



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

**Σταθερότητα και κροκίδωση γαλακτωμάτων σε ένα απλό
μοντέλο του πεπτικού συστήματος**

**Emulsion Flocculation and Stability in a Simple *in Vitro*
Gastrointestinal Model**

ΡΟΥΣΗ ΖΩΗ

ΑΤΕΙΘ 2013

**Σταθερότητα και κροκίδωση γαλακτωμάτων σε ένα απλό
μοντέλο του πεπτικού συστήματος**

Ρούση Ζωή

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

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

Εισηγητής: Ριζούλης Χρήστος

Εξεταστική επιτροπή: Δημητρέλη Γεωργία

Καραγεωργίου Βασίλειος

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή μου κ. Ριτζούλη Χρήστο για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια του, τον κ. Παναγιώτη Καραγιαννακίδη .

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση των συνθηκών που επικρατούν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα στη σταθερότητα ενός γαλακτώματος ελαιολάδου-σε-νερό το οποίο είναι σταθεροποιημένο με BSA σε pH 7. Κύριος σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης της χοίρειας γαστρικής μυξίνης σε συνθήκες που προσομοιώνουν το γαστρικό περιβάλλον, εφόσον αρχικά εξετάστηκαν οι φυσικοχημικές μεταβολές που υφίσταται το γαλάκτωμα υπό γαστρικές συνθήκες (pH 3, υψηλή ιοντική ισχύ) απουσία μυξίνης. Έτσι λοιπόν δημιουργήθηκε ένα μοντέλο που προσομοιώνει τη διαδρομή που ακολουθεί ένα γαλάκτωμα μετά την είσοδο του στο στόμα και την κατάποση του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μετάβαση του γαλακτώματος από το στόμα στο στομάχι οδηγεί στην ισχυρή κροκίδωση του γαλακτώματος λόγω της μεταβολής του pH (7→3) αλλά και της υψηλής ιοντικής ισχύος που επικρατεί στο γαστρικό περιβάλλον. Αντίθετα, η παρουσία της χοίρειας γαστρικής μυξίνης (PGM) στο προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα φαίνεται να ενισχύει τη σταθερότητα του, ελέγχοντας το επίπεδο της κροκίδωσης μέσω της ηλεκτροστατικής της αλληλεπίδρασης με την ήδη προσροφημένη στη διεπιφάνεια BSA.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	2
2.1. Γαλακτώματα	2
2.1.1.Αλβουμίνη Βοείου Ορού (BSA).....	3
2.1.2.Σταθερότητα γαλακτωμάτων.....	4
2.1.3.Επίδραση του pH και της ιοντικής ισχύος στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων	6
2.2. Αλληλεπιδράσεις βιοπολυμερών σε διαλύματα και γαλακτώματα	8
2.2.1.Αλληλεπιδράσεις βιοπολυμερών σε διαλύματα	8
2.2.2.Αλληλεπιδράσεις βιοπολυμερών σε γαλακτώματα.....	10
2.3. Φυσικοχημικές αλλαγές των γαλακτωμάτων κατά την έκθεση τους στις στοματικές και γαστρικές συνθήκες.....	12
2.3.1.Στοματικές συνθήκες	12
2.3.2.Γαστρικές συνθήκες.....	15
2.4. Μυξίνη.....	18
3. Σκοπός.....	20
4. Πειραματικό Μέρος.....	21
4.1. Υλικά και μέθοδοι.....	21
4.1.1.Υλικά	21
4.1.2.Όργανα.....	21
4.2. Μέθοδοι	22
4.2.1.Αλληλεπιδράσεις υδατικών διαλυμάτων BSA και PGM σε γαστρικές συνθήκες.....	22
4.2.2.Παρασκευή και έκθεση γαλακτώματος σε στοματικές και γαστρικές συνθήκες.....	23
4.2.3.Παρασκευή προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος και διαλύματος σιέλου	24
5. Αποτελέσματα	25
6. Συμπεράσματα.....	33
7. Βιβλιογραφία.....	35

1. Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες που σχετίζονται με την επίδραση διαφόρων συνθηκών που εφαρμόζονται κατά την επεξεργασία των γαλακτωμάτων (π.χ. θερμοκρασία, υψηλή πίεση κ.α.) στις ιδιότητες τους (π.χ. τις ρεολογικές τους ιδιότητες, την κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων, τη σταθερότητα των φάσεων κ.α.) (Sarkar et al., 2009a). Πρόσφατα όμως διαπιστώθηκε ότι υπάρχει περιορισμένη κατανόηση ως προς τις αλληλεπιδράσεις των γαλακτωμάτων σε φυσιολογικές συνθήκες *in vivo* (Sarkar et al., 2010). Γενικότερα, όταν καταναλώνεται ένα τρόφιμο εκτίθεται σε ένα μεγάλο εύρος φυσικών (π.χ. ανάδευση και θερμοκρασία) και βιοχημικών (π.χ. αραίωση, pH, ένζυμα, χολικά άλατα κτλ) συνθηκών καθώς διέρχεται από το στόμα στο στομάχι και από εκεί στο έντερο (Sarkar et al., 2009 (b)). Σε μία προσπάθεια να γίνουν κατανοητές οι φυσικοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στα τρόφιμα κατά την κατανάλωση τους, έχουν σχεδιαστεί λιγότερο ακριβές και χρονοβόρες *in vitro* μεθοδολογίες προκειμένου να προσομοιώσουν τις συνθήκες που επικρατούν στα διάφορα στάδια της γαστρεντερικής οδού. Αυτά τα συστήματα παρέχουν καλύτερη κατανόηση για το πώς τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας και η μικροδομή των κολλοειδών συστημάτων επηρεάζουν την πέψη και τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (Sarkar et al., 2010).

Η μυξίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που περιέχεται στο εκκρινόμενο σάλιο στο στόμα σε συγκέντρωση 30-500 $\mu\text{g/ml}$ σιέλου (Sarkar et al., 2009a) αλλά και στα εκκρινόμενα γαστρικά υγρά του στομάχου. Μέχρι σήμερα, έχει βρεθεί ότι η παρουσία της στο στόμα επηρεάζει τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την ανάμιξη τους με προσομοιωμένο ή φυσικό ανθρώπινο στοματικό διάλυμα. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το πώς τα γαλακτώματα που είναι σταθεροποιημένα με διάφορες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τη γαστρική μυξίνη όταν εκτίθενται στο γαστρικό περιβάλλον (Singh., 2011). Αυτό είναι και το κύριο αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, στην οποία εξετάζονται οι φυσικοχημικές μεταβολές που μπορεί να υποστεί ένα γαλάκτωμα σταθεροποιημένο με BSA κατά την έκθεση του σε προσομοιωμένες γαστρικές συνθήκες απουσία και παρουσία μυξίνης.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1. Γαλακτώματα

Ως γαλάκτωμα μπορεί να οριστεί η διασπορά ενός μερικώς αναμίξιμου υγρού, σε ένα άλλο μερικώς αναμίξιμο υγρό, με τη μορφή σταγονιδίων, η διάμετρος των οποίων είναι συνήθως μεταξύ 0,1 και 100μm. Μεταξύ των δύο φάσεων υπάρχει ένα διεπιφανειακό στρώμα, το οποίο μπορεί να καταληφθεί από επιφανειοδραστικές ουσίες. Τα γαλακτώματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός τουλάχιστον πολικού υδρόφιλου υγρού και ενός λιπόφιλου υγρού, όπου στην απλούστερη περίπτωση αυτά είναι το νερό και το λάδι. Συνήθως, ένα γαλάκτωμα χαρακτηρίζεται ως γαλάκτωμα ελαίου-σε-νερό (O/W) ή νερού-σε-έλαιο (W/O), όπου η πρώτη φάση αποτελεί την διασπαρμένη φάση και η δεύτερη τη συνεχή φάση (Singh et al., 2009).

Στη βιομηχανία τροφίμων, τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό παρασκευάζονται με τη χρήση ομογενοποιητών υψηλής πίεσης, οι οποίοι προκαλούν τη διάσπαση των σταγονιδίων μέσω της ταυτόχρονης εφαρμογής ανατάραξης και έντονης διαμητρικής ροής. Την ίδια στιγμή, ο γαλακτωματοποιητής προσροφάται στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού, σχηματίζοντας ένα στρώμα σταθεροποίησης στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Στα τρόφιμα που βρίσκονται υπό μορφή γαλακτώματος, το πιο σημαντικό λειτουργικό συστατικό είναι ο γαλακτωματοποιητής, καθώς οι ιδιότητες της διεπιφάνειας ελαίου-νερού καθορίζουν τη σταθερότητα και τη συμπεριφορά των γαλακτωμάτων κατά την επεξεργασία τους (Nik et al., 2011). Η προσεκτική επιλογή του γαλακτωματοποιητή δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθούν οι διεπιφανειακές ιδιότητες όπως, το ηλεκτρικό φορτίο, το πάχος της διεπιφάνειας, οι ρεολογικές ιδιότητες και η συμπεριφορά του γαλακτώματος στις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον όπου εκτίθεται (όπως pH, ιονική ισχύ, θερμοκρασία και ενζυμική δραστηριότητα) (McClements et al., 2010).

Οι γαλακτωματοποιητές είναι αμφίφιλα μόρια, δηλαδή φέρουν υδρόφοβες και υδρόφιλες ομάδες στο μόριο τους και τείνουν να κατανέμονται μεταξύ της ελαιώδους και της υδατικής φάσης σύμφωνα με τη σχετική διαλυτότητα τους σε αυτές, όπου συνήθως εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε μία από τις

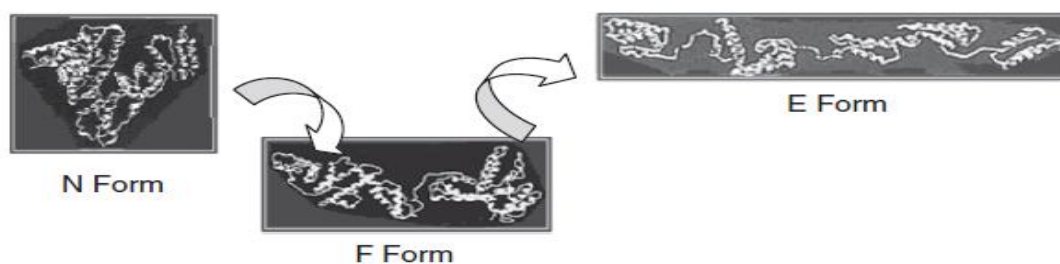
δύο φάσεις (Singh et al., 2009). Οι πιο συνηθισμένοι γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είναι αμφίφιλες πρωτεΐνες, τασιενεργές ουσίες μικρού μοριακού βάρους ή ο συνδυασμός πολυμερών και τασιενεργών ουσιών (Nik et al., 2011). Οι πρωτεΐνες προσροφώνται αυθόρμητα στις διεπιφάνειες ελαίου-νερού και αέρα-νερού. Η κύρια κινητήρια δύναμη είναι η απομάκρυνση των μη πολικών πλευρικών αλυσίδων του πολυμερούς μακριά από το μη ευνοϊκό περιβάλλον του υδατικού διαλύματος. Κατά τη διάρκεια της προσρόφησης μειώνεται η θερμοδυναμική ενεργότητα (δηλ. η συγκέντρωση) των μορίων του νερού στην περιοχή της διεπιφάνειας. Η κύρια συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια από την προσρόφηση των πρωτεϊνών έχει εντροπικό χαρακτήρα, καθώς η διαδικασία περιλαμβάνει την αντικατάσταση των διατεταγμένων μορίων νερού από το μη ευνοϊκό περιβάλλον της ελεύθερης επιφάνειας. Η δεύτερη κινητήρια δύναμη σχετίζεται με το ξεδίπλωμα του μορίου της πρωτεΐνης κατά την προσρόφηση. Αυτό οδηγεί σε μία επιπλέον αλλαγή στην ισορροπία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης- πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-νερού (Dickinson., 2011).

2.1.1. Αλβουμίνη Βοείου Ορού (BSA)

Η Αλβουμίνη Βοείου Ορού (BSA) συντίθεται στο ήπαρ των θηλαστικών, έχοντας χρόνο ημιζωής 19 ημέρες, αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος, συνεισφέρει κατά 80% στην κολλοειδή οσμωτική πίεση του αίματος και διατηρεί το pH του (Guo et al., 2011). Η BSA βρίσκεται στον ορό του αίματος και του γάλακτος, είναι σφαιρική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 66kDa και η δομή της αποτελείται κυρίως από α-έλικες, 17 δισουλφιδικές γέφυρες και μία ελεύθερη θειόλη. Επίσης, αποτελεί έναν φυσικό φορέα μικρών μορίων στο αίμα και περιέχει τρεις περιοχές που ειδικεύονται στη δέσμευση ιόντων, λιπών και νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, λόγω της ικανότητας της να δεσμεύει μικρά μόρια, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές στα τρόφιμα και στα φάρμακα για τη μεταφορά βιοενεργών ενώσεων και ενώσεων που προάγουν την υγεία. (Livney., 2010).

Η διαμόρφωση της δομής του μορίου της BSA εξαρτάται σημαντικά από το pH. Σε ουδέτερο pH, η διαμόρφωση της δομής της έχει σχήμα “καρδιάς” - μορφή “N” ενώ σε χαμηλότερο pH, και συγκεκριμένα κάτω από 4, η BSA

υιοθετεί τη μορφή *fast* “F” και για τιμές pH χαμηλότερες του 3 τη μορφή *expanded* “E” (Guo et al., 2011).



Σχήμα 1. Μοριακή απεικόνιση των ισομερών της BSA (Jachimska & Pajor., 2012).

Η BSA χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής για την παρασκευή γαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό. Οι Rangsansarid & Fukada (2007), μελέτησαν την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως η συγκέντρωση της BSA, το pH και η ιοντική ισχύς στη σταθερότητα γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό, σταθεροποιημένο με BSA. Παρατηρήθηκε ότι σε pH 6,7 και σε συγκεντρώσεις BSA μεγαλύτερες του 1g/l, μειώνεται η επιφανειακή τάση του συστήματος, παρασκευάζονται σταθερότερα γαλακτώματα με μικρότερα μεγέθη σταγονιδίων, ιδιαίτερα όταν το κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης είναι μικρό, και η επίδραση υψηλών τιμών ιοντικής ισχύος δεν είναι σημαντική. Σταθερά γαλακτώματα επιτυγχάνονται και σε άλλες τιμές pH, μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο της BSA (pH: 3,5, 4,5, 9,0), όπου οι ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των σταγονιδίων είναι ισχυρές, ενώ στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pH 5), λόγω της απουσίας φορτίου επέρχεται η συγχώνευση των σταγονιδίων και η αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος.

2.1.2. Σταθερότητα γαλακτωμάτων

Οι φυσικοχημικές αρχές που κυριαρχούν προκειμένου ένα γαλάκτωμα να είναι σταθερό βασίζονται στις κλασικές θεωρίες της ηλεκτροστατικής και της στερεοχημικής σταθεροποίησης, κατάλληλα εφαρμοσμένες έτσι ώστε να επιτρέπουν την παρουσία τασιενεργών ουσιών και/ή πρωτεϊνών στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Η ηλεκτροστατική σταθεροποίηση επέρχεται από την παρουσία ηλεκτρικών φορτίων στην επιφάνεια των σταγονιδίων ή συχνότερα από το φορτίο του προσροφημένου στη διεπιφάνεια των

σταγονιδίων στρώματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η πυκνότητα του φορτίου και όσο χαμηλότερη είναι η ιοντική ισχύς του υδατικού μέσου, τόσο πιο σταθερό είναι το γαλάκτωμα. Η στερεοχημική σταθερότητα προέρχεται από την παρουσία ενός πολυμερικού (στερεοχημικού) φράγματος στην επιφάνεια της σταγόνας. Για να αποδοθεί σταθερότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα, το προσροφημένο πολυμερές θα πρέπει να βρίσκεται σε επαρκή συγκέντρωση για να καλύψει πλήρως τη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Επιπλέον, το στρώμα του πολυμερούς θα πρέπει να μείνει μονίμως συνδεδεμένο στη διεπιφάνεια, με κάποια μέρη του μορίου να προεξέχουν από την επιφάνεια, προσανατολισμένα στην υδατική φάση. Στην περίπτωση των γαλακτωμάτων που είναι σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες, η συμβολή της ηλεκτροστατικής και της στερεοχημικής κατανομής εξαρτάται από τη δομή της πρωτεΐνης και το pH του διαλύματος (Dickinson., 2010)

Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα και έτσι μπορεί να διαχωριστούν σε ξεχωριστές φάσεις μετά από ένα σύντομο χρονικό διάστημα. Γι' αυτό το λόγο, στην πράξη η κινητική της σταθερότητας των γαλακτωμάτων είναι σημαντική. Τα γαλακτώματα μπορεί να αποσταθεροποιηθούν εξαιτίας διαφόρων τύπων φυσικών και χημικών διαδικασιών. Οι κύριες φυσικές διεργασίες αποσταθεροποίησης είναι η συγχώνευση, η κρέμωση και η κροκίδωση, ενώ η χημική αποσταθεροποίηση περιλαμβάνει αλλαγή στη σύνθεση των σταγονιδίων, όπως οξείδωση των λιπιδίων και υδρόλυση ή αλλαγή στη σύνθεση του διεπιφανειακού στρώματος.

Η συγχώνευση αναφέρεται στην αύξηση του μεγέθους των σταγονιδίων μέσω της συνένωσης των σταγονιδίων, και το φαινόμενο αυτό μπορεί βαθμιαία να οδηγήσει στο διαχωρισμό των φάσεων. Αυτή η διαδικασία είναι συνήθως μη αντιστρεπτή. Η κροκίδωση προκύπτει όταν τα σταγονίδια συγκρούονται και ενώνονται μεταξύ τους, ως αποτέλεσμα της μη ισορροπίας μεταξύ των ελκτικών και των απωστικών δυνάμεων (Singh et al., 2009). Κατά την κροκίδωση η συνένωση των σταγονιδίων γίνεται χωρίς τη διάσπαση του προστατευτικού διεπιφανειακού στρώματος. Η κροκίδωση γεφύρωσης κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης συμβαίνει μέσω της κατανομής των μορίων μίας πρωτεΐνης ή των συμπλόκων αυτής μεταξύ δύο ή περισσότερων

γειτονικών σταγονιδίων, καθώς η ποσότητα της πρωτεΐνης που είναι διαθέσιμη κατά τη γαλακτωματοποίηση δεν είναι επαρκής για να καλύψει πλήρως την επιφάνεια των σταγονιδίων. Επίσης μπορεί να συμβεί και μετά τη γαλακτωματοποίηση λόγω ελκτικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ της πρωτεΐνης και ενός άλλου μακρομορίου πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη (Dickinson., 2010).

Η οσμωτική κροκίδωση συμβαίνει λόγω της παρουσίας ενός βιοπολυμερούς στη συνεχή φάση του γαλακτώματος, το οποίο δεν προσροφάται και μπορεί να προκαλέσει τη συνένωση των σταγόνων του ελαίου μέσω της διαβάθμισης της οσμωτικής πίεσης στη συνεχή φάση που περιβάλλει τα σταγονίδια. Εάν το προστιθέμενο πολυμερές είναι είτε μη προσροφημένο ή ελάχιστα προσροφημένο, τότε απομακρύνεται από την περιοχή, μεταξύ των δύο σταγονιδίων. Έτσι, η συγκέντρωση στην υδατική φάση μεταξύ των σταγονιδίων είναι μικρότερη από αυτή στο συνολικό διάλυμα, με αποτέλεσμα την οσμωτική ανισορροπία. Οι δεσμοί που σχηματίζονται κατά την οσμωτική κροκίδωση είναι ασθενείς, ευέλικτοι και αντιστρεπτοί (Singh et al., 2009).

2.1.3. Επίδραση του pH και της ιοντικής ισχύος στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων

Οι πρωτεΐνες μπορούν να προσφέρουν τις επιθυμητές λειτουργικές τους ιδιότητες σε προϊόντα τα οποία έχουν ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών τιμών pH και ιοντικής ισχύος (McClements., 2004). Επιπλέον, όταν ένα γαλάκτωμα που είναι σταθεροποιημένο με πρωτεΐνη εισέλθει στο στόμα και από εκεί στο στομάχι και στα έντερα, υφίσταται μεταβολή στο pH και την ιοντική ισχύ (Singh., 2009). Το διεπιφανειακό στρώμα που σχηματίζεται συνήθως από τις πρωτεΐνες είναι λεπτό και ηλεκτρικά φορτισμένο, επομένως ο κύριος μηχανισμός που παρεμποδίζει την κροκίδωση στα γαλακτώματα που είναι σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες είναι η ηλεκτροστατική άπωση και όχι τόσο η στερεοχημική (McClements., 2004). Έτσι, η σταθερότητα των γαλακτωμάτων επηρεάζεται ιδιαίτερα από το pH και τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών. Σε χαμηλές τιμές pH, οι αμινομάδες είναι θετικά φορτισμένες ($-NH_3^+$) και οι καρβοξυλικές ομάδες είναι ουδέτερες ($-COOH$), ενώ σε υψηλές τιμές pH οι αμινομάδες είναι ουδέτερες και οι καρβοξυλομάδες είναι αρνητικά φορτισμένες ($-COO^-$). Επομένως, σε $pH < pI$, ο συνολικός αριθμός των $-NH_3^+$

είναι μεγαλύτερος από αυτόν των $-COOH$, ενώ σε $pH > pI$ συμβαίνει το αντίθετο (Tokle & McClements., 2011), με αποτέλεσμα όταν το pH βρίσκεται μακριά από pI των πρωτεϊνών, το ηλεκτρικό φορτίο των σταγονιδίων να αυξάνεται και να ενισχύεται η σταθερότητα τους ενάντια στη συσσωμάτωση καθώς οι ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των σταγονιδίων είναι αρκετά μεγάλες και υπερσχύουν των ελκτικών αλληλεπιδράσεων (Kulmyrzaev et al., 2000). Στο ισοηλεκτρικό σημείο ($pH = pI$), επέρχεται ισορροπία μεταξύ των θετικά και αρνητικά φορτισμένων ομάδων με αποτέλεσμα το φορτίο της πρωτεΐνης να είναι μηδέν (Tokle & McClements., 2011).

Τα ιόντα των ηλεκτρολυτών στη συνεχή φάση επηρεάζουν τη συσσωμάτωση των σταθεροποιημένων με πρωτεΐνες σταγονιδίων με διάφορους τρόπους. Μειώνουν τις ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των σταγονιδίων μέσω της εξουδετέρωσης του ηλεκτρικού φορτίου. Μπορούν να δεσμευτούν σε αντίθετα φορτισμένες ομάδες στην επιφάνεια των σταγονιδίων του γαλακτώματος, μειώνοντας έτσι την τιμή του ζ-δυναμικού με αποτέλεσμα τη μείωση των ηλεκτροστατικών απώσεων. Επιπλέον, η δέσμευση των ιόντων μπορεί να αυξήσει το εύρος των απωστικών δυνάμεων ενυδάτωσης μεταξύ των σταγονιδίων, φαινόμενο το οποίο μπορεί να αντισταχθεί στη συσσωμάτωση των σταγονιδίων. Τέλος, μεγάλες συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών μπορεί να αλλάξουν τη δομική οργάνωση του νερού, το οποίο μεταβάλλει στη συνέχεια την έκταση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μη πολικών ομάδων. Επομένως, η σταθερότητα των σταγονιδίων που είναι σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες έναντι της κροκίδωσης, εξαρτάται από το σθένος και το μέγεθος των ιόντων, τα ηλεκτροστατικά χαρακτηριστικά στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων και τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο εκτίθενται (Kulmyrzaev et al., 2000). Οι Kulmyrzaev et al (2000) έδειξαν ότι γαλακτώματα σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες ορού γάλακτος αποσταθεροποιούνται παρουσία $CaCl_2$ όταν το pH του γαλακτώματος είναι κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης, και κυρίως πάνω από αυτό, καθώς τα πολυσθενή ιόντα, εδώ τα δισθενή ιόντα Ca^{2+} , είναι πιο αποτελεσματικά στο να εξουδετερώνουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και να δεσμεύονται στις αντίθετα φορτισμένες επιφάνειες σε αντίθεση με τα μονοσθενή. Για γαλακτώματα σταθεροποιημένα με λακτοφερίνη η επίδραση

της ιοντικής ισχύος μελετήθηκε με προσθήκη NaCl και CaCl₂ σε pH 3, 6 και 9 και παρατηρήθηκε ότι σημαντικό ρόλο στη κροκίδωση του γαλακτώματος παίζει το φορτίο του γαλακτώματος η συγκέντρωση των αλάτων αλλά και το σθένος των αντισταθμιστικών ιόντων στη συνεχή φάση. Στην περίπτωση του NaCl, η σταθερότητα των γαλακτωμάτων επηρεάστηκε μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις σε pH 6, ενώ όταν προστέθηκε CaCl₂ παρατηρήθηκε κροκίδωση σε pH 9 (pH>ρI) η οποία αποδόθηκε στην παρουσία των δισθενών κατιόντων Ca. (Tokle & McClements., 2011).

2.2. Αλληλεπιδράσεις βιοπολυμερών σε διαλύματα και γαλακτώματα

2.2.1. Αλληλεπιδράσεις βιοπολυμερών σε διαλύματα

Όταν δύο αναλύτες συνυπάρχουν σε ένα διάλυμα, η πιθανότητα να υπάρξει διαχωρισμός φάσεων καθορίζεται από το εάν η ελεύθερη ενέργεια ανάμιξης είναι θετική ή αρνητική, όπου εάν είναι θετική τότε το μίγμα των διαλυμάτων θα έχει την τάση να διαχωριστεί σε δύο φάσεις. Η ελεύθερη ενέργεια ανάμιξης κατά Gibbs δίνεται από το συνδυασμό της ενθαλπίας και της εντροπίας ανάμιξης:

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix}$$

Γενικότερα, η ΔH_{mix} είναι θετική και έτσι ευνοείται ο διαχωρισμός δύο αναλυτών σε ένα διάλυμα, παρόλα αυτά για αναλύτες μικρού μοριακού βάρους, η ΔS_{mix} είναι συνήθως αρκετά υψηλή και θετική και έτσι οι δύο αναλύτες αναμιγνύονται. Αυτό όμως δεν συμβαίνει όταν οι αναλύτες είναι πολυμερή όπου η ΔS_{mix} είναι αρκετά μικρότερη και έτσι ο όρος ΔH_{mix} κυριαρχεί. Ως αποτέλεσμα, είναι φυσιολογικό για δύο πολυμερικούς αναλύτες σε ένα κοινό διαλύτη να διαχωρίζονται και είναι γενικότερα πιο σπάνιο για τον όρο ΔH_{mix} να είναι επαρκώς ευνοϊκός έτσι ώστε να σχηματιστεί μία φάση και να είναι επαρκής ώστε τα δύο πολυμερή να σχηματίζουν σύμπλοκα. Για τα πολυμερή που φέρουν φορτισμένες ομάδες στη δομή τους, η πιθανότητα να υπάρξουν ευνοϊκές ή μη ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο διαφορετικών πολυμερών σε ένα διάλυμα εξαρτάται από το φορτίο και το μέγεθος του φορτίου των δύο πολυμερών. Όταν δύο πολυμερή δεν είναι φορτισμένα ή έχουν παρόμοιο φορτίο τότε το σύστημα τείνει να διαχωριστεί

σε δύο φάσεις, ενώ όταν τα δύο πολυμερή φέρουν αντίθετο φορτίο, τότε υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πολυμερών και σχηματίζονται σύμπλοκα τα οποία είτε δημιουργούν μία ξεχωριστή φάση είτε καθιζάνουν (Frith, 2010).

Οι θερμοδυναμικά μη ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως αποτέλεσμα της επίδρασης του πεπερασμένου όγκου του μορίου, που διέπεται από το φυσικό όγκο που καταλαμβάνεται από ένα μόριο βιοπολυμερούς ο οποίος δεν είναι προσβάσιμος από άλλα μόρια βιοπολυμερών, και τις ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των όμοια φορτισμένων λειτουργικών ομάδων των βιοπολυμερών.

Η φύση της αλληλεπίδρασης, δηλ ο σχηματισμός συμπλόκων ή ο διαχωρισμός, αλλά και η έκταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο ανόμοιων πολυμερών εξαρτάται σημαντικά από τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο εκτίθενται (pH, ιοντική ισχύ, θερμοκρασία) αλλά και από τη διαθεσιμότητα και την κατανομή των λειτουργικών ομάδων των δύο πολυμερών. Καθώς τα πολυμερή είναι ηλεκτρολύτες, οι ηλεκτροστατικές απώσεις και η συμβολή των αντισταθμιστικών ιόντων στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, περιλαμβάνονται στους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις των πολυμερών και επομένως τη σταθερότητα των διαλυμάτων τους έναντι στο διαχωρισμό των φάσεων. Ο βαθμός στον οποίο το ηλεκτρικό φορτίο του πολυμερούς μπορεί να επηρεάσει τις ηλεκτρικές απώσεις Coulomb εξαρτάται από το πόσο μακριά είναι το ισοηλεκτρικό σημείο του πολυμερούς από το pH του διαλύματος και κατά πόσο η ιοντική ισχύς του διαλύματος μπορεί να επιφέρει την εξουδετέρωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Στην πραγματικότητα, όταν και τα δύο πολυμερή φέρουν το ίδιο φορτίο, τότε αμφότερα η μείωση του pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των πολυμερών και η αύξηση της ιοντικής ισχύος, θα μπορούσαν είτε να μειώσουν την ένταση των θερμοδυναμικά μη ευνοϊκών απωστικών αλληλεπιδράσεων, είτε να τροποποιήσουν δραστικά τον χαρακτήρα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο πολυμερών από απωστικές σε ελκτικές.

Οι θερμοδυναμικά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις (η αμοιβαία έλξη) θα μπορούσαν να υποκινούνται είτε από τις άμεσες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις (σύμπλεξη), είτε από την έμμεση εντροπική συνεισφορά από τα αντισταθμιστικά ιόντα ή από τα μόρια του νερού. Η σύμπλεξη είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων λειτουργικών ομάδων των βιοπολυμερών, όπου όταν η πυκνότητα του φορτίου είναι χαμηλή σχηματίζονται διαλυτά σύμπλοκα, ενώ αντίθετα η καθίζηση (ή η κροκίδωση των συμπλόκων) και/ή η πήξη, συμβαίνουν όταν η πυκνότητα του φορτίου είναι υψηλή και η μοριακή αναλογία των πολυμερών στο μίγμα είναι ίση. Η έμμεση εντροπική συνεισφορά από την παρουσία των αντισταθμιστικών ιόντων είναι χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός ιονικού και ενός μη ιονικού βιοπολυμερούς και μπορεί να αυξηθεί με τη αύξηση του φορτίου του ιονικού βιοπολυμερούς (Semenova, 2007).

2.2.2. Αλληλεπιδράσεις βιοπολυμερών σε γαλακτώματα

Τα γαλακτώματα που είναι σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες μπορούν να περιέχουν έναν ή περισσότερους τύπους βιοπολυμερών στη συνεχή φάση. Αυτά τα βιοπολυμερή μπορεί να είναι ένα κλάσμα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε ως γαλακτωματοποιητής και δεν προσροφήθηκε στην επιφάνεια των σταγονιδίων ή άλλα λειτουργικά συστατικά (McClements, 2004). Επίσης, τα γαλακτώματα όταν καταναλώνονται αναμιγνύονται με τα εκκρινόμενα στοματικά και γαστρικά υγρά στα οποία περιέχονται μεταξύ άλλων συστατικών και βιοπολυμερή, όπως η μυξίνη (Singh et al., 2011). Αυτά τα βιοπολυμερή μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα ή έμμεσα με την πρωτεΐνη που είναι προσροφημένη στη διεπιφάνεια και να επηρεάσουν τη σταθερότητα του γαλακτώματος μέσω διαφόρων μηχανισμών (McClements, 2004).

Έτσι, στην περίπτωση όπου ένα δεύτερο πολυμερές προστεθεί σε ένα κολλοειδές σύστημα που είναι σταθεροποιημένο με κάποιο άλλο πολυμερές, μπορεί να λάβουν χώρα φαινόμενα όπως: η αντικατάσταση του ήδη προσροφημένου πολυμερούς από το δεύτερο, η προσρόφηση του πολυμερούς στη διεπιφάνεια και η δημιουργία ενός δεύτερου στρώματος,

κροκίδωση γεφύρωσης στην περίπτωση όπου το δεύτερο πολυμερές προσροφάται σε περισσότερα από ένα σταγονίδια ή οσμωτική κροκίδωση στην περίπτωση που το δεύτερο πολυμερές δεν προσροφάται και παραμένει στη συνεχή φάση.

Στην περίπτωση όπου το δεύτερο πολυμερές έχει αντίθετο φορτίο από το πρώτο, τότε τα κολλοειδή σωματίδια τείνουν να καλυφθούν μερικώς ή πλήρως από ένα δεύτερο στρώμα πολυμερούς, ως αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών ελκτικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων μορίων των δύο πολυμερών, με πιθανό αποτέλεσμα την κροκίδωση των μορίων και την αποσταθεροποίηση του συστήματος. Έτσι, η σταθερότητα κάθε κολλοειδούς συστήματος τέτοιου τύπου εξαρτάται από την ισορροπία που υπάρχει μεταξύ δύο κύριων αντιτιθέμενων παραγόντων: της στερεοχημικής προστασίας του πολυμερούς που διατηρεί σταθερό το σύστημα και των ηλεκτροστατικών ελκτικών δυνάμεων που οδηγούν στην κροκίδωση (Che & Dickinson., 1995).

Οι Ritzoulis et al (2012), έδειξαν ότι η σταθερότητα των γαλακτωμάτων που είναι σταθεροποιημένα με καζεϊνικό νάτριο επηρεάζεται από την παρουσία της PGM. Συγκεκριμένα η παρουσία της PGM σε pH 3, όπου τα δύο πολυμερή φέρουν αντίθετο φορτίο, είχε ως αποτέλεσμα την κροκίδωση του γαλακτώματος μέσω του μηχανισμού της γεφύρωσης λόγω των ελκτικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της προσροφημένης πρωτεΐνης στο διεπιφανειακό στρώμα των σταγονιδίων ελαίου και της PGM, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH (pH>5), όπου οι δύο πρωτεΐνες φέρουν υψηλό αρνητικό φορτίο παρατηρείται οσμωτική κροκίδωση. Οι Dickinson & Pawlowsky (1998) έδειξαν ότι γαλακτώματα ελαίου-σε-νερό σταθεροποιημένα με BSA παρουσία κ-καραγενάνης παρουσιάζουν κροκίδωση μέσω του μηχανισμού της γεφύρωσης. Η κροκίδωση του γαλακτώματος οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες παρατηρήθηκαν και στα υδατικά διαλύματα των δύο πολυμερών, και εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη και από το pH του συστήματος, όπου σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της BSA οι αλληλεπιδράσεις είναι πιο ισχυρές και η κροκίδωση επέρχεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις του πολυσακχαρίτη.

2.3. Φυσικοχημικές αλλαγές των γαλακτωμάτων κατά την έκθεση τους στις στοματικές και γαστρικές συνθήκες

2.3.1. Στοματικές συνθήκες

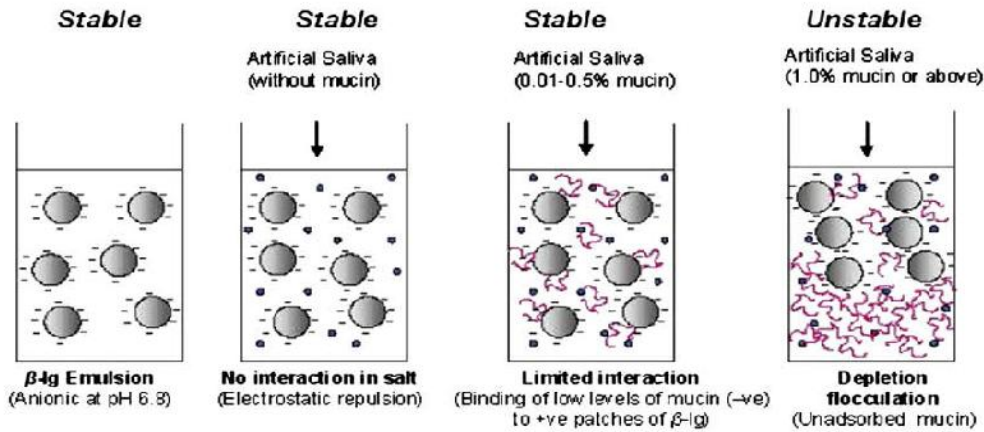
Η κατανόηση της επεξεργασίας που υφίστανται τα γαλακτώματα στη στοματική κοιλότητα είναι πολύ σημαντική για την καλύτερη μεταχείριση των φυσικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των κολλοειδών συστημάτων τροφίμων, όπως είναι η σταθερότητα των γαλακτωμάτων, η κρέμωση και η απελευθέρωση του αρώματος (Sarkar et al., 2009 (a); Singh & Sarkar., 2011). Όταν ένα γαλάκτωμα καταναλώνεται, παραμένει για ένα μικρό χρονικό διάστημα στο στόμα. Κατά την παραμονή του εκεί, αναμιγνύεται με σάλιο και αέρα, ψύχεται ή θερμαίνεται (37°C) και υπόκειται σε μεταβολή του pH (6-7) και της ιοντικής ισχύος (Hur et al., 2009; Sarkar et al., 2009 (a); Sarkar et al., 2010; Singh et al., 2009; Singh & Sarkar., 2011; Vingerhoeds et al., 2005). Αν και τα γαλακτώματα παραμένουν στο στόμα για μικρό χρονικό διάστημα, προσβάλλονται από διάφορα ένζυμα του σιέλου (αμυλάσες), πολυμερή όπως η μυξίνη, πρωτεΐνες της βλεννογόνου και άλατα διαφορετικής ιοντικής ισχύος, έρχονται σε επαφή με τις επιφάνειες της στοματικής κοιλότητας και εκτίθενται σε πολύπλοκα προφίλ ροής (Sarkar et al., 2009 (a); Sarkar et al., 2010; Singh et al., 2009; Singh & Sarkar., 2011).

Στο στόμα η συμπεριφορά των γαλακτωμάτων που είναι σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες, υποκινείται σημαντικά από τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των συστατικών του σιέλου και του προσροφημένου στρώματος των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Αυτή η συμπεριφορά έχει μελετηθεί με την ανάμιξη ανθρώπινου ή προσομοιωμένου σιέλου με γαλακτώματα που έχουν σταθεροποιηθεί με πρωτεΐνες ή τασιενεργές ουσίες. Οι μέχρι τώρα μελέτες, έχουν δείξει ότι όταν ένα γαλακτώματα αναμιγνύεται με το σάλιο προκαλείται κροκίδωση η οποία επηρεάζεται από το φορτίο των σταγονιδίων και την παρουσία αλάτων και βιοπολυμερών του σιέλου (Singh & Sarkar., 2011; Vingerhoeds et al., 2005; Sarkar et al., 2009 (a); Silletti et al., 2007 (a); Silletti et al., 2007(b)).

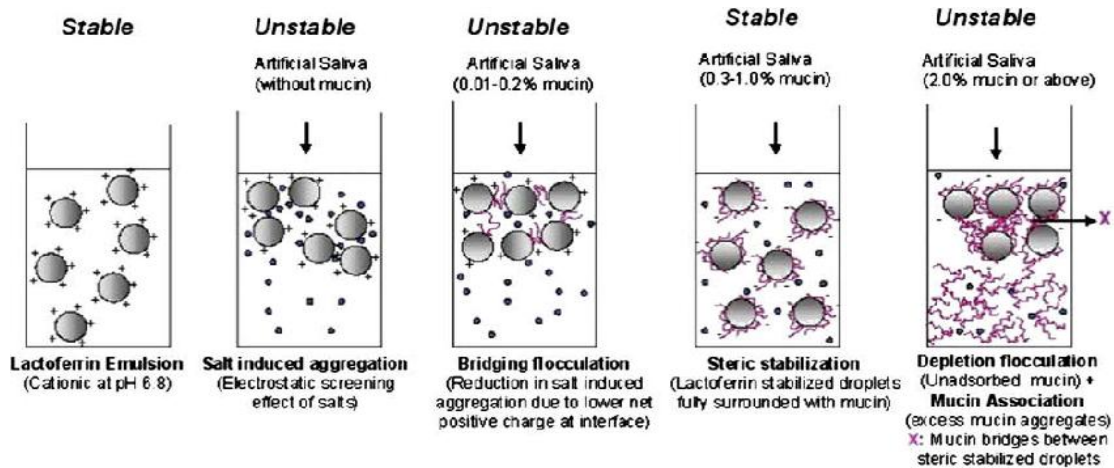
Η κροκίδωση των γαλακτωμάτων αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία της μυξίνης του σιέλου. Η μυξίνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο εξαιτίας

του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο περιβάλλον (Sarkar et al., 2009 (a)). Κατά την ανάμιξη σιέλου που εκκρίνεται από την παρωτίδα, στο οποίο περιέχεται ελάχιστη μυξίνη, με γαλακτώματα παρατηρήθηκε κροκίδωση γεφύρωσης, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η κροκίδωση των γαλακτωμάτων μπορεί να οφείλεται και σε άλλα συστατικά του σιέλου, όπως στα άλατα του σιέλου ή σε πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη, τα οποία με την παρουσία τους ενισχύουν την κροκίδωση (Vingerhoeds et al., 2005; Singh & Sarkar., 2011; Singh., 2011). Η κροκίδωση των γαλακτωμάτων στη στοματική κοιλότητα θεωρείται ότι υποκινείται από δυνάμεις εκκένωσης, δυνάμεις van der Waals και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του διεπιφανειακού στρώματος των σταγονιδίων και των πρωτεϊνών του σιέλου (Singh & Sarkar., 2011; Silletti et al., 2007).

Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την ανάμιξη τους με το σάλιο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το φορτίο που φέρουν τα σταγονίδια του γαλακτώματος. Τα γαλακτώματα που φέρουν υψηλό αρνητικό φορτίο δεν παρουσιάζουν κροκίδωση καθώς οι ηλεκτροστατικές απώσεις παρεμποδίζουν τα σταγονίδια να πλησιάσουν μεταξύ τους. Γαλακτώματα που είναι ελαφρώς αρνητικά φορτισμένα ή ουδέτερα υφίστανται αντιστρεπτή οσμωτική κροκίδωση, λόγω της παρουσίας της μυξίνης και τη συγκέντρωση στην οποία βρίσκεται στο σύστημα ή συμπλόκων που σχηματίζονται στο σάλιο. Τέλος, στα θετικά φορτισμένα γαλακτώματα παρατηρείται κροκίδωση γεφύρωσης, μέσω της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ των πρωτεϊνών του σιέλου και των φορτισμένων σταγονιδίων του γαλακτώματος (Silletti et al., 2007 (b); Singh., 2011). Έτσι, η κροκίδωση των γαλακτωμάτων στο στόμα ενδέχεται να επηρεάσει την υφή, τις ρεολογικές και τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (Vingerhoeds et al., 2005). Παρακάτω, στα σχήματα 2 και 3, παρουσιάζονται οι μεταβολές που υφίσταται ένα κατιονικό και ένα ανιονικό γαλακτώμα όταν εκτίθενται στις στοματικές συνθήκες.



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολών που υφίσταται ένα κατιονικό γαλάκτωμα, που είναι σταθεροποιημένο με β-λακτογλοβουλίνη, το οποίο εκτίθεται σε στοματικό περιβάλλον απουσία και παρουσία μυξίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (Sarkar et al., 2009a).



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολών που υφίσταται ένα ανιονικό γαλάκτωμα, που είναι σταθεροποιημένο με λακτοφερίνη, το οποίο εκτίθεται σε στοματικό περιβάλλον απουσία και παρουσία μυξίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (Sarkar et al., 2009a).

Μετά από μερικά δευτερόλεπτα παραμονής στο στόμα, ακολουθεί η κατάποση του γαλακτώματος. Η κατάποση περιλαμβάνει την ενσωμάτωση του γαλακτώματος στην κίνηση της γλώσσας, του φάρυγγα, του οισοφάγου και του στομάχου (Singh et al., 2009).

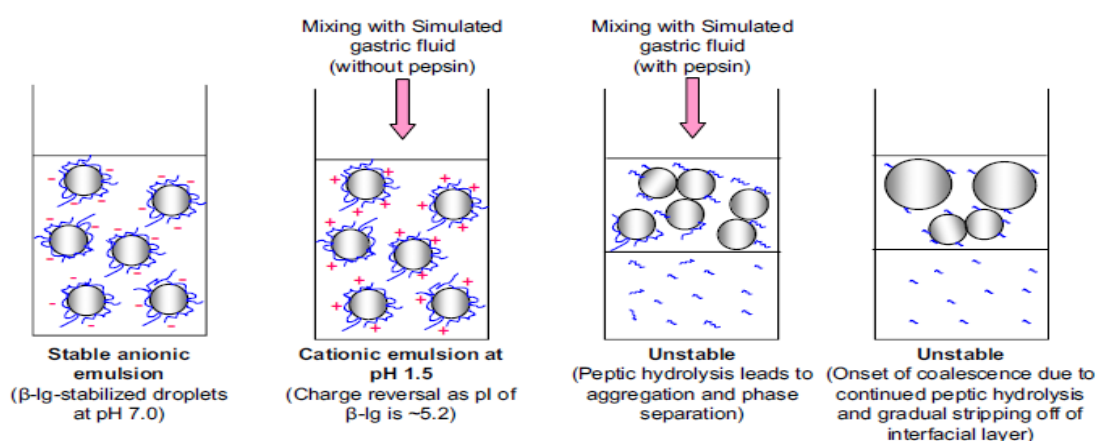
2.3.2. Γαστρικές συνθήκες

Μόλις ένα τρόφιμο διέλθει στο στομάχι, μπορεί να παραμείνει εκεί για ένα μικρό χρονικό διάστημα (από λίγα λεπτά, μέχρι λίγες ώρες) ανάλογα με τη φύση του τροφίμου (χημική σύνθεση, μέγεθος, σχήμα, μικροδομή, pH, ιοντική ισχύ, ρεολογικές ιδιότητες κτλ) (Sarkar et al., 2009 (b)). Στο στομάχι τα λιπίδια που βρίσκονται στο βλωμό εκτίθενται σε ισχυρά όξινο περιβάλλον (pH 1-3), υπόκεινται σε υδρόλυση από τα ένζυμα (πεψίνη και γαστρική λιπάση) και σε πολύπλοκη ροή λόγω των διαφορετικών δομών και της περισταλτικής κίνησης του στομάχου, με αποτέλεσμα να αλλάζει η χημική και η δομική τους οργάνωση (Hur et al., 2009; Sarkar et al., 2009b; Sarkar et al., 2010; Singh et al., 2009; Singh & Sarkar., 2011).

Στο στομάχι, είναι πιθανό να υπάρχουν τασιενεργές ουσίες που προέρχονται από τα εκκρινόμενα γαστρικά υγρά (μυξίνη, ένζυμα) ή από άλλα μερικώς πεπτούμενα τρόφιμα (πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, ένζυμα) τα οποία ανταγωνίζονται και μπορεί να αντικαταστάσουν τις επιφανειοδραστικές ουσίες που βρίσκονται στη επιφάνεια των λιπαρών σταγονιδίων, αλλάζοντας έτσι τη σύνθεση και τις ιδιότητες της διεπιφάνειας τους (Hur et al., 2009; Singh et al., 2009). Η παρουσία τασιενεργών ουσιών επιβεβαιώνεται από τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης των υγρών που εκκρίνονται από το ανθρώπινο στομάχι, η οποία βρέθηκε να είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του καθαρού νερού (Singh et al., 2009).

Τα γαλακτώματα που είναι σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες αναμένεται να υποστούν μεγάλες αλλαγές στο στομάχι εξαιτίας της πιθανής δράσης της πεψίνης στο προσροφημένο στρώμα, την επίδραση του χαμηλού pH και της ιοντικής ισχύος στο φορτίο των σταγονιδίων και την αλληλεπίδραση της μυξίνης με την πρωτεΐνη στη διεπιφάνεια. Η υδρόλυση του διεπιφανειακού στρώματος από την πεψίνη είναι ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας για τον καθορισμό της σταθερότητας των γαλακτωμάτων που είναι σταθεροποιημένα με πρωτεΐνες κατά την έκθεση τους στο γαστρικό περιβάλλον (Singh., 2011). Γαλακτώματα που σταθεροποιήθηκαν με β- λακτογλοβουλίνη και λακτοφερίνη κατά την έκθεση τους σε προσομοιωμένες γαστρικές συνθήκες και παρουσία πεψίνης, υφίστανται κροκίδωση και σε κάποιο βαθμό συγχώνευση. Η

αποσταθεροποίηση αυτή αποδίδεται στην υδρόλυση του προσροφημένου στρώματος από την πεψίνη, με αποτέλεσμα την απώλεια του θετικού φορτίου της επιφάνειας των σταγονιδίων και τη μείωση του πάχους του στρώματος (Sarkar et al., 2009b; Sarkar et al., 2010). Έτσι, τα πεπτίδια που παραμένουν στη διεπιφάνεια μετά την πρωτεόλυση δεν είναι ικανά να παρέχουν επαρκείς ηλεκτροστατικές απώσεις και/ή στερεοχημική σταθερότητα (Sarkar et al., 2010). Επίσης, αναφέρεται ότι η υψηλή συγκέντρωση των αλάτων ενισχύει την κροκίδωση που υφίστανται τα γαλακτώματα (Sarkar et al., 2009b).



Σχήμα 2. Σχηματικό διάγραμμα της αλληλεπίδρασης του σταθεροποιημένου γαλακτώματος με β - λακτογλοβουλίνη με το προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα (SGF), παρουσία και απουσία πεψίνης. Οι μακριές ελικοειδείς δομές αντιπροσωπεύουν τη β -lg, ενώ οι μικρότερες τα πεπτίδια που σχηματίστηκαν αργότερα (Sarkar et al., 2009b).

Επιπλέον εκτός από την πεψίνη, η παρουσία και άλλων επιφανειοδραστικών ουσιών επηρεάζουν την υδρόλυση των πρωτεϊνών και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων κατά την πέψη. Για παράδειγμα, η α-λακταλβουμίνη υδρολύεται με πιο αργό ρυθμό παρουσία της φωσφατιδυλοχολίνης κατά τη διάρκεια της γαστρικής πέψης. Η παρουσία της φωσφατιδυλοχολίνης δεν επηρεάζει την υδρόλυση της β - λακταλβουμίνης κατά την έκθεση της σε γαστρικές συνθήκες, αλλά παρέχει προστασία ενάντια στην πρωτεόλυση από την τρυψίνη και τη χυμοτριψίνη (που απαντώνται στο λεπτό έντερο). Επιπλέον, αναφέρεται ότι οι πρωτεΐνες που προσροφώνται στη διεπιφάνεια αντικαθίστανται από τη φωσφατιδυλοχολίνη κατά τη διάρκεια της γαστρικής πέψης και ότι τα σύμπλοκα πρωτεΐνες – φωσφατιδυλοχολίνης

που σχηματίζονται στο διάλυμα μεταβάλλουν την ευαισθησία της β-λακτογλοβουλίνης και της β-καζεΐνης στην υδρόλυση (Nik et al., 2011).

Στο στομάχι, η δράση της γαστρικής λιπάσης επιφέρει αλλαγές στο εσωτερικό των σταγονιδίων καθώς και στο διεπιφανειακό στρώμα όπου προσροφάται (Singh et al., 2009). Έτσι, η χημική διάσπαση των λιπιδίων (τριγλυκερίδια) ξεκινάει από το στομάχι, όπου τα γαλακτοποιημένα λίπη υδρολύονται μερικώς από τη γαστρική λιπάση, η οποία συνεισφέρει κατά 10-30% επί της συνολικής υδρόλυσης των πεπτόμενων τριγλυκεριδίων ενός ενήλικα (Hur et al., 2009; Sarkar et al., 2010; Singh., 2011). Η λιπάση μπορεί να δράσει με αποτέλεσμα την παραγωγή επιφανειοδραστικών λιπαρών οξέων και μονογλυκεριδίων από το υδρόφοβο κέντρο των λιπιδίων. Μερικά από αυτά τα συστατικά μπορούν να ανταγωνιστούν και να αντικαταστήσουν, μερικώς ή πλήρως, τον αρχικό γαλακτωματοποιητή που βρίσκεται στην διεπιφάνεια των σταγονιδίων επηρεάζοντας το μέγεθος των σταγονιδίων και κατ' επέκταση τη σταθερότητα του γαλακτώματος (Sarkar et al., 2010; Singh., 2011).

Ο ρυθμός και η έκταση της γαστρικής λιπόλυσης εξαρτάται από την περιοχή της επιφάνειας των τριγλυκεριδίων που είναι διαθέσιμη για λιπόλυση, η οποία καθορίζεται κυρίως από την περιεκτικότητα σε λίπος, και το μέγεθος των σταγονιδίων. Ο τύπος του γαλακτωματοποιητή ίσως να παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς ο γαλακτωματοποιητής μπορεί να προστατεύει την επιφάνεια των τριγλυκεριδίων από την ενζυμική λιπόλυση. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το προσροφημένο στρώμα των ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία εμφανίζονται πρωτονιωμένα στο χαμηλό pH του στομάχου, είναι ικανά να παρεμποδίσουν τη γαστρική λιπόλυση (Van Aken et al., 2011).

2.3.2.1. Αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων στο στομάχι

Λόγω της μείωσης του pH στο στομάχι και της δράσης της γαστρικής λιπάσης και της πεψίνης, οι φυσικές ιδιότητες ενός γαλακτώματος μπορεί να αλλάξουν σημαντικά κατά τη διάρκεια της πέψης. Για παράδειγμα, τα γαλακτώματα που αποσταθεροποιούνται σε όξινο περιβάλλον παρουσιάζουν διαχωρισμό φάσεων στο στομάχι, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός στρώματος λίπους στην κορυφή του γαστρικού περιεχομένου, μακριά από τη βαλβίδα εξόδου του στομάχου (πυλωρό). Αυτό το στρώμα βρέθηκε ότι καθυστερεί την είσοδο

του λίπους στο λεπτό έντερο. Ως αποτέλεσμα, ένα σχετικά ασθενές ενεργειακά υδατικό στρώμα απομακρύνεται γρήγορα από το στομάχι, μειώνοντας τη διόγκωση του και την έναρξη της αίσθησης κορεσμού κατά τη διάρκεια του γεύματος.

Κατά τη μελέτη της συμπεριφοράς γαλακτωμάτων σταθεροποιημένα με διάφορες τασιενεργές ουσίες (Tween 80, πρωτεΐνες ορού γάλακτος και πρωτεΐνες ορού γάλακτος και καζεϊνικά άλατα) σε ένα περίπλοκο γαστρικό περιβάλλον παρατηρήθηκε η κροκίδωση των γαλακτωμάτων, η οποία μπορεί να οδηγήσει στο διαχωρισμό ενός υψηλού ενεργειακά στρώματος πλούσιο σε λιπίδια και πρωτεΐνες, το οποίο είτε κρεμοποιείται, είτε καθιζάνει. Εξηγείται, ότι *in vivo*, η κρέμωση ενός τέτοιου στρώματος είναι γνωστό ότι καθυστερεί τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών στο λεπτό έντερο, με αποτέλεσμα να μειώνεται το αίσθημα της πληρότητας κατά τη διάρκεια του γεύματος.

Αντίθετα, η καθίζηση ενός στρώματος υψηλής θρεπτικότητας κατά τη γαστρική πέψη, ίσως να οδηγήσει σε παρατεταμένη αίσθηση πληρότητας και γρήγορο κορεσμό κατά τη διάρκεια του γεύματος, καθώς το στρώμα με την υψηλότερη θερμιδική αξία απομακρύνεται πρώτο από το στομάχι, με αποτέλεσμα ο όγκος του στομάχου να παραμένει μεγάλος μέχρι να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος (van Aken et al., 2011).

2.4. Μυξίνη

Η βλέννα είναι μία σύνθετη παχύρρευστη έκκριση που συντίθεται από ειδικά καλυκοειδή κύτταρα στο κυλινδρικό επιθήλιο το οποίο περιβάλλει όλα τα όργανα που εκτίθενται στο εξωτερικό περιβάλλον. Αυτά περιλαμβάνουν το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό και το αναπαραγωγικό σύστημα και την ωτορινολαρυγγική οδό. Το κύριο συστατικό της βλέννας που είναι υπεύθυνο για τις ιξώδεις και τις ελαστικές ιδιότητες της είναι η μυξίνη (Bansil & Turner., 2006). Τα μόρια της μυξίνης αποτελούνται από μία γραμμική πολυπεπτιδική ραχοκοκαλιά και ακτινικά διατεταγμένες αλυσίδες πολυσακχαριτών (70-80%). Οι γλυκοζυλιωμένες περιοχές είναι πλούσιες σε σερίνη και θειονίνη οι οποίες συνδέονται με τους ολιγοσακχαρίτες μέσω της δέσμευσης τους στις N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Τα μη γλυκοζυλιωμένα τμήματα περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό περιοχών που είναι πλούσιες σε

κυστεΐνη και φορτισμένα αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες, αποτελούν το 20% της μοριακής μάζας της μυξίνης και είναι διατεταγμένες σε διάφορες περιοχές του μορίου.

Η μυξίνη τείνει να συσσωματώνεται και να σχηματίζει πηκτή. Η ανθρώπινη μυξίνη σχηματίζει πηκτή σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 30°C και σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 14mg/ml (Bansil & Turner., 2006). Οι ιδιότητες της μυξίνης σε υδατικά διαλύματα κατευθύνονται κυρίως από μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση μέσω των ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων και τις συνδεδεμένες υδρόφοβες μικροπεριοχές. Τα αρνητικά φορτία, προέρχονται από τα αμινοξέα, ενώ οι υδρόφοβες μικροπεριοχές κατά μήκος του πολυμερικού backbone προέρχονται κυρίως από τις περιοχές που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη. Από αυτά είναι προφανές ότι οι αλλαγές του pH θα επηρεάσουν τον ιονισμό του σιαλικού οξέος και των αμινοξέων της πεπτιδικής backbone της μυξίνης, κάνοντας τα μόρια της μυξίνης αρνητικά φορτισμένα κάτω από αυτό το pH και την πυκνότητα του φορτίου της να αυξάνει με την αύξηση του pH (Maleki et al., 2008).

Σε διάφορες μελέτες, όπως και στην παρούσα, όπου χρησιμοποιούνται προσομοιωμένες συνθήκες, η χοίρεια γαστρική μυξίνη (PGM) χρησιμοποιείται έναντι της μυξίνης που εκκρίνεται από το ανθρώπινο σώμα. Η PGM εμφανίζει ελαφρώς αρνητικό φορτίο σε pH 3 και ελαφρώς θετικό σε pH 1, άρα το ισοηλεκτρικό της σημείο κυμαίνεται μεταξύ 1 και 3 (Ritzoulis et al., 2012). Σε τιμές pH<2, οι αλυσίδες δημιουργούν ένα δίκτυο με ασθενή σύνδεση, σε pH=2 σχηματίζεται ένα ισχυρό ετερογενές δίκτυο από αλληλένδετες αλυσίδες ενώ σε pH>>2 οι αλυσίδες είναι πιο ομοιόμορφα διασπαρμένες και έτσι αναπτύσσεται ένα ομογενές δίκτυο (Maleki et al., 2008)

Στο στόμα, οι μυξίνες περιέχονται στο εκκρινόμενο σάλιο όπου αποτελούν το 10-25% της συνολικής περιεκτικότητας του σε πρωτεΐνη και είναι υπεύθυνες για την ιξωδοελαστική συμπεριφορά του σιέλου και τη διατήρηση του στο στόμα. Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί η παρουσία της στο σάλιο κατά την ανάμιξη του με γαλακτώματα έχει σαν αποτέλεσμα, ανάλογα με τη φύση του εκάστοτε γαλακτώματος, την κροκίδωση αυτών. Ο υψηλός βαθμός γλυκοζυλίωσης διατηρεί την πρωτεϊνική αλυσίδα σε εκτεταμένη μορφή, ακόμη

και σε συνθήκες μετουσίωσης (χαμηλό pH, υψηλό pH, παρουσία αλάτων) (Vingerhoeds et al., 2005). Η προστατευτική λειτουργία του ιξωδοελαστικού στρώματος που σχηματίζει, είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη διάρκεια της πέψης στο στομάχι, όπου το pH της γαστρικής κοιλότητας είναι μεταξύ 1 και 2, ενώ η επιθηλιακή επιφάνεια έχει τυπική τιμή pH κοντά στο 7 (Maleki et al., 2008). Επίσης, οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες προστατεύουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα από την ενζυμική διάσπαση και παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του νερού (Vingerhoeds et al., 2005).

Είναι γνωστό ότι σε φυσιολογική συγκέντρωση (>2,0%) και σε όξινο περιβάλλον, η μυξίνη σχηματίζει πηκτή, η οποία προστατεύει την περίμετρο του στομάχου. Επομένως, η μυξίνη ίσως να μην είναι διαθέσιμη ώστε να προσροφηθεί στη διεπιφάνεια των λιπαρών σταγονιδίων του γαλακτώματος. Παρόλα αυτά, η μυξίνη που περιέχεται στο σάλιο, εισέρχεται στο στομάχι με το βλωμό και μπορεί να επηρεάσει ενδεχομένως τη συνένωση των σταγονιδίων σε χαμηλό pH και κατ' επέκταση το ρυθμό της πρωτεόλυσης και τα χαρακτηριστικά των σταγονιδίων του γαλακτώματος (Sarkar et al., 2010).

3. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της συμπεριφοράς ενός γαλακτώματος ελαιολάδου-σε-νερό το οποίο σταθεροποιήθηκε με BSA σε pH 7 κατά την έκθεση του σε στοματικές και γαστρικές συνθήκες.

Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε:

- ✓ Η επίδραση της μεταβολής του pH, από 7 σε 3 κατά από τη μετάβαση του γαλακτώματος από το “στόμα” στο “στομάχι”
- ✓ Η συμπεριφορά του γαλακτώματος κατά την έκθεση του σε προσομοιωμένες γαστρικές συνθήκες παρουσία και απουσία χοίρειας γαστρικής μυξίνης

4. Πειραματικό Μέρος

4.1. Υλικά και μέθοδοι

4.1.1. Υλικά

- Tris (Τρις -Υδροξυμέθυλο- Αμινομεθάνιο)
- Νατραζίδιο
- BSA
- PGM
- HCl 0,1N
- NaOH 1N
- KCl
- KSCN
- NaH₂PO₄
- NaSO₄
- NaCl
- NaHCO₃
- Urea
- CaCl₂*2H₂O
- NH₄Cl
- Glucose
- Glucuronic acid
- CH₃COOH

4.1.2. Όργανα

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire UK
- Μικροσκόπιο Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Germany
- Ομογενοποιητής υπερήχων, Hielscher UP-100H, Germany
- Ρεόμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Φυγόκεντρος

4.2. Μέθοδοι

4.2.1. Αλληλεπιδράσεις υδατικών διαλυμάτων BSA και PGM σε γαστρικές συνθήκες

Προετοιμάστηκε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με 25mM CH₃COOH και 1,625g/L NaN₃. Η ρύθμιση του διαλύματος σε pH 3 έγινε στη συνέχεια με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος HCl 0,1N ή διαλύματος NaOH 1N κατά τη συνεχή και ήπια ανάδευση του διαλύματος. Τα διαλύματα των πρωτεϊνών παρασκευάστηκαν με διάλυση σκόνης BSA και PGM στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση 0,5 και 0,01% w/w, αντίστοιχα. Η ενυδάτωση των πρωτεϊνών έγινε με ήπια ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την διεξαγωγή του πειράματος, προετοιμάστηκε προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα (SGF-Simulated Gastric Fluid), η σύσταση του οποίου δίνεται παρακάτω.

Ακολούθησε η παρασκευή μιγμάτων με την ανάμιξη του διαλύματος SGF σε αναλογία 1:1 με υδατικά διαλύματα BSA διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175, 0,200, 0,225, 0,250% w/w), καθώς επίσης και με υδατικά διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων PGM (0,00024, 0,00061, 0,00122, 0,00183, 0,00244, 0,00366% w/w). Επίσης, προετοιμάστηκαν μίγματα των υδατικών διαλυμάτων SGF, BSA και PGM, όπου η ανάμιξη του SGF με τα υδατικά διαλύματα της BSA και της PGM έγινε σε αναλογία 1:1. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση της BSA στο μίγμα σε 0,0732% w/w, μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση της PGM (0,00024, 0,00061, 0,00122, 0,00183, 0,00244, 0,00366% w/w), ενώ στη συνέχεια η ανάμιξη έγινε διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της PGM σε 0,0012% w/w και μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση της BSA (0,0000, 0,0012, 0,0037, 0,0061, 0,0183, 0,0366, 0,0732% w/w). Αμέσως μετά την ανάμιξη των υδατικών διαλυμάτων και την ήπια ανάδευση του εκάστοτε μίγματος ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 500nm στο φασματοφωτόμετρο.

4.2.2. Παρασκευή και έκθεση γαλακτώματος σε στοματικές και γαστρικές συνθήκες

Παρασκευάστηκε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με Tris (τρις -υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο) σε συγκέντρωση 3g/L και 0,025% w/w NaN_3 , το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αντιμικροβιακός παράγοντας. Η ρύθμιση του διαλύματος σε pH 7 έγινε στη συνέχεια, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος HCl 0,1N ή διαλύματος NaOH 1N κατά τη συνεχή και ήπια ανάδευση του διαλύματος. Για την προετοιμασία του διαλύματος πρωτεΐνης, BSA σε σκόνη διαλύθηκε σε συγκέντρωση 1,5% w/w σε κατάλληλη ποσότητα του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ποσότητα ελαιολάδου προστέθηκε στο διάλυμα πρωτεΐνης έτσι ώστε το κλάσμα όγκου του ελαιολάδου στο μίγμα να είναι $\phi=0,3$ και το μίγμα αφέθηκε για λίγο να αναδευτεί σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η παρασκευή του αρχικού γαλακτώματος ολοκληρώθηκε με την ομογενοποίηση του μίγματος για 3 min σε ομογενοποιητή υπερήχων.

Μετά την παρασκευή του γαλακτώματος, ένα μέρος αυτού αναμίχθηκε σε αναλογία 1:1 με το προσομοιωμένο διάλυμα σιέλου (SMF-Simulated Mouth Fluid) και το μίγμα αναδεύτηκε για 3min. Ακολούθησε, η φυγοκέντρηση του μίγματος για 5 min στις 4000 x g και ο διαχωρισμός της κρέμας από το υποκείμενο υγρό. Στη συνέχεια, ισόποσα μέρη της κρέμας αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:3 σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3, σε SGF και σε SGF στο οποίο είχε προηγηθεί διάλυση της PGM σε συγκέντρωση 0,5% w/w. Η διασπορά της κρέμας έγινε με ήπια ανάδευση με το χέρι για 3min. Αμέσως μετά την παρασκευή του γαλακτώματος, την έκθεση του στις προσομοιωμένες στοματικές (ανάμιξη με το SMF) και γαστρικές συνθήκες (σε pH 3 και μετά την ανάμιξη με το SGF παρουσία και απουσία μυζίνης) προσδιορίστηκε η κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων στο Mastersizer. Επίσης, παρατηρήθηκε η μικροδομή τους στο μικροσκόπιο όπου με την εφαρμογή ψηφιακής κάμερας πάρθηκαν φωτογραφίες. Τέλος, μελετήθηκε η ρεολογική τους συμπεριφορά στους 25°C με τη χρήση ρεομέτρου.

4.2.3. Παρασκευή προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος και διαλύματος σιέλου

Για την προσομοίωση των συνθηκών, ως προς την ιοντική ισχύ και το pH, στο στοματικό και το γαστρικό διάλυμα, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα (πίνακας 1) σύμφωνα με τη σύσταση που δίνεται από την επιστημονική δημοσίευση των Hur et al., 2009.

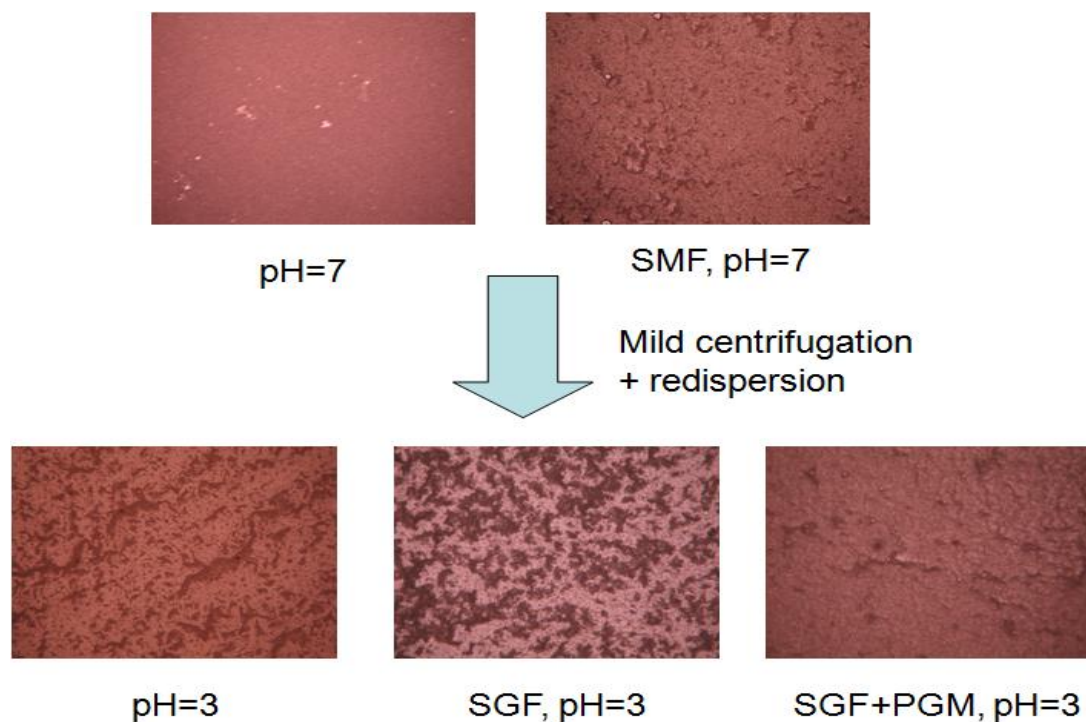
Πίνακας 1. Σύσταση προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος και διαλύματος σιέλου.

	Προσομοιωμένο στοματικό διάλυμα (pH 7,0)	Προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα (pH 3)
Ανόργανα Συστατικά	10 ml KCl 89,6g/l	15.7ml NaCl 175,3g/l
	10ml KSCN 20,0g/l	3.0 ml NaH ₂ PO ₄ 88,8g/l
	10ml NaH ₂ PO ₄ 88,8g/l	9.2 ml KCl 89,6g/l
	10ml NaSO ₄ 57,0g/l	18.0 ml CaCl ₂ *2H ₂ O 22,2g/l
	1.7ml NaCl 175,3g/l	10.0 ml NH ₄ Cl 30,6g/l
	20ml NaHCO ₃ 84,7g/l	
Οργανικά συστατικά	8ml Urea 25,0g/l	3.4 ml Urea 25,0g/L
		10.0 ml Glucose 65,0 g/l
		10.0 ml Glucuronic Acid 2,0g/l

5. Αποτελέσματα

Στο *σχήμα 5* παρουσιάζεται η μικρογραφία ενός τυπικού γαλακτώματος το οποίο υποβάλλεται στα διάφορα στάδια ενός προτεινόμενου πεπτικού μοντέλου. Ένα σταθερό, μη κροκιδωμένο, γαλάκτωμα (*σχήμα πάνω αριστερά*) μετά την αραίωση του με το προσομοιωμένο στοματικό διάλυμα (SMF) παρουσιάζει κάποια σημάδια ανομοιογένειας (*σχήμα πάνω δεξιά*) όπου στη μικρογραφία διακρίνονται με τη μορφή τραχιάς εμφάνισης. Οι εν λόγω ανομοιογένειες υποδηλώνουν τοπικούς διαχωρισμούς φάσεων σε μία κλίμακα μερικών μικρομέτρων, που οφείλονται προφανώς στην κροκίδωση των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Η παρατηρούμενη κροκίδωση θα μπορούσε να χαρακτηριστεί σχετικά ασθενής, καθώς η ισχυρή κροκίδωση συνήθως εκδηλώνεται με εντονότερο διαχωρισμό φάσεων.

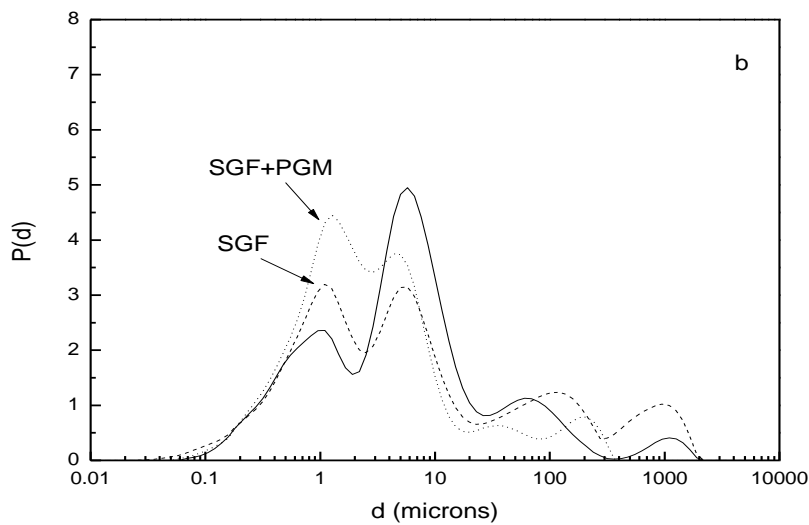
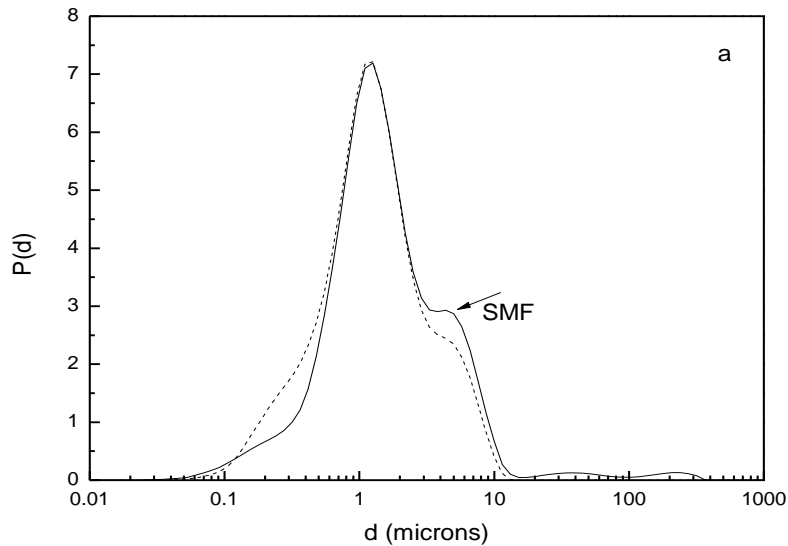
Μετά από ήπια φυγοκέντρηση, το διαχωρισμό των λιπαρών σταγονιδίων από τον ορό (“στόμα”) και τη διάλυση τους σε προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα (SGF, pH 3), παρατηρείται έντονος διαχωρισμός φάσεων ο οποίος εύλογα αποδίδεται στην ισχυρή κροκίδωση των σταγονιδίων (*κάτω κεντρικό σχήμα*). Η παρουσία των αλάτων στο SGF φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την εκτεταμένη κροκίδωση που παρατηρείται, καθώς η διάλυση των ίδιων φυγοκεντρημένων σταγονιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3, απουσία SGF, οδηγεί σε λιγότερο έντονο διαχωρισμό φάσεων και κατ’ επέκταση σε πιο ασθενή κροκίδωση (*σχήμα κάτω αριστερά*). Μετά τη διάλυση των ίδιων φυγοκεντρημένων λιπαρών σταγονιδίων σε ένα διάλυμα που αποτελείται από SGF και χοίρεια γαστρική μυξίνη (PGM, *κάτω δεξί σχήμα*) παρατηρείται μία επαναλαμβανόμενη και ενδιαφέρουσα τάση: Η έκταση του διαχωρισμού των φάσεων, ως εκ τούτου και η κροκίδωση, μειώνεται σημαντικά σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται απουσία μυξίνης.



Σχήμα 5: Απεικόνιση της μικροδομής του γαλακτώματος αμέσως μετά την παρασκευή του (pH 7), την αραίωση του με το SMF και τη διάλυση της κρέμας μετά τη φυγοκέντρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3, σε SGF και σε SGF με περιεκτικότητα σε PGM 0,5% w/w.

Η ίδια τάση παρατηρείται και με τη μέτρηση της κατανομής του μεγέθους των σταγονιδίων (Σχήμα 6). Το αρχικό γαλάκτωμα το οποίο είναι σταθεροποιημένο με BSA σε pH 7, παρουσιάζει μονοκόρυφη κατανομή μεγέθους σταγονιδίων, ενώ η έκθεση του στο προσομοιωμένο στοματικό περιβάλλον (SMF) επιφέρει τη δημιουργία μίας πολύ μικρής κορυφής, η οποία ενδέχεται να είναι στα όρια πειραματικού σφάλματος, δείχνοντας ότι η οποιαδήποτε κροκίδωση είναι ασθενής και αντιστρέψιμη (Σχήμα 3a). Η διάλυση των φυγοκεντρημένων σταγονιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3 οδηγεί σε πολύκορη κατανομή μεγέθους (Σχήμα 3b). Καθώς σε καμία από τις μικρογραφίες του σχήματος 2 δεν παρατηρούνται μεγάλες σταγόνες, οι κορυφές που αντιστοιχούν σε μερικές δεκάδες ή εκατοντάδες μικρόμετρα αποδίδονται σε κροκιδώματα που αποτελούνται από συσσωματωμένες σταγόνες. Ο σχετικός πληθυσμός των κροκιδωμάτων φαίνεται να αυξάνεται παρουσία του SGF στο γαλάκτωμα, ενώ παρουσία της μυξίνης τα μεγάλα

κροκιδώματα τείνουν να μειώνονται προς σχηματισμό μεμονωμένων σταγονιδίων, φαινόμενο το οποίο είναι σε συμφωνία και με τις μικρογραφίες.



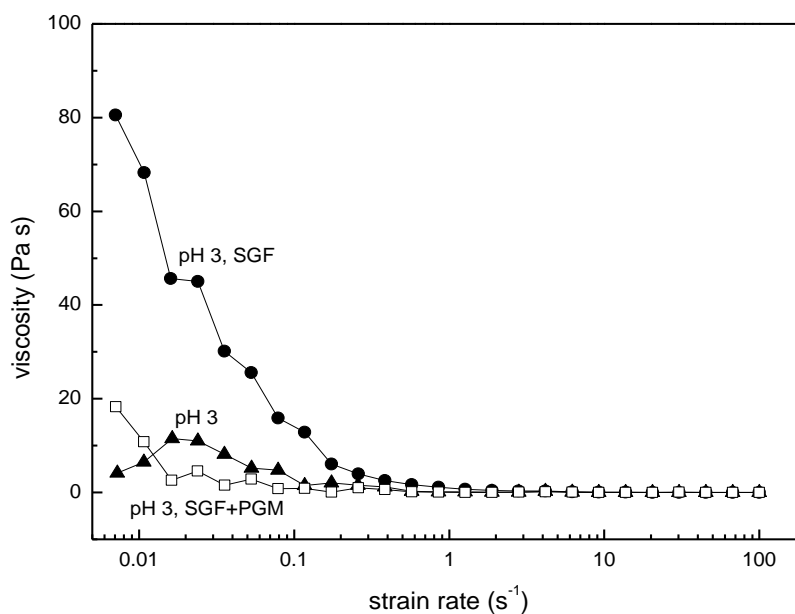
Σχήμα 6: Κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων του γαλακτώματος που είναι σταθεροποιημένο με BSA σε pH 7 (a) και σε pH 3 (b), παρουσία / απουσία προσομοιωμένου στοματικού / γαστρικού διαλύματος (SMF / SGF) και γαστρικής χοίρειας μυξίνης (PGM).

Σύμφωνα με τα δεδομένα των σχημάτων 2 και 3 προκύπτει η εξής τάση: Ένα τρώφιμο υπό μορφή γαλακτώματος σταθεροποιημένο με μία τυπική πρωτεΐνη

με ισοηλεκτρικό σημείο που κυμαίνεται μεταξύ των τιμών pH του στόματος και του στομάχου, παρουσιάζει ασθενή κροκίδωση μετά την εισαγωγή του στο στόμα και την επακόλουθη διασπορά του στο προσομοιωμένο στοματικό διάλυμα. Η μετέπειτα εξέλιξη των σταγονιδίων στο στομάχι (σε προσομοιωμένο σύστημα σε pH 3) σχετίζεται με ισχυρή κροκίδωση παρουσία του προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος, ενώ ο ρόλος της γαστρικής μυξίνης φαίνεται να σχετίζεται με την τροποποίηση / τον έλεγχο της κροκίδωσης. Βέβαια, η γενίκευση ενός τέτοιου ισχυρισμού θα έπρεπε να στηρίζεται και σε άλλα δεδομένα αναφορικά με το γαστρικό περιβάλλον. Στο περιορισμένο πεδίο εφαρμογής του παρόντος συστήματος, περισσότερα δεδομένα σχετικά με το ρόλο της μυξίνης στην εξέλιξη των μελετώμενων γαλακτοποιημένων σταγονιδίων στο προσομοιωμένο γαστρικό περιβάλλον μπορούν να εξαχθούν έμμεσα μέσω της ρεολογικής μελέτης των εξεταζόμενων γαλακτωμάτων.

Στο *σχήμα 7* παρουσιάζονται τα ρεολογικά δεδομένα, τα οποία έχουν προκύψει από την εφαρμογή ελεγχόμενου ρυθμού διάτμησης, για τα γαλακτώματα σε pH 3. Στην περίπτωση ενός γαλακτώματος στο οποίο έχει γίνει η επαναδιασπορά των φυγοκεντρημένων σταγονιδίων σε pH 3, ο χαρακτήρας του γαλακτώματος είναι τυπικά αυτός του μη κροκιδωμένου ή του ασθενώς κροκιδωμένου γαλακτώματος: Το ιξώδες είναι μικρότερο από 5 Pa s και είναι πρακτικά ανεξάρτητο από το ρυθμό διάτμησης, με εξαίρεση τους πολύ χαμηλούς ρυθμούς διάτμησης των $0,01 \text{ s}^{-1}$ (μία επαναλήψιμη τάση παρατηρείται κατά την αύξηση αλλά και τη μείωση του ρυθμού διάτμησης). Η διάλυση των ίδιων φυγοκεντρημένων σταγονιδίων στο SGF επιφέρει δραματική αύξηση στην ψευδοπλαστική συμπεριφορά: ενώ σε υψηλούς ρυθμούς διάτμησης το ιξώδες είναι παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε απουσία του SGF, για ρυθμούς διάτμησης μικρότερους από $0,5 \text{ s}^{-1}$ το ιξώδες υφίσταται αύξηση μερικών δεκάδων Pa s, περίπου 80 Pa s σε ρυθμό διάτμησης $0,01 \text{ s}^{-1}$, που αποτελεί δεκαπλάσια αύξηση σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται απουσία του SGF. Μία τέτοια εξέλιξη στην ψευδοπλαστική συμπεριφορά αποτελεί ισχυρή ένδειξη εκτεταμένης κροκίδωσης. Σε απόλυτη συμφωνία με τις παρατηρήσεις από τη μικροσκόπηση και τις μετρήσεις από την κατανομή μεγέθους των *σχημάτων 5 και 6*, η παρουσία της χοίρειας

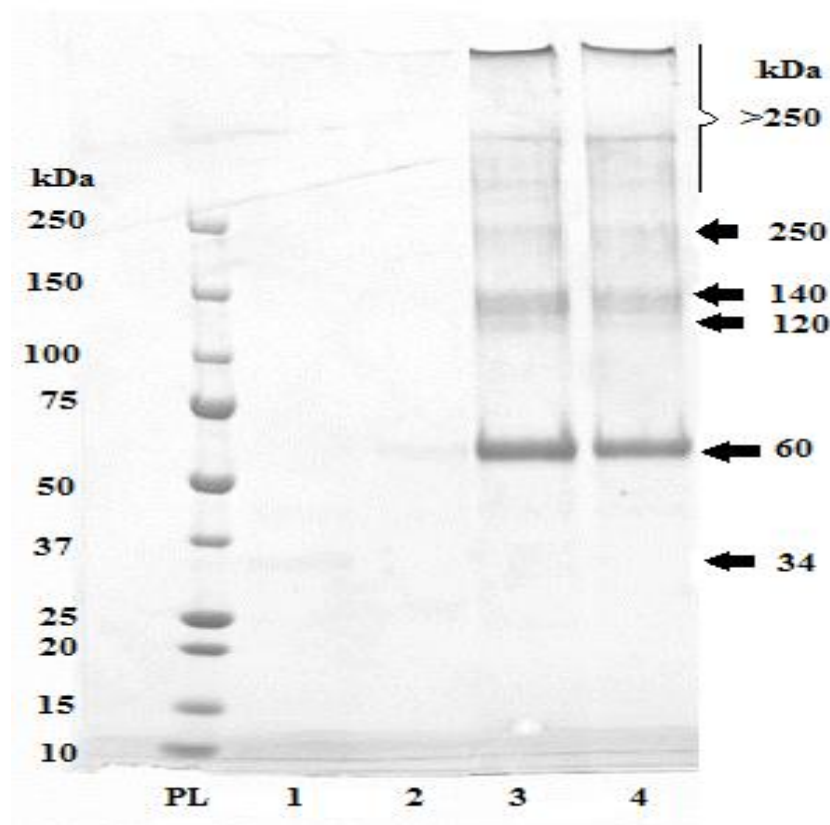
γαστρικής μυξίνης (PGM) αναιρεί την ψευδοπλαστική συμπεριφορά του SGF: όπως φαίνεται στο σχήμα 7, η διάλυση των φυγοκεντρημένων σταγονιδίων στο SGF παρουσία PGM έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της ψευδοπλαστικής συμπεριφοράς και την εκδήλωση Νευτώνειας συμπεριφοράς, παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται σε pH 3 απουσία του προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος. Αυτό μπορεί να εξυπηρετήσει ως επιβεβαίωση ότι η παρουσία της PGM στο SGF μπορεί να δράσει μειώνοντας ή ελέγχοντας, το επίπεδο της κροκίδωσης των σταγονιδίων.



Σχήμα 7: Γραφικές παραστάσεις ρυθμού διάτμησης – ιξώδους για τα γαλακτώματα σε pH 3, παρουσία και απουσία προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος (SGF) και χοίρειας γαστρικής μυξίνης (PGM).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ένας σημαντικός αριθμός γαλακτωμάτων τροφίμων σταθεροποιούνται αρχικά με ένα διεπιφανειακό στρώμα πρωτεϊνών όπου το ισοηλεκτρικό τους σημείο είναι μεγαλύτερο του pH 3 (και επακόλουθα είναι θετικά φορτισμένα σε ένα περιβάλλον όπως το γαστρικό) η μυξίνη ίσως να έχει ένα βιολογικό ρόλο ρυθμίζοντας, και όχι απλά προκαλώντας, την κροκίδωση του γαλακτώματος. Προκειμένου να ρίξουμε λίγο φως στη λειτουργική αυτή πλευρά της γαστρικής μυξίνης, είναι απαραίτητο να γίνει κατανοητή η τοπολογία της κατανομής της PGM σε ένα γαλάκτωμα, δηλαδή

εάν η PGM βρίσκεται κοντά στη διεπιφάνεια (σχηματίζοντας έτσι ένα μέρος του διεπιφανειακού στρώματος) ή εάν παραμένει στη συνεχή φάση (και σχετίζεται έτσι με φαινόμενα όπως η εκκένωση). Προκειμένου να μελετηθεί αυτό, τα γαλακτώματα φυγοκεντρήθηκαν (εδώ, η φυγοκέντρωση αποτελεί ένα επιπλέον στάδιο το οποίο δεν θα έπρεπε να συγχέεται με τη φυγοκέντρωση που γίνεται προκειμένου να απομονωθούν τα σταγονίδια του γαλακτώματος πριν τη διασπορά τους σε pH 3) στη συνέχεια συλλέχθηκε προσεκτικά ο ορός, ακολούθησε η ξήρανση του με λυοφιλίωση και η παραμένουσα ξηρή ύλη μελετήθηκε με τη μέθοδο SDS-PAGE, τέλος στα τζελ της ηλεκτροφόρησης εφαρμόστηκε χρωστική για πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.



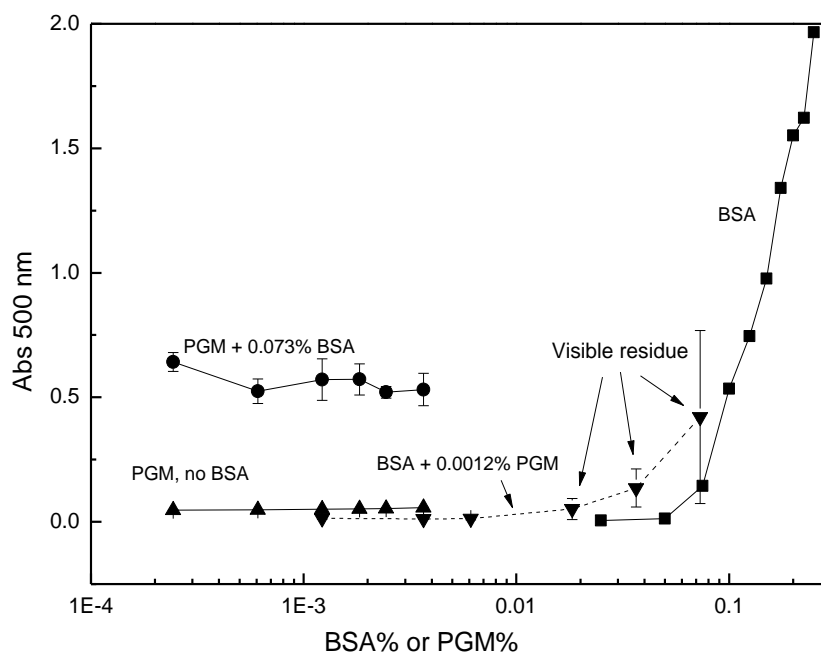
Σχήμα 8: Αποτελέσματα από την SDS-PAGE που προέκυψαν μετά τη φυγοκέντρωση και την ξήρανση του ορού των γαλακτωμάτων. Από αριστερά προς τα δεξιά: (4) γαλάκτωμα σταθεροποιημένο με BSA σε pH 7 (3) γαλάκτωμα με BSA μετά τη διάλυση του σε SMF, pH 7, (2) συλλογή της κρέμας σε pH 7 και επαναδιασπορά σε SGF, pH 3, (1) συλλογή της κρέμας σε pH 7 και επαναδιασπορά σε SGF+PGM, pH 3, (PL) πρότυπα MB.

Στο *σχήμα 8* φαίνεται ότι τα γαλακτώματα που είναι σταθεροποιημένα με BSA σε pH 7 (δείγματα 3 και 4) περιέχουν στη συνεχή φάση μη προσροφημένη πρωτεΐνη. Αυτή είναι προφανώς επιπλέον ποσότητα BSA, η οποία δεν προσροφήθηκε λόγω του κορεσμού της διεπιφάνειας των σταγονιδίων με αυτή την πρωτεΐνη. Στο ίδιο σχήμα, τα δείγματα 1 και 2 αντιπροσωπεύουν γαλακτώματα που προετοιμάστηκαν σε pH 7, στη συνέχεια οι σταγόνες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε η διασπορά τους σε pH 3, σε SGF (2) και σε SGF + PGM (1). Καθώς ο ορός απομακρύνθηκε πριν τη διάλυση των λιπαρών σταγονιδίων στο SGF, είναι λογικό ότι δεν αναμένεται να ανιχνευθεί BSA στη συνεχή φάση αυτών των γαλακτωμάτων. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι δεν βρέθηκε μυξίνη στη συνεχή φάση του δείγματος (1). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε χρωστική για πολυσακχαρίτες. Η PGM, ως γλυκοπρωτεΐνη, θα έπρεπε να είχε ανιχνευθεί στη συνεχή φάση με τουλάχιστον μία από τις δύο χρωστικές. Η απουσία της από τα τζελ της SDS-PAGE δείχνει ότι βρίσκεται στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι συμβαίνουν αντιστρέψιμες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της διεπιφανειακής καζεΐνης ($pI > 3$) και της PGM (Ritzoulis et al., 2012), η έκταση των οποίων συνδέεται άμεσα με το φορτίο των δύο μακρομοριακών πληθυσμών. Σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις, η μη εμπορική PGM φέρει ελάχιστο φορτίο σε pH κοντά στο 2 (Maleki et al., 2008), ενώ το pI της BSA είναι μεγαλύτερο του pH 3 (Livney, 2010). Αυτό επαρκεί για να προτείνουμε την ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της BSA και της PGM στη διεπιφάνεια.

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της BSA και της PGM, σαν και αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω, θα έπρεπε να είναι υπεύθυνες για την αποσταθεροποίηση, παρά για τη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων. Παρόλα αυτά, μία ξεκάθαρη τάση έχει συζητηθεί βάσει των σχημάτων 5, 6 και 7, σχετικά με το γεγονός ότι η PGM είναι ωφέλιμη για τη σταθερότητα του γαλακτώματος που έχει σταθεροποιηθεί με BSA παρουσία του SGF. Προκειμένου να διευκρινιστεί αυτή η φαινομενική αντιπαράθεση, μελετήθηκε η απορρόφηση των διαλυμάτων του SGF που περιείχαν BSA και/ή PGM στα

500nm, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μακρομοριακών πληθυσμών (Σχήμα 9).

Σύμφωνα με το σχήμα 9, παρουσία του προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος (pH 3), τα διαλύματα της BSA, σε συγκέντρωση περίπου 0,05%, αρχίζουν να παρουσιάζουν αυξητική τάση στην απορρόφηση (υποδηλώνοντας κροκίδωση). Αυτή η κροκίδωση θα μπορούσε να αποδοθεί στην εξουδετέρωση του φορτίου της πρωτεΐνης από τα άλατα που περιέχονται στο SGF. Η προσθήκη της PGM σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (0,0012%) μειώνει τη σταθερότητα του διαλύματος της BSA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κροκιδωμάτων σε συγκέντρωση BSA 0,02%. Αυτό δείχνει ότι όντως αναπτύσσονται ελκτικές δυνάμεις μεταξύ της BSA και της PGM. Παρόλα αυτά, σε μία συγκέντρωση όπου η BSA από μόνη της παρουσιάζει κάποια απορρόφηση (0,073%), η προσθήκη της PGM δεν οδηγεί σε αύξηση των τιμών της απορρόφησης ή στην εμφάνιση ορατών κροκιδωμάτων. Έτσι, προκύπτει ότι παρόλο που η BSA και η PGM μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα, τα αποτελέσματα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι κυρίως εμφανή σε μια κλίμακα μερικών μακρομορίων, καθώς η αύξηση της ποσότητας της PGM δεν φαίνεται να ενισχύει την κροκίδωση της BSA. Η παρουσία της PGM θα ελαχιστοποιήσει τοπικά τα φορτία της πρωτεΐνης, αλλά δεν θα οδηγήσει στη γεφύρωση πολλαπλών πρωτεϊνικών μορίων.



Σχήμα 9: Απορροφήσεις στα 500nm διαλυμάτων σε pH 3 που περιέχουν προσομοιωμένου γαστρικό διάλυμα (SGF) και χοίρεια γαστρική μυξίνη (PGM).

6. Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στην περίπτωση των γαλακτωμάτων τα διεπιφανειακά στρώματα της BSA θα κροκιδωθούν κατά τη μετάβαση τους από το SMF στο SGF εξαιτίας: (i) της παροδικής ελαχιστοποίησης του επιφανειακού φορτίου κατά τη μείωση του pH από 7 σε 3 και (ii) της εξουδετέρωσης των φορτίων λόγω της παρουσίας των αλάτων στο SGF. Η BSA που βρίσκεται προσροφημένη στην επιφάνεια θα αλληλεπιδράσει με την PGM (επομένως η μυξίνη θα μείνει στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων και όχι στη συνεχή φάση του γαλακτώματος, όπως φαίνεται και στο σχήμα 8). Παρόλα αυτά, καθώς η προσθήκη της PGM δεν οδηγεί στο σχηματισμό εκτεταμένων συμπλόκων, οι γειτονικές διεπιφάνειες που αποτελούνται από BSA και PGM δεν θα αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και έτσι η κροκιδωση θα είναι λιγότερο έντονη σε σχέση με την περίπτωση της εξουδετέρωσης του

φορτίου της BSA από την παρουσία των αλάτων (προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα απουσία μυξίνης).

Ο ρόλος της μυξίνης στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων στο στοματικό περιβάλλον σχετίζεται με την πρόκληση κροκίδωσης (i.e. Shi, Miller, Caldwell, & Valint, 1999; Vingerhoeds et al., 2005.; Silletti et al., 2007; Sarkar et al., 2009).

7. Βιβλιογραφία

- Bansil R. and Turner B.S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **11**, 164 – 170.
- Chen J. and Dickinson E. (1995). Protein/surfactant interfacial interactions Part 1. Flocculation of emulsions containing mixed protein + surfactant. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **100**, 255-265.
- Dickinson E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **81**, 130–140.
- Dickinson E. (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1966-1983.
- Dickinson E. and Pawlowsky K. (1998). Influence of k-carrageenan on the properties of a protein stabilized emulsion. *Food Hydrocolloids*, **12**, 417-423.
- Frith W. J. (2010). Mixed biopolymer aqueous solutions – phase behaviour and rheology. *Advances in Colloid and Interface Science*, **161**, 48–60.
- Hur S. J., Decler E. A. and McClement D. J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, **114**, 253-262.
- Jachimska B. and Pajor A. (2012). Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry*, **87**, 138–146.
- Kulmyrzaev A., Chanamai R and McClements D.J. (2000). Influence of pH and CaCl₂ on the stability of dilute whey protein stabilized emulsions. *Food Research International*, **33**, 15-20.
- Livney Y.D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **15**, 73-83.
- Nik A. M., Wright A. J. and Corredig M. (2011). Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **83**, 321–330

- Maleki A., Lafitte G, Kjoniksen A.L., Thuresson K. and Nystrom B. (2008). Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin. *Carbohydrate Research*, **343**, 328-340.
- Rangsansarid J. and Fukada K. (2007). Factors affecting the stability of O/W emulsion in BSA solution: Stabilization by electrically neutral protein at high ionic strength. *Journal of Colloid and Interface Science*, **316**, 779-786.
- Ritzoulis C., Siasios S., Melikidou K.D., Koukiotis C., Vasiliadou C and Lolakos S. (2012). Interactions between pig gastric mucin and sodium caseinate in solutions and in emulsions. *Food Hydrocolloids*, **29**, 382-388.
- Sarkar A., Goh K.K.T. and Singh H. (2009a). Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1270–1278.
- Sarkar A., Goh K.K.T., Singh R.P. and Singh H. (2009b). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by b-lactoglobulin in an in vitro gastric model, *Food Hydrocolloids*, **23**, 1563-1569.
- Sarkar A., Goh K.K.T. and Singh H. (2010). Properties of oil-in-water emulsions stabilized by b-lactoglobulin in simulated gastric fluid as influenced by ionic strength and presence of mucin. *Food Hydrocolloids*, **24**, 534-541.
- Semenova M. G. (2007). Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. *Food Hydrocolloids*, **21**, 23–45.
- Shi L., Miller C., Caldwell K.D., and Valint P. (1999). Effects of mucin addition on the stability of oil – water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **15**, 303 – 312.
- Silletti E., Vingerhoeds M.H., Norde W and van Aken G.A. (2007a). Complex formation in mixtures of lysozyme-stabilized emulsions and human saliva. *Journal of Colloid and Interface Science*, **313**, 485-493.
- Silletti E., Vingerhoeds M.H., Norde W and van Aken G.A. (2007b). The role of electrostatics in saliva-induced emulsion flocculation. *Food Hydrocolloids*, **21**, 596–606.

- Singh. H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1938-1944
- Singh H., Ye A and Horne D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, **48**, 92-100.
- Singh H. and Sarkar A. (2011). Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **165**, 47–57.
- Tokle T. and McClements D.J. (2011). Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: Effects of pH, salt and heating. *Food Hydrocolloids*, **25**, 976-982.
- Van Aken G.A., Bomhof E., Zoet F.D., Verbeek M. and Oosterveld A. (2011). Differences in in vitro gastric behavior between homogenized milk and emulsions stabilised by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. *Food Hydrocolloids*, **25**, 781-788.
- Vingerhoeds M.H., Blijdenstein T.B.J., Zoet F.D. and van Aken G.A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, **19**, 915-922.