Pilosof, 2011). Αντίθετα με τη δημιουργία συμπλόκων, ο διαχωρισμός φάσεων που οφείλεται στην ασυμβατότητα μεταξύ των βιοπολυμερών έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία δύο φάσεων, όπου κάθε φάση είναι πλουσιότερη σε ένα βιοπολυμερές (Tolstoguzov, 2003).

Η ποσοτικοποίηση της ασυμβατότητας γίνεται μέσω του διαγράμματος φάσεων. Η διφασική καμπύλη είναι αυτή που χωρίζει το διάγραμμα την περιοχή όπου τα μακρομόρια είναι συνδιαλυτά από την περιοχή του διαχωρισμού των φάσεων ενώ τα άκρα της καμπύλης ορίζουν τις περιοχές όπου υπάρχει περιορισμένη συνδιαλυτότητα. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη είναι η περιοχή που η πρωτεΐνη και ο πολυσακχαρίτης βρίσκονται σε μια φάση ενώ πάνω από την καμπύλη βρίσκεται η περιοχή των δύο φάσεων (σχήμα 1) (Rodriguez Patino & Pilosof, 2011, Tolstoguzov, 2003). Έτσι ένα μίγμα είναι ένα σημείο και η περιοχή στην οποία βρίσκεται φανερώνει την συμπεριφορά του συστήματος. Όταν στην περιοχή πάνω από την καμπύλη δημιουργείται μια σταγονοειδής μορφολογία τότε το σύστημα χαρακτηρίζεται ως γαλάκτωμα νερού σε νερό (w/w). Τέτοια διφασικά συστήματα παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ρεολογικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των υποκαταστατών λίπους που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα (Perrechil & Cunha, 2012).



**Σχήμα 1.** Τυπικό διάγραμμα φάσεων ενός μίγματος πολυσακχαρίτη-πρωτεΐνης, τα σημεία A και B είναι οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και πολυσακχαρίτη αντίστοιχα, ενώ το σημείο C το αρχικό μίγμα. Μετά το διαχωρισμό των φάσεων το σημείο D αντιπροσωπεύει την φάση που είναι πλούσια σε πρωτεΐνη και το σημείο E τη φάση που είναι πλούσια σε πολυσακχαρίτη (Patino & Pilosof,2011).

Βασιζόμενοι στον διαχωρισμό των φάσεων του μίγματος καζεϊνικού νατρίου και κόμμεως χαρουπιού σε pH 5.5 οι Perrechil & Cunha (2012) δημιούργησαν γαλακτώματα λαδιού σε νερό σε νερό (o/w/w). Για την δημιουργία αυτών αναμίχθηκαν 3% w/v καζεϊνικό νάτριο με 0.3% w/v κόμμι χαρουπιού. Μετά από φυγοκέντριση το μίγμα διαχωρίστηκε σε δύο φάσεις μια πλούσια σε πολυσακχαρίτη και μια σε πρωτεΐνη. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν διαφορετικές αναλογίες των δύο φάσεων ώστε να δημιουργηθούν γαλακτώματα w/w. Τη διεσπαρμένη φάση αποτελούσε σε κάθε περίπτωση η φάση με το μικρότερο κλάσμα όγκου. Όλα τα γαλακτώματα ήταν ιδιαίτερα ασταθή και διαχωρίστηκαν λίγα λεπτά μετά την παρασκευή τους. Την μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσίασε το γαλάκτωμα με μεγαλύτερη αναλογία πολυσακχαρίτη. Τα γαλακτώματα o/w/w δημιουργήθηκαν από τη διασπορά ενός γαλακτώματος o/w σταθεροποιημένο με καζεϊνικό νάτριο σε διαφορετικά γαλάκτωμα w/w. Το μόνο γαλάκτωμα που είχε δομή o/w/w και θα μπορούσε να βρεί εφαρμογή ως

μέσο ενθυλάκωσης σε τρόφιμα ήταν αυτό που περιείχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτη.

## 2.2. Γαλακτώματα

Τα γαλακτώματα αποτελούν τη διασπορά ενός υγρού ,μη αναμείξιμου, μέσα σε ένα άλλο, που αποτελεί τη συνεχή φάση, με τη μορφή σταγονιδίων. Στην απλή τους μορφή τα γαλακτώματα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα γαλακτώματα λαδιού σε νερό (o/w) και τα γαλακτώματα νερού σε λάδι (w/o). Τα γαλακτώματα βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων καθώς τα περισσότερα τρόφιμα είναι γαλακτώματα, αλλά και στις βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών. Το γάλα, η μαγιονέζα, το παγωτό και το βούτυρο αποτελούν μερικά παραδείγματα τροφίμων που είναι γαλακτώματα.

Επιπλέον πολλαπλά γαλακτώματα χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό ενεργών συστατικών. Η διαδικασία αυτή γίνεται είτε για την προστασία του συστατικού από παράγοντες όπως το οξυγόνο και η θερμότητα, είτε για την απελευθέρωση του συστατικού μέσα στον οργανισμό στο σωστό σημείο την κατάλληλη στιγμή. Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα και έχουν την τάση να καταστρέφονται με το πέρασμα του χρόνου (McClements, 2000). Αλλαγές στην σταθερότητα οδηγούν σε αλλαγές στην κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων και στις ιδιότητες του συστήματος (Shi et al., 1999). Είναι συστήματα που δεν δημιουργούνται αυθόρμητα καθώς η ελεύθερη ενέργεια για το σχηματισμό τους είναι μεγαλύτερη από το μηδέν ( $\Delta G > 0$ ) και γι' αυτό διαχωρίζονται τελικά σε δύο φάσεις (Burguera & Burguera, 2012).

Η καταστροφή των γαλακτωμάτων μπορεί να γίνει με διάφορους μηχανισμούς όπως ο βαρυτικός διαχωρισμός, η συγχώνευση, η κροκίδωση, η μοριακή αντιδιάχυση και η αντιστροφή των φάσεων (McClements, 2000, Dickinson, 2003). Κατά το βαρυτικό διαχωρισμό αν τα σταγονίδια ή σωματίδια που βρίσκονται σε διασπορά είναι ελαφρύτερα του υγρού που αποτελεί τη συνεχή φάση τότε αυτά ανέρχονται στη κορυφή και η διαδικασία ονομάζεται κρέμωση (Robins, 2000). Αντίθετα κατά τον ίδιο μηχανισμό όταν η διεσπαρμένη φάση είναι βαρύτερη τότε καθιζάνει και η διαδικασία λέγεται

καθίζηση (Watson et al., 2005). Η κροκίδωση των σταγονιδίων λαδιού σε ένα γαλακτώμα λαδιού σε νερό εξαρτάται από τη φύση και τη δύναμη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σταγονιδίων. Επιφανειοδραστικά μόρια μπορούν να προσροφηθούν ταυτόχρονα σε περισσότερα από ένα σταγονίδια προκαλώντας την κροκίδωση μέσα από ένα μηχανισμό γεφύρωσης. Αυτός ο τύπος κροκίδωσης εμφανίζεται όταν η επιφανειακή κάλυψη από το προσροφημένο μόριο είναι μικρή. Όταν υπάρχει συγκέντρωση πολυμερούς ικανή να καλύψει πλήρως την επιφάνεια των σταγονιδίων βελτιώνεται η σταθερότητα του γαλακτώματος. Παρόλα αυτά υπάρχει πιθανότητα αποσταθεροποίησης όταν ποσότητα πολυμερούς δεν έχει προσροφηθεί. Η συγχώνευση είναι η διαδικασία κατά την οποία δύο σταγόνες συνενώνονται σε μια, βασικό ρόλο και εδώ παίζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σταγόνων. Σε αυτήν την περίπτωση δημιουργούνται σταγόνες μεγαλύτερες σε όγκο. Τέλος η μοριακή αντιδιάχυση είναι μια διαδικασία όπου οι μεγαλύτερες σταγόνες μεγαλώνουν εις βάρος των μικρότερων (Dickinson, 2009). Αυτά τα φαινόμενα αλλάζουν δραματικά τη μορφή και τα χαρακτηριστικά απελευθέρωσης των γαλακτωμάτων και γι'αυτό η σταθερότητα τους είναι μέγιστης σημασίας για τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων (Shi et al., 1999).

### **2.3. Γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές**

Σημαντικό ρόλο στην παρασκευή και σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων παίζουν οι γαλακτωματοποιητές και οι σταθεροποιητές. Αυτοί μπορεί να είναι είτε φυσικοί είτε συνθετικοί. Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια χρήσης των βιοπολυμερών (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες) και σε άλλες βιομηχανίες πέρα από αυτήν των τροφίμων με στόχο την αντικατάσταση των συνθετικών πολυμερών που μπορούν πιθανά να προκαλέσουν ερεθισμούς στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και την ικανοποίηση των καταναλωτών που ζητούν φυσικά και βιοδιασπώμενα προϊόντα (Bouyer et al., 2011).

Ένας γαλακτωματοποιητής για να είναι αποτελεσματικός θα πρέπει να μειώνει γρήγορα την επιφανειακή τάση στις νέες διεπιφάνειες λαδιού-νερού, αφού προσροφηθεί να προσδένεται δυνατά στη διεπιφάνεια και να προστατεύσει τις νέες σταγόνες από την

κροκίδωση και την συγχώνευση. Η προστασία από την άμεση επανασυγχώνευση γίνεται μέσω φαινομένων που οφείλονται στη δυναμική επιφανειακή τάση (μηχανισμοί Gibbs–Marangoni) και έπειτα στις κολλοειδείς απωστικές (μηχανισμοί ηλεκτροστατικής και στερεοχημικής σταθεροποίησης) (Dickinson, 2009).

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια με πολικά και μη πολικά μέρη που τις καθιστούν επιφανειοδραστικές, δηλαδή έχουν την τάση να προσροφούνται στη διεπιφάνεια λαδιού-νερού και να δημιουργούν σταθεροποιητικά στρώματα γύρω από σταγονίδια λαδιού (Dickinson, 2003). Η προσρόφηση τους στην διεπιφάνεια των νέων σταγονιδίων που δημιουργούνται τα προστατεύει από τη συγχώνευση με τα γειτονικά σταγονίδια και τη δημιουργία μεγαλύτερων σταγόνων. Σε σύγκριση με τους πολυσακχαρίτες οι πρωτεΐνες είναι αποτελεσματικότερες γιατί απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση από αυτές για την σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων (Dickinson, 2009).

Ένας από τους βασικούς ρόλους των υδροκολλοειδών είναι η συμμετοχή τους στην δημιουργία των γαλακτωμάτων αλλά και η αύξηση της διάρκειας ζωής τους. Οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται σε γαλακτώματα λαδιού σε νερό γιατί αυξάνουν το ιξώδες της υδατικής φάσης και έτσι δημιουργούν την επιθυμητή υφή που καθυστερεί την αποκορύφωση. Σε υψηλές συγκεντρώσεις δημιουργούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα μέσα στο οποίο παγιδεύονται τα σταγονίδια λαδιού και έτσι αναστέλλεται η κίνηση τους (McClements, 2000, Boyer et al., 2011). Δηλαδή τα περισσότερα υδροκολλοειδή μπορούν να σταθεροποιήσουν γαλακτώματα λαδιού σε νερό, όμως είναι λίγα εκείνα που έχουν γαλακτωματοποιητική ικανότητα (Dickinson, 2009). Για να μπορεί ένα μόριο να προσροφηθεί στη διεπιφάνεια θα πρέπει να είναι αμφίφιλο. Έτσι ένας πολυσακχαρίτης πρέπει να περιέχει αρκετές υδρόφοβες ομάδες που να έχουν εύκολη πρόσβαση στη διεπιφάνεια ώστε να μπορεί το μόριο να προσκολληθεί και να εξαπλωθεί σε αυτήν γρήγορα. Η μικρή γαλακτωματοποιητική ικανότητα κάποιων βιοπολυμερών αποδίδεται στη χαμηλή διαλυτότητα και στο ότι δεν παρουσιάζουν αμφίφιλο χαρακτήρα (Dickinson, 2003).

Ωστόσο υπάρχουν μερικοί πολυσακχαρίτες που μπορούν να προσροφηθούν στην διεπιφάνεια λαδιού-νερού. Μερικοί από αυτούς είναι το υδρόφοβα τροποποιημένο άμυλο και παράγωγα κυτταρίνης. Εκτός από τους τροποποιημένους πολυσακχαρίτες στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται κόμμεα που έχουν από τη φύση τους

γαλακτωματοποιητική ικανότητα. Το αραβικό κόμμι είναι υδροκολλοειδές που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στα τρόφιμα γιατί εκτός από την ικανότητα του να αυξάνει το ιξώδες της συνεχούς φάσης σε γαλακτώματα ο/w μπορεί να προσροφηθεί στη διεπιφάνεια. Σε pH 3 το αραβικό κόμμι σε συγκέντρωση 10% δημιουργεί σταθερά γαλακτώματα με σταγονίδια διαμέτρου 0.82  $\mu\text{m}$  (Nakauma et al., 2008) ενώ σε pH 4.2 γαλακτώματα που περιείχαν 5%(w/w) αραβικό κόμμι παρέμειναν σταθερά για 7 μέρες (Bouyer et al., 2011). Η γαλακτωματοποιητική ικανότητα του αποδίδεται στην παρουσία πρωτεΐνης στο μόριο η οποία συνδέεται μέσω ομοιοπολικού δεσμού με τον υδρογονάνθρακα (Dickinson, 2009).

Άλλοι πολυσακχαρίτες που έχουν την ιδιότητα να γαλακτωματοποιούν είναι οι γαλακτομαννάνες. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν το κόμμι γκουάρ (guar gum), το κόμμι χαρουπιού (locust bean gum) και το κόμμι από τριγωνέλλα (fenugreek gum). Είναι υδρόφιλα βιοπολυμερή που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητικοί παράγοντες (Dickinson, 2003). Αυτοί οι πολυσακχαρίτες είναι αποτελεσματικοί και ως γαλακτωματοποιητές. Έχει αποδειχθεί ότι κόμμι γκουάρ και το κόμμι χαρουπιού μειώνουν την διεπιφανειακή τάση ως περίπου 20 mN/m. Οι δύο πολυσακχαρίτες περιέχουν πρωτεϊνικό κλάσμα στα μόρια τους και καθαρίστηκαν ώστε να μειωθεί το ποσοστό της πρωτεΐνης στο ελάχιστο. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη που περιέχουν τα κόμμεα δεν συνεισφέρει σημαντικά στη μείωση της διεπιφανειακής τάσης. Ωστόσο τα γαλακτώματα του κόμμεως γκουάρ είχαν μεγάλα σταγονίδια και αποσταθεροποιήθηκαν τέσσερις μέρες μετά την παρασκευή τους (Garti & Reichman, 1994). Το κόμμι από τριγωνέλλα δεν χρησιμοποιείται όσο το κόμμι χαρουπιού και το κόμμι γκουάρ γιατί είναι περισσότερο υδρόφιλο και λιγότερο αποτελεσματικό σαν σταθεροποιητής. Οι Garti et al. (1997) έδειξαν ότι το κόμμι τριγωνέλλας από το οποίο έχει απομακρυνθεί η πρωτεΐνη μειώνει την διεπιφανειακή τάση περισσότερο από το κόμμι γκουάρ και ότι δημιουργεί σταθερά γαλακτώματα με σταγονίδια μέσης διαμέτρου 3  $\mu\text{m}$ . Έπειτα από μια διαδικασία καθαρισμού του κόμμεως τα δείγματα περιείχαν 10 g/kg πρωτεΐνη. Σε αυτή τη μορφή το κόμμι τριγωνέλλας βρέθηκε να μειώνει την διεπιφανειακή τάση έως και 19 mN/m και έτσι χαρακτηρίζεται ως καλύτερος γαλακτωματοποιητής από το κόμμι γκουάρ.

#### **2.4. Σύμπλοκα πρωτεϊνών- πολυσακχαριτών**

Τα τελευταία χρόνια γίνονται μελέτες με στόχο την αξιοποίηση των ιδιοτήτων των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών μέσω της δημιουργίας συμπλόκων. Τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να δημιουργηθούν είτε μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είτε μέσω της ένωσης των βιοπολυμερών ομοιοπολικά (Dickinson, 2009). Στην προηγούμενη ενότητα αναφερθήκαμε στην δημιουργία ηλεκτροστατικών συμπλόκων. Αυτά τα σύμπλοκα δημιουργούν σταθερά γαλακτώματα. Έχει αποδειχθεί ότι τα ηλεκτροστατικά σύμπλοκα που δημιουργήθηκαν μεταξύ της β-λακτογλοβουλίνης και του αραβικού κόμμεως σταθεροποίησαν γαλακτώματα λαδιού σε νερό. Κατά τη γαλακτωματοποίηση η πρωτεΐνη προσροφάται στην διεπιφάνεια και ο πολυσακχαρίτης που συνδέεται ηλεκτροστατικά μαζί της δημιουργεί ένα δεύτερο προστατευτικό στρώμα γύρω από την σταγόνα (Bouyer et al, 2011).

Η ομοιοπολική σύνδεση ενός πολυσακχαρίτη με μια πρωτεΐνη επιτυγχάνεται μέσω της αντίδρασης Maillard. Στις αντιδράσεις αυτές οι αμινομάδες της πρωτεΐνης αντιδρούν με τις καρβοξυλομάδες του πολυσακχαρίτη σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς. Σε αυτή τη διαδικασία τα βιοπολυμερή έρχονται σε επαφή κατά τη διάλυση τους σε νερό. Έπειτα το διάλυμα λυοφυλοποιείται και το ξηρό υπόλειμμα θερμαίνεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων. Τα σύμπλοκα αυτά έχουν τις ιδιότητες της υδρόφοβης πρωτεΐνης και του υδρόφιλου πολυσακχαρίτη και επιπλέον είναι σταθερότερα στις μεταβολές στις τιμές του pH, της θερμοκρασίας και της ιονικής ισχύος (Fechner et al., 2007). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη δημιουργία γαλακτωματοποιητών (Al-Hakkak & Al-Hakkak, 2010 & Wooster & Augustin, 2006). Λόγω της πρωτεΐνης το σύμπλοκο είναι περισσότερο επιφανειοδραστικό από έναν πολυσακχαρίτη. Παράλληλα η ύπαρξη του πολυσακχαρίτη προσφέρει προστασία από την αποσταθεροποίηση καθώς σταθεροποιεί το γαλακτώμα μέσω της στερικής άπωσης μεταξύ των σταγονιδίων (Fechner et al., 2007).

#### **2.5. Μυξίνη**

Οι μυξίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούν το κύριο συστατικό της βλέννας που καλύπτει τις κοίλες επιφάνειες των επιθηλιακών οργάνων και διαχωρίζει το



εξωκυτταρικό περιβάλλον από τη μεμβράνη του πλάσματος (Shi et al.1999). Βρίσκονται στο αναπνευστικό σύστημα, στο αναπαραγωγικό και στο γαστρεντερικό σωλήνα. Βρίσκονται στο ανθρώπινο σάλιο, που αποτελείται κυρίως από νερό (99.5%), μαζί με άλλες πρωτεΐνες (0.3%) (Sarkar et al., 2009). Το μοριακό τους βάρος ποικίλει από 0.5 έως 20 MDa. Έχουν την μορφή νήματος και αποτελούνται από έναν πεπτιδικό σκελετό που ενώνεται με υδατάνθρακες. Το μόριο της μυξίνης είναι ιδιαίτερα γλυκοζυλιωμένο καθώς το 80% του μορίου αποτελούν οι υδατάνθρακες και το υπόλοιπο 20% είναι πρωτεΐνη (Vingerhoeds et al., 2005, Bansil & Turner, 2006). Ο υψηλός βαθμός γλυκοζυλίωσης κρατά την αλυσίδα της μυξίνης σε εξαπλωμένη μορφή ακόμη και κάτω από συνθήκες που θα μπορούσαν να προκαλέσουν την μετουσίωση της. Επιπλέον οι υδατανθρακικές αλυσίδες την προστατεύουν από την ενζυμική αποικοδόμιση. Ο ρόλος της στο σάλιο είναι σημαντικός αφού είναι υπεύθυνη για την ιξωδοελαστικότητα του. Η μυξίνη έχει τη τάση να κροκιδώνει και να δημιουργεί πηκτές (Vingerhoeds et al., 2005). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μυξίνη από το γαστρικό σύστημα χοίρων (PGM). Έχει βρεθεί ότι η PGM είναι αρνητικά φορτισμένη σε pH 7 ενώ σε pH 3 είναι ελαφρώς αρνητικά φορτισμένη και φορτίζεται θετικά σε pH 1, άρα το ισοηλεκτρικό της σημείο βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 3 και 1 (Ritzoulis et al., 2012). Σε pH 2 παρατηρείται αύξηση του ιξώδους των υδατικών της διαλυμάτων η οποία είναι αντιστρεπτή. Επιπλέον σε χαμηλές τιμές pH αυξάνεται η υδροφοβικότητα του πρωτεϊνικού τμήματος της PGM (Bansil & Turner, 2006). Η μυξίνη ως πρωτεΐνη είναι επιφανειοδραστική, σε συγκέντρωση 0.05% και σε ουδέτερο pH δημιουργεί σταθερά γαλακτώματα με πολύ μικρά σταγονίδια περίπου 500 nm. Η προσθήκη υψηλότερης συγκέντρωσης μυξίνης οδήγησε στη δημιουργία ακόμη μικρότερων σταγονιδίων, των οποίων η κατανομή μεγέθους δεν άλλαξε ακόμη και 33 μέρες μετά την παρασκευή των γαλακτωμάτων (Shi et al., 1999). Όταν ένα γαλάκτωμα καταναλώνεται παραμένει για μερικά δευτερόλεπτα στο στόμα. Σε αυτό το μικρό χρονικό διάστημα το γαλάκτωμα υπόκειται σε φυσικές και βιοχημικές αλλαγές όπως η ανάμιξη του με το σάλιο (Sarkar et al., 2009). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη μυξίνης προκαλεί κροκίδωση στα γαλακτώματα (Vingerhoeds et al., 2005, Sarkar et al., 2009, Vingerhoeds et al., 2009). Η προσθήκη PGM σε γαλακτώματα λαδιού σε νερό σταθεροποιημένα με καζεϊνικό νάτριο, σταθερά

σε pH 1 και 7, οδήγησε σε κροκίδωση η οποία ήταν αντιστρεπτή, αποδεικνύοντας ότι η μυξίνη αλληλεπιδρά με προσροφημένες πρωτεΐνες (Ritzoulis et al., 2012).

## **2.6. HBSS από σαλέπι**

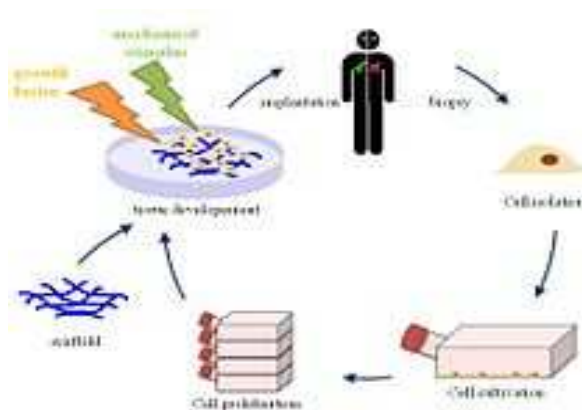
Το HBSS (hot buffer soluble solids) είναι ένας πολυσακχαρίτης που εκχυλίζεται από σαλέπι. Οι πολυσακχαρίτες του σαλεπιού αποτελούνται κυρίως από γλυκομαννάνες. Το HBSS βρέθηκε ότι αποτελείται από τρεις πληθυσμούς μακρομορίων ένα με μοριακό βάρος 600-700 kDa, ένα πληθυσμό με μοριακό βάρος 50 kDa και τέλος έναν με μοριακό βάρος 12 kDa. Επιπλέον οι μετρήσεις του ζ δυναμικού έδειξαν ότι ο πολυσακχαρίτης είναι ανιονικός και ο προσδιορισμός του ολικού αζώτου ότι το εκχύλισμα περιέχει πρωτεΐνη σε ποσοστό 8.2%. Οι πολυσακχαρίτες από σαλέπι είναι γνωστό ότι είναι καλοί σταθεροποιητικοί παράγοντες καθώς αυξάνουν το ιξώδες της συνεχούς φάσης των γαλακτωμάτων ο/ω. Συγκεκριμένα διαλύματα 1% HBSS διατηρούν υψηλές τιμές ιξώδους ακόμη και σε υψηλό ρυθμό παραμόρφωσης. Έτσι είναι εύκολο να συμπαιράνει κανείς ότι το HBSS σχηματίζει ένα ισχυρό τρισδυστάτο δίκτυο λόγω των ισχυρών διαμοριακών δυνάμεων. Για να μελετηθεί η σταθεροποιητική ικανότητα του HBSS, διάλυμα του πολυσακχαρίτη σε διάφορες συγκεντρώσεις προστέθηκε σε γαλακτώματα σταθεροποιημένα με Tween 20. Η προσθήκη διαλύματος 0.1% οδήγησε στην αποκορύφωση του γαλακτώματος μια ώρα μετά την παρασκευή του. Παρόλα αυτά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (έως 2%), λόγω της αύξησης του ιξώδους της συνεχούς φάσης, παρατηρείται καθυστέρηση της αποσταθεροποίησης (Georgiadis et al., 2012).

## **2.7. Μηχανική Ιστών**

Η Μηχανική Ιστών είναι ο συνδυασμός επιστήμης και μηχανικής για την αποκατάσταση του ανθρώπινου μυοσκελετικού ιστού. Είναι μία μέθοδος η οποία συνδυάζει μία ποικιλία βιολογικών και μηχανικών αρχών για τη δημιουργία λειτουργικών ιστών και οργάνων για μεταφύτευση οι οποίες αποκαθιστούν, υποστηρίζουν ή βελτιώνουν τη λειτουργία των ιστών. Η αρχή της Μηχανικής Ιστών βασίζεται στο ότι οι ιστοί μπορούν να απομονωθούν από έναν ασθενή, να επεκταθούν με μία καλλιέργεια

και να εμφυτευτούν μέσα σε ένα ικρίωμα (scaffold) φτιαγμένο από ένα δομικό υλικό ώστε να σχηματιστεί ο νέος ιστός σύμφωνα με το σχήμα του τρισδιάστατου ικριώματος. Έπειτα η κατασκευή μπορεί να μεταφτευθεί στον ίδιο ασθενή ως υποκατάστατο ιστού. Τα αγγεία αίματος αναπτύσσονται μέσα στο νέο ιστό, το ικρίωμα διαλύεται και ο νέος ολοκληρωμένος ιστός συνδέεται με αυτούς που τον περιβάλλουν. Η τεχνολογία που αναπτύσσεται στη Μηχανική Ιστών υποστηρίζει τη δημιουργία ποικίλων ειδών ιστών συμπεριλαμβανομένων δέρματος, χόνδρου, οστού, ήπατος, νεύρων και αγγείων. Η επιτυχία της αναδημιουργίας ιστών αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα του ικριώματος για δομική μορφοποίηση και στην βιοδραστικότητά του με τα εμφυτευμένα κύτταρα. Οι βέλτιστες δομικές και θρεπτικές συνθήκες για την ανάπτυξη ενός ιστού διασφαλίζονται όταν χρησιμοποιείται ένας ήδη υπάρχων βιολογικός δομημένος 3D ιστός ως πρότυπο σύμφωνα με τον οποίο μπορεί να σχεδιαστεί η δομή του ικριώματος. Για αυτό το σκοπό έχουν γίνει πολλές προόδους στη Μηχανική Ιστών, στην επιστήμη των βιοϋλικών, στη βιομηχανική, βελτιστοποιήσεις στην ενσωμάτωση και λειτουργία των ιστών και επίσης στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και την κατασκευή των προηγμένων ικριωμάτων ιστών.

Ο όρος έχει εφαρμοστεί στις προσπάθειες για την εκτέλεση ειδικών βιοχημικών λειτουργιών που χρησιμοποιούν τα κύτταρα μέσα σε ένα τεχνητό σύστημα υποστήριξης που δημιουργήθηκε (π.χ. ένα τεχνητό πάγκρεας, ή ένα βιοτεχνητό ήπαρ).



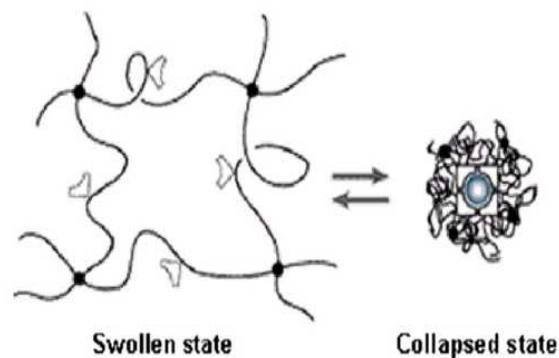
**Σχήμα 2.** Αρχή της μηχανικής ιστών

## 2.8. Οι υδροπηκτές και οι εφαρμογές τους

Υδροπηκτές είναι τρισδιάστατα υδρόφιλα πολυμερή δίκτυα που μπορούν να απορροφήσουν και να διατηρήσουν ένα σημαντικό ποσό του νερού με τη διατήρηση του σχήματός τους. Ενέσιμες βιοδιασπώμενες υδροπηκτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως η χορήγηση φαρμάκων / κυττάρων και της μηχανικής ιστών, λόγω των εξαιρετικά υδρόφιλων χαρακτηριστικών τους.

Ενέσιμες βιοδιασπώμενες υδροπηκτές συμπολυμερών που εμφανίζουν μια sol-gel (από διαλυτές σε πηκτές και αντίστροφα) μεταβατική φάση αντίδρασης σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως οι αλλαγές της θερμοκρασίας, του pH ή και τα δύο, έχουν βρει μια σειρά χρήσεων στον τομέα της βιοϊατρικής και εφαρμογές φαρμακευτικής, όπως η χορήγηση φαρμάκων, την ανάπτυξη των κυττάρων, και της μηχανικής ιστών. Αυτές οι υδροπηκτές μπορεί να χρησιμοποιούνται σε απλά φαρμακευτικά σκευάσματα που μπορούν να παρασκευαστούν με ανάμειξη της υδροπηκτικής με φάρμακα, πρωτεΐνες, ή κύτταρα (Nguyen & Lee, 2010).

Κατά τον Vinatier et al. οι υδροπηκτές είναι ιδιαίτερα πολύτιμα για ικρίωματα τριών διαστάσεων της καλλιέργειας των κυττάρων λόγω της βιομιμητικής φύσης τους. Οι υδροπηκτές παράγονται από φυσικά πολυμερή (πρωτεΐνες ή πολυσακχαρίτες) ή από συνθετικά πολυμερή (πολυγαλακτικό οξύ, οξειδίο του πολυαιθυλενίου, πολυβινυλαλκοόλες). Υδροπηκτές αντικαθιστούν πολλές λειτουργίες της εξωκυττάριας μήτρας, την οργάνωση των κυττάρων σε τρεις διαστάσεις, προσφέροντας μηχανική ακεραιότητα στο νέο ιστό, και επιτρέποντας τη διάχυση των θρεπτικών συστατικών και των μεταβολιτών από και προς τα κύτταρα (Vinatier et al., 2006).



**Σχήμα 3.** Σχηματική αναπαράσταση υδροπηκτής.

Ένα υψηλό πορώδες και ένα επαρκές μέγεθος πόρων είναι απαραίτητα για να διευκολύνουν τη σπορά και τη διάχυση κυττάρων σε όλη τη δομή και των κυττάρων και των θρεπτικών ουσιών.

Σε πολλές περιπτώσεις, η δημιουργία των λειτουργικών ιστών και των βιολογικών δομών απαιτεί την *in vitro* εκτενή καλλιέργεια για να προωθήσει την επιβίωση, την αύξηση και την παρότρυνση της λειτουργίας των κυττάρων. Γενικά, οι βασικές προϋποθέσεις των κυττάρων πρέπει να διατηρηθούν στην καλλιέργεια, οι οποίες περιλαμβάνουν το οξυγόνο, το pH, την υγρασία, τη θερμοκρασία, τις θρεπτικές ουσίες και τη συντήρηση ωσμωτικής πίεσης.

Μεταξύ των διαφόρων τύπων των βιοϋλικών, οι υδροπηκτές βασίζονται στα υδρόφοβα, βιοσυμβατά πολυμερή και πεπτίδια που ξεχωρίζουν ως ένα εξαιρετικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων λόγω της μοναδικής ιδιότητας τους που τους επιτρέπει *in situ* σχηματισμό πηκτής. Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό των υδροπηκτών δημιουργεί επίσης έναν ιστό όπως τρισδιάστατο (3D) περιβάλλον (Ye et al., 2011).

Η χιτοζάνη, ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από τη μερική διακετυλίωση της χιτίνης από τα καρκινοειδή κοχύλια, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βιοϋλικό λόγω βιοδιασπασιμότητας, βιοσυμβατότητας, μη τοξικότητας, και bioadhesive βιοκολλητικών ιδιοτήτων. Μια ενέσιμη υδροπηκτική δημιουργήθηκε από το συνδυασμό της χιτοζάνης και β-φωσφορικής γλυκερόλης (C / GP). Βιοδιασπώμενα πολυμερή υδροπηκτών που ανταποκρίνονται στις αλλαγές pH / θερμοκρασίας χρησιμοποιούνται ευρέως για

βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως τα φάρμακα, η μεταφορά πρωτεϊνών και η μηχανική ιστών. Τα υδατικά διαλύματα του πολυμερούς μπορούν να μεταφερθούν με τα φάρμακα, τις πρωτεΐνες ή τα κύτταρα σε συγκεκριμένη θερμοκρασία πριν από την ένεση σε συγκεκριμένα μέρη στο σώμα.

Μερικά νέα ελπιδοφόρα συστήματα ραδιοφαρμακευτικών είναι βασισμένα στη δυνατότητά τους να γίνουν τοπικά ζελατινοποιημένα μετά από μια καθυστέρηση του χρόνου προκειμένου να διατηρούνται στον ιστό. Η χιτοζάνη, η φιβροΐνη και το άλας αλγινικού οξέος είναι καλά παραδείγματα αυτών των συστημάτων (Hamoudeh, 2008).

Στα περισσότερα πηκτώματα, είναι ο διαλύτης που αποτελεί την πλειοψηφία (από το βάρος) του πηκτώματος. Τα αυτό-συναρμολογούμενα πηκτώματα αποτελούνται χαρακτηριστικά από 0,1–10% w/w gelator ουσία που θα σχηματίσει την πηκτή, ενώ στα πολυμερή πηκτώματα το ποσοστό βάρους του ομοιοπολικού πολυμερούς σώματος τείνει να είναι υψηλότερο. Εάν ο διαλύτης είναι οργανικός, το πήκτωμα είναι γνωστό ως οργανοπηκτή (organogel), ενώ εάν ο διαλύτης είναι ύδωρ, κατόπιν το πήκτωμα είναι υδροπηκτή. Εξ αιτίας της δυνατότητάς τους να προσαρμοστούν σε οποιαδήποτε μορφή απαιτείται από αυτούς και της έμφυτης μηχανικής ακαμψίας τους, τα πηκτώματα είναι διαφορετικά στα εκχύσιμα διαλύματα (Truong, 2011).

Τα πηκτώματα είναι πολυμερή σώματα που βασίζονται στα μονομερή, οι μονάδες των πολυμερών σωμάτων συνδέονται μέσω των ομοιοπολικών δεσμών και αυτό οδηγεί σε πηκτώματα με ισχυρές μηχανικές ιδιότητες. Επιπλέον οι ιδιότητες των πηκτών από πολυμερή μπορούν να διαφέρουν σημαντικά από παρτίδα σε παρτίδα που επεξεργάζεται εξ αιτίας της έλλειψης ελέγχου του μήκους και της μορφής των πολυμερών σωμάτων.

Κατά τον Liu et al. (2009) υδροπηκτές από πολυβινυλική αλκοόλη (PVA) έχουν θεωρηθεί δυνητικά κατάλληλες για εφαρμογές όπως μηχανοποιημένα δοχεία αίματος λόγω της δομής και των μηχανικών ιδιοτήτων τους. Εντούτοις, η υδροφιλικότητα του PVA δεν του επιτρέπει να ενεργεί ως υπόστρωμα για τη σύνδεση κυττάρων. Σαν φάρμακο, το PVA έχει συνδυαστεί με χιτοζάνη, ζελατίνη, άμυλο, και οι υδροπηκτές τους που διαμορφώθηκαν με την υποβολή των διαλυμάτων σε κύκλους ψύξης- απόψυξης ακολουθούμενες από τη βύθιση λουτρών πήξης. Οι σχέσεις δομής-ιδιότητας για αυτές

τις υδροπηκτές εξετάστηκαν από τη μέτρηση της διόγκωσής τους, της ενυδάτωσης, της υποβάθμισης, και των μηχανικών ιδιοτήτων τους. Η πολυβυνιλική αλκοόλη (PVA), σαν συνθετικό πολυμερές σώμα, έχει προσελκύσει την προσοχή ως πιθανό βιολογικό υλικό για δοχεία τεχνητού αίματος επειδή μπορεί να σχηματίσει υδροπηκτική, και μπορεί να ταιριάζει με τις μηχανικές ιδιότητες του αγγειακού συστήματος.

Εντούτοις, οι υδροπηκτές PVA μόνες τους δεν είναι κατάλληλες για σύνδεση κυττάρων λόγω της υψηλά υδρόφιλης φύσης τους. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα, διάφορα βιοσυμβατά μακρομόρια έχουν συνδυαστεί με το PVA. Ζελατίνη, δεξτράνη, κολλαγόνο, άμυλο, χιτοζάνη, και υαλουρονικό οξύ αναμίχθηκαν με PVA και έχουν μελετηθεί εντατικά από τον Cascone. Η ζελατίνη χρησιμοποιείται ευρέως για να κατασκευάσει τον ιστό ικρίωμα σε συνδυασμό με διάφορα συνθετικά πολυμερή σώματα με σκοπό τη βελτίωση της βιοσυμβατότητας των συνθετικών πολυμερών, συμπεριλαμβανομένου του PVA. Το άμυλο, ένας πολυσακχαρίτης είναι ένα μίγμα αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης και έχει συνδυαστεί με PVA σε προηγούμενες μελέτες. Η τεχνική ψύξης-απόψυξης έχει ένα αξιοπρόσεκτο πλεονέκτημα, είναι ικανή να διασυνδέσει το διάλυμα του πολυμερούς χωρίς να αφήσει στο καλούπι της πηκτής κανένα υπόλοιπο διασύνδεσης το οποίο θα μπορούσε να διαρρεύσει έξω και να προκαλέσει τη σοβαρή δυσμενή επίδραση μετά από την εμφύτευση της στο ανθρώπινο σώμα. Μέσω της διαδικασίας ψύξης-απόψυξης παράγονται υδροπηκτές από PVA με ένα ευρύ φάσμα μηχανικών ιδιοτήτων, με τον έλεγχο των παραμέτρων όπως ο αριθμός των κύκλων, η θερμοκρασία, και ο ρυθμός απόψυξης. Μια αύξηση στον αριθμό των κύκλων ψύξης-απόψυξης και μια μείωση στον ρυθμό της απόψυξης θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια πιο δύσκαμπτη υδροπηκτική. Η ιδιαίτερα διογκωμένη υδροπηκτική αντιπροσωπεύει μια λιγότερο σφιχτή δομή και ένα χαμηλότερο βαθμό διασύνδεσης οπότε συγκρίνεται με τις υδροπηκτές που έχουν μικρότερη αναλογία διόγκωσης. Οι διασυνδέσεις στις υδροπηκτές εμποδίζουν την κινητικότητα της πολυμερικής αλυσίδας και οδηγούν σε χαμηλότερη αναλογία διόγκωσης. Ο βαθμός διόγκωσης ισορροπίας σχετίζεται στενά με τη δομή της υδροπηκτικής. Ένας υψηλός βαθμός διόγκωσης ισορροπίας συνδέεται γενικά με το μεγάλο πόρο ή το μεγάλο μέγεθος του δικτύου της πηκτής. Μια σημαντική αλλαγή στη δομή των βασισμένων υδροπηκτών σε PVA μπορεί να απεικονιστεί ποιοτικά από τις αλλαγές στη διόγκωση

ισορροπίας. Οι Flory και Rehner συνεισέφεραν στην πρόωρη ανάπτυξη της θεωρίας ελαστικότητας για τα πολυμερή σώματα. Οι Perpas και Merrill τροποποίησαν περαιτέρω αυτή τη θεωρία και ανέπτυξαν ένα νέο πρότυπο κατάλληλο για τις υδροπηκτές και προετοίμασαν την παρουσία ενός διαλύτη.

## **2.9. Μελέτη ενυδάτωσης**

Όταν ένα αφυδατωμένο δείγμα υδροπηκτής καταδύεται στο ύδωρ, συμβαίνει διόγκωση λόγω της απορρόφησης του ύδατος, το οποίο προκαλείται από οσμωτική πίεση. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας προσρόφησης, η διάχυση του ύδατος στον δοκιμαστικό σωλήνα προκαλεί συνεχείς μεταβολές στα υλικά μέχρι να επιτευχθεί η διόγκωση του σημείου ισορροπίας.

Οι Watase et al. αρχικά ερεύνησαν την επίδραση του παγώματος και της εκκένωσης στις υδροπηκτές PVA στο πολύπλοκο μοντέλο του Young και συμπέραναν ότι η αύξηση του συντελεστή ελαστικότητας οφείλεται στην αύξηση της κρυσταλλικότητας των υδροπηκτών.

Κατά τους Ngoenkam et al. (2010) ενχύσιμη υδροπηκτική για την μεταφορά χονδροκυττάρων αναπτύχθηκε από ανάμειξη της χιτοζάνης και του αμύλου που προήλθαν από διαφορετικές πηγές με φωσφορικό άλας γλυκερίνης-β (GP) με την προσδοκία ότι θα διατηρούσε την υγρή κατάσταση (φάση) σε θερμοκρασία δωματίου και ένα πήκτωμα (gel) στις αυξημένες θερμοκρασίες. Η προσθήκη αλάτων της πολυόλης, όπως το γλυκεροφωσφορικό δινατρίο σε διάλυμα χιτοζάνης δημιουργεί ένα παχύρρευστο υγρό σε θερμοκρασία δωματίου ή χαμηλότερη και στη συνέχεια μετατρέπεται σε μια ημιστερεή μορφή καθώς πλησιάζει τη θερμοκρασία του σώματος. Τα δείγματα καλύπτονται με έλαιο για να αποτρέπεται η εξάτμιση του νερού κατά τη διάρκεια της μέτρησης.

Όπως η χιτοζάνη, το άμυλο είναι ένα βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο και μη τοξικό πολυμερές. Επιπλέον, η μη ιονική φύση του αμύλου το καθιστά συμβατό με διάφορα είδη πολυμερών συμπεριλαμβανομένων την χιτοζάνη. Η απορρόφηση νερού είναι μια σημαντική παράμετρος για την ανάπτυξη των υδροπηκτών και το βαθμό ενυδάτωσης επηρεάζουν άμεσα οι ιδιότητες της επιφανείας τους, οι μηχανικές ιδιότητες, η διαπερατότητα θρεπτικών συστατικών και ως εκ τούτου η ανάπτυξη των κυττάρων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη έδειξαν ότι η υδροπηκτική που



αποτελείται από χιτοζάνη, άμυλο και-GP (C / S / GP) είχαν μεγαλύτερη απορρόφηση του νερού από εκείνη την υδροπηκτική που αποτελείται από τη χιτοζάνη και-GP (C / GP). Αυτό θα μπορούσε να συνεπάγεται υδροφιλικότητα του αμύλου, επιτρέποντας την απορρόφηση νερού (Wang et al., 2007). Στην συγκεκριμένη μελέτη, διερευνήθηκε ο σχηματισμός της υδροπηκτικής μετά από υποδόρια ένεση.

## 2.10. Γλυκομαννάνη

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, οι πολυσακχαρίτες έχουν αποκτήσει ολοένα και μεγαλύτερη προσοχή στον τομέα της βιοϊατρικής και της μεταφοράς φαρμάκων. Μεταξύ αυτών, η γλυκομαννάνη (GM), έχει γίνει ένα ιδιαίτερα ελκυστικό πολυμερές. Επανεξετάζονται οι φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες που έχουν καθοριστική σημασία για την εκμετάλλευση της GM ως βιοϋλικό. Στην πραγματικότητα, οι πολυσακχαρίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να διευκολυνθεί η αλληλεπίδραση της νανοδομής με μια συγκεκριμένη βιολογική επιφάνεια. Η GM είναι ένας πολυσακχαρίτης που συνίσταται σε β-1, 4 μαννόζη συνδεδεμένα με υπολείμματα γλυκόζης. Η GM είναι ένας πολυσακχαρίτης της οικογένειας mannan, που βρίσκεται σε αφθονία στη φύση, ειδικά σε κωνοφόρα δέντρα, σε ρίζες και πολλούς βολβούς φυτών. Παρά το γεγονός ότι η GM είναι ένα υδρόφιλο μόριο, η διαλυτότητά της στο νερό μπορεί να μειωθεί λόγω του σχηματισμού ισχυρών δεσμών υδρογόνου μετά τον καθαρισμό της ή την ξήρανση. Μεταξύ των παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαλυτότητα της GM στο νερό, ο βαθμό ακετυλίωσης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Συγκεκριμένα, η παρουσία των ακετυλομάδων στη GM αναστέλλει το σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, βελτιώνοντας έτσι τη διαλυτότητα της GM (Alonso-Sande et al., 2009).

Η γνώση του μηχανισμού πήξης της GM, καθώς και οι μεταβλητές που επηρεάζουν τη διαδικασία αυτή, είναι χρήσιμη στο σχεδιασμό και την κατανόηση της δημιουργίας πηκτής της GM με βάση τα συστήματα μεταφοράς. Οι πηκτές της GM μπορούν να προετοιμαστούν με τη θέρμανση του διαλύματος της GM που περιέχουν αλκαλικές ενώσεις ή μεγαλύτερες ποσότητες ουδέτερου άλατος. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί διαρθρωτικές αλλαγές στα μόρια της GM, η οποία διευκολύνει την εγκατάσταση των δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων της GM, κατά συνέπεια, οδηγούν στο σχηματισμό ενός δικτύου δομή της

πηκτής. Υπάρχει μια σειρά από παραμέτρους που επηρεάζουν την πηκτική συμπεριφορά της GM και, ως εκ τούτου, οι ιδιότητες της τελικής δομής της πηκτής. Αυτοί οι παράμετροι είναι ο βαθμός ακετυλίωσης της GM, το μοριακό βάρος της GM, η θερμοκρασία καθώς επίσης και η συγκέντρωση τόσο της GM όσο και η συμμετοχή αλκαλίων στη διαδικασία πήξης. Δεδομένου ότι η ακετυλίωση εμποδίζει τη συγκέντρωση της GM, η αύξηση του βαθμού ακετυλίωσης της GM οδηγεί σε καθυστέρηση της διαδικασίας πήξης. Αντίθετα, η πήξη ευνοείται όταν το μοριακό βάρος, η συγκέντρωση αλκαλίων ή η θερμοκρασία αυξάνονται. Αυτό δεν οφείλεται μόνο στην βελτίωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων της GM, αλλά και λόγω του σχηματισμού των δεσμών υδρογόνου. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις της GM, ο σχηματισμός της GM πηκτής είναι μειωμένος από την απόσταση μεταξύ των μορίων. Στην περίπτωση αυτή, η προηγούμενη διαδικασία αποακετυλίωσης απαιτείται προκειμένου να διευκολυνθεί η προσέγγιση των μορίων της GM. Πάντως, σε υψηλές συγκεντρώσεις της GM η εγγύτητα των γενετικά τροποποιημένων μορίων προωθεί την αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ευνοώντας τη δημιουργία του δικτύου. Η δυνατότητα συνδυασμού της GM με άλλα πολυμερή αύξησε την ευελιξία της στον τομέα χορήγησης φαρμάκων. Η καραγενάνη, η ξανθάνη, η ακετόνη, το κόμμι gellan, το αλγινικό και η χιτοζάνη είναι μερικά παραδείγματα από πολυσακχαρίτες που συνδυάστηκαν με την GM. Η GM είναι ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές, εκ των οποίων τα προϊόντα αποδόμησης είναι φυσικές ενώσεις που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα (Alonso-Sande et al., 2009).

## **2.11. Πηκτές πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών**

Κατά τους Nishinari & Takahashi οι πολυσακχαρίτες είναι μια κατηγορία των βιοπολυμερών που αποτελούνται από απλά μονομερή σάκχαρα. Η κυτταρίνη είναι από μόνη της, άκρως αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες λόγω του πολύ υψηλού επιπέδου των ενδο-ή διαμοριακών δεσμών υδρογόνου (Nishinari & Takahashi, 2003) .

Το υαλουρονικό είναι μια φυσική μη-θειωμένη γλυκοζαμινογλυκάνη και το κύριο μακρομοριακό συστατικό της μεσοκυττάριας μήτρας των περισσότερων συνδετικών ιστών όπως ο χόνδρος. Ως εκ τούτου, οι εφελκυστικές ιδιότητες ροής θεωρούνται ως ένα βασικό χαρακτηριστικό του υαλουρονικού οξέος (Nishinari & Takahashi, 2003). Οι Krause et al. ανέφεραν ότι δεν υπήρχαν αποδείξεις των διαμοριακών δεσμών

υδρογόνου που προκαλούν σχηματισμό πηκτής σε διάλυμα υαλουρονικού οξέος χωρίς την παρουσία της πρωτεΐνης. Στην Ιαπωνία, η ξυλογλυκάνη χρησιμοποιείται ευρέως ως πηκτικό στα τρόφιμα, σταθεροποιητές και πηκτικά μέσα. Όπως και πολλοί άλλοι πολυσακχαρίτες, η ξυλογλυκάνη είναι διαλυτή στο νερό, αλλά τα επιμέρους μακρομόρια τείνουν να μην ενυδατώνονται πλήρως. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα πολυμερή δείχνουν μια ισορροπία μεταξύ υδρόφοβου και υδρόφιλου χαρακτήρα. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι το μίγμα ξυλογλυκάνης και gellan στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπου κάθε πολυσακχαρίτης δεν σχηματίζει πηκτή από μόνος του, διαμορφώνει ένα πήκτωμα.

Οι Ikeda και Nishinari διαπίστωσαν ότι οι αδύνατες ρεολογικές ιδιότητες τύπου-πηκτωμάτων των διασπορών K-καραγεννάνης οφείλονταν σε έναν αρκετά μακροχρόνιο χρόνο χαλάρωσης των δεσμών μεταξύ των διπλών-ελικοειδών διαμορφώσεων αλλά όχι στο σχηματισμό ενός τρισδιάστατου δικτύου. Το Gumhas Gellan ήταν αναμενόμενο για να είναι όχι μόνο ένα νέο πηκτικό μέσο που διαμορφώνει ένα διαφανές πήκτωμα ανθεκτικό στο οξύ και τη θερμότητα παρουσία των δισθενών κατιόντων αλλά και ένα καλό πρότυπο για τη μελέτη της θερμοανατρεπόμενης διαδικασίας πήξης (Nishinari et al., 2000).

Οι Ogawa et al. ερεύνησαν τις επιπτώσεις των κατιονικών ιόντων στις διαμορφωτικές ιδιότητες της κόμμι gellan σε υδατικά διαλύματα και διαπίστωσαν ότι η θερμοκρασία μετάβασης των Li-, Na και K-gellan δεν εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση του πολυμερούς αλλά και από τη συγκέντρωση του πρόσθετου άλατος και των αντίθετα φορτισμένων ιόντων. Η παρατηρούμενη θερμοκρασία μετάβασης για διάλυμα K-gellan με KCl είναι υψηλότερη από ότι για τα διαλύματα της Ligellan με LiCl, και Na-gellan με NaCl. Επίσης, μελέτησαν τα αποτελέσματα των σακχάρων στη διαμορφωτική αλλαγή κόμμι gellan.

Η σουκκινογλυκανη (succinoglycan) είναι ένας ιοντικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από ορισμένα βακτηριακά είδη, και αυτός ο πολυσακχαρίτης σε υδατικό διάλυμα άλατος σε χαμηλές θερμοκρασίες παίρνει μια διατεταγμένη ελικοειδή διάπλαση και αλλάζει η διάπλαση του σε μια κατάσταση αταξίας, με την αύξηση της θερμοκρασίας (Nishinari et al., 2000).

Πρόσφατες εξελίξεις στις πηκτές υδροκολλοειδών που αποτελούνται από διεσπαρμένες φάσεις (πολυσακχαρίτης ή πρωτεΐνη) και διασπορά μέσου (νερού) εξετάζονται από τους Nishinari et al. Τα πηκτώματα και οι διαδικασίες πήξης πολυσακχαριτών, όπως το κόμμι gellan, η μεθυλοκυτταρίνη, η ξυλογλυκάνη, curdlan, γλυκομαννάνη konjac και άμυλο περιγράφονται από τον (Nishinari et al.,2000).

Μερικά υδροκολλοειδή μεταπηδούν από μια κατάσταση κολλοειδούς διαλύματος σε μια κατάσταση πηκτωμάτων με τη μείωση ή την αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία εξαρτάται από τη φύση των δευτεροβάθμιων ή μη-ομοιοπολικών μοριακών δεσμών όπως οι δεσμοί υδρογόνου ή οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Ο όρος "φυσική υδροπηκτή" έχει πλαθεί για να περιγράψει το μη-ομοιοπολικό διασυνδεδεμένο δίκτυο για να το διακρίνει από τις χημικές υδροπηκτές που διαμορφώνονται με τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Χημικές υδροπηκτές είναι συνήθως διογκωμένα από νερό δίκτυα υδρόφιλων ομοπολυμερών ή συμπολυμερών. Για τις υδροπηκτές πολυσακχαριτών, ο όρος "ζώνη συνδέσεων" έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για να περιγράψει τη διασύνδεση.

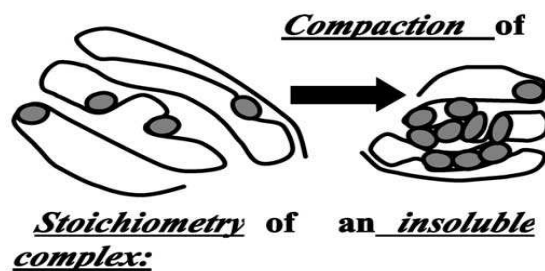
Το σημαντικά αυξανόμενο ενδιαφέρον σε πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες οφείλεται στις πολυάριθμες εφαρμογές τους, ως πηκτικοί παράγοντες, πυκνωτικά, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές, με τη συμμετοχή σε διάφορους τομείς, π.χ. τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά, υφάσματα και στη βιοιατρική (Nishinari et al.,2000).

Το κόμμι gellan αναμένεται να είναι όχι μόνο ένα νέο πηκτικό μέσο το οποίο αποτελεί ένα διαφανές gel ανθεκτικό σε οξύ και θερμότητα με την παρουσία δισθενών κατιόντων αλλά και ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της θερμο-αναστρέψιμης πηκτικής διαδικασίας.

Το κόμμι χαρουπιού (LBG) σχηματίζει μια πηκτή με τον κύκλο ψύξης / απόψυξης και η πήξη του συνήθως περιορίζεται σε συνεργιστικά συστήματα πήξης. Πρόσφατα, οι Richardson et al. έχουν διαπιστώσει ότι το LBG κάνει πηκτή από διαλύματα που περιέχει άνω του 1% στερεά σε θερμοκρασία δωματίου σε μια χρονική κλίμακα των αρκετών μηνών. Το άμυλο χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο των ρεολογικών ιδιοτήτων των τροφίμων. Οι Yoshimura et al. διαπίστωσαν ότι το μέτρο ελαστικότητας της πηκτής από άμυλο καλαμποκιού αυξήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης για μία ή δύο εβδομάδες στους 5 °C, αλλά μειώθηκε στο αρχικό επίπεδο

πριν από την αποθήκευση από τη θέρμανση έως 60 °C. Είναι γνωστό ότι τα σάκχαρα καθυστερούν την ανάδρομη πορεία του αμύλου όπου οι Ahmad και Williams μελέτησαν την επίδραση των διαφόρων σακχάρων στις θερμικές και ρεολογικές ιδιότητες του αμύλου σάγο και εξέτασαν τη σταθερότητα ψύξης και απόψυξης.

Οι πρωτεΐνες είναι βιομηχανικά σημαντικές λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν πηκτές και την επιφανειοδραστικότητα. Εφόσον οι πρωτεΐνες είναι γενικά σταθερές σε υδατικό διάλυμα, η μετουσίωση / αποσταθεροποίηση αποτελεί προϋπόθεση για την πήξη. Η ενζυμική διασύνδεση είναι ένας άλλος τρόπος για να σχηματιστεί πηκτή από πρωτεΐνη. Οι επιδράσεις των αλάτων στην πήξη πρωτεϊνών είναι αξιοσημείωτες στα ηλεκτροστατικά τους αποτελέσματα. Τα άλατα συμβάλλουν στην ισορροπία ελκτικών και απωστικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων πρωτεΐνης. Εάν το pH είναι μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης και η ιοντική ισχύς του συστήματος είναι χαμηλή, αναφορικά τα λεπτά γραμμικά μεγέθη (N nm), που σχηματίζονται λόγω της κυριαρχίας των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων πρωτεΐνης, έχουν ως αποτέλεσμα την διαμόρφωση της λεγόμενης λεπτής πτυχής πηκτής.



Σχήμα 4. Συμπύκνωση συμπλόκου πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη

Τα αποτελέσματα του μοριακού βάρους στις ρεολογικές και θερμικές συμπεριφορές των πηκτωμάτων, το ελάχιστο μήκος αλυσίδων που είναι απαραίτητο για να διαμορφωθεί μια ελικοειδής δομή, η δομή των ζωνών συνδέσεων, η κατάσταση του ύδατος στα πηκτώματα, ποιο είδος μοριακών δυνάμεων είναι αρμόδιο για τη σταθεροποίηση των

αναστολών και για το σχηματισμό μιας κολλοειδούς κρυστάλλινης δομής μερικών σφαιρικών πρωτεϊνών ή αδιάλυτων πολυσακχαριτών, όλα αυτά παραμένουν ακόμα ένα θέμα συζήτησης.

Οι πολυσακχαρίτες διαδραματίζουν έναν ουσιαστικό ρόλο στα συστήματα τροφίμων, ειδικότερα ως παράγοντες σχηματισμού δομής. Από τις έρευνες για τη συμπεριφορά των πολυσακχαριτών στα διαλύματα η έμφαση είναι στις διαμορφωτικές μεταβάσεις έλικας-σπειρών τους καθώς επίσης και τις αλληλεπιδράσεις με τα ιόντα μετάλλων (Braudo et al., 1998). Πολλοί πολυσακχαρίτες μπορούν να σχηματίσουν υδροπηκτές είτε με θέρμανση ή ψύξη, αν και μερικά από αυτά, όπως η πουλλουάνη μπορούν να σχηματίσουν μόνο ένα υδατικό διάλυμα σε οποιεσδήποτε θερμοκρασίες (Nishinari & Zhang, 2004). Έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι η ελάχιστη συγκέντρωση για το σχηματισμό πηκτώματος στην οποία δεσμοί υδρογόνου είναι η κύρια μοριακή δύναμη μειώνεται με αύξηση της ακαμψίας των πολυμερικών αλυσίδων (Okada, Koga, & Tanaka, 2002). Η δυσκολία στη μελέτη επί του μηχανισμού πήξης των πολυσακχαριτών έγκειται στην μικρή διαλυτότητα πηκτών πολυσακχαριτών σε νερό. Υπάρχουν διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στον επί τόπου σχηματισμό πηκτής: η διαλυτική ανταλλαγή, η UV-ακτινοβολία, ιοντικοί δεσμοί σύνδεσης, η αλλαγή pH, και η ρύθμιση θερμοκρασίας.

Πήξη μπορεί να συμβεί επί τόπου από ιοντικούς δεσμούς ή μετά από μια αλλαγή στο pH ή τη θερμοκρασία. Ορισμένα πολυμερή υφίστανται απότομες αλλαγές στη διαλυτότητα στην ανταπόκριση στις αυξήσεις στην θερμοκρασία του περιβάλλοντος (χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος, LCST).

Το αλγινικό είναι ένας γνωστός πολυσακχαρίτης ευρέως χρησιμοποιούμενος λόγω των ιδιοτήτων πηκτωματοποίησης του σε υδατικά διαλύματα που σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του καρβοξυλικού οξέος και των δισθενών ιόντων, όπως ασβέστιο, μόλυβδος και χαλκός, είναι επίσης δυνατό να ληφθεί ένα πήγμα αλγινικού οξέος μειώνοντας την περιβαλλοντική τιμή του pH.

Είναι γνωστό ότι τα υδατικά διαλύματα πολλών συνθετικών και φυσικών πολυμερών όπως ξανθάνης και LBG, αμυλοπηκτίνη, αμυλόζη και μαλτοδεξτρίνες υφίστανται φυσικές αλλαγές ως αποτέλεσμα της κατάψυξης τους, της αποθήκευσης τους στην κατάψυξη και στην μετέπειτα απόψυξη τους από τις υδατικές τους

διασπορές. Τέτοια κρυογενική επεξεργασία πολυμερών διαλυμάτων (συμπυκνωμένα ή αραιωμένα) δίνει αφορμή για το σχηματισμό φυσικών διασυνδεδεμένων (μη ομοιοπολικών) δικτύων κάτω από μια ποικιλία συνθηκών. Αυτό το φαινόμενο έχει ονομαστεί ως cryostructuring κρυοδόμηση ή cryotropic κρυοτροπική πήξη ή cryogelation κρυοπήκτωση. (Damshkaln, Simenel, & Lozinsky, 1999; Giannouli & Morris, 2003; Hassan & Peppas, 2000; Lozinsky & Damshkaln, 2001; Lozinsky, Damshkaln, Brown, & Norton, 2000a–c, 2002; Lozinsky, Zubov, Savina, & Plieva, 2000d; Stauffer & Peppas, 1992; Tanaka, Hatakeyama, & Hatakeyama, 1998; Watase & Nishinari, 1988; Willcox et al., 1999).

Όταν η πήξη με επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης γίνεται μεταξύ των θερμοκρασιών άνω  $0^{\circ}\text{C}$  και κάτω από  $0^{\circ}\text{C}$ , αυτό βελτιώνει τις λειτουργικές ιδιότητες των πηγμένων υλικών. (Giannouli & Morris, 2003; Hassan & Peppas, 2000).

Ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό των κρυογελών είναι η ετερογενής και εξαιρετικά πορώδης δομή τους που προκύπτει από τον σχηματισμό πάγου κρυστάλλων κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Οι κρύσταλλοι πάγου ενεργούν ως παράγοντες σχηματισμού πόρων και μετά την απόψυξη τους οι μακροπόροι σε διάφορες διαστάσεις και «αρχιτεκτονική», παραμένουν στο σώμα κρυογελών (Lozinsky & Plieva, 1998). Μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων κατάψυξης-απόψυξης οι επιπλέον πόροι σχηματίζονται και διασυνδέονται οδηγώντας σε αύξηση του μεγέθους των πόρων. Πράγματι, σε μια προηγούμενη μελέτη σχετικά με πορώδη υλικά έχει βρεθεί ότι η φιβροΐνη του μεταξιού είναι δυνατόν να ελέγχει τα χαρακτηριστικά πόρων και τις φυσικές ιδιότητες των υλικών που λαμβάνονται από την προσαρμογή των επαναλήψεων απόψυξης και της θερμοκρασίας τήξης (Li et al., 2002).

Κρυογέλη της πολυ (βινυλική αλκοόλη) (cryoPVAGs) σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της κρυογενικής επεξεργασίας (κατάψυξη-αποθήκευση σε κατεψυγμένη κατάσταση-απόψυξη) διαλυμάτων πυκνού PVA σε νερό ή DMSO.

## **2.12. Επίδραση ειδικών ιόντων σε πηκτώματα πρωτεΐνης σπόρου**

Ο Olayide Samuel Lawal (2009) μελέτησε ένα συμπύκνωμα πρωτεΐνης που παρασκευάστηκε από τους σπόρους jack bean (*Canavalia ensiformis*), και την επιρροή

των επιλεγμένων αλάτων Hofmeister για τις λειτουργικές ιδιότητες του συμπυκνώματος της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κοσμοτροπικά άλατα ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaBr}$ ) βελτίωναν την ικανότητα απορρόφησης νερού και μείωναν την συγκέντρωση πήξης των πρωτεϊνών περισσότερο από τα χαοτροπικά άλατα ( $\text{NaI}$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{NaSCN}$ ). Κατά συνέπεια, οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών μεταβάλλονται ως αποτέλεσμα των αλλαγών που επιβάλλονται από την παρουσία αυτών των ιόντων.

Ένα πήκτωμα είναι ένα συνεχές δίκτυο με μακροσκοπικές διαστάσεις βυθισμένο σε ένα υγρό μέσο που παρουσιάζει ασταθή κατάσταση. Η πήξη συνεπάγεται το σχηματισμό ενός τρισδιάστατου δικτύου από προοδευτική συσσωμάτωση των μακρομορίων ή σωματίδια μέσω χημικών δεσμών ή φυσικές αλληλεπιδράσεις υπό κατάλληλες συνθήκες. Οι διαδικασίες που εμπλέκονται στην θερμικά επαγόμενη διαδικασία πήξης είναι αποδιάταξη της πρωτεΐνης, δέσμευση του νερού, αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, και η ακινητοποίηση του νερού.

Όταν η συγκέντρωση άλατος είναι υψηλή, η αφθονία των ιόντων θα μπορούσε να μειώσει την διαλυτική δύναμη του διαλύτη και ενδεχομένως να εξουδετερώσει το ηλεκτρικό φορτίο των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες είναι αδιάλυτες αν εξουδετερώνονται τα ηλεκτρικά τους φορτία, και αυτό παρεμποδίζει το σχηματισμό πηκτής (Olayide Samuel Lawal, 2009).



### 3. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

- Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του HBSS και της PGM σε υδατικά διαλύματα σε pH 3 και 7.
- Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων με τη χρήση HBSS και PGM και η μελέτη της σταθερότητας τους σε pH 3 και 7.
- Η δημιουργία πηκτής από υδατικό διάλυμα HBSS με την εφαρμογή κύκλων ψύξης-απόψυξης καθώς και η επίδραση των αλάτων της σειράς Hofmeister, του pH και της συγκέντρωσης του πολυμερούς στο σχηματισμό της.

## **4.Πειραματικό μέρος**

### **4.1. Υλικά και μέθοδοι**

#### **4.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια**

- Σκόνη σαλεπιού
- Αιθυλική αλκοόλη 70% v/v
- Ακετόνη
- Οξικό νάτριο
- Απιονισμένο νερό
- HBSS
- PGM
- Trizma
- Κιτρικό οξύ
- Νατραζίδιο
- Δεκαεξάνιο
- KSCN
- K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Νατραζίδιο

#### **4.1.2 Όργανα**

- Υπερφυγόκεντρος RC28-S Sorvall, Newtown, Connecticut, USA
- Πιλοτικός Λυοφυλοποιητής, Christ, Germany

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ομογενοποιητής υπερήχων
- Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire UK
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
- Φασματοφωτόμετρο Helios, Thermo Electron Corporation
- Πεχάμετρο
- Ψυγείο, Hitachi
- Ρεόμετρο C-VOR Bohlin Instruments

## 4.2. Μέθοδοι

### 4.2.1. Εκχύλιση HBSS από σαλέπι

Το αλεσμένο δείγμα σαλεπιού εκχυλίστηκε με αιθυλική αλκοόλη 70% v/v (2x300 mL) στους 40 °C για μια ώρα. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση για να παραληφθούν τα αδιάλυτα στην αλκοόλη στερεά και έγινε έκπλυση του στερεού υπολείμματος με ακετόνη (2x150 mL) και το υπόλειμμα ξηράθηκε στον αέρα για 24 ώρες. 10 g του ξηρού υπολείμματος εκχυλίστηκαν τρεις φορές με 600 mL ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.05 M σε pH 5.2 στους 70 °C για 30 λεπτά (HBSS hot buffer soluble solids). Μετά από κάθε εκχύλιση ακολούθησε φυγοκέντριση και το υπερκείμενο υγρό λυοφιλοποιήθηκε.

### 4.2.2. Αλληλεπιδράσεις HBSS – PGM σε υδατικά διαλύματα

Για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις του HBSS με την PGM δημιουργήθηκαν διαλύματα των δύο βιοπολυμερών σε ρυθμιστικά διαλύματα 0.025 M Trizma για το pH 7 και 0.025 M κιτρικό οξύ για το pH 3. Και στα δύο ρυθμιστικά διαλύματα έγινε προσθήκη 0,025 M νατραζίδιο. Για την δημιουργία των διαλυμάτων του HBSS έγιναν αραιώσεις από 0– 0.5 % w/w, με τον ίδιο τρόπο έγιναν και τα διαλύματα της PGM. Κάθε διάλυμα περάστηκε από φίλτρο 1μm. Στη συνέχεια έγινε ανάμιξη 1:1 σταθερής συγκέντρωσης PGM σε διαλύματα HBSS μεταβαλλόμενων συγκεντρώσεων από 0 – 0.5 % w/w. Για το

pH 7 προετοιμάστηκε μια σειρά μιγμάτων που περιείχαν σταθερή συγκέντρωση σε PGM (0, 0.075, 0.1, 0.5, 0.2 % w/w) αλλά διαφορετικές συγκεντρώσεις HBSS (0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 % w/w). Με ανάλογο τρόπο πραγματοποιήθηκε η διαδικασία και σε pH 3 ώστε η περιεκτικότητα της PGM να διατηρείται κάθε φορά σταθερή (0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2 % w/w) με ίδιες συγκεντρώσεις του HBSS (0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 % w/w). Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 600nm στο φασματόμετρο. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε μια επανάληψη.

#### **4.2.3. Προετοιμασία γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό**

Για την προετοιμασία των γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό δημιουργήθηκαν διαλύματα HBSS 1.5% w/w και PGM (0, 0.5, 1, 2 % w/w με αραιώσεις) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.025 M Trizma για το pH 7 και σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.025 M κιτρικού οξέος για το pH 3. Τα διαλύματα αυτά αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 και αποτελούν τη συνεχή φάση σε γαλακτώματα με κλάσμα όγκου  $\phi=0.3$ . Τα δείγματα αναμίχθηκαν με δεκαεξάνιο σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή υπερήχων για 3 λεπτά. Αμέσως μετά την ομογενοποίηση έγινε αραιώση των γαλακτωμάτων σε απιονισμένο νερό ώστε να προσδιοριστεί η κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων με τη χρήση του Mastersizer. Έπειτα τα γαλακτώματα τοποθετήθηκαν σε μικροσκόπιο το οποίο είχε ενσωματωμένη κάμερα ώστε να παρθούν οι φωτογραφίες τους. Τα γαλακτώματα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες για να διαπιστωθεί η αποκορύφωση τους μετά από 3 μέρες. Ο προσδιορισμός της κατανομής του μεγέθους και η μικροσκοπία επαναλήφθηκαν μετά από 3 μέρες για να παρατηρηθούν πιθανές αλλαγές στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων.

#### **4.2.4. Πηκτές**

Για το σχηματισμό πηκτής από υδατικά διαλύματα HBSS εφαρμόστηκαν κύκλοι ψύξης-κατάψυξης. Μελετήθηκε η επίδραση του pH, της συγκέντρωσης του HBSS, του είδους και της συγκέντρωσης του ιόντος στο σχηματισμό υδροπηκτής. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σε συνθήκες pH 7 και pH 1 σε ρυθμιστικά διαλύματα Trizma και κιτρικού οξέος αντίστοιχα. Οι περιεκτικότητες σε HBSS ήταν 2% w/w και 4% w/w. Τα

ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $K_2SO_4$  και  $KSCN$  με συγκεντρώσεις 0.2, 1.0 και 0.2, 1.0 (M) αντίστοιχα.

Σκόνη HBSS αναμίχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα και άλας στην επιθυμητή συγκέντρωση. Ακολούθησε ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα με ταυτόχρονη θέρμανση των δειγμάτων μέχρι τους 90 °C ώστε να γίνει πλήρης διαλυτοποίηση. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τελικά τοποθετούνται σε καλούπια. Σκεπάζονται τα καλούπια με καπάκια για την αποφυγή της εξάτμισης και τοποθετούνται στο ψυγείο. Μετά την ολοκλήρωση του κάθε κύκλου τα δείγματα ζυγίστηκαν και εκτιμήθηκε η πήξη τους μακροσκοπικά. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής χαρακτηρισμοί: υγρό, πηχτό, πηγμένο και διαχωρισμένο. Ως πηχτό χαρακτηρίστηκε το πηχτό υγρό, ως πηγμένο χαρακτηρίστηκε εκείνο που πλησίαζε την μορφολογία πηκτής και τέλος ως διαχωρισμένο αυτό που δεν ήταν διαυγές και, επομένως, ήταν εμφανής ο διαχωρισμός φάσεων. Επιπλέον έγινε και ρεολογική μελέτη των πηκτών με τη βοήθεια ρεόμετρου κάτω από συνθήκες ελεγχόμενης παραμόρφωσης (control strain), σταθερό ρυθμό διάτμισης  $0.0001s^{-1}$  (shear rate) σε εύρος συχνοτήτων  $f=0.01-10Hz$  σε θερμοκρασία 4°C. Τέλος οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της ρεολογίας.

**Πίνακας 1.** Συνθήκες για τον σχηματισμό των υδροπηκτών

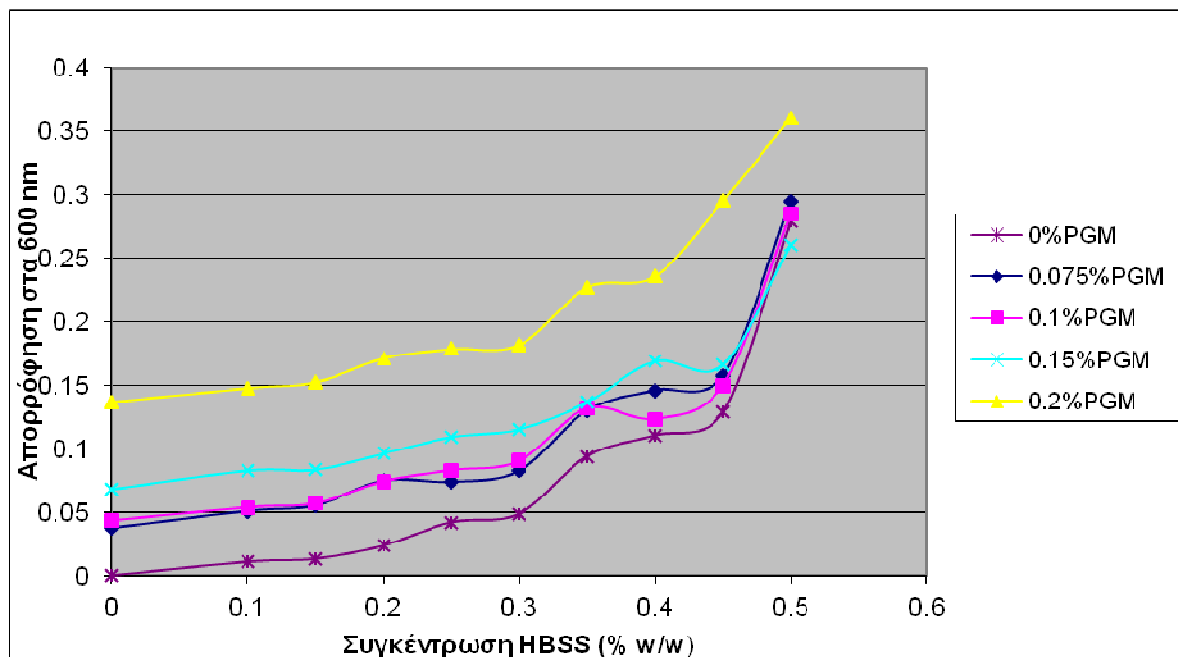
Αριθμός δείγματος	pH	HBSS(%w/w)	Ιόν	Περιεκτικότητα σε ιόν (M)	Κύκλοι
1	7	2	2	0.2	6
2	1	4	1	1.0	6
3	7	2	2	1.0	6
4	7	4	1	1.0	6
5	1	4	2	0.2	6
6	1	2	1	0.2	6
7	7	4	2	1.0	6
8	7	4	-	-	6

Όπου για το ιόν 1:  $K_2SO_4$  και 2: KSCN

## 5. Αποτελέσματα

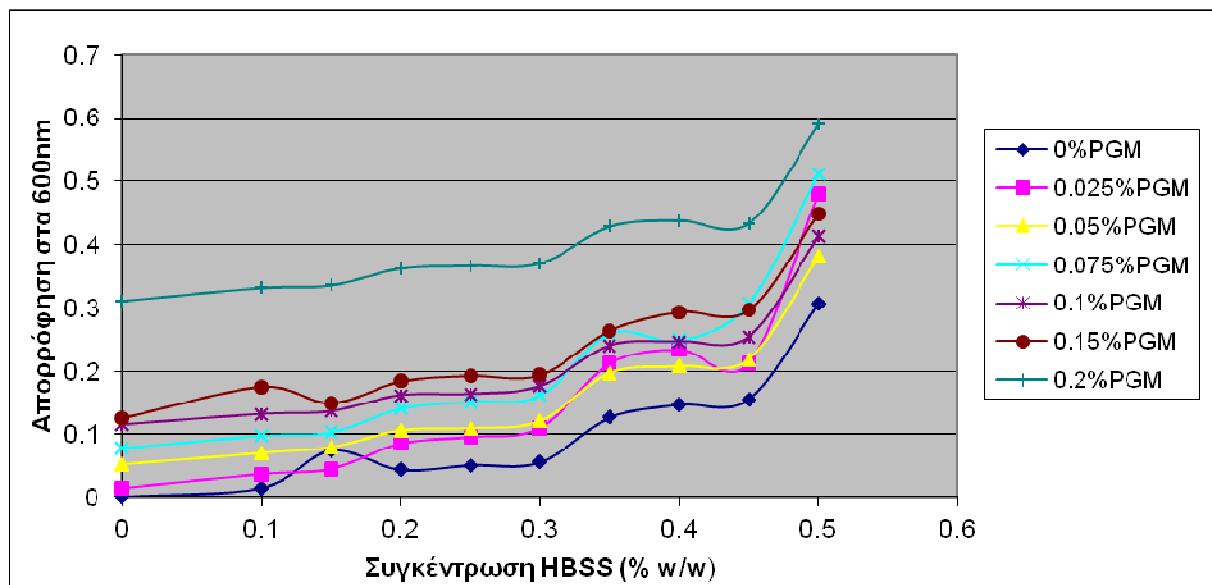
### 5.1 Αλληλεπιδράσεις διαλυμάτων HBSS-PGM

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις HBSS και PGM τα μίγματα είναι διαυγή ενώ όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις γίνονται θολά. Η προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης HBSS (0-0.5 w/w %) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης των μιγμάτων HBSS- μυσίνης σε pH 7. Συγκεκριμένα στην περιοχή συγκεντρώσεων 0-0.3% HBSS δεν υπήρξε σημαντική αύξηση της απορρόφησης, ενώ σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0.3% παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση στην απορρόφηση. Επιπλέον μεγαλύτερη απορρόφηση είχε το μίγμα που περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση PGM (0.2 w/w %) όπως φαίνεται στο σχήμα 5.



**Σχήμα 5.** Απορρόφηση διαλυμάτων HBSS (από σαλέπι) – PGM (μυξίνης) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του HBSS (0-0.5 w/w %) σε pH 7.

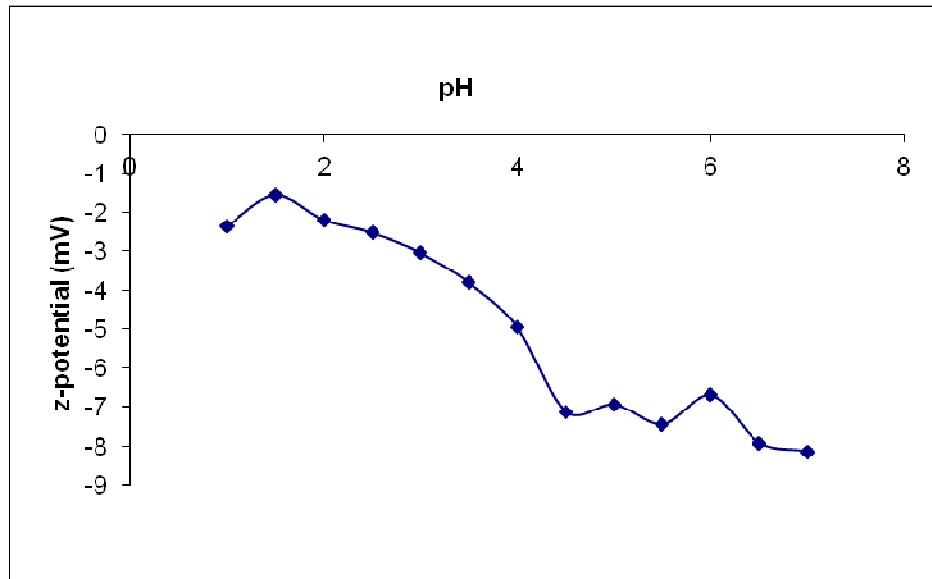
Αντίστοιχα με το pH 7 έτσι και στο pH 3 παρατηρήθηκε παρόμοια μεταβολή στην απορρόφηση. Με την αύξηση των συγκεντρώσεων PGM και HBSS τα μίγματα από διαυγή έγιναν θολά. Έτσι στην περιοχή συγκεντρώσεων 0-0.3% w/w HBSS η απορρόφηση δεν αυξήθηκε ιδιαίτερα ενώ στην 0.3-0.45% w/w η μεταβολή της ήταν μεγαλύτερη και τελικά από την 0.45% w/w η απορρόφηση αυξήθηκε ραγδαία όπως φαίνεται στο σχήμα 6.



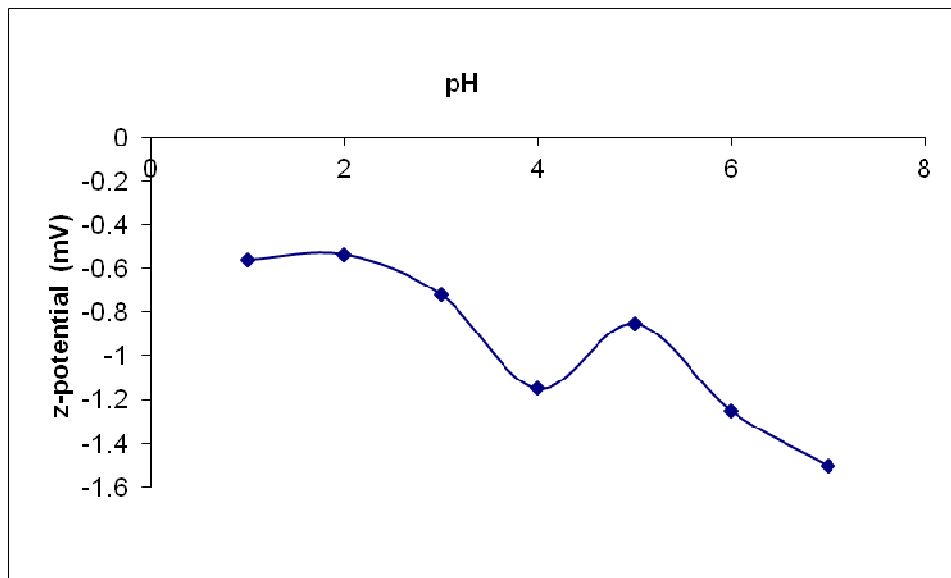
**Σχήμα 6.** Απορρόφηση διαλυμάτων HBSS (από σαλέπι) – PGM (μυξίνης) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του HBSS (0-0.5 w/w %) σε pH 3.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του HBSS και της PGM σε υδατικά διαλύματα δεν είναι ηλεκτροστατικής φύσεως. Σύμφωνα με τις μετρήσεις του ζ δυναμικού (σχήμα 7 και 8) που έγιναν στα υδατικά διαλύματα των βιοπολυμερών σε συνάρτηση με το pH και τα δύο μακρομόρια είναι αρνητικά φορτισμένα. Μάλιστα το HBSS σε τιμές pH από 3 και κάτω έχει σχεδόν μηδενικό φορτίο. Η αύξηση της απορρόφησης για συγκεντρώσεις 0.3-0.5 % w/w καταδεικνύει κροκίδωση η οποία όμως δεν οφείλεται σε ελκτικές δυνάμεις. Σύμφωνα με τον Dickinson (2003) όταν και τα δύο βιοπολυμερή είναι αρνητικά φορτισμένα υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού διαλυτών συμπλόκων. Σε αυτή την περίπτωση ο ανιονικός πολυσακχαρίτης αλληλεπιδρά με θετικά φορτισμένες ομάδες πάνω στην πρωτεΐνη. Στο συγκεκριμένο ζεύγος βιοπολυμερών είναι πιθανότερο αυτό που παρατηρείται να οφείλεται σε θερμοδυναμική ασυμβατότητα μεταξύ των μορίων. Παρόλα αυτά για να επιβεβαιωθεί ότι ισχύει αυτή η υπόθεση πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα όπως η δημιουργία των μιγμάτων και στη συνέχεια η φυγοκέντρωση τους ώστε να διαπιστωθεί αν όντως δημιουργούνται δύο διαφορετικές φάσεις. Μια πλούσια σε PGM και μια πλούσια σε HBSS.





**Σχήμα 7.** Επίδραση της αύξησης του pH στην μεταβολή του z-δυναμικού (mV) της PGM.

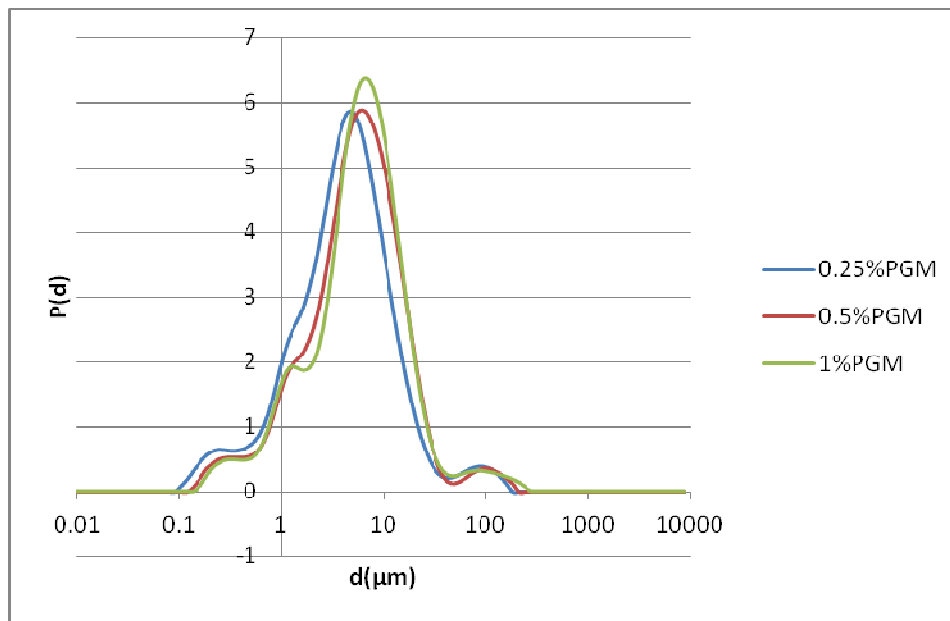


**Σχήμα 8.** Επίδραση της αύξησης του pH στην μεταβολή του z-δυναμικού (mV) του HBSS.

## 5.2. Γαλακτώματα λαδιού σε νερό

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ HBSS και PGM μελετήθηκαν σε γαλακτώματα δεκαεξανίου σε νερό που σταθεροποιήθηκαν με μίγμα των διαλυμάτων των βιοπολυμερών σε αναλογία 1:1. Στο σχήμα 9 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων

των γαλακτωμάτων με κλάσμα όγκου  $\phi = 0.3$  που περιέχουν σταθερή περιεκτικότητα σε HBSS (0.75% w/w) και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση PGM σε pH 3 αμέσως μετά την παρασκευή τους. Όπως φαίνεται στο σχήμα τα αποτελέσματα της σκέδασης φωτός δείχνουν ότι τα γαλακτώματα αποτελούνται από σταγονίδια μεγέθους μικρότερου των 10  $\mu\text{m}$ . Στο ίδιο pH το γαλάκτωμα που δεν περιέχει πρωτεΐνη αποτελείται από ακόμη μικρότερα σταγονίδια (σχήμα 11).



**Σχήμα 9.** Κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων που περιέχουν σταθερή περιεκτικότητα 0.75% w/w HBSS και διαφορετική συγκέντρωση σε PGM σε pH 3 την ημέρα της παρασκευής τους.

Τα γαλακτώματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια σε θερμοκρασία 25 °C ώστε να παρατηρηθεί η αποσταθεροποίησή τους σε συνάρτηση με τον χρόνο. Τρεις μέρες μετά την παρασκευή τους τα γαλακτώματα που περιέχουν σταθερή περιεκτικότητα σε HBSS και PGM σε συγκέντρωση από 0.25 – 1% w/w αποσταθεροποιήθηκαν (σχήμα 10). Αρχικά παρατηρούμε ότι σε pH 7 το γαλάκτωμα που περιέχει 0.75% w/w HBSS έχει αποκορυφωθεί. Επιπλέον σε pH 3 το μόνο γαλάκτωμα που έχει παραμείνει σταθερό είναι αυτό που δεν περιέχει καθόλου PGM ενώ

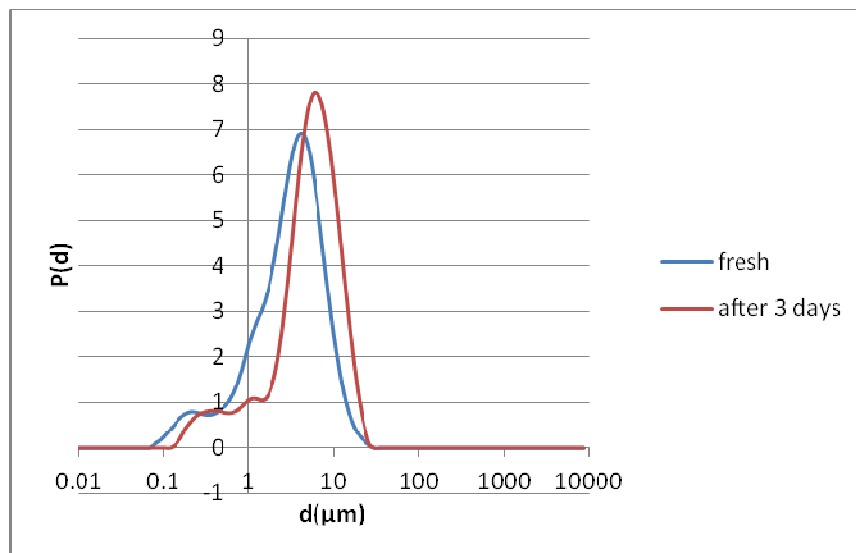
αντίθετα αυτό που παρουσιάζει την μεγαλύτερη αποκορύφωση περιέχει και την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε PGM.



**Σχήμα 10.** Φωτογραφία γαλακτωμάτων που περιέχουν 0,75% w/w HBSS σε pH 7 και 0,75% w/w HBSS και PGM 0-1% w/w σε pH 3, 3 ημέρες μετά την παρασκευή τους.

Οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και από τις εικόνες από το μικροσκόπιο (σχήμα 13) όπου είναι εμφανές ότι στο pH 7 δεν δημιουργήθηκε εξαρχής σταθερό γαλάκτωμα (όποτε δεν υπήρχε και λόγος προσθήκης PGM) σε αντίθεση με το αντίστοιχο γαλάκτωμα σε pH 3 το οποίο φαίνεται σταθερό ακόμα και 3 ημέρες μετά την γαλακτωματοποίηση (σχήμα 10,11 και 13). Μπορούμε λοιπόν να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το HBSS έχει την ικανότητα να γαλακτωματοποιεί καλύτερα σε pH 3. Αυτή η γαλακτωματοποιητική ικανότητα είναι πιθανό να οφείλεται σε πρωτεΐνες που βρίσκονται στο HBSS σε ποσοστό 8.2% (Georgiadis et al.,2012). Τα αποτελέσματα από μετρήσεις του ζ δυναμικού (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) δείχνουν ότι η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών απώσεων στην σταθεροποίηση του γαλακτώματος είναι αμελητέα καθώς το φορτίο ήταν αρνητικό και σχεδόν μηδενικό άρα η σταθεροποίηση είναι στερεοχημική. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε από τους Garti et al. (1999) σε γαλακτώματα που σταθεροποιήθηκαν με POG (*Portulaca oleracea gum*), και σε εκείνη την περίπτωση οι ηλεκτροστατικές απώσεις δεν ήταν σημαντικές

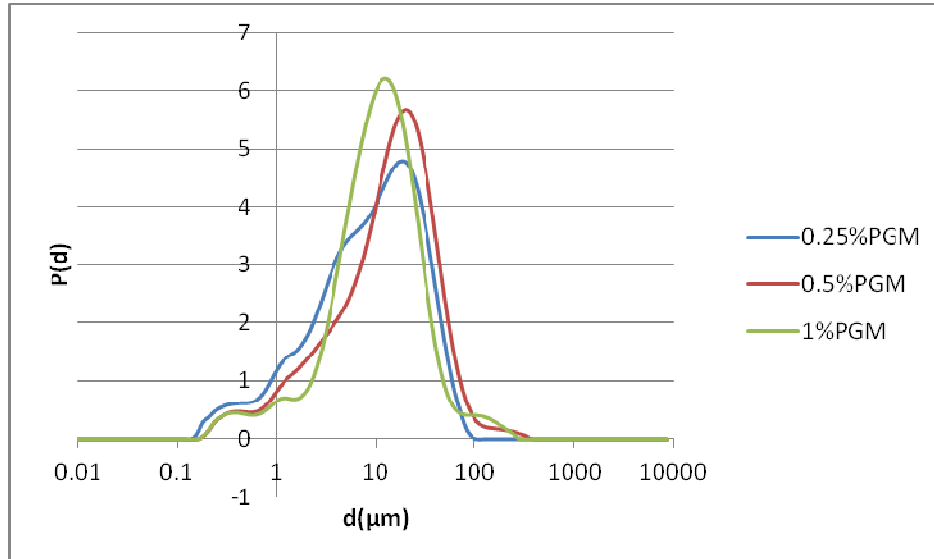
και το σταθερότερο γαλάκτωμα ήταν αυτό σε pH 3 ενώ σε υψηλότερες τιμές pH η προσρόφηση του πολυσακχαρίτη ήταν μειωμένη. Μπορεί λοιπόν και στη συγκεκριμένη περίπτωση να υποθεθεί ότι σε pH 7 η ποσότητα HBSS που προσροφάται στη διεπιφάνεια δεκαεξανίου – νερού είναι μικρότερη κι έτσι το στρώμα που καλύπτει τα σταγονίδια του λαδιού δεν είναι πυκνό. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι HBSS που φέρει μεγαλύτερο φορτίο είναι περισσότερο υδρόφιλο και διαλύεται στην υδατική φάση ευκολότερα. Επιπλέον δεν μπορούμε να αποκλείσουμε και την πιθανότητα σταθεροποίησης κατά Pickering, αν και κάθε διάλυμα πολυσακχαρίτη περάστηκε από φίλτρο 1  $\mu\text{m}$  παρατηρήθηκε η ύπαρξη σωματιδίων σε διασπορά.



**Σχήμα 11.** Κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων του γαλακτώματος που είναι σταθεροποιημένο με 0.75% w/w HBSS σε pH 3 την ημέρα της παρασκευής του (μπλέ γραμμή) και 3 μέρες μετά ( κόκκινη γραμμή).

Οι εικόνες από το μικροσκόπιο (σχήμα 13) δείχνουν ότι τα γαλακτώματα που περιείχαν PGM παρουσίασαν κάποια κροκιδωση αμέσως μετά την παρασκευή τους. Τρεις μέρες μετά από την παρασκευή τους έχει αυξηθεί το μέγεθος των σταγονιδίων, ιδιαίτερα στο γαλάκτωμα που περιείχε 0.5% PGM το μέγεθος των σταγονιδίων αυξήθηκε μέχρι 20 $\mu\text{m}$

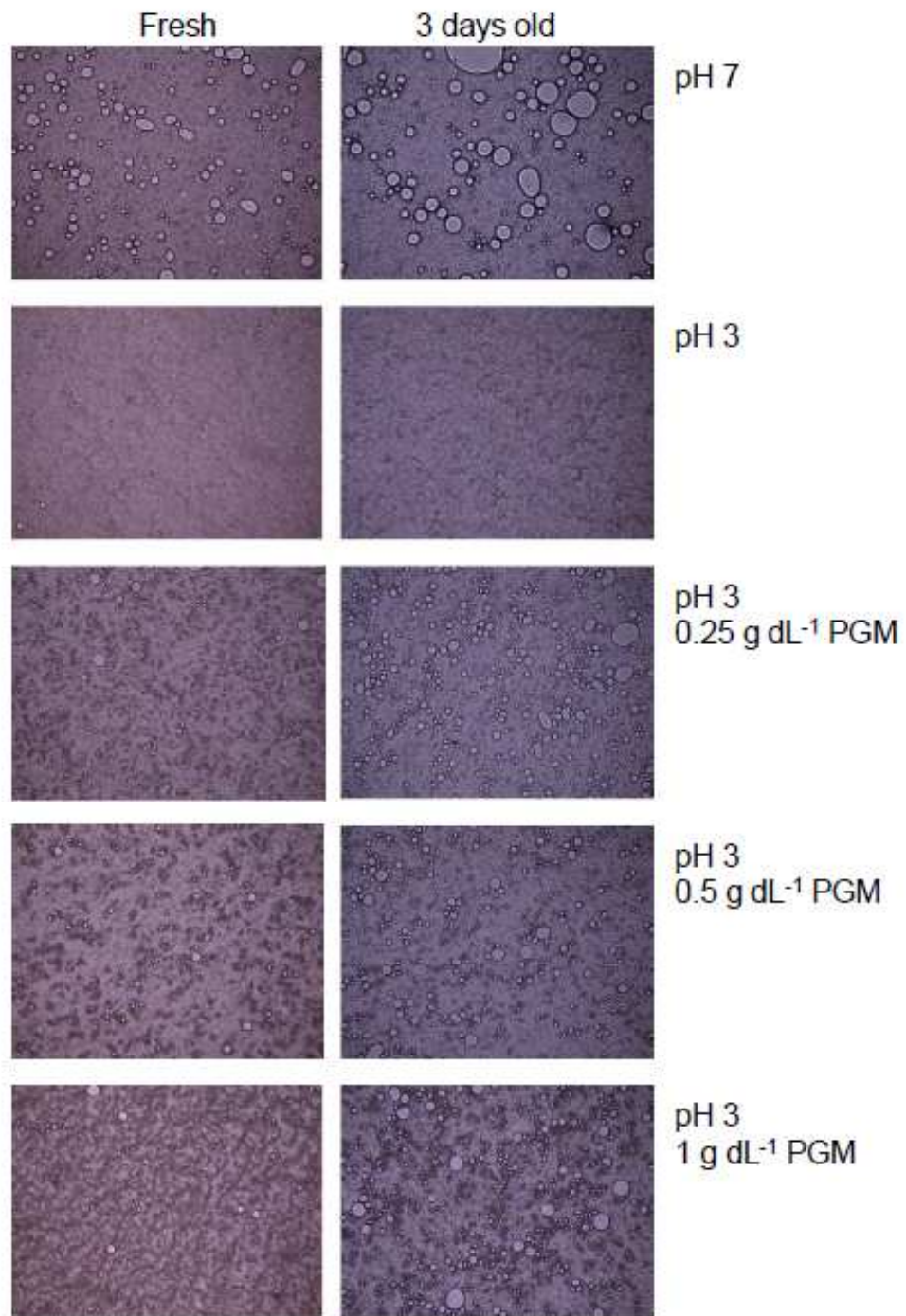
(σχήμα 12), η κροκίδωση είναι εκτεταμένη ενώ μερικές σταγόνες έχουν συγχωνευθεί και δεν παρατηρείται κίνηση Brown.



**Σχήμα 12.** Κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων που περιέχουν σταθερή περιεκτικότητα 0.75% w/w HBSS και διαφορετική συγκέντρωση σε PGM σε pH 3 τρεις μέρες μετά την παρασκευής τους.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε pH 3 τα δύο πολυμερή έχουν ίδιο φορτίο πράγμα που καθιστά αδύνατη την δημιουργία ηλεκτροστατικών συμπλόκων. Άρα υπάρχουν δύο πιθανά σενάρια. Αρχικά η πρωτεΐνη ως αμφίφιλο πολυμερές, να είναι επιφανειοδραστικότερη από το HBSS και καταλαμβάνει τη θέση στη διεπιφάνεια. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης όλο και περισσότερη ποσότητα HBSS δεν μπορεί να προσροφηθεί. Αυτή η ποσότητα πολυσακχαρίτη που δεν έχει προσροφηθεί προκαλεί οσμωτική κροκίδωση κατά την οποία μόρια του HBSS απομακρύνονται από μια στενή περιοχή γύρω από τα σταγονίδια. Αντίθετα με τη συνεχή φάση στην οποία υπάρχουν μόρια κολλοειδούς, στη συγκεκριμένη περιοχή η συγκέντρωσή τους είναι μηδενική. Με αυτόν τον τρόπο ευνοείται η μεταφορά μορίων του διαλύτη στην συνεχή φάση και τα σταγονίδια πλησιάζουν μεταξύ τους (McClements 2000). Δεύτερον το HBSS να είναι αυτό που προσροφάται και η PGM να προκαλεί την αποσταθεροποίηση ή να ανταγωνίζεται με την PGM για μια θέση στην διεπιφάνεια και να εκτοπίζει από αυτήν μερικά μόρια πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση για μια καλύτερη

κατανόηση του συστήματος θα μπορούσε μετά την αποκορύφωση να ληφθεί δείγμα από τον διαχωρισμένο ορό και να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ώστε να διαπιστωθεί εάν τα μόρια της βρίσκονται στην διεπιφάνεια ή στη συνεχή φάση.



**Σχήμα 13.** Φωτογραφίες από μικροσκόπιο γαλακτωμάτων που περιέχουν 0.75% w/w HBSS και PGM 0-1% w/w, από αριστερά τα φρέσκα γαλακτώματα και δεξιά 3 ημέρες μετά την παρασκευή τους.

### 5.3 Πηκτές

Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η μεταβολή βάρους των πηκτών κατά τη διάρκεια των κύκλων ψύξης-απόψυξης.

**Πίνακας 2.** Βάρος δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	0ΚΥΚΛΟΙ	1ΚΥΚΛΟΙ	2ΚΥΚΛΟΙ	6ΚΥΚΛΟΙ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΒΑΡΟΥΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΕΙΩΣΗΣ ΒΑΡΟΥΣ (%)
1A	80.375	77.695	80.29	72.32	8.055	10.02
1B	71.02	64.013	70.204	55.679	15.341	21.60
2A	80.522	80.436	80.469	63.548	16.974	21.08
2B	82.308	82.116	81.241	71.479	10.829	13.16
3A	79.661	79.626	79.276	63.611	16.05	20.15
3B	80.17	79.905	79.288	67.547	12.623	15.75
8A	75.66	75.638	75.567	65.234	10.426	13.78
8B	73.875	73.863	73.844	57.317	16.558	22.41
8Γ	78.531	75.343	78.236	63.132	15.399	19.61
4A	115.234	110.06	115.235	113.276	1.958	1.70
4B	104.176	102.658	104.116	102.281	1.895	1.82
5A	80.287	77.803	79.949	67.435	12.852	16.01
5B	79.79	73.968	79.699	55.116	24.674	30.92
6A	77.926	70.409	77.259	76.79	1.136	1.46
6B	77.373	76.759	76.701	75.304	2.069	2.67
6Γ	75.884	64.302	74.484	72.971	2.913	3.84
6Δ	79.83	79.609	79.579	78.514	1.316	1.65
7A	78.236			78.111	0.125	0.16
7B	78.618			78.198	0.42	0.53
7Γ	71.918			68.431	3.487	4.85
7Δ	80.647			73.418	7.229	8.96



Η απώλεια βάρους των δειγμάτων κατά την εναλλαγή των κύκλων πιθανόν να οφείλεται στο χειρισμό των δειγμάτων αλλά και σε συρρίκνωση και εξάτμιση του διαλύματος. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ρεολογικής μελέτης των μιγμάτων του HBSS.

**Πίνακας 3.** Ρεολογικά δεδομένα μιγμάτων πολυσακχαρίτη

ΔΕΙΓΜΑ	G' (Pa)	tan δ	n* (Pas)	γ (10 <sup>-5</sup> )
8	101.9	3.753	1327	2.609
7	324.1	0.8475	1533	1.226
1	883.8	0.9006	10610	1.756
2	301.2	0.831	3374	2.977
3	669.5	7.308	9523	2.270
4	775.9	2.731	27360	1.625
5	390.8	3.786	71650	2.577

Τα δείγματα του μάρτυρα εμφανίζονται να έχουν την πιο αδύνατη δομή και παρουσιάζουν τον πιο έντονο χαρακτήρα υγρού από όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν όπως προκύπτει από τη τιμή της εφαπτομένης της γωνίας δ (tanδ) που είναι εξαιρετικά υψηλή για το μάρτυρα, από τη τιμή του μιγαδικού ιξώδους(η\*) που είναι πολύ μικρή όπως επίσης και από τη τιμή του συντελεστή ελαστικότητας(G') που είναι η μικρότερη από όλα τα δείγματα. Τα δείγματα της ομάδας 2 παρουσιάζονται να είναι πολύ πιο συνεκτικά από εκείνα της ομάδας 5 όπως φαίνεται τόσο από τη τιμή του συντελεστή G' όσο και της tanδ. Στη περίπτωση του δείγματος της ομάδας 3 σε σύγκριση με το δείγμα της ομάδας 7 τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ενώ εμφανίζει μικρότερη τιμή του G' σε σχέση με αυτή του δείγματος 7 πράγμα που σημαίνει ότι είναι λιγότερο συνεκτικό από το δείγμα 7 εν τούτοις εμφανίζεται να έχει χαρακτήρα στερεού σε μεγαλύτερο βαθμό από το δείγμα 7 γιατί η τιμή tanδ είναι μικρότερη από αυτή του δείγματος 7 το οποίο εμφανίζει πιο ιξώδη χαρακτήρα. Σε παρόμοια αποτελέσματα οδηγεί και η σύγκριση μεταξύ του δείγματος 6 και του δείγματος 14. Το δείγμα 14 εμφανίζει χαρακτήρα περισσότερο στερεού από ότι το δείγμα 6 παρόλο που η τιμή G' είναι χαμηλότερη από

εκείνη του 6 επειδή η τιμή  $\tan \delta$  που εμφανίζει είναι μικρότερη από εκείνη του 6 που έχει περισσότερο ιξώδη χαρακτήρα. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν από τη σύγκριση του δείγματος 7 με το δείγμα 14. Στη περίπτωση αυτή ο ιξώδης χαρακτήρας του δείγματος είναι περισσότερο έντονος από αυτόν του 6 όπως δείχνουν οι τιμές τόσο της εφαπτομένης της γωνίας  $\delta$  όσο και του μιγαδικού ιξώδους. Αναφορικά με τη σύγκριση των δειγμάτων 3 και 6 τα πειραματικά δεδομένα οδηγούν στη διαπίστωση ότι το δείγμα έχει σε μεγαλύτερο βαθμό τον χαρακτήρα του στερεού από ότι το δείγμα 6 άσχετα αν το δείγμα 6 εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή  $G'$  από ότι το δείγμα 3 γιατί το 3 έχει μικρότερη τιμή  $\tan \delta$  από ότι το 6 που επιπλέον εμφανίζει και μεγαλύτερη τιμή μιγαδικού ιξώδους.

Στον πίνακα 4 δίνονται τα αποτελέσματα της μακροσκοπικής παρατήρησης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μόνο τα δείγματα της ομάδας 6 είναι πηγμένα. Επιπλέον, σε όλα τα δείγματα όπου προστέθηκε  $K_2SO_4$  υπήρξε διαχωρισμός φάσεων, σε αντίθεση με την προσθήκη  $KSCN$  όπου δεν υπήρξε διαχωρισμός. Η συγκέντρωση του HBSS φαίνεται να επηρεάζει την πήξη καθώς τα δείγματα που περιείχαν τον πολυσακχαρίτη σε συγκέντρωση 2% w/w ήταν υγρά, σε αντίθεση με αυτά όπου η συγκέντρωση ήταν 4% w/w, τα οποία ήταν πιο πηχτά. Κατά την μακροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων φαίνεται πως τα δείγματα της ομάδας 13 είναι πηχτά και πηγμένα στο κέντρο χωρίς να υπάρχει διαχωρισμός φάσεων παρουσιάζοντας χαρακτήρα στερεού. Τα χαρακτηριστικά αυτά δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα της ρεολογίας όπου τα δείγματα αυτά χαρακτηρίζονται ως υγρά. Στην περίπτωση των δειγμάτων της ομάδας 2 τα αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι υγρά προς πηχτά ενώ τα ρεολογικά του χαρακτηριστικά παρουσιάζονται ως συνεκτικά. Τα δείγματα της ομάδας 3 παρουσιάζονται να είναι υγρά ενώ στην περίπτωση της ρεολογίας έχουν χαρακτήρα στερεού. Τα δείγματα της ομάδας 5 παρουσιάζονται ως υγρά και στην ρεολογία χαρακτηρίζονται ως όχι πολύ συνεκτικά. Τα δείγματα της ομάδας 6 εμφανίζονται να είναι πηγμένα πράγμα που σημαίνει ότι έχουμε σχηματισμό πηκτής καλύτερο από τα υπόλοιπα δείγματα και ως προς την ρεολογία έχουν ιξώδη χαρακτήρα. Τα δείγματα της ομάδας 7 παρουσιάζονται ως πηχτά και έχουν ιξώδη χαρακτήρα ως προς την ρεολογία. Τέλος τα δείγματα της ομάδας 11 χαρακτηρίζονται ως υγρά. Η ρεολογία και η μακροσκοπική παρατήρηση δίνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα που μπορεί να

οφείλονται στη φύση των δειγμάτων που μετρήθηκαν ρεολογικά (απώλεια δείγματος και άρα πολύ μικρό πάχος ή μη λεία επιφάνεια, άρα αδυναμία σωστής επαφής κεφαλής ταλάντωσης με το δείγμα)

**Πίνακας 4.** Μακροσκοπική παρατήρηση πηκτών

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
1Α	-	ΥΓΡΟ	-	ΠΗΧΤΟ
1Β	-	ΥΓΡΟ	-	ΠΗΧΤΟ
2Α	+	ΥΓΡΟ	+	ΥΓΡΟ
2Β	++	ΠΗΓΜΕΝΟ	++	ΥΓΡΟ
3Α	-	ΥΓΡΟ	-	ΥΓΡΟ
3Β	-	ΥΓΡΟ	-	ΥΓΡΟ
8Α	-	ΠΗΧΤΟ Κ ΠΗΓΜΕΝΟ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟ		
8Β	-	ΠΗΧΤΟ Κ ΠΗΓΜΕΝΟ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟ		
8Γ	-	ΠΗΧΤΟ Κ ΠΗΓΜΕΝΟ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟ		
4Α	++	ΠΗΓΜΕΝΟ	++	ΠΗΓΜΕΝΟ
4Β	++	ΠΗΓΜΕΝΟ	++	ΠΗΓΜΕΝΟ
5Α	-	ΠΗΧΤΟ	-	ΠΗΧΤΟ
5Β	-	ΠΗΧΤΟ	-	ΠΗΧΤΟ
6Α	ΛΙΓΟ+	ΥΓΡΟ	+	ΥΓΡΟ
6Β	ΛΙΓΟ+	ΥΓΡΟ	+	ΥΓΡΟ
6Γ	ΛΙΓΟ+	ΥΓΡΟ	+	ΥΓΡΟ
6Δ	ΛΙΓΟ+	ΥΓΡΟ	+	ΥΓΡΟ
7Α	-	ΠΗΧΤΟ	-	ΠΗΧΤΟ
7Β	-	ΠΗΧΤΟ	-	ΠΗΧΤΟ
7Γ	-	ΠΗΧΤΟ	-	ΠΗΧΤΟ
7Δ	-	ΠΗΧΤΟ	-	ΠΗΧΤΟ

## 6. Συμπεράσματα

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της PGM και του HBSS σε υδατικά διαλύματα έδειξε ότι δεν είναι δυνατή η δημιουργία ηλεκτροστατικών συμπλόκων λόγω του φορτίου των βιοπολυμερών οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι μεταξύ των μορίων υπάρχει θερμοδυναμική ασυμβατότητα. Η χρήση του HBSS για τη δημιουργία γαλακτωμάτων δεκαεξανίου σε νερό είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό σταθερού γαλακτώματος σε pH 3, σε αντίθεση με τα γαλακτώματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως γαλακτωματοποιητής μίγμα PGM HBSS και εμφανίζονται από την αρχή κροκιδωμένα. Επιπλέον σε pH 7 το HBSS δεν κατάφερε να δημιουργήσει σταθερό γαλάκτωμα. Το σχεδόν μηδενικό φορτίο των γαλακτωμάτων HBSS σε pH 3 αποδεικνύει ότι η σταθεροποίηση είναι στερεοχημική. Παράλληλα η κροκίδωση των γαλακτωμάτων που περιείχαν και πρωτεΐνη είναι πιθανό να είναι οσμωτική λόγω μορίων που δεν κατάφεραν να προσροφηθούν στην διεπιφάνεια. Παρόλα αυτά δεν μπορούμε να πούμε με σιγουριά αν την κροκίδωση προκαλεί η πρωτεΐνη ή ο πολυσακχαρίτης. Σαν γενικό συμπέρασμα στο σχηματισμό των πηκτών παρατηρήθηκε ότι δεν επιτεύχθηκε η πήξη των διαλυμάτων. Επιπλέον οι συνθήκες που φαίνεται να επηρέασαν την πήξη των διαλυμάτων ήταν το είδος του άλατος και η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη. Συγκεκριμένα το άλας που ήταν αναμενόμενο να οδηγήσει σε σχηματισμό πηκτής ήταν το KSCN, ενώ τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα που είχαν πιο στερεό χαρακτήρα ήταν αυτά που περιείχαν  $K_2SO_4$ . Επίσης τα δείγματα που περιείχαν τον πολυσακχαρίτη σε συγκέντρωση 2% ήταν υγρά συγκριτικά με αυτά που περιείχαν 4%. Τέλος τα αποτελέσματα της μακροσκοπικής παρατήρησης και της ρεολογίας είναι αντικρουόμενα πράγμα που είναι πιθανό να οφείλεται στη φύση των δειγμάτων.

## 7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Μέτρηση διεπιφανειακής τάσης των γαλακτωμάτων HBSS σε pH 3 και 7 ώστε να διαπιστωθεί εάν όντως το HBSS προσροφάται στην διεπιφάνεια καθώς και μελέτη της διεπιφανειακής ρεολογίας.
- Μέτρηση του πάχους του στρώματος που προσροφάται στη διεπιφάνεια.
- Μελέτη της ηλεκτροφοριστικής κινητικότητας του HBSS με SDS-PAGE. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη που βρίσκεται στο HBSS είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το μόριο του πολυσακχαρίτη ή αν απλά παραλαμβάνεται με την εκχύλιση και επιμολύνει τον πολυσακχαρίτη.
- Μελέτη της συμπεριφοράς των γαλακτωμάτων HBSS σε προσομοιωμένες συνθήκες του γαστρικού συστήματος με αραίωση τους σε διάλυμα PGM.
- Μελέτη της θερμοδυναμικής ασυμβατότητας του συστήματος HBSS PGM και σχεδιασμός διφασικής καμπύλης.
- Φυγοκέντριση των γαλακτωμάτων HBSS PGM και προσδιορισμός ολικού αζώτου του διαχωρισμένου ορού για να αποδειχθεί αν η πρωτεΐνη είναι αυτή που προκαλεί την κροκίδωση.
- Μελέτη σχηματισμού πηκτών HBSS με την προσθήκη σακχάρων.
- Μελέτη της συνεργιστικής δράσης άλλων πολυσακχαριτών ή πρωτεϊνών με το HBSS στη δημιουργία πηκτών.
- Επανεξέταση της μεθόδου παρασκευής δειγμάτων πηκτών (π.χ. στεγανοί περιέκτες), για να αντιμετωπιστεί η ασυμφωνία μακροσκοπικής παρατήρησης – ρεολογίας.
- Καθαρισμός του μορίου του HBSS από την πρωτεΐνη με τη βοήθεια ενζύμων και μελέτη σχηματισμού πηκτών και γαλακτωμάτων.

## 8. Βιβλιογραφία

- McClements, D.J. (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173-177.
- Watson A. D., Barker G. C., Robins M. M. (2005). Sedimentation in bidisperse and polydisperse. *Colloid and Interface Science*, 286, 176-186.
- Robins M. M. (2000). Emulsion creaming – phenomena. *Current opinion in Colloid and Interface Science*, 5, 265-272.
- Burguera J. L., Burguera M. (2012). Analytical applications of emulsions and microemulsions. *Talanta*, 96, 11-20.
- Georgiadis N., Ritzoulis C., Charchari E., Koukiotis C., Tsiptsias C., Vasiliadou C. (2012). Isolation, characterization and emulsion stabilizing properties of polysaccharides from orchid roots (salep). *Food Hydrocolloids*, 28, 68-74.
- Dickinson E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.
- Dickinson E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482.
- Bouyer E., Mekhloufi G., Le Potier I., du Fou de Kerdaniel T., Grossiord J-L., Rosilio V., Angely F., (2011). Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by  $\beta$ -lactoglobulin and gum Arabic, 354, 467-477.
- Nakauma M., Funami T., Noda S., Ishihara S., Al-Assaf S., Nishinari K., Philips G. O. (2008). Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum Arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 22, 1254-1267.
- Garti N., Reichman D. (1994). Surface properties and emulsification activity of galactomannans. *Food Hydrocolloids*, 8, 155-173.

- Garti N., Madar Z., Aserin A., Sternheim B. (1997). Fenugreek Galactomannans as Food Emulsifiers, 30, 305-311.
- Garti N., Slavin Y., Aserin A. (1999). Surface properties of a new gum extracted from *Portulaca oleracea* L. *Food Hydrocolloids*, 13, 145-155.
- Fechner A., Knoth A., Sherze I., Muschciolik G. (2007). Stability and release properties of double-emulsions stabilized by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, 21, 943-952.
- Wooster T. J., Augustin M. A. (2006).  $\beta$ -Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303, 564-572.
- Al-Hakkak J., Al-Hakkak F. (2010). Function egg white-pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 100, 152-159.
- Shi L., Miller C., Caldwell K. D., Valint P. (1999). Effect of mucin addition on the stability of oil-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 303-312.
- Vingerhoeds M. H., Blijdenstein T. B. J., Zoet F. D., van Aken G. A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva mucin. *Food Hydrocolloids*, 19, 915-922.
- Vingerhoeds M. H., Silletti E., de Groot J., Schipper R. J., van Aken G. A. (2009). Relating the effect of saliva-induced emulsion flocculation on rheological properties and retention on the tongue surface with sensory perception. *Food Hydrocolloids*, 23, 773-785.
- Ritzoulis C., Siasios S., Melikidou K. D., Koukiotis C., Vasiliadou C., Lolakos S. (2012). Interaction between pig gastric mucin and sodium caseinate in solutions and in emulsions. *Food Hydrocolloids*, 29, 382-388.



- Rodriguez Patino J.M, Pilosof, A.M.R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*,25,1925-1937.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robin, G.W., de Kruif, C.G. (2004). Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550-3555.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., de Kruif, C.G. (2003).Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Guzey, D., McClements, D.J. (2006). Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 124-131.
- Perrechil, F.A., Cunha, R.L. (2012). Development of multiple emulsions based on the repulsive interaction between sodium caseinate and LBG. *Food Hydrocolloids*, 26, 126-134.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.
- Frith, W.J. (2010). Mixed biopolymer aqueous solutions - phase behavior and rheology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 161, 48-60.
- Alonso-Sande M., Teijeiro-Osorio D., Remuñán-López C., Alonso M.J. (2009). Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 453–462.
- Liu Y., Vrana N. E., Cahill P. A., McGuinness G. B. (2009). Physically Crosslinked Composite Hydrogels of PVA With Natural Macromolecules: Structure, Mechanical Properties, and Endothelial Cell Compatibility. *Appl Biomater* 90B: 492–502.

- Ngoenkama J., Faikruab A., Yasothornsrikulc S., Viyocha J. (2010). Potential of an injectable chitosan/starch/ $\alpha$ -glycerol phosphate hydrogel for sustaining normal chondrocyte function. *International Journal of Pharmaceutics*, 391, 115–124.
- Elisseeff J., Puleo C., Yang F., Sharma B. (2005). Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod Craniofacial Res* 8, 150–161.
- Hamoudeh M., Anas Kamleh M., Diab R., Fessi H. (2008). Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1329–1346.
- Nguyen M.K., Lee D. S. (2010). Injectable Biodegradable Hydrogels. *Macromol. Biosci.*, 10, 563–579.
- Truong W. T., Su Y., Meijer J. T., Thordarson P., Braet F. (2011). Self-Assembled Gels for Biomedical Applications. *Chem. Asian J.*, 6, 30–42.
- Vinatier C., Guicheuxa J., Daculsi G., Layrolle P., Weiss P. (2006). Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 16, S107–S113.
- Ye Z. , Zhou Y., Cai H., Tan W. (2011). Myocardial regeneration: Roles of stem cells and hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* xxx (2011) xxx–xxx.
- Braudo E. E., Plashchina I. G., Semenova M. G., Yuryev V. P. (1998). Structure formation in liquid solutions and gels of polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 12, 253-261.
- Coviello T., Matricardi P., Marianecchi C., Alhaique F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119, 5–24.
- Ruel-Gariepy E., Leroux J.-C. (2004). In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 409–426.
- Alonso-Sande M., Teijeiro-Osorio D., Remuñán-López C., Alonso M.J. (2009). Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 453–462.
- Nishinar K., Zhang H., Ikeda S. (2000). Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 195-201.

- Nishinari K., Takahashi R. (2003). Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8 , 396–400.
- Doyle J.P. , Giannouli P. , Martin E.J. , Brooks M. , Morris E.R. (2006). Effect of sugars, galactose content and chainlength on freeze–thaw gelation of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 64, 391–401.
- Lazaridou A., Biliaderis C.G. (2004). Cryogelation of cereal b-glucans: structure and molecular size effects. *Food Hydrocolloids*, 18, 933–947.
- Lozinsky V. I., Damshkaln L. G., Kurochkin I. N., Kurochkin I. I. (2008). Study of Cryostructuring of Polymer Systems: 28. Physicochemical Properties and Morphology of Poly(vinyl alcohol) Cryogels Formed by Multiple Freezing–Thawing. *Colloid Journal*, Vol. 70, No. 2, pp. 189–198.
- Nishinaria K., Zhang H. (2004). Recent advances in the understanding of heat set gelling polysaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 305–312.
- Lawal O. S. (2009). Specific Ions Effect on Emulsions, Foams, and Gels of a Seed Protein. *Food Biophysics*, 4, 347–352.
- Herranz B. , Tovar C. A. , Solo-de-Zaldívar B. , Borderias A. J. (2012). Effect of alkalis on konjac glucomannan gels for use as potential gelling agents in restructured seafood products. *Food Hydrocolloids*, 27, 145-153.
- Yin W. , Zhang H. , Huang L. , Nishinari K. (2008). Effects of the lyotropic series salts on the gelation of konjac glucomannan in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 74, 68–78.
- Guzey D., McClements D. J. (2006). Characterization of b-lactoglobulin–chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 2, 124–131.
- Crouzier T., Boudou T., Picart C. (2010). Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 417–426.