



Πανεπιστήμιο Κύπρου
Τμήμα Χημείας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ
ΠΟΛΥΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ ΣΑΒΒΟΥΛΛΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2021



Πανεπιστήμιο Κύπρου
Τμήμα Χημείας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ
ΠΟΛΥΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ ΣΑΒΒΟΥΛΛΑ

Διατριβή η οποία υποβλήθηκε προς απόκτηση διδακτορικού τίτλου σπουδών στο
Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΙΟΥΛΙΟΣ 2021

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ ΣΑΒΒΟΥΛΑ

ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ

Υποψήφια Διδάκτορας: Αλεξανδράκη Σαββούλλα

Τίτλος Διατριβής: Ορθολογικός σχεδιασμός πολυστρωματικών γαλακτωμάτων για την προστασία ευαίσθητων στην οξείδωση συστατικών τροφίμων

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού Διπλώματος στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου και εγκρίθηκε στις 27 Ιουλίου 2021 από τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

Εξεταστική Επιτροπή:

1. Ερευνητικός Σύμβουλος: Δρ. Λεοντίδης Επαμεινώνδας, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου

Υπογραφή:

2. Μέλος Επιτροπής: Δρ. Πατρίκιος Κώστας, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου

Υπογραφή:

3. Πρόεδρος Επιτροπής: Δρ. Πινακουλάκη Ευτυχία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου

Υπογραφή:

4. Μέλος Επιτροπής: Δρ. Ξενάκης Αριστοτέλης, Ερευνητής Α, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα, Αθήνα

Υπογραφή:

5. Μέλος Επιτροπής: Δρ. Παρασκευοπούλου Αδαμαντίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Υπογραφή:

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

Η παρούσα Διατριβή υποβάλλεται προς συμπλήρωση των απαιτήσεων για απονομή Διδακτορικού Τίτλου Χημείας στο Πανεπιστήμιο Κύπρου. Αποτελεί προϊόν πρωτότυπης εργασίας αποκλειστικά δικής μου, εκτός των περιπτώσεων που ρητώς αναφέρονται μέσω βιβλιογραφικών αναφορών, σημειώσεων ή και άλλων δηλώσεων. Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή διεξήχθη από εμένα στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Επιφανειών και Κολλοειδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Επαμεινώνδα Λεοντίδη, κατά τη χρονική περίοδο Σεπτέμβριος 2017 - Ιούλιος 2021.

Η λυοφιλίωση των φρέσκων τεύτλων έγινε από την Ερευνητική Ομάδα της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Δρ. Ευτυχίας Πινακουλάκη του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου.

Οι μετρήσεις χρονοεξαρτημένου φθορισμού των πρωτεϊνών έγιναν από την Ερευνητική Ομάδα του Καθηγητή Δρ. Ανδρέα Όθωνος του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου.

Οι μετρήσεις χρονοεξαρτημένου φθορισμού των βηταλαϊνών έγιναν από την Ερευνητική Ομάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Γρηγορίου Ίτσκου του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου.

Τα πειράματα HPLC για τον χαρακτηρισμό του εκχυλίσματος βηταλαϊνών έγιναν από την Ερευνητική Ομάδα της Επίκουρης Καθηγήτριας Δρ. Χρυσούλας Δρούζα του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου.

Ημερομηνία:

Ονοματεπώνυμο:

Υπογραφή:

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αποτελεί ο ορθολογικός σχεδιασμός πολυστρωματικών γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (o/w) για την ενθυλάκωση ελαίου που περιέχει τα βιοδραστικά ωμέγα-3 λιπαρά οξέα εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ (DHA) και εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA), με σκοπό τη μακροπρόθεσμη σταθερότητά τους. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα είναι να διασφαλιστεί ότι τα αντιοξειδωτικά θα βρίσκονται στις διεπιφάνειες των σταγονιδίων μέσω σύνδεσής τους με τους γαλακτωματοποιητές ή τους πολυηλεκτρολύτες των πολυστρωμάτων με μη-ομοιοπολικές συζεύξεις. Με τον τρόπο αυτό επιδιώκεται να αυξηθεί η οξειδωτική σταθερότητα της λιπιδικής φάσης.

Στην παρούσα εργασία επιχειρείται η ενίσχυση της διεπιφανειακής εναπόθεσης των αντιοξειδωτικών μορίων στα πολυστρωματικά γαλακτώματα (ΠΓ) χρησιμοποιώντας μια «ορθολογική» διαδοχική προσέγγιση, βασισμένη στις αρχές της χημείας κolloειδών και επιφανειών. Σε αυτήν την κolloειδή προσέγγιση τριών βημάτων, αρχικά σχηματίζονται τα «βέλτιστα» συμπλέγματα μεταξύ αντιοξειδωτικού και πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη σε διάλυμα, στη συνέχεια τα συμπλέγματα αυτά μεταφέρονται σε στερεό υπόστρωμα σε κατάλληλη πολυστρωματική εναπόθεση και τέλος οι βέλτιστοι πολυστρωματικοί συνδυασμοί προάγονται για τη σταθεροποίηση σταγονιδίων στα ΠΓ. Οι αλληλεπιδράσεις αντιοξειδωτικών – βιοπολυμερών σε υδατικά διαλύματα μετρούνται χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές και θερμοδυναμικές μεθόδους, όπως η φασματοσκοπία φθορισμού, η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού και η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης.

Σε ένα δεύτερο στάδιο, αποδεικνύεται ότι τα συμπλέγματα αντιοξειδωτικών – βιοπολυμερών μπορούν να σχηματίσουν υψηλής ποιότητας δομές στρώματος προς στρώμα (layer-by-layer, LbL) με τα υπόλοιπα επιλεγμένα βιοπολυμερή σε επίπεδες στερεές επιφάνειες. Ο επιτυχής σχηματισμός πολυστρωματικών δομών παρακολουθείται με φασματοσκοπία UV-Vis, με τη χρήση μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία (QCM) και με φασματοσκοπία ανάκλασης απορρόφησης υπερύθρου (PM-IRRAS). Η εργασία LbL χρησιμεύει στην επιλογή των καλύτερων συνδυασμών βιοπολυμερών στα πολυστρώματα, περιορίζοντας τον μεγάλο αριθμό πιθανών επιλογών σε εκείνα τα συστήματα που επιδεικνύουν την καλύτερη συνέργεια σε μια στερεή επιφάνεια.

Στο τρίτο στάδιο, σχηματίζονται ΠΓ με τα επιλεγμένα συστατικά σε συνδυασμό με το αντιοξειδωτικό σε διάφορα πιθανά στρώματα. Η αντιοξειδωτική προστασία που παρέχεται έτσι

στα ευαίσθητα έλαια για διάφορες δυνατές διεπιφανειακές γεωμετρίες μπορεί να εξετασθεί με διάφορες μεθόδους. Για τον έλεγχο της οξειδωτικής σταθερότητας της λιπιδικής φάσης των ΠΓ επιλέχθηκε μια έμμεση μέθοδος, όπου αξιολογείται η ροή ελευθέρων ριζών από τη συνεχή φάση προς την ελαιώδη φάση.

Ως αντιοξειδωτικά επιλέχθηκαν το ταννικό οξύ, που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο, και οι βηταλαΐνες μια ομάδα φυσικών αντιοξειδωτικών που απομονώνονται από τα κόκκινα τεύτλα. Ως πρωτοταγείς γαλακτωματοποιητές επιλέχθηκε το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα του όρου του γάλακτος (Whey protein isolate – WPI) και η αλβουμίνη του βόειου ορού (BSA - Bovine Serum Albumin). Η χιτοζάνη χρησιμοποιείται ως κατιοντικό στρώμα στα ΠΓ, ενώ η θειική χονδροϊτίνη, το αλγινικό νάτριο, το καζεϊνικό νάτριο και η πηκτίνη ως ανιοντικά στρώματα, ανάλογα με την τιμή του pH.

Από τις μελέτες σε διάλυμα προέκυψε και για τα δύο αντιοξειδωτικά πως αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πρωτεΐνη BSA. Στο δεύτερο βήμα, χρησιμοποιείται εναπόθεση στρώμα προς στρώμα (LbL) σε στερεές επιφάνειες για να προσδιοριστεί ποιοι από τους πολυσακχαρίτες σε συνδυασμό με BSA / ταννικό οξύ ή BSA / βηταλαΐνες σε ένα σύστημα πολλών στρωμάτων διασφαλίζουν τη μέγιστη παρουσία του αντιοξειδωτικού στις διεπιφάνειες. Από τις φασματοσκοπικές μεθόδους απορρόφησης (PM-IRRAS και UV-Vis) προκύπτει ότι τα αποτελεσματικότερα συστατικά που πρέπει να χρησιμοποιούνται σε πολυστρωματικά γαλακτώματα μαζί με BSA / ταννικό οξύ είναι η χιτοζάνη και η πηκτίνη.

Στη συνέχεια η BSA, η χιτοζάνη και η πηκτίνη χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό γαλακτωμάτων ο/w τριών στρωμάτων με το ταννικό οξύ ή τις βηταλαΐνες να εισάγονται σε οποιαδήποτε από τις τρεις στιβάδες ως αντιοξειδωτικά. Εκτιμήθηκε η επίδραση της ακριβούς τοποθέτησης των αντιοξειδωτικών στην οξειδωτική σταθεροποίηση του λινελαίου με παρακολούθηση του φθορισμού της χρωστικής Nile Red, η οποία είναι διαλυμένη στα σταγονίδια ελαίου, υπό την προσβολή από ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στην υδατική φάση του γαλακτώματος. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η διαδικασία τριών σταδίων που παρουσιάζεται εδώ μπορεί υπό προϋποθέσεις να οδηγήσει σε ενισχυμένο εντοπισμό των αντιοξειδωτικών στις διεπιφάνειες των ΠΓ, αρκεί αυτά να έχουν επιφανειοενεργό χαρακτήρα ή να αναπτύσσουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τους γαλακτωματοποιητές, ώστε να αποκτούν τέτοιο χαρακτήρα. Από την άποψη αυτή το ταννικό οξύ είναι ιδανικό αντιοξειδωτικό, αλλά οι βηταλαΐνες όχι. Οι τελευταίες θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω για την καλύτερη αξιοποίησή τους σε ΠΓ.

ABSTRACT

Subject of this Doctoral Thesis is the systematic design of multilayer oil in water (o/w) emulsions for the encapsulation of oil that contains the bioactive omega-3 fatty acids docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), in order to retain their long-term stability towards oxidation. A major difficulty is to ensure the maximal presence of the antioxidants at the droplet interfaces via non-polar coupling with the emulsifiers or the polyelectrolyte multilayers. In this way, it is sought to increase the oxidative stability of the lipid phase.

The present work aims towards the enhancement of the interfacial deposition of the antioxidant molecules in the multilayer emulsions (MEs), utilizing a systematic approach, based on the fundamentals of colloidal and surface chemistry. In the adopted three step colloidal based approach, the "optimal" complexes between an antioxidant and a protein or polysaccharide are first formed in a solution, followed by the transfer of these complexes to a solid substrate in a suitable multilayer deposition. Finally the optimal multilayer combinations are used for the droplet stabilization on the MEs.

First, antioxidant-biopolymer interactions in aqueous solutions are measured using spectroscopic and thermodynamic methods, such as fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy and isothermal titration calorimetry.

In a second step, it is demonstrated that the optimal antioxidant-biopolymer complexes can form high quality layer-by-layer structures (LbL) with the remaining selected biopolymers on flat solid surfaces. The successful formation of multilayer structures is monitored by UV-Vis spectroscopy, quartz crystal microbalance (QCM) measurements and infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS). The LbL work serves to select the best biopolymer combinations in multilayers by limiting the large number of possible options to those systems that exhibit the best synergy at a solid surface.

Thirdly, MEs are formed with the selected ingredients in combination with the antioxidant in several possible layers. The antioxidant protection provided to sensitive oils by the various possible interfacial geometries can be examined by a variety of methods. An indirect method was chosen here to assess the oxidative stability of the lipid phase of the MEs, by measuring the flow of free radicals from the continuous phase towards the oil phase.

Tannic acid, which was used as a standard, and betalains, a group of natural antioxidants isolated from red beet roots, were selected as the antioxidants. Whey protein isolate (WPI) and bovine serum albumin (BSA) were used as the primary emulsifiers. Chitosan is used as the cationic layer, while chondroitin sulfate, sodium alginate, sodium caseinate and pectin are used as the anionic layers, depending on the pH value.

The studies in solution have shown that both chosen antioxidants interact more strongly with BSA. As a second step, LbL deposition on solid surfaces was used to determine which polysaccharides in combination with BSA / Tannic Acid and BSA / Betalains in a multilayer system ensure the maximum transfer of the antioxidant at the interfaces. From the spectroscopic absorption methods (PM-IRRAS and UV-vis) it is suggested that the best ingredients to use in a multilayer emulsion droplet, along with BSA / tannic acid, are chitosan and pectin.

BSA, chitosan and pectin are then used to form three-layer o/w emulsions and tannic acid or betalains are introduced into either one of the three layers as antioxidants. The effect of the precise placement of the antioxidants on the oxidative stabilization of linseed oil under attack from radicals produced in the aqueous phase of the emulsion was evaluated by monitoring the fluorescence of the dye Nile Red, which is dissolved in the oil droplets. The results show that the three-step process presented here can, under certain conditions, serve to increase the localization of antioxidants on the interfaces of the MEs, as long as they are surface active or develop strong interactions with emulsifiers to acquire such character. In this respect, tannic acid is an ideal antioxidant, but betalains are not. The latter should be further studied for better utilization in ME work.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της Διδακτορικής μου Διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους ανθρώπους που είχα δίπλα μου και με έχουν βοηθήσει τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο και συνέβαλαν στην διεκπεραίωση της μελέτης αυτής.

Καταρχάς ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Δρ. Επαμεινώνδα Λεοντίδη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να δουλέψω στο ερευνητικό του εργαστήριο για τη συνεχή καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές, υποδείξεις και που με έμαθε να σκέφτομαι και να χειρίζομαι προβλήματα και δύσκολες καταστάσεις, κάτι το οποίο συμβαίνει συχνά σε τομείς έρευνας. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη εκτίμηση που έχω προς το πρόσωπό του, εφόσον είναι ένας εξαιρετος επιστήμονας και πάνω από όλα άνθρωπος. Πέραν των δυσκολιών της έρευνας, υπήρχαν και αμέτρητες όμορφες στιγμές, πολλές από τις οποίες έλαβαν χώρα στα συνέδρια στα οποία συμμετείχα. Επομένως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου και το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου για τη δυνατότητα συμμετοχής σε αυτά.

Επίσης θερμά ευχαριστώ τους καθηγητές του τμήματος Χημείας Καθηγητή Δρ. Κώστα Πατρίκιο και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη για τη συμμετοχή τους στις επιτροπές αξιολόγησης της ερευνητικής μου εργασίας. Οι συμβουλές και υποδείξεις σας ήταν πολύ χρήσιμες και καθοριστικές για τη συνέχιση της ερευνάς μου. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, Ερευνητή Α του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στην Αθήνα, καθώς και την Δρ. Αδαμαντίνη Παρασκευοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την ευγενική τους αποδοχή να συμμετέχουν στη σύνθεση της εξεταστικής μου επιτροπής και για τις υποδείξεις τους στην επιμέλεια του τελικού κειμένου της Διατριβής μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους ανθρώπους με τους οποίους έχω συνεργαστεί και με βοήθησαν στα πλαίσια της διατριβής μου. Ευχαριστώ την Ερευνητική Ομάδα της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Δρ. Ευτυχίας Πινακουλάκης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου για τη βοήθεια τους στη διαδικασία της λυοφιλίωσης των φρέσκων τεύτλων, την Ερευνητική Ομάδα του Καθηγητή Δρ. Ανδρέα Όθωνος του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου για τις μετρήσεις χρονοεξαρτημένου φθορισμού των πρωτεϊνών, την Ερευνητική Ομάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Γρηγορίου Ίτσκου του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου για τις μετρήσεις χρονοεξαρτημένου φθορισμού των βηταλαϊνών, τον Δρ. Γιάννη Σαρηγιάννη, Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Λευκωσίας

για την παραχώρηση του οργάνου ZetaSizer για τις μετρήσεις ζήτα δυναμικού και μεγέθους των γαλακτωμάτων και τέλος την Δρ. Χρυσούλα Δρούζα Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου για τις μετρήσεις HPLC. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον ανώτατο τεχνικό κ. Σάββα Σάββα, του οποίου η βοήθεια ήταν καταλυτική έτσι ώστε να λυθούν και να ξεπεραστούν προβλήματα που προέκυψαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης αυτής. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στη Γραμματεία του Τμήματος Χημείας και φίλη Έλενα Αριστοτέλους, για τη πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο Κύπρου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη της Ομάδας Φυσικοχημείας Κολλοειδών, με τα οποία είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ, για την άριστη συνεργασία και το κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω σε ολόκληρη την οικογένειά μου, τους γονείς μου, τα αδέρφια μου, τον σύντροφό μου Μάριο και τους φίλους μου. Για την αγάπη, τη στήριξη, την καθοδήγηση, τις ξέγνοιαστες στιγμές που χρειάζονται για να ξεφεύγεις λίγο από την έγνοια των πειραμάτων και της διατριβής, τη ζεστή αγκαλιά και το χαμόγελό τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα Εγκυρότητας.....	i
Υπεύθυνη Δήλωση.....	ii
Περίληψη.....	iii
Abstract.....	v
Ευχαριστίες.....	vii
Περιεχόμενα.....	ix
Περιεχόμενα Σχημάτων.....	xviii
Περιεχόμενα Πινάκων.....	xl
Κατάλογος Κύριων Συντμήσεων και Συμβόλων.....	xliii
Κατάλογος Δημοσιεύσεων.....	xliv
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	1
1.1 Στόχος Διδακτορικής Διατριβής.....	1
1.2 Πρωτοτυπία Διδακτορικής Διατριβής.....	6
1.3 Περιγραφή περιεχομένων των κεφαλαίων.....	7
Κεφάλαιο 2: Γαλακτώματα.....	8
2.1 Εισαγωγή στα γαλακτώματα.....	8
2.2 Ιδιότητες γαλακτωμάτων.....	9
2.2.1 Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων.....	9
2.2.2 Διεπιφανειακές Ιδιότητες Γαλακτωμάτων.....	10
2.2.3 Φορτίο σφαιρικών σωματιδίων.....	10
2.3 Σταθερότητα Γαλακτωμάτων.....	10
2.3.1 Βαρυτικός διαχωρισμός.....	13

2.3.2	Συσσωμάτωση σταγονιδίων.....	13
2.3.2.1	Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.....	14
2.3.2.2	Στερική απωστικές αλληλεπιδράσεις.....	14
2.3.2.3	Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.....	15
2.3.2.4	Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.....	15
2.3.2.5	Συνολικές αλληλεπιδράσεις.....	16
2.3.3	Ωρίμανση Ostwald.....	17
2.4	Κατηγορίες γαλακτωμάτων.....	18
2.4.1	Νανογαλακτώματα.....	18
2.4.2	Πολυστρωματικά Γαλακτώματα (ΠΓ).....	19
2.4.3	Γαλακτώματα Pickering.....	21
2.4.4	«Στερεά» Νανοςωματίδια Λιπιδίων (SLNs).....	22
2.4.5	Πολλαπλά Γαλακτώματα.....	22
2.4.6	Πληρωμένα σωματίδια υδρογέλης.....	22
Κεφάλαιο 3: Συστατικά Γαλακτωμάτων.....		24
3.1	Λιπιδική Φάση.....	24
3.1.1	ω -3 Λιπαρά Οξέα.....	25
3.1.2	Χημικές μεταβολές.....	26
3.1.2.1	Υδρόλυση Λιπιδίων.....	26
3.1.2.2	Οξείδωση Λιπιδίων.....	26
3.2	Υδατική φάση.....	28
3.3	Γαλακτωματοποιητές.....	28
3.3.1	Επιφανειοδραστικά μόρια.....	29
3.3.1.1	Φωσφολιπίδια.....	29
3.3.1.2	Σαπωνίνες.....	29
3.3.2	Πρωτεΐνες.....	30
3.3.3	Πολυσακχαρίτες.....	32

3.4 Συμπλέγματα γαλακτωματοποιητών.....	34
Κεφάλαιο 4: Αντιοξειδωτικά.....	36
4.1 Εισαγωγή στα αντιοξειδωτικά.....	36
4.2 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών.....	36
4.2.1 Συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	37
4.2.2 Φυσικά αντιοξειδωτικά.....	37
4.3 Θέση αντιοξειδωτικού στο γαλάκτωμα.....	39
4.4 Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών.....	42
4.4.1 Χηλική δέσμευση.....	42
4.4.2 Δέσμευση ελευθέρων ριζών.....	42
4.4.3 Δέσμευση προϊόντων δευτερογενούς οξείδωσης λιπιδίων.....	43
4.4.4 Φυσική παρεμπόδιση.....	43
4.5 Ταννικό Οξύ.....	43
4.6 Βηταλαΐνες.....	45
4.6.1 Αντιοξειδωτική δράση βηταλαϊνών.....	46
4.6.2 Σταθερότητα βηταλαϊνών.....	47
4.6.3 Εκχύλιση δύο υδατικών φάσεων: Μέθοδος απομόνωσης βηταλαϊνών.....	47
Κεφάλαιο 5: Συστατικά των τοιχωμάτων των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων και αλληλεπιδράσεις τους με επιλεγμένα αντιοξειδωτικά.....	50
5.1 Πρωτεΐνες που λειτουργούν ως γαλακτωματοποιητές.....	50
5.1.1 Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin – BSA).....	50
5.1.2 Πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος (Whey Protein – WP).....	53
5.1.3 Καζεΐνη και Καζεϊνικό Νάτριο (Sodium Caseinate – SC).....	54
5.2 Οι πολυσακχαρίτες των ΠΠ και οι αλληλεπιδράσεις τους με μικρο- και μακρομόρια.....	56
5.2.1 Χιτοζάνη (Chitosan – CH).....	56

5.2.2 Πηκτίνη (Pectin – PE).....	57
5.2.3 Αλγινικό Νάτριο (Sodium Alginate – SA).....	59
5.2.4 Θεϊκή Χονδροϊτίνη (Chondroitin Sulfate – CS).....	60
Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Χαρακτηρισμού.....	62
6.1 Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	62
6.1.1 Γενικές αρχές φασματοσκοπίας φθορισμού.....	62
6.1.2 Στατικός Φθορισμός.....	63
6.1.2.1 Απόσβεση Φθορισμού.....	63
6.1.2.2 Ενίσχυση Φθορισμού.....	66
6.1.2.3 Σύγχρονος Φθορισμός Σταθερού Μήκους Κύματος (Constant-Wavelength Synchronous Fluorescence – CWSF).....	67
6.1.2.4 Χρονοεξαρτημένος Φθορισμός.....	68
6.2 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Microcalorimetry – ITC).....	70
6.2.1 Γενικά για τη θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης.....	70
6.2.2 Οργανολογία ITC.....	70
6.2.3 Διόρθωση των μη επεξεργασμένων δεδομένων του ITC.....	71
6.2.4 Θερμοδυναμική της συμπλοκοποίησης.....	73
6.3 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism – CD).....	74
6.3.1 Γενικές αρχές φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού.....	74
6.3.2 Αρχή φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού.....	74
6.4 Αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών με μακρομόρια σε ισορροπία μέσω πειραμάτων διαπίδυσης.....	77
6.5 Φασματοσκοπία Ανάκλασης Απορρόφησης Υπερύθρου (Infrared Reflection Absorption Spectrometry – IRRAS).....	81
6.5.1 Αρχές και θεωρία της Φασματοσκοπίας Ανάκλασης Απορρόφησης Υπερύθρου.....	81
6.5.2 Θεωρητικό Υπόβαθρο Φασματοσκοπίας Ανάκλασης Απορρόφησης Υπερύθρου.....	82

6.5.3 Κανόνες επιλογής τεχνικής IRRAS για επιφάνειες.....	84
6.5.4 Αρχές λειτουργίας τεχνικής PM-IRRAS.....	85
6.6 Μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance – QCM).....	87
6.7 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS).....	88
6.8 Ζήτα – Δυναμικό (ζ – Δυναμικό).....	91
6.9 Ομογενοποιητής Υψηλής Πίεσης.....	93
Κεφάλαιο 7: Πειραματικό Μέρος.....	95
7.1 Υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές μελέτες της παρούσας διδακτορικής διατριβής.....	95
7.1.1 Πληροφορίες για τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....	96
7.2 Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιοξειδωτικών με βιολογικά μόρια σε υδατικά διαλύματα	97
7.2.1 Πειραματικές μεθοδολογίες απομόνωσης φυσικών αντιοξειδωτικών.....	97
7.2.1.1 Απομόνωση βηταλίνων από κόκκινα τεύτλα.....	98
7.2.2 Πειραματικές μεθοδολογίες των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιοξειδωτικών με βιολογικά μόρια σε διαλύματα.....	99
7.2.2.1 Πειράματα θολερότητας.....	99
7.2.2.2 Πειράματα φθορισμού.....	100
7.2.2.3 Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD).....	103
7.2.2.4 Πειράματα Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC).....	104
7.2.2.5 Πειράματα διαπίδυσης.....	106
7.2.3 Πειραματικές μεθοδολογίες των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιοξειδωτικών με βιολογικά μόρια σε επιφάνειες.....	107

7.2.3.1 Πειράματα Layer-by-Layer (LbL) και διερεύνηση με φασματοσκοπία UV-Vis.....	107
7.2.3.2 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με μικροζυγό κρυστάλλου χαλαζία-QCM.....	108
7.2.3.3 Πειράματα φασματοσκοπίας ανάκλασης απορρόφησης υπερύθρου (PM-IRRAS).....	109
7.2.4 Πειραματικές μεθοδολογίες των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη πολυστρωματικών γαλακτωμάτων.....	111
7.2.4.1 Παρασκευή πολυστρωματικών γαλακτωμάτων.....	112
7.2.4.2 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης πολυστρωματικών γαλακτωμάτων μετρώντας τη διαπερατότητα των ριζών υδροξυλίου από την υδατική έως τη λιπιδική φάση των γαλακτωμάτων.....	114
7.2.4.3 Μετρήσεις ζήτα-δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων..	115
Κεφάλαιο 8: Συστατικά των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων - ταννικό οξύ: Η κολλοειδής προσέγγιση.....	116
8.1. Πρώτο Στάδιο: Αλληλεπιδράσεις σε υδατικά διαλύματα.....	116
8.1.1 Πειράματα θολερότητας.....	116
8.1.2 Αποτελέσματα πειραμάτων φθορισμού.....	120
8.1.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων απόσβεσης φθορισμού πρωτεϊνών.....	120
8.1.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων σύγχρονου φθορισμού.....	123
8.1.3 Αποτελέσματα πειραμάτων κυκλικού διχρωισμού (CD).....	125
8.1.4 Αποτελέσματα πειραμάτων θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC).....	129
8.1.5 Αποτελέσματα πειραμάτων διαπύδησης.....	134

8.1.6 Σύνοψη αποτελεσμάτων πρώτου σταδίου.....	138
8.2. Δεύτερο Στάδιο: Αλληλεπιδράσεις σε επίπεδες επιφάνειες.....	141
8.2.1 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία UV-Vis.....	141
8.2.2 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με μικροζυγό κρυστάλλων χαλαζία-QCM.....	146
8.2.3 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία ανάκλαση απορρόφηση υπερύθρου (PM-IRRAS).....	148
8.2.4 Σύνοψη αποτελεσμάτων δεύτερου σταδίου.....	153
8.3. Τρίτο Στάδιο: Αλληλεπιδράσεις σε γαλακτώματα.....	154
8.3.1 Μετρήσεις ζήτα - δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων.....	155
8.3.2 Μετρήσεις αντιοξειδωτικής σταθερότητας λιπιδικής φάσης γαλακτωμάτων.....	156
Κεφάλαιο 9: Συστατικά των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων – βηταλαΐνες: Η κολλοειδής προσέγγιση.....	159
9.1 Απομόνωση βηταλαϊνών από κόκκινα τεύτλα.....	159
9.2 Πρώτο Στάδιο: Αλληλεπιδράσεις σε υδατικά διαλύματα.....	161
9.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων θολερότητας.....	161
9.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων φθορισμού.....	163
9.2.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων απόσβεσης φθορισμού πρωτεϊνών.....	164
9.2.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων σύγχρονου φθορισμού.....	167
9.2.2.3 Αποτελέσματα πειραμάτων ενίσχυσης φθορισμού.....	168
9.2.2.4 Αποτελέσματα πειραμάτων χρονοεξαρτημένου φθορισμού.....	171

9.2.3 Αποτελέσματα πειραμάτων κυκλικού διχρωισμού (CD).....	175
9.2.4 Αποτελέσματα πειραμάτων θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC).....	178
9.2.5 Αποτελέσματα πειραμάτων διαπύδησης.....	181
9.2.6 Σύνοψη αποτελεσμάτων πρώτου σταδίου.....	182
9.3. Δεύτερο Στάδιο: Αλληλεπιδράσεις σε επίπεδες επιφάνειες.....	183
9.3.1 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία UV-Vis.....	183
9.4. Τρίτο Στάδιο: Αλληλεπιδράσεις σε γαλακτώματα.....	184
9.4.1 Μετρήσεις ζήτα - δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων.....	185
9.4.2 Μετρήσεις αντιοξειδωτικής σταθερότητας λιπιδικής φάσης γαλακτωμάτων.....	186
Κεφάλαιο 10: Ανακεφαλαίωση – Συμπεράσματα.....	188
10.1 Γενικά συμπεράσματα.....	188
10.2 Ανακεφαλαίωση των κυριότερων αποτελεσμάτων από τις μελέτες αλληλεπιδράσεων των συστατικών των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με το ταννικό οξύ.....	189
10.2.1 Μελέτες σε διαλύματα.....	189
10.2.2 Μελέτες σε στερεές επιφάνειες.....	191
10.2.3 Μελέτες σε γαλακτώματα.....	192
10.3 Ανακεφαλαίωση των κυριότερων αποτελεσμάτων από τις μελέτες αλληλεπιδράσεων των συστατικών των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με τις βηταλαΐνες.....	192
10.3.1 Μελέτες σε διαλύματα.....	192

10.3.2 Μελέτες σε στερεές επιφάνειες και γαλακτώματα.....	194
10.4 Μελλοντική εργασία.....	195
Βιβλιογραφία.....	197
Παράρτημα.....	219

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Κεφάλαιο 1

Σχήμα 1.1	Χρήση των αρχών της επιστήμης κolloειδών και επιφανειών για τον ορθολογικό σχεδιασμό των ΠΓ με αντιοξειδωτικό «κέλυφος». (α) Σχηματισμός συμπλέγματος μεταξύ αντιοξειδωτικού και πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη σε διάλυμα, (β) Σχηματισμός πολυστρωματικού υμενίου μεταξύ του συμπλέγματος και άλλου πολυσακχαρίτη σε στερεό υπόστρωμα και (γ) Χρήση του βέλτιστου πολυστρωματικού συνδυασμού για την κατασκευή κελυφών ΠΓ.....	3
------------------	---	---

Κεφάλαιο 2

Σχήμα 2.1	Σχηματική αναπαράσταση γαλακτώματος ελαίου σε νερό (O/W) (αριστερά) και γαλακτώματος νερού σε έλαιο (W/O) (δεξιά).....	9
Σχήμα 2.2	Σχηματική αναπαράσταση φυσικοχημικών διεργασιών που καταστούν φυσικά ασταθή τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό.....	12
Σχήμα 2.3	Οι συνολικές κolloειδείς αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από το εύρος, το μέγεθος και την ύπαρξης ελκτικών και απωστικών δυνάμεων, η είναι ο διαχωρισμός μεταξύ επιφανειών σταγονιδίων, το r είναι η ακτίνα του σταγονιδίου και το δ είναι το πάχος του επιφανειακού στρώματος.....	17
Σχήμα 2.4	Σχηματική αναπαράσταση γαλακτωμάτων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων.....	19
Σχήμα 2.5	Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας σχηματισμού ΠΓ μέσω της μεθόδου LbL.....	20

Κεφάλαιο 3

Σχήμα 3.1	Μηχανισμός ελευθέρων ριζών που ακολουθείται κατά την οξείδωση λιπιδίων.....	27
------------------	---	----

Σχήμα 3.2	Σχηματική αναπαράσταση ειδών γαλακτωματοποιητών που χρησιμοποιούνται για την σταθεροποίηση γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό.....	30
Σχήμα 3.3	Σχηματική αναπαράσταση διαφορετικών ειδών μικτής διεπιφανειακής στιβάδας που μπορεί να σχηματισθεί σε επιφάνειες σταγονιδίων λαδιού για τη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων.....	35
Κεφάλαιο 4		
Σχήμα 4.1	Χημικές δομές κοινών συνθετικών αντιοξειδωτικών.....	37
Σχήμα 4.2	(α) Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της διεπιφάνειας σε διεργασίες οξείδωσης λιπιδίων που συμβαίνουν σε γαλακτώματα ελαίου / νερό και (β) Σχηματική αναπαράσταση ενθυλακωμένων σταγονιδίων ελαίου σε προστατευτικό αντιοξειδωτικό κέλυφος (πάνω) και αντιοξειδωτικό στην λιπιδική φάση (κάτω μέρος).....	40
Σχήμα 4.3	Τύποι των επιφανειακών αντιοξειδωτικών.....	41
Σχήμα 4.4	Χημική δομή ταννικού οξέος.....	44
Σχήμα 4.5	Γενικές δομές βητακυανίνων και βηταξανθινών από το πρόδρομο μόριο του βηταλαμικού οξέος.....	45
Σχήμα 4.6	Διάγραμμα φάσεων συστήματος με δύο υδατικό φάσεων (TCB = Καμπύλη συνύπαρξης, C = Κρίσιμο σημείο, TB = Γραμμή σύνδεσης, T = Σύσταση της άνω φάσης, B = Σύσταση της κάτω φάσης και X, Y και Z = συνολική σύσταση ATPS.).....	49
Κεφάλαιο 5		
Σχήμα 5.1	Τρισδιάστατη δομή πρωτεΐνης BSA.....	52
Σχήμα 5.2	Χημική δομή χιτίνης και χιτοζάνης.....	57
Σχήμα 5.3	Χημική δομή πηκτίνης.....	58
Σχήμα 5.4	Χημική δομή αλγινικού νατρίου.....	60
Σχήμα 5.5	Χημική δομή θεικής χονδροϊτίνης.....	61

Κεφάλαιο 6

Σχήμα 6.1	Διάγραμμα Jablonski.....	63
Σχήμα 6.2	Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού δυναμικής και στατικής απόσβεσης.....	64
Σχήμα 6.3	Υπολογισμός χρόνου αποδιέγερσης μετά από έκθεση σε παλμικό φως..	69
Σχήμα 6.4	Σχηματικό διάγραμμα μια τυπικής διάταξης κυψελίδων ενός οργάνου ITC για την εκτέλεση μιας τιτλοδότησης.....	71
Σχήμα 6.5	Το ηλεκτρικό διάνυσμα (α) του γραμμικά πολωμένου φωτός και (β) του κυκλικά πολωμένου φωτός ως συνάρτηση της θέσης και του χρόνου...	75
Σχήμα 6.6	Διάγραμμα Scatchard που περιγράφει την πρόσδεση (α) σε πανομοιότυπες ανεξάρτητες θέσεις πρόσδεσης, (β) σε πανομοιότυπες ανεξάρτητες θέσεις πρόσδεσης με το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των υποκαταστών που προσδέονται και (γ) μεταξύ μακρομορίων και μεγάλων μορίων υποκαταστατών, τα οποία συμπεριφέρονται σαν αλυσίδες επαναλαμβανόμενων ομάδων.....	79
Σχήμα 6.7	Πιθανοί τρόποι δέσμευσης ενός υποκαταστάτη με 3 διαδοχικές μονάδες σε ένα μακρομόριο με 12 επαναλαμβανόμενες μονάδες.....	79
Σχήμα 6.8	Διάγραμμα Scatchard που περιγράφει την πρόσδεση του υποκαταστάτη L, με 1 διαδοχικές μονάδες, στο μακρομόριο με N επαναλαμβανόμενες μονάδες όταν μεταξύ των υποκαταστατών αναπτύσσεται το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης.....	80
Σχήμα 6.9	Η ανάκλαση και η διάθλαση που μπορεί να υφίσταται η εισερχόμενη δέσμη φωτός όταν προσπίπτει στη διεπιφάνεια δύο μέσων με δείκτες διάθλασης n_1 και n_2 . Τα μαύρα τόξα συμβολίζουν την p-πολωμένη κατάσταση του φωτός, ενώ οι πράσινοι κύκλοι συμβολίζουν την s-πολωμένη κατάσταση.....	82
Σχήμα 6.10	Αναπαράσταση των κανόνων επιλογής για επιφάνειες κατά την τεχνική IRRAS.....	85
Σχήμα 6.11	Σχηματική αναπαράσταση των διάφορων βημάτων ανάλυσης δεδομένων PM-IRRAS. (α) Συμβολόγραμμα $J_2(Rp-Rs)$, (β)	

	Συμβολόγραμμα (R_p+R_s), (γ) Μετασχηματισμός Fourier των δύο συμβολογραφημάτων A και B, (δ) Φάσμα διαφορικής ανάκλασης ($\Delta R/R$).....	87
Σχήμα 6.12	Σχηματική αναπαράσταση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης της έντασης, $g_2(\tau)$	90
Σχήμα 6.13	Σχηματική αναπαράσταση εντοπισμού του ζ δυναμικού.....	92
Σχήμα 6.14	Σχηματική αναπαράσταση παρασκευής γαλακτώματος μέσω της διαδικασίας της ομογενοποίησης. (α) Παρασκευή γαλακτώματος μέσω ανάδευσης υπό ισχυρή διατμητική τάση και (β) σχηματισμός γαλακτωμάτων μικρότερου μεγέθους μέσω ομογενοποιητή υψηλής πίεσης.....	94
Κεφάλαιο 7		
Σχήμα 7.1	Φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1900, Διδακτικά Εργαστήρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κύπρου.....	99
Σχήμα 7.2	Φασματοφωτόμετρο φθορισμού, Jasco FP-8300 (αριστερά) Διδακτικά Εργαστήρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κύπρου και Φασματοφωτόμετρο φθορισμού, Jasco FP-6300 (δεξιά) Ερευνητική Ομάδα Φυσικοχημείας και Κolloειδών, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κύπρου.....	102
Σχήμα 7.3	Φασματοφωτόμετρο φθορισμού, fluorolog 3 (Horiba) Τμήματος Φυσικής, Πανεπιστημίου Κύπρου.....	103
Σχήμα 7.4	Όργανο κυκλικού διχρωισμού, J-815, Jasco, Ερευνητικό Εργαστήριο Ομάδας Φουλερενίων και Υπερμοριακής Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου.....	104
Σχήμα 7.5	Θερμιδόμετρο ισοθερμικής τιτλοδότησης Nano-ITC, Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κolloειδών, Πανεπιστημίου Κύπρου.....	105
Σχήμα 7.6	Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διάταξης μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία – QCM. (α) Σύριγγα, (β) ηλεκτρόδιο συσκευής ενσωματωμένο σε ειδική κυψελίδα ροής, (γ) όργανο μέτρησης συχνοτήτων και (δ) ηλεκτρονικός υπολογιστής καταγραφής	

	αποτελεσμάτων, Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κολλοειδών, Πανεπιστημίου Κύπρου.....	109
Σχήμα 7.7	Σχηματική αναπαράσταση του οργάνου KSV NIMA PM-IRRAS, Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κολλοειδών, Πανεπιστημίου Κύπρου. (1): Πρώτο τμήμα του οργάνου που περιλαμβάνει το laser και τον φωτοελαστικό διαμορφωτή (PEM), (2): Δεύτερο τμήμα του οργάνου που περιλαμβάνει τον ανιχνευτή MCT και (3): Γωνιόμετρο...	111
Σχήμα 7.8	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης (Avestin, EmulsiFlex-C5), Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κολλοειδών, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου.....	113
Σχήμα 7.9	Όργανο Nano ZS (Malvern), Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Λευκωσίας.....	115
Κεφάλαιο 8		
Σχήμα 8.1	Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων TA / BSA σε pH = 4 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις BSA. Ένθετο: Κρίσιμες τιμές γραμμομοριακής αναλογίας στην οποία παρατηρείται έναρξη της αύξησης θολερότητα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης BSA.....	117
Σχήμα 8.2	Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων, (α) TA / SC σε pH = 7 και (β) TA / BSA σε pH = 4 και 7, ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις SC και BSA.....	118
Σχήμα 8.3	Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων (α) TA / WPI σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις WPI και (β) TA / πολυσακχαρίτη σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαλύματα πολυσακχαρίτη 1 mg / mL σε pH = 4 και 7.....	119
Σχήμα 8.4	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-7.1 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της	

	πρωτεΐνης BSA από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	121
Σχήμα 8.5	(α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια TA pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer, K_{sv} , και της σταθεράς K_Q και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.4 για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_S και του αριθμού προσδεδεμένων μορίων TA ανα μόριο BSA, n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.....	121
Σχήμα 8.6	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης CS σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-2.95 \times 10^{-5}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης CS από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	122
Σχήμα 8.7	α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης CS από μόρια TA σε pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer K_{sv} ή της σταθεράς K_Q και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.4 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_S και του αριθμού n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.....	123
Σχήμα 8.8	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	124
Σχήμα 8.9	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	124
Σχήμα 8.10	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης SC σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$	

	nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	125
Σχήμα 8.11	Φάσματα CD για τα συστήματα 7.5×10^{-7} M BSA και ($0-1.0 \times 10^{-5}$ M) TA (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.....	126
Σχήμα 8.12	Μεταβολή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε pH 4.....	127
Σχήμα 8.13	Φάσματα CD για τα συστήματα (α) 2.8×10^{-6} M WPI και ($0-5.0 \times 10^{-6}$ M) TA σε pH 4 και (β) 2.8×10^{-6} M WPI και ($0-8.0 \times 10^{-6}$ M) TA σε pH 7.....	127
Σχήμα 8.14	(α) Φάσματα CD για το σύστημα 2.1×10^{-6} M SC και $0-3.75 \times 10^{-6}$ M TA σε pH 7 και (β) Μεταβολή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA, WPI και SC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε pH 4 και 7.....	129
Σχήμα 8.15	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 9,7610 mM TA σε 0,0497 mM BSA σε pH = 4 στους 25 ° C και (β) διάγραμμα προσαρμογής των σιγμοειδή καμπύλων των ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης πάνω στην ολοκληρωτική θερμότητα.....	130
Σχήμα 8.16	Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας πρόσδεσης πρωτεϊνών με υποκαταστάτη.....	131
Σχήμα 8.17	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 9,2002 mM TA σε 0,2234 mM BSA και (β) σε 8,9115 mM TA σε 0,011 mM BSA σε pH = 7 στους 25 °C.....	131
Σχήμα 8.18	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol WPI για την τιτλοδότηση (α) 2.4848mM TA σε 0.032 mM WPI και (β) 9.7610 mM TA σε 0,1020 mM WPI σε pH = 4, στους 25 °C.....	132
Σχήμα 8.19	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol WPI για την τιτλοδότηση (α) 2.4788 mM TA σε 0.0323 mM	

	WPI σε pH = 7 και (β) 9.4808 mM TA σε 0.0323 mM WPI σε pH 7 στους 25 ° C.....	133
Σχήμα 8.20	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol SC για την τιτλοδότηση 8,2664 mM TA σε 0.0098 mM WPI σε pH 7 στους 25 ° C.....	133
Σχήμα 8.21	Σακούλι διαπίδυσης στην αρχή του πειράματος και στην ισορροπία.....	134
Σχήμα 8.22	Διαγράμματα συγκέντρωσης «ελεύθερου» TA ως προς τη συγκέντρωση του συνολικού TA για πειράματα διαπίδυσης (α) σε μεμβράνη που περιέχει μόνο TA σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4 και (β) σε μεμβράνη που περιέχει TA-BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4.....	135
Σχήμα 8.23	Γραφική παράσταση Scatchard πειράματος διαπίδυσης TA-BSA pH 4..	136
Σχήμα 8.24	Διαγράμματα τροποποιημένης μορφής της Εξίσωσης Hill, από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά aH μέσω της κλίσης $-1/aH$ του διαγράμματος για το σύστημα BSA-TA.....	137
Σχήμα 8.25	(α) Διαγράμματα συγκέντρωσης «ελεύθερου» TA ως προς τη συγκέντρωση του συνολικού TA για πειράματα διαπίδυσης σε μεμβράνη που περιέχει μόνο TA σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4 και σε μεμβράνη που περιέχει TA-CH σε pH 4 και (β) Γραφική παράσταση Scatchard πειράματος διαπίδυσης TA-CH pH 4.....	138
Σχήμα 8.26	Προσαρμογή του συνεργιστικού μοντέλου της Εξίσωσης 6.34 πάνω στο διάγραμμα Scatchard του Σχήματος 8.25 (β).....	138
Σχήμα 8.27	(α) Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης και μιγμάτων BSA και TA ($n(TA) / n(BSA) = 15$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4 και (β) Διάγραμμα απορρόφησης στα 300 nm συνάρτηση του αριθμού των στιβάδων κατά την εναπόθεση CH και BSA / TA σε pH 4.....	142
Σχήμα 8.28	Εναποθέτουσα ποσότητα BSA / TA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL με πολυσακχαρίτη περιττού στρώματος τη χιτοζάνη. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL σε pH 4.....	143

Σχήμα 8.29	Εναποθέτουσα ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL (α) σε συστήματα $n(TA) / n(BSA) = 15$ και (β) σε συστήματα $n(TA) / n(BSA) = 30$, συνάρτηση διαφορετικών πολυσακχαρίτων ως περιττό στρώμα σε pH 4. Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg / mL.....	144
Σχήμα 8.30	Εναποθέτουσα ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL σε συστήματα $n(TA) / n(BSA) = 30$ συνάρτηση διαφορετικών πολυσακχαρίτων ως περιττό στρώμα σε pH 7. Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg / mL	145
Σχήμα 8.31	(α) Εναποθέτουσα ποσότητα TA / WPI για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL συστήματα $n(TA) / n(WPI) = 10$ συνάρτηση διαφορετικών πολυσακχαρίτων ως πρώτο στρώμα σε pH 4 και (β) Εναποθέτουσα ποσότητα TA / πρωτεΐνης για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL συστήματα $n(TA) / n(πρωτεΐνης) = 30, 20$ και 10 συνάρτηση πηκτικής ως πρώτο στρώμα σε pH 4 και 7. Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg / mL	146
Σχήμα 8.32	Διάγραμμα ρυθμού ροής ως προς το χρόνο για τις μετρήσεις QCM.....	147
Σχήμα 8.33	Διάγραμμα συχνότητας σε συνάρτηση του χρόνου κατά τη διάρκεια εναπόθεσης των στιβάδων για το σύστημα χιτοζάνης και $n(TA) / n(BSA)$ ίση με 15. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL	147
Σχήμα 8.34	(α) Διάγραμμα ΔF συναρτήσει του αριθμού των στιβάδων και (β) Διάγραμμα μάζας που εναποτίθεται συναρτήσει του αριθμού των στιβάδων για μίγματα BSA / TA με συγκέντρωση 1 mg/mL και $n(TA)/n(BSA)$ ίση με 15 με ενδιάμεσα στρώματα χιτοζάνη ή πηκτίνη συγκέντρωσης 1 mg/mL	148
Σχήμα 8.35	Φάσματα FTIR στερεής BSA, χιτοζάνης και ταννικού οξέος σε σύγκριση με ένα φάσμα PM-IRRAS διπλής στιβάδας χιτοζάνης και BSA / TA (μοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$) που εναποτέθηκε	

	σε ανακλαστική επιφάνεια. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL.....	149
Σχήμα 8.36	Αποσυνέλιξη του φάσματος PM-IRRAS ενός υμενίου στην περιοχή 1400-1800 cm^{-1} . Πρόκειται για μια μεμβράνη που περιέχει έξι στρώσεις: η χιτοζάνη χρησιμοποιείται στα περιττά στρώματα και BSA / TA σε γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$ στα άρτια στρώματα. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL.....	149
Σχήμα 8.37	(α) Επίδειξη της επίδρασης του υλικού του υποστρώματος, σε υμενία LbL πηκτίνης – $n(\text{TA})/n(\text{BSA}) = 15$ συνάρτηση του σήματος PM-IRRAS και (β) Εξέταση της ομοιογένειας των υμενίων LbL χιτοζάνης - $n(\text{TA})/n(\text{BSA}) = 15$ με μέτρηση σε δύο διαφορετικές θέσεις του υποστρώματος.....	150
Σχήμα 8.38	(α) Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA ($n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 7.5$) στην άρτια στιβάδα και (β) Διαδικασία για την απομόνωση της κορυφής ταννικού οξέος (μπλε) από το φάσμα PM-IRRAS ενός υμενίου στο εύρος 1400-1800 cm^{-1} . Πρόκειται για τη δεύτερη στιβάδα του συστήματος CH - TA/BSA = 7.5. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg/mL pH 4....	151
Σχήμα 8.39	Εναποθέτουσα ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας στην περιττή στιβάδα χιτοζάνη για γραμμομοριακές αναλογίες $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 7.5, 15, 22.5$ και 30 σε pH 4 (α) χωρίς ανάδευση και (β) με ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg/mL pH 4.	152
Σχήμα 8.40	(α) Εναποθέτουσα ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας ως περιττό στρώμα πολυηλεκτρολύτη στην με γραμμομοριακές αναλογίες $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$ σε pH 4 και (β) Εναποθέτουσα ποσότητα TA / πρωτεΐνης για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας ως περιττό στρώμα χιτοζάνη στην με γραμμομοριακές αναλογίες $n(\text{TA}) / n(\text{πρωτεΐνη}) = 15$ σε pH 4. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg/mL pH 4.	153

Σχήμα 8.41	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red σε διάφορα γαλακτώματα πολλαπλών στρωμάτων που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το BSA ως τον κύριο γαλακτωματοποιητή και χιτοζάνη και πηκτίνη ως υλικά του τοιχώματος απουσία συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού.....	157
Σχήμα 8.42	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red σε διάφορα γαλακτώματα πολλαπλών στρωμάτων που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το BSA ως τον κύριο γαλακτωματοποιητή και χιτοζάνη και πηκτίνη ως υλικά του τοιχώματος παρουσία του TA σε διαφορετικά στρώματα.....	158
Κεφάλαιο 9		
Σχήμα 9.1	Φάσμα UV-Vis εκχύλισματος βηταλαϊνών σε pH = 4. Το κόκκινο φάσμα αντιστοιχεί σε εκχύλισμα το οποίο περιέχει κυρίως βητανίνη ενώ το μαύρο φάσμα αντιστοιχεί σε εκχύλισμα το οποίο περιέχει βουλγαξανθίνη – I και βητανίνη. Η κορυφή στα 440 nm και 480 nm οφείλεται στις βηταξανθίνες και στα 540 nm αντιστοιχεί στη βητανίνη.....	160
Σχήμα 9.2	Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων BE / Πρωτεΐνη σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Ένθετο: Κρίσιμες τιμές γραμμομοριακής αναλογίας στην οποία παρατηρείται έναρξη της αύξησης θολερότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης SC.....	161
Σχήμα 9.3	Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων BE / πολυσακχαρίτη ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαλύματα πολυσακχαρίτη 1 mg / mL σε pH = 4 και 7.....	163
Σχήμα 9.4	Φάσμα φθορισμού BE (α) με διέγερση στα 540 nm και εκπομπή πάνω από 600 nm και (β) με διέγερση στα 440 nm και εκπομπή πάνω από 540 nm (Μεταφορά FRET).....	164
Σχήμα 9.5	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-4.0 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της	

	πρωτεΐνης BSA από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	165
Σχήμα 9.6	(α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA (1.37×10^{-6} M) από μόρια BE ($0 - 25 \times 10^{-6}$ M) pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer, K_{sv} , και της σταθεράς K_Q και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_S και του αριθμού προσδεδεμένων μορίων BE ανά μόριο BSA, n	165
Σχήμα 9.7	Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA (1.37×10^{-6} M) από μόρια BE ($0 - 25 \times 10^{-6}$ M) από εκχύλισμα βηταλαϊνών πλούσιο σε (α) βηταξανθίνες και (β) βητανίνες.....	166
Σχήμα 9.8	(α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης SC (8.4×10^{-6} M) από μόρια BE ($0 - 25 \times 10^{-6}$ M) pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer, K_{sv} , και της σταθεράς K_Q και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_S και του αριθμού προσδεδεμένων μορίων BE ανά μόριο SC, n	166
Σχήμα 9.9	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-1.1 \times 10^{-5}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	168
Σχήμα 9.10	(α) Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA ($0-2.4 \times 10^{-5}$ M) σε pH 4 και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Benesi-Hildebrand για την ενίσχυση του φθορισμού της BE από μόρια πρωτεΐνης BSA. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.....	169
Σχήμα 9.11	(α) Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης SC ($0-6.7 \times 10^{-5}$ M) σε pH 7 και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Benesi-Hildebrand για την ενίσχυση του φθορισμού της BE από μόρια πρωτεΐνης SC. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.....	169

Σχήμα 9.12	(α) Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης CH ($0-7.5 \times 10^{-6}$ M) σε pH 4	170
Σχήμα 9.13	Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA ($0-2.4 \times 10^{-5}$ M) σε pH 7.....	171
Σχήμα 9.14	Χρόνοι αποδιέγερσης βηταλαϊνών κατά τη διέγερσή τους στα 405 nm στα συστήματα (α) BE - BSA σε pH = 4, (β) BE - BSA σε pH = 7 και BE - SC σε pH = 7 συνάρτηση των μεταβαλλόμενων συγκεντρώσεων BSA και SC.....	172
Σχήμα 9.15	(α) Χρόνοι αποδιέγερσης της BSA κατά τη διέγερσή τους στα 266 nm στα συστήματα BSA - BE σε pH = 4 και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια BE ($0 - 9 \times 10^{-6}$ M) pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_D . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.....	173
Σχήμα 9.16	Χρόνοι αποδιέγερσης των πρωτεϊνών κατά τη διέγερσή τους στα 266 nm (α) στο σύστημα BSA - BE και (β) στο σύστημα SC - BE σε pH = 7.....	174
Σχήμα 9.17	Φάσματα CD για τα συστήματα 7.5×10^{-7} M BSA και ($0-1.0 \times 10^{-5}$ M) BE (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.....	175
Σχήμα 9.18	Μεταβολή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BE σε pH 4.....	176
Σχήμα 9.19	Φάσματα CD για τα συστήματα 2.8×10^{-6} M WPI και ($0-1.95 \times 10^{-6}$ M) BE (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.....	177
Σχήμα 9.20	Φάσματα CD για το σύστημα 2.1×10^{-6} M SC και $0-3.75 \times 10^{-6}$ M BE σε pH 7.....	177
Σχήμα 9.21	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 0,1647 mM BE σε 0,0251 mM BSA και (β) 0,1647 mM BE σε 0,0100 mM BSA σε pH = 4 στους 25 ° C.....	178

Σχήμα 9.22	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA για την τιτλοδότηση 0,1647 mM BE σε 0,0100 mM BSA σε pH = 7 στους 25 °C.....	179
Σχήμα 9.23	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol WPI για την τιτλοδότηση 0,1647 mM BE σε 0,0274 mM WPI (α) σε pH = 4 και (β) σε pH = 7, στους 25 °C.....	180
Σχήμα 9.24	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 0.1647 mM BE σε 0,0101 mM SC σε pH = 7 στους 25 ° C και (β) Διάγραμμα προσαρμογής των σιμοειδή καμπύλων των ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης πάνω στην ολοκληρωτική θερμότητα.....	180
Σχήμα 9.25	Διαγράμματα συγκέντρωσης «ελεύθερων» BE ως προς τη συγκέντρωση των συνολικών BE για πειράματα διαπίδυσης (α) για το σύστημα BSA-BE και (β) για το σύστημα CH-BE pH 4.....	181
Σχήμα 9.26	(α) Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων πηκτίνης και μιγμάτων SC και TA ($n(TA) / n(SC) = 12$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 7 και (β) Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης και μιγμάτων SC και BE ($n(BE) / n(SC) = 4$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου.....	184
Σχήμα 9.27	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red σε διάφορα γαλακτώματα πολλαπλών στρωμάτων που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το BSA ως τον κύριο γαλακτωματοποιητή και χιτοζάνη και πηκτίνη ως υλικά του τοιχώματος παρουσία των BE σε διαφορετικά στρώματα.....	187
Παράρτημα		
Σχήμα Π.1	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-2.95 \times 10^{-5}$ M) και (β) εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	219

Σχήμα Π.2	α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια TA σε pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς φθορισμού K_{sv} ή K_Q και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_S και του αριθμού n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.....	219
Σχήμα Π.3	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-1.68 \times 10^{-5}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	220
Σχήμα Π.4	α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA σε pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς φθορισμού K_{sv} ή K_Q και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_S και του αριθμού n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.....	220
Σχήμα Π.5	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-2.78 \times 10^{-4}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	221
Σχήμα Π.6	α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA σε pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς φθορισμού K_{sv} ή K_Q και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_S και του αριθμού n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.....	221
Σχήμα Π.7	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI (5.5×10^{-5} M) σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	222

Σχήμα Π.8	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI (5.5×10^{-5} M) σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	222
Σχήμα Π.9	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 8,264 mM TA σε 0,011 mM BSA σε pH = 4 και (β) 9,4808 mM TA σε 0,0481 mM BSA σε pH = 7 στους 25 ° C.....	223
Σχήμα Π.10	Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol πρωτεΐνης για την τιτλοδότηση (α) 9.7610 mM TA σε 0.0331 mM WPI σε pH = 4 και (β) 9,4808 mM TA σε 0,0498 mM CS σε pH = 7, στους 25 ° C.....	223
Σχήμα Π.11	Καμπύλη βαθμονόμησης TA σε εύρος συγκεντρώσεων $0-1.5 \times 10^{-5}$ M συνάρτηση της απορρόφησης για το σύστημα TA-BSA. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.....	224
Σχήμα Π.12	Καμπύλη βαθμονόμησης TA σε εύρος συγκεντρώσεων $0-1.5 \times 10^{-5}$ M συνάρτηση της απορρόφησης για το σύστημα TA-CH Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.....	224
Σχήμα Π.13	(α) Φάσματα UV-Vis για το TA και την BSA και (β) Αποσυνέλιξη φάσματος UV- Vis για το TA με την βοήθεια του προγράμματος Origin.	225
Σχήμα Π.14	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης και μιγμάτων BSA και TA (α) $(n(TA) / n(BSA) = 7,5)$ και (β) $(n(TA) / n(BSA) = 30)$ κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4..	225
Σχήμα Π. 15	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης – πηκτίνης και μιγμάτων BSA και TA $(n(TA) / n(BSA) = 30)$ κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.....	226
Σχήμα Π.16	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων πηκτίνης και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία (α) $(n(TA) / n(BSA) = 15)$ και (β)	

	(n (TA) / n (BSA) = 30) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.....	226
Σχήμα Π.17	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) θεικής χονδροϊτίνης και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία (n (TA) / n (BSA) = 15) και (β) αλγινικού νατρίου και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία (n (TA) / n(BSA) = 15) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.....	227
Σχήμα Π.18	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) καζεϊνικού νατρίου και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία (n (TA) / n (BSA) = 30) και (β) θεικής χονδροϊτίνης και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία (n (TA)/ n (BSA) = 30) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 7.....	227
Σχήμα Π.19	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) χιτοζάνης και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία (n (TA) / n (WPI) = 10) και (β) πηκτίνης και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία (n (TA) / n (WPI) = 10) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 7.....	228
Σχήμα Π.20	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) θεικής χονδροϊτίνης και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία (n (TA) / n(WPI) = 10) και (β) αλγινικού νατρίου και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία (n(TA) / n(WPI) = 10) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.....	228
Σχήμα Π.21	Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων πηκτίνης και μιγμάτων SC και TA σε αναλογία (n(TA) / n(SC) = 12) σε pH 7.....	229
Σχήμα Π.22	Μελέτη της σειράς εναπόθεσης των στρωμάτων και μέτρηση σήματος PM-IRRAS κάθε άρτιου στρώματος χρησιμοποιώντας ως περιττό στρώμα TA και ως άρτιο τη BSA (μαύροι κύκλοι) και αντίστροφα (κόκκινοι κύκλοι).....	229
Σχήμα Π.23	Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα (α) για γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n(BSA) = 15 και (β) για γραμμομοριακή αναλογία n (TA)/n(BSA) = 22.5, σε pH = 4 χωρίς ανάδευση.....	230

Σχήμα Π.24	Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα (α) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA)/n(BSA) = 30$ χωρίς ανάδευση και (β) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 7.5$ σε pH = 4 με ανάδευση.....	230
Σχήμα Π.25	Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα (α) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ και (β) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA)/n(BSA) = 22.5$, σε pH = 4 με ανάδευση.....	231
Σχήμα Π.26	Φάσματα PM-IRRAS για (α) το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 30$ και (β) το σύστημα πηκτίνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ σε pH = 4.....	231
Σχήμα Π.27	Φάσματα PM-IRRAS (α) για το σύστημα θειικής χονδροϊτίνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ και (β) για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / WPI στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(WPI) = 15$ σε pH = 4.....	232
Σχήμα Π.28	Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας ως περιττό στρώμα πηκτίνη με γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ σε pH4.....	232
Σχήμα Π.29	Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα (α) BSA – CH – PE και (β) BSA – PE – CH.....	233
Σχήμα Π.30	Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα (α) BSA – CH – TA/PE και (β) BSA – TA/CH – PE.....	233
Σχήμα Π.31	Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα TA/BSA – CH – PE..	233
Σχήμα Π.32	Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα (α) BSA – CH – PE και (β) BSA – PE – CH.....	234

Σχήμα Π.33	Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα (α) BSA – TA/CH – PE και (β) BSA – CH – TA/PE.....	234
Σχήμα Π.34	Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα TA/BSA – CH – PE.....	234
Σχήμα Π.35	Εξέταση της χρονικής διάσπασης φθορισμού της χρωστικής Nile Red διαλυτοποιημένη στη λιπιδική φάση, παρουσία και απουσία του εκκίνητη ριζών AAPH. Το RFI είναι ο λόγος από τις δύο άλλες καμπύλες.....	235
Σχήμα Π.36	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα TA / BSA_CH_PE.....	235
Σχήμα Π.37	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA_TA / CH_PE.....	236
Σχήμα Π.38	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA_CH_TA / PE.....	236
Σχήμα Π.39	Χρωματογράφημα HPLC του εκχυλίσματος βηταλαΐνων μέσω της μεθόδου ATPS, (α) στα 480 nm και (β) στα άνω φάση 538 nm. Η κορυφή (1) αντιστοιχεί στη βουλγαξανθίνης – I και η κορυφή (2) στη βητανίνη.....	237
Σχήμα Π.40	Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων (α) BE / BSA και (β) BE / WPI, σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών.....	237
Σχήμα Π.41	Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων BE / Πολυσακχαρίτη σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις πολυσακχαρίτη.....	238
Σχήμα Π.42	Γραφική παράσταση της μέγιστης έντασης φθορισμού έναντι της συγκέντρωσης των βηταλαΐνων.....	238
Σχήμα Π.43	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA 1.5×10^{-5} M σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-4.5 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	239

Σχήμα Π.44	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI 5.5×10^{-5} M σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-7.0 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	239
Σχήμα Π.45	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI 5.5×10^{-5} M σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-3.0 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	240
Σχήμα Π.46	(α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης SC 4.2×10^{-5} M σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-6.0 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης SC από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.....	240
Σχήμα Π.47	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-1.1 \times 10^{-5}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	241
Σχήμα Π.48	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-1.1 \times 10^{-5}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	241
Σχήμα Π.49	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-1.1 \times 10^{-5}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	242
Σχήμα Π.50	(α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης SC σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-7.0 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.....	242

Σχήμα Π.51	Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης (α) WPI ($0-6.7 \times 10^{-5}$ M) σε pH 4 και (β) WPI ($0-7.5 \times 10^{-5}$ M) σε pH 7.....	243
Σχήμα Π.52	Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πολυσακχαρίτη CS ($0-4.6 \times 10^{-6}$ M) (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.....	243
Σχήμα Π.53	Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πολυσακχαρίτη PE ($0-3.2 \times 10^{-6}$ M) (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.....	244
Σχήμα Π.54	Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πολυσακχαρίτη SA ($0-6.2 \times 10^{-5}$ M) (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.....	244
Σχήμα Π.55	Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της BE 2.0×10^{-6} M με διέγερση στα 405 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA (α) 3.0×10^{-6} , (β) 6.0×10^{-6} και (γ) 9.0×10^{-6} M σε pH 4.....	245
Σχήμα Π.56	Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της BE 2.0×10^{-6} M με διέγερση στα 405 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA (α) 0 M, (β) 3.0×10^{-6} , (γ) 6.0×10^{-6} M και (δ) 9.0×10^{-6} M σε pH 7...	246
Σχήμα Π.57	Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της BE 2.0×10^{-6} M με διέγερση στα 405 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης SC (α) 0 M, (β) 3.0×10^{-6} , (γ) 6.0×10^{-6} M και (δ) 9.0×10^{-6} M σε pH 7....	246
Σχήμα Π.58	Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA 1.5×10^{-5} M με διέγερση στα 266 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE (α) 0 M, (β) 2.0×10^{-6} M, (γ) 4.0×10^{-6} M και (δ) 5.0×10^{-6} M, (ε) 6.0×10^{-6} M και (στ) 8.0×10^{-6} M σε pH 4.....	247
Σχήμα Π.59	Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA 1.5×10^{-5} M με διέγερση στα 266 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE (α) 0 M, (β) 2.0×10^{-6} M, (γ) 4.0×10^{-6} M και (δ) 5.0×10^{-6} M και (ε) 6.0×10^{-6} M σε pH 7.....	248

Σχήμα Π.60	Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα (α) BSA/BE – CH – PE και (β) BSA – CH/BE – CH.....	249
Σχήμα Π.61	Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα BSA– CH – PE/BE....	249
Σχήμα Π.62	Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα (α) BSA/BE – CH – PE και (β) BSA – CH/BE – CH.....	249
Σχήμα Π.63	Κατανομή μεγεθών για το σύστημα BSA– CH – PE/BE.....	250
Σχήμα Π.64	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA/BE_CH_PE.....	250
Σχήμα Π.65	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA_CH/BE_PE.....	251
Σχήμα Π.66	Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA_CH_PE/BE	251

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΩΝ

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.1	Κύρια αντιοξειδωτικά από φυσικές πηγές.....	38
--------------------	---	----

Κεφάλαιο 7

Πίνακας 7.1	Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως γαλακτωματοποιητές, πολυηλεκτρολύτες και αντιοξειδωτικά κατά τις μελέτες αλληλεπίδρασης και σχηματισμού των ΠΓ.....	96
Πίνακας 7.2	Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών που μελετήθηκαν στα συστήματα σταθεροποιητή ή πολυηλεκτρολύτη – TA ή BE σε pH 4 και 7.....	100
Πίνακας 7.3	Συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών ουσιών που μελετήθηκαν στα πειράματα απόσβεσης και ενίσχυσης φθορισμού σε pH 4 και 7.....	103
Πίνακας 7.4	Συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με ITC σε pH 4 και 7.....	105
Πίνακας 7.5	Συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με μέθοδο LbL-UV-Vis σε pH 4 και 7.....	107
Πίνακας 7.6	Συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με μέθοδο LbL-PM-IRRAS σε pH 4.....	111
Πίνακας 7.7	Συστατικά και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων σε pH 4.....	113

Κεφάλαιο 8

Πίνακας 8.1	Σταθερές απόσβεσης φθορισμού και ο αριθμός μορίων n αντιοξειδωτικών που προσδένονται σε ένα μόριο πρωτεΐνης.....	121
--------------------	--	-----

Πίνακας 8.2	Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 7.5×10^{-7} M.....	126
Πίνακας 8.3	Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης WPI (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 2.8×10^{-6} M.....	128
Πίνακας 8.4	Μεταβολή δευτεροταγούς δομής του SC (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε σταθερή συγκέντρωση SC 2.8×10^{-7} M σε pH 7.....	128
Πίνακας 8.5	Δοκιμές συστημάτων που μελετήθηκαν για την παρασκευή σταθερών γαλακτωμάτων.....	154
Πίνακας 8.6	Μεγέθη σταγονιδίων και ζήτα – δυναμικό για τα τριτοταγή ΠΠ που μελετήθηκαν.....	155
Κεφάλαιο 9		
Πίνακας 9.1	Σταθερές απόσβεσης φθορισμού και ο αριθμός μορίων n αντιοξειδωτικών που προσδένονται σε ένα μόριο πρωτεΐνης.....	166
Πίνακας 9.2	Σταθερές Benesi-Hildebrand που προσδιορίστηκαν από τα πειράματα ενίσχυσης φθορισμού των βηταλαϊνών.....	170
Πίνακας 9.3	Χαρακτηριστικοί χρόνοι αποδιέγερσης βηταλαϊνών κατά τη διέγερσή τους στα 405 nm παρουσία BSA και SC συγκέντρωσης 3.0×10^{-6} M...	172
Πίνακας 9.4	Χαρακτηριστικοί χρόνοι αποδιέγερσης πρωτεϊνών BSA συγκέντρωσης 1.5×10^{-5} M σε pH = 4 και 7 και SC συγκέντρωσης 1.5×10^{-5} M σε pH = 7 κατά τη διέγερσή τους στα 266 nm.....	173
Πίνακας 9.5	Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BE σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 7.5×10^{-7} M.....	176

Πίνακας 9.6	Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης WPI (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ΒΕ σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 2.8×10^{-6} Μ.....	177
Πίνακας 9.7	Συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με μέθοδο LbL-UV-Vis σε pH 4 και 7.....	184
Πίνακας 9.8	Μεγέθη σταγονιδίων και ζήτα – δυναμικό για τα τριτοταγή ΠΓ που μελετήθηκαν.....	185

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

AAPH	2'-Azobis(2-aminodinopropane) dihydrochloride
ALA	α -linoleic acid, α -λινολεϊκό οξύ
ATPS	Aqueous two-phase system – Υδατικό σύστημα δύο φάσεων
BE	Betalains - Βηταλαΐνες
BSA	Bovine Serum Albumin - Αλβουμίνη του βόειου ορού
CD	Circular dichroism spectroscopy - Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού
CH	Chitosan - Χιτοζάνη
CS	Chondroitin Sulfate - Θεϊκή Χονδροϊτίνη
DHA	Docosahexaenoic acid - Εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ
DLS	Dynamic Light Scattering - Δυναμική σκέδαση Φωτός
EPA	Eicosapentaenoic acid - Εικοσιπενταενοϊκό οξύ
ITC	Isothermal titration calorimetry - Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης
K	Σταθερά σύνδεσης
K_b	Σταθερά πρόσδεσης
K_D	Σταθερά δυναμικής απόσβεσης φθορισμού
K_Q	Διμοριακή σταθερά ρυθμού απόσβεσης φθορισμού
K_{sv}	Σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer
LbL	Layer by Layer – (εναπόθεση) στρώμα-με-στρώμα
MRE	Mean Residue Ellipticity - Μέση ελλειπτικότητα καταλοίπων
PE	Pectin - Πηκτίνη

	Polarization Modulation-Infrared Reflection Absorption Spectroscopy
PM-IRRAS	- Φασματοσκοπία Ανάκλασης Απόρροφησης Υπερύθρου με Διαμόρφωση Πόλωσης
Q	Θερμότητα
QCM	Quartz Crystal Microbalance - Μικροζυγός Κρυσταλλου Χαλαζία
SA	Sodium Alginate - Αλγινικό Νάτριο
SC	Sodium Caseinate - Καζεϊνικό Νάτριο
TA	Tannic Acid - Ταννικό οξύ
Trp	Tryptophan - Τρυπτοφάνη
Tyr	Tyrosine - Τυροσίνη
Uv-Vis	Ultraviolet-Visible, Ορατό – Υπεριώδες
WPI	Whey Protein Isolate - Πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα του όρου του γάλακτος
ΔG	Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs
ΔH	Μεταβολή της ενθαλπίας
ΔS	Μεταβολή της εντροπίας
Δλ	Διαφορά μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής
ΠΓ	Πολυστρωματικά Γαλακτώματα
τ	Χρόνος αποδιέγερσης φθορισμού

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

- **Alexandraki S.**, Epameinondas L., (2021), “Towards the systematic design of multilayer O/W emulsions with tannic acid as an interfacial antioxidant”, Royal Society of Chemistry Advances, 11, 23616–23626
- **Alexandraki S.**, Epameinondas L., (2021), “Interactions of betalains from red beets with protein emulsifiers” – In preparation

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Στόχος Διδακτορικής Διατριβής

Στόχος της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι ο ορθολογικός σχεδιασμός, η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός πολυστρωματικών γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (o/w) για την ενθυλάκωση ελαίων που περιέχουν τα βιοδραστικά ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, με σκοπό τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση και σταθερότητά τους.

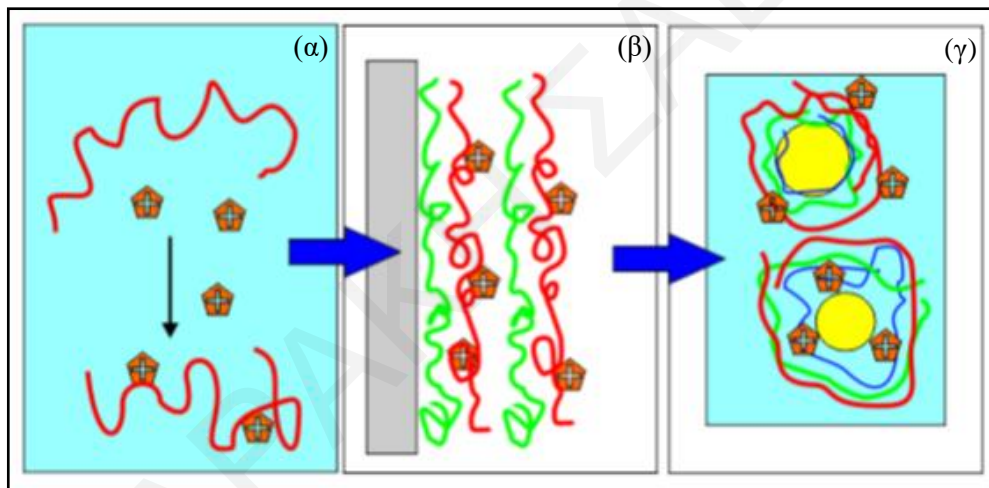
Τα γαλακτώματα συγκεντρώνουν υψηλό ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω του μεγάλου αριθμού τεχνολογικών εφαρμογών τους. Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, λόγω της μεγάλης ανάγκης για μακροπρόθεσμη αποθήκευση πολύτιμων συστατικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα σκευάσματά τους. (McClements 2015) Για την ενθυλάκωση βιοδραστικών ουσιών τα γαλακτώματα προσφέρουν ελεγχόμενες δυνατότητες μακροχρόνιας αποθήκευσης και απόδοσης. (McClements 2016) Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι συστημάτων απελευθέρωσης με βάση τα γαλακτώματα, που εντάσσονται στην ευρύτερη περιοχή της νανοτεχνολογίας. Μεταξύ των συστημάτων αυτών, τα πολυστρωματικά γαλακτώματα (ΠΓ) έχουν επιλεχθεί στην παρούσα εργασία, λόγω της μεγάλης ευελιξίας της δομής τους και της δυνατότητας ρύθμισης της σταθερότητάς τους χρησιμοποιώντας βασικές αρχές της χημείας κolloειδών. (McClements & Yan 2010)

Τα ΠΓ είναι μια σχετικά πρόσφατη μέθοδος ενθυλάκωσης στην τεχνολογία τροφίμων (Guzey & McClements 2006, Grigoriev & Miller 2009, McClements 2012, Shchukina & Shchukin 2012, McClements 2015, McClements & Jafari 2018). Η παρασκευή των ΠΓ βασίζεται στην εναπόθεση στρώματος προς στρώμα πολυηλεκτρολυτών, που εφαρμόστηκε αρχικά σε στερεές επιφάνειες (Decher et al. 1991, Lvov et al. 1995, Decher 1997). Τα πολλαπλά στρώματα εναλλακτικά φορτισμένων πολυηλεκτρολυτών βρέθηκε ότι μπορούν να είναι σταθερά σε

καμπύλες επιφάνειες σωματιδίων (Sukhorukov et al. 1998) οδηγώντας σε έξυπνες νανοκάψουλες (Peyratout & Dähne 2004). Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν με επιτυχία σε επιφάνειες σταγονιδίων γαλακτώματος, αποτρέποντας την αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος μέσω ηλεκτροστατικής και στερεικής σταθεροποίησης. Οι νανοκάψουλες πολυηλεκτρολυτών προσέλκυσαν αμέσως την προσοχή των τεχνολόγων τροφίμων (Guzey & McClements 2006, Sagalowicz & Leser 2010, McClements 2012, Shchukina & Shchukin 2012, Jiménez-Colmenero 2013, Cuomo et al. 2014, McClements 2015, McClements 2016, McClements 2018, McClements & Jafari 2018). Τα ΠΓ είναι ελκυστικά για τους ερευνητές επειδή η διεπιφανειακή τους σύσταση παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία και επιτρέπει τη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων σε ευρεία κλίμακα pH, ιοντικής ισχύος και θερμοκρασίας, κάτι που δεν επιτυγχάνεται εύκολα με συμβατικά γαλακτώματα (Guzey & McClements 2006, Schmelz et al. 2011, Fioramonti et al. 2015, Liu et al. 2016).

Κύριος στόχος της παρούσας έρευνας είναι η ενθυλάκωση ελαίων που περιέχουν βιοδραστικά ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, πιο συγκεκριμένα το εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ (DHA) και το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA). Αυτές οι ενώσεις έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών τους αποτελεσμάτων σε ασθενείς με καρδιαγγειακές παθήσεις (Dyerberg & Bang 1979). Γύρω από τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα έχει χτιστεί μια τεράστια αγορά συμπληρωμάτων διατροφής, ειδικά γύρω από ιχθυέλαιο και λινέλαιο πλούσιο σε EPA και DHA. Ωστόσο, αυτά τα ακόρεστα λιπαρά οξέα οξειδώνονται εύκολα. Για αποφυγή αυτού του προβλήματος η τεχνολογία τροφίμων έχει στραφεί σε μεθόδους ενθυλάκωσης, μερικές από τις οποίες βασίζονται σε ΠΓ. Έχει βρεθεί ότι η φύση του υλικού του τοιχώματος των σταγονιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική σταθεροποίηση του ιχθυελαίου (Hu et al. 2003, Katsuda et al. 2008, Charoen et al. 2012, Berton-Carabin & Schroën 2014). Παρά την αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυστρωμάτων πρέπει να ενσωματωθούν στα σκευάσματα των ΠΓ αντιοξειδωτικά καθώς δεν μπορεί κανείς να βασιστεί για μακροπρόθεσμη σταθερότητα αποκλειστικά στην αντιοξειδωτική προστασία των διεπιφανειακών στιβάδων. Επιπλέον, σε ορισμένες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση φάσεων πλούσιων σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, όπως η ξήρανση με ψεκασμό, (Hogan et al. 2003, Klinkesorn et al. 2005, Shaw et al. 2007, Encina et al. 2016) θα πρέπει τα αντιοξειδωτικά να βρίσκονται κατά προτίμηση στα τοιχώματα των σταγονιδίων, καθώς σε τέτοιες περιπτώσεις χάνεται η προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών που διαλύονται στη συνεχή υδατική φάση. Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές προσπαθούν να εκτιμήσουν εάν ο εντοπισμός αντιοξειδωτικών στις διεπιφάνειες γαλακτώματος προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι της ύπαρξής τους στη συνεχή υδατική φάση (Laguerre et al. 2015, McClements & Decker 2018). Αρκετές ομάδες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ των επιφανειοδραστικών αντιοξειδωτικών

και της αντιοξειδωτικής δράσης και έχουν διερευνήσει πως η θέση τους στη διεπιφάνεια παρέχει πλεονεκτήματα (Viljanen et al. 2005, Gonzalez et al. 2015, Pan & Nitin 2015). Πρόσφατα έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η ιδέα της εναπόθεσης αντιοξειδωτικών στα τοιχώματα των σταγονιδίων γαλακτώματος μετά από κατάλληλη σύζευξη με τα κατάλληλα υλικά του τοιχώματος (Wan et al. 2013, Wan et al. 2014, Von Staszewski et al. 2014, Laguerre et al. 2015, McClements & Decker 2018). Είναι βέβαιο ότι μια τέτοιου είδους σύζευξη θα επιτυγχανόταν καλύτερα με ομοιοπολική σύνδεση αντιοξειδωτικών μορίων στα βιοπολυμερή των τοιχωμάτων και έχουν αναφερθεί μερικές τέτοιες προσπάθειες (Wan et al. 2014, Pan & Nitin 2015, Liu et al. 2016). Ωστόσο στην παρούσα εργασία, επιχειρείται η ενίσχυση της διεπιφανειακής εναπόθεσης των αντιοξειδωτικών μορίων σε ΠΓ μόνο μέσω ασθενέστερων διαμοριακών δυνάμεων, χρησιμοποιώντας μια «ορθολογική» διαδοχική προσέγγιση, βασισμένη στις αρχές της χημείας κolloειδών και επιφανειών. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1: Χρήση των αρχών της επιστήμης κolloειδών και επιφανειών για τον ορθολογικό σχεδιασμό των ΠΓ με αντιοξειδωτικό «κέλυφος». (α) Σχηματισμός συμπλέγματος μεταξύ αντιοξειδωτικού και πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη σε διάλυμα, (β) Σχηματισμός πολυστρωματικού υμενίου μεταξύ του συμπλέγματος και άλλου πολυσακχαρίτη σε στερεό υπόστρωμα και (γ) Χρήση του βέλτιστου πολυστρωματικού συνδυασμού για την κατασκευή κελυφών ΠΓ.

Σε αυτήν την κolloειδή προσέγγιση τριών βημάτων, πρώτα επιλέγεται ένα αντιοξειδωτικό που δεν είναι διαλυτό στη λιπιδική φάση και κατά προτίμηση να είναι επιφανειοενεργό. Επιπλέον, το αντιοξειδωτικό αυτό θα πρέπει να μπορεί να σχηματίζει ισχυρά «φυσικά» σύμπλοκα σε διάλυμα με τα διάφορα βιοπολυμερή που είναι συστατικά των διεπιφανειακών πολλαπλών στρώσεων των σταγονιδίων των ΠΓ. Οι αλληλεπιδράσεις αντιοξειδωτικών – βιοπολυμερών σε υδατικά διαλύματα μετρούνται χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές και θερμοδυναμικές μεθόδους, όπως η φασματοσκοπία φθορισμού, η φασματοσκοπία κυκλικού

διχρωισμού και η θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης. Επιπλέον, πραγματοποιούνται μετρήσεις θολερότητας για τον εντοπισμό πιθανών φαινομένων συσσωμάτωσης μεγαλύτερης κλίμακας, τα οποία πρέπει να εκτιμηθούν προσεκτικά πριν από τη χρήση υλικών για σχηματισμό γαλακτώματος. Σε ένα δεύτερο στάδιο, αποδεικνύεται ότι τα συμπλέγματα αντιοξειδωτικών – βιοπολυμερών μπορούν να σχηματίσουν υψηλής ποιότητας δομές στρώματος προς στρώμα με τα υπόλοιπα επιλεγμένα βιοπολυμερή σε επίπεδες στερεές επιφάνειες, χρησιμοποιώντας μια μεθοδολογία στρώματος προς στρώμα (layer-by-layer, LbL) σε στερεές επιφάνειες. Ο επιτυχής σχηματισμός πολυστρωματικών δομών παρακολουθείται με φασματοσκοπία UV-Vis, με τη χρήση μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία (QCM) και με φασματοσκοπία ανάκλασης απορρόφησης υπερύθρου (PM-IRRAS). Η εργασία LbL χρησιμεύει στην επιλογή των καλύτερων συνδυασμών βιοπολυμερών στα πολυστρώματα περιορίζοντας τον μεγάλο αριθμό πιθανών επιλογών σε εκείνα τα συστήματα που επιδεικνύουν την καλύτερη συνέργεια σε μια σταθερή επιφάνεια. Στόχος εδώ είναι όχι μόνο η μεγάλη σταθερότητα των υμενίων, αλλά κυρίως η μεγιστοποίηση της ποσότητας του αντιοξειδωτικού στα επιφανειακά πολυστρώματα. Τρίτο, σχηματίζονται ΠΓ με τα επιλεγμένα συστατικά σε συνδυασμό με το αντιοξειδωτικό σε διάφορα πιθανά στρώματα. Η αντιοξειδωτική προστασία που παρέχουν στα ευαίσθητα έλαια οι διάφορες δυνατές διεπιφανειακές γεωμετρίες μπορεί να εξετασθεί με διάφορες μεθόδους. Εδώ, αντί για την πιο παραδοσιακή μέθοδο μέτρησης προϊόντων οξειδωσης (Shekhar & Anju 2014), έχει επιλεγθεί μια έμμεση μέθοδος όπου αξιολογείται η ροή ελεύθερων ριζών από τη συνεχή φάση προς την ελαιώδη φάση. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση της μείωσης φθορισμού της χρωστικής Nile Red, μιας διαλυτοποιημένης χρωστικής στα σταγονίδια ελαίου (μέθοδος ORAC, Pan & Nitin 2015).

Η επιτυχία αυτής της προσέγγισης τριών βημάτων πρέπει αρχικά να εκτιμηθεί με επιλογή ενός κατάλληλου αντιοξειδωτικού. Πρόσφατες καινοτόμες εργασίες (Lomova et al. 2010, Lau et al. 2017, Sadonovoy et al. 2013) πρότειναν ένα αποτελεσματικό φυσικό αντιοξειδωτικό, το ταννικό οξύ, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ίδιο ως συστατικό τοιχώματος γαλακτωμάτων σε συνδυασμό με πρωτεΐνες και κατιοντικούς πολυηλεκτρολύτες. Το ταννικό οξύ είναι ένα μεγάλο, εύκαμπτο μόριο, το οποίο είναι τόσο υδατοδιαλυτό όσο και διεπιφανειακά ενεργό (Chibowski et al. 1998, Lin & Xing 2008). Το ταννικό οξύ είναι το ιδανικό αντιοξειδωτικό γιατί μπορεί να ληφθεί σε καθαρή μορφή και σε μεγάλες ποσότητες από φυσικές πηγές. Επίσης, είναι γνωστό ότι σχηματίζει ισχυρά, ακόμη και αδιάλυτα σύμπλοκα με ποικιλία πρωτεϊνών (Van Buren & Robinson 1969), συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούνται ως πρωτογενείς γαλακτωματοποιητές σε ΠΓ (Ishtikhar et al. 2018, Thongkaew et al. 2014, Xie et al. 2017, Yang et al. 2021, Zhan et al. 2018, Zhan et al. 2018). Επιπλέον, το ταννικό οξύ είναι γνωστό ότι σχηματίζει σταθερά πολλαπλά στρώματα με μεγάλη ποικιλία πολυμερών και

πρωτεϊνών σε στερεά υποστρώματα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο LbL που υιοθετήθηκε στην παρούσα έρευνα (Ball 2014, Chen et al. 2018, Lau et al. 2019, Ringwald & Ball 2016, Shutava et al. 2006, Shutava et al. 2005, Yang et al. 2019, Zhang et al. 2019). Τέλος έχει αναφερθεί η καλή αντιοξειδωτική ικανότητα του ταννικού οξέος, τόσο σε πολυστρωματικά υμένια σε στερεές επιφάνειες (Shutava et al. 2006, Yang et al. 2019), όσο και σε γαλακτώματα (Gulcin et al. 2010, Wang et al. 2021, Yang et al. 2021, Zhou et al. 2020) που περιέχουν ταννικό οξύ. Μετά την απόδειξη της χρησιμότητας της προσέγγισης τριών βημάτων με το ταννικό οξύ, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί σε άλλα συστήματα ξεκινώντας με τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών, για τα οποία οι αλληλεπιδράσεις με συστατικά των ΠΓ είναι πολύ λιγότερο γνωστές.

Στην αναζήτηση πιθανών «κατιοντικών» αντιοξειδωτικών για χρήση σε γαλακτώματα εστίασαμε στις βηταλαΐνες (betalains). Το ενδιαφέρον για τις βηταλαΐνες έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, επειδή έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, πιθανώς καλύτερη από άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά όπως οι ανθοκυανίνες ή τα φλαβονοειδή. (Kanner et al. 2001) Έχει γίνει σχετικά μικρή χρήση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των βηταλαϊνών σε συστήματα τροφίμων μέχρι στιγμής και περιορισμένη εργασία σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w). Από όσο γνωρίζουμε, οι βηταλαΐνες δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ως «ενσωματωμένα» φυσικά αντιοξειδωτικά σε γαλακτώματα και μάλιστα σε ΠΓ.

Οι βηταλαΐνες έχουν πολλά χαρακτηριστικά που μπορούν να μετατραπούν σε σημαντικά πλεονεκτήματα για την εφαρμογή τους σε γαλακτώματα. Κατ' αρχήν το φορτίο τους εξαρτάται έντονα από το pH και μπορούν να συμπεριφέρονται ως κατιόντα σε πολύ χαμηλό pH και ως δίπολα ιόντα στο χρήσιμο εύρος pH 3 – 4 (Wyler 1969). Το θετικό φορτίο μπορεί να προσφέρει ελκτικές αλληλεπιδράσεις με τον μεγάλο αριθμό υπαρχόντων ανιοντικών γαλακτωματοποιητών. Δεύτερον, μπορούν να απομονωθούν και να καθαριστούν από κόκκινα τεύτλα (Cardoso-Ugarte et al. 2014) και από άλλες πηγές (Sanchez-Gonzalez et al. 2013) χρησιμοποιώντας καθιερωμένες διαδικασίες. Τα μη συμπλεγμένα σάκχαρα που υπάρχουν σε τέτοια μείγματα μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν με εκχύλιση από το προκύπτον μείγμα ώστε να απλοποιείται σημαντικά η σύσταση του τελικού μείγματος. (Chethana S., et al. 2007). Επιπλέον, οι βηταλαΐνες μπορούν να σχηματίσουν φυσικά σύμπλοκα με ορισμένους πολυσακχαρίτες και η σταθερότητά τους φαίνεται να αυξάνεται κατά την συμπλοκοποίηση. (Marchuk M., et al, 2019) Αυτό σημαίνει ότι η σταθερότητά τους μπορεί να βελτιωθεί όταν χρησιμοποιούνται σε γαλακτώματα σε συνδυασμό με πρωτεΐνες και άλλους γαλακτωματοποιητές. Οι βηταλαΐνες έχουν ωστόσο μεγάλη ευαισθησία στο φως, στο O₂, στο

pH και υδρολύονται εύκολα, άρα θέτουν σημαντικές δυσκολίες και περιορισμούς στην χρήση τους σε ΠΓ.

Συνοψίζοντας, ο κύριος στόχος αυτής της διατριβής είναι να αποδειχθεί η γενική αρχή ότι τα φυσικά συμπλέγματα που σχηματίζονται χάρη στις ισχυρές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις αντιοξειδωτικών – βιοπολυμερών στο διάλυμα και δίνουν υψηλής ποιότητας υμένια LbL σε στερεές επιφάνειες, είναι επίσης εξαιρετικά επιτυχημένα στη σταθεροποίηση της λιπιδικής φάσης των ΠΓ έναντι της οξείδωσης, τόσο για το ταννικό οξύ όσο και για τις βηταλαΐνες. Ο επόμενος κύριος στόχος είναι να αποδειχθεί ότι ο εντοπισμός του ταννικού οξέος ή των βηταλαϊνών στις επιφάνειες σταγονιδίων ΠΓ σε καλά καθορισμένες γραμμομοριακές αναλογίες προς τα συστατικά των τοιχωμάτων των ΠΓ, αλλά και το ακριβές στρώμα όπου τοποθετούνται αποτελούν σημαντικές παραμέτρους που μπορούν να βελτιώσουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των διεπιφανειών.

1.2 Πρωτοτυπία Διδακτορικής Διατριβής

Βασικό στοιχείο πρωτοτυπίας της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι η συστηματική κολλοειδής προσέγγιση τριών βημάτων. Αρχικά, αξιολογούνται οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις στο διάλυμα των αντιοξειδωτικών με τους γαλακτωματοποιητές και πολυηλεκτρολύτες, που θα χρησιμοποιηθούν ως συστατικά ΠΓ. Ακολούθως, αξιολογείται κατά πόσο τα σταθερά συμπλέγματα που σχηματίζονται στην υδατική φάση μπορούν να συνδυασθούν με άλλους πολυσακχαρίτες και να εναποτεθούν με επιτυχία σε επιφάνειες σχηματίζοντας σταθερά υμένια με μεγιστοποίηση του αντιοξειδωτικού στην επιφάνεια. Στη συνέχεια, καταλληλότεροι συνδυασμοί προωθούνται για το σχηματισμό γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (o/w) με σκοπό τη βέλτιστη οξειδωτική προστασία των ω-3 λιπαρών οξέων. Παράλληλα για πρώτη φορά εξετάζεται, η ικανότητα των γαλακτωμάτων να διατηρούν την οξειδωτική σταθερότητα των συστατικών της ελαιώδους φάσης ως συνάρτηση της σύστασης και της γεωμετρίας των στρωμάτων. Αυτή η νέα μεθοδολογία που ακολουθήθηκε δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα στην τεχνολογία των ΠΓ.

Επιπλέον είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται συστηματική μελέτη των αλληλεπιδράσεων των βηταλαϊνών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες τόσο σε διάλυμα όσο και σε επιφάνειες. Επίσης είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιούνται οι βηταλαΐνες ως αντιοξειδωτικά στα ΠΓ, αφού δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα γενικότερα η χρήση τους ως αντιοξειδωτικά σε γαλακτώματα. Πέραν της χρήσης αυτών των νέων αντιοξειδωτικών, έχουν μελετηθεί νέοι συνδυασμοί γαλακτωματοποιητών – πολυηλεκτρολυτών, οι οποίοι, εξ όσων γνωρίζουμε δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα.

Τέλος η χρήση της τεχνικής PM-IRRAS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών σε πολυστρώματα είναι μια καινοτομία, καθώς η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται συνήθως σε πειράματα στρώματος προς στρώμα με βιοπολυμερή. Είναι μια ισχυρή μέθοδος, η οποία εφαρμόζεται κυρίως σε μονοστιβάδες λιπιδίων και βιοπολυμερών σε επιφάνειες νερού και χρησιμοποιείται πολύ σπάνια για στρώματα πολυμερών ή λιπιδίων σε ηλεκτρόδια. (Mendelsohn et al. 1995)

1.3 Περιγραφή περιεχομένων των κεφαλαίων

Το κείμενο της παρούσας διατριβής αποτελείται από δέκα κεφάλαια. Το πρώτο κεφάλαιο αποτελεί την εισαγωγή της εργασίας. Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα γαλακτώματα με ιδιαίτερη έμφαση στα πολυστρωματικά γαλακτώματα. Το τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζει τις φάσεις των γαλακτωμάτων και τους μηχανισμούς αποσταθεροποίησής τους, ενώ στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στα γαλακτώματα και ιδιαίτερα στο ταννικό οξύ και στις βηταλαΐνες. Στο πέμπτο κεφάλαιο γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των πρωτεϊνών – πολυσακχαριτών που χρησιμοποιούνται στα ΠΓ και των αλληλεπιδράσεων τους με αντιοξειδωτικά και στο έκτο κεφάλαιο περιγράφεται το θεωρητικό υπόβαθρο όλων των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις σε διάλυμα και επιφάνειες, καθώς και για τον χαρακτηρισμό των γαλακτωμάτων. Οι πειραματικές διαδικασίες της διατριβής περιγράφονται στο έβδομο κεφάλαιο. Στα κεφάλαια οκτώ και εννέα παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά το σχεδιασμό των ΠΓ με ταννικό οξύ και βηταλαΐνες αντίστοιχα. Η διατριβή αυτή κλείνει με το δέκατο κεφάλαιο, στο οποίο γίνεται ανακεφαλαίωση των αποτελεσμάτων και των συμπερασμάτων της εργασίας. Τέλος αναλύονται τα κενά που έχουν παραμείνει στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πολυσακχαριτών και αντιοξειδωτικών και συζητείται η πιθανή μελλοντική εργασία που μπορεί να καλύψει αυτά τα κενά. Στο παράρτημα βρίσκονται συμπληρωματικά διαγράμματα και πίνακες πειραματικών δεδομένων και αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την μελέτη της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών – πολυσακχαριτών και αντιοξειδωτικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

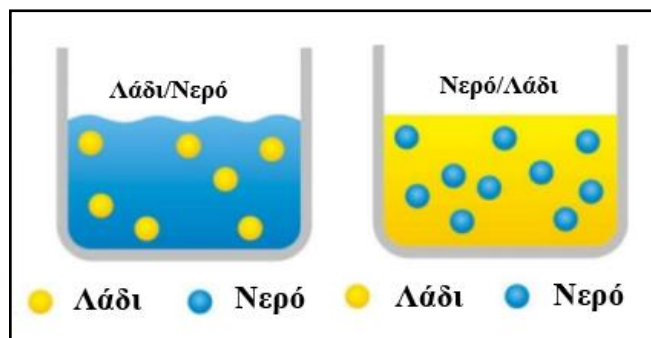
Γαλακτώματα

2.1 Εισαγωγή στα γαλακτώματα

Τα γαλακτώματα συγκεντρώνουν υψηλό ενδιαφέρον στην βιομηχανία τροφίμων λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών και λειτουργικών ιδιοτήτων τους. Την τελευταία δεκαετία, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη κολλοειδών συστημάτων που χρησιμοποιούν τα γαλακτώματα ως μέσο προστασίας, ενθυλάκωσης και απελευθέρωσης ελαιοδιαλυτών και υδατοδιαλυτών βιοδραστικών συστατικών, όπως βιταμίνες, χρωστικές, γευστικά συστατικά, συντηρητικά, θρεπτικά και φαρμακευτικά προϊόντα. (McClements 2016, McClements 2015) Τα γαλακτώματα έχουν την ικανότητα να ενισχύουν σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες του προϊόντος όπως η υφή και η γεύση. Οι βιομηχανίες τροφίμων βασίζονται στις αρχές της επιστήμης και της τεχνολογίας των γαλακτωμάτων για την παραγωγή μεγάλης ποικιλίας προϊόντων διατροφής, όπως γάλα, κρέμα, παγωτό, σάλτσες, μαγιονέζα, ποτά, σούπες, βούτυρο και μαργαρίνη.

Τα γαλακτώματα αποτελούνται από δύο μη αναμίξιμα υγρά, συνήθως μια οργανική και μια υδατική φάση, με το ένα υγρό να βρίσκεται διασκορπισμένο υπό τη μορφή μικρών σφαιρικών σωματιδίων μέσα στη συνεχή φάση του άλλου υγρού. Τα συστήματα, στα οποία σωματίδια ελαίου είναι διασκορπισμένα μέσα σε συνεχή φάση νερού, ονομάζονται γαλακτώματα ελαίου σε νερό (oil in water, O/W), ενώ αντίθετα τα συστήματα τα οποία περιέχουν σωματίδια νερού διασκορπισμένα μέσα σε συνεχή φάση ελαίου ονομάζονται γαλακτώματα νερού σε έλαιο (water in oil, W/O). Οι δύο τύποι γαλακτωμάτων παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.1. Για το σχηματισμό σταθερών γαλακτωμάτων, πέραν της υδατικής και της οργανικής φάσης, απαραίτητη είναι η χρήση μορίων γαλακτωματοποιητών ώστε να σταθεροποιηθούν τα σταγονίδια που σχηματίζονται κατά την ανάμιξη ελαίου με νερό. Στα συμβατικά γαλακτώματα, οι μέσες διαμέτροι σταγονιδίων κυμαίνονται συνήθως από 100 nm έως 100 μm. (McClements

2016) Εκτεταμένη συζήτηση για τους γαλακτωματοποιητές και γενικότερα για τα συστατικά των γαλακτωμάτων θα γίνει στο Κεφάλαιο 3.



Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση γαλακτώματος ελαίου σε νερό (O/W) (αριστερά) και γαλακτώματος νερού σε έλαιο (W/O) (δεξιά).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γαλακτωμάτων γενικά κατηγοριοποιούνται ως μέθοδοι υψηλής ή χαμηλής ενέργειας. Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας περιλαμβάνουν τη χρήση μηχανικών συσκευών, συμπεριλαμβανομένων μικρορευστοποιητών, υπερήχων και ομογενοποιητών βαλβίδων υψηλής πίεσης. Αυτά τα είδη συσκευών χρησιμοποιούνται ήδη στη βιομηχανία τροφίμων και έχουν υψηλή απόδοση, πράγμα που σημαίνει ότι είναι κατάλληλα για σκοπούς εμπορικής παραγωγής μεγάλης κλίμακας. Οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας περιλαμβάνουν αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση και θερμοκρασία αντιστροφής φάσης. (Tan & McClements 2021) Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν αλλαγές στο χημικό δυναμικό των συστατικών όταν η μεθοδολογία σύνθεσης ή η θερμοκρασία αλλάζουν με συγκεκριμένο τρόπο. Αν και οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας απαιτούν χαμηλές δαπάνες εξοπλισμού και λειτουργίας, απαιτούν σχετικά υψηλά επίπεδα συνθετικών επιφανειοδραστικών ουσιών και συχνά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες σε αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή τους. (McClements & Yan 2010)

2.2 Ιδιότητες γαλακτωμάτων

2.2.1 Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων

Πολλές από τις σημαντικότερες ιδιότητες των τροφίμων όπως η εμφάνιση, η σύσταση και η γεύση που βασίζονται σε γαλακτώματα, καθορίζονται από το μέγεθος των σφαιρικών σωματιδίων που αυτά περιέχουν. Συνεπώς, είναι σημαντικό για τους επιστήμονες τροφίμων να ελέγχεται αξιόπιστα, να προβλέπεται, να μετριέται και να αναφέρεται το μέγεθος των σφαιρικών σωματιδίων στα γαλακτώματα. Εάν όλα τα σωματίδια σε ένα γαλάκτωμα είναι του ίδιου μεγέθους τότε αυτό καλείται μονοδιάσπαρτο, ενώ εάν υπάρχει ποικιλία μεγέθους, το

γαλάκτωμα αναφέρεται ως πολυδιάσπαρτο. Το μέγεθος των σωματιδίων σε ένα μονοδιάσπαρτο γαλάκτωμα μπορεί να χαρακτηριστεί εντελώς από μία ιδιότητα, όπως η διάμετρος (d) ή η ακτίνα (r). Εντούτοις τα γαλακτώματα τροφίμων περιέχουν πάντα μια κατανομή μεγεθών σωματιδίων και έτσι η μέτρηση του μεγέθους τους είναι πιο πολύπλοκη από αυτή των μονοδιάσπαρτων συστημάτων. Παρόλα αυτά, σε πολλές καταστάσεις είναι επαρκής η γνώση του μέσου μεγέθους των σωματιδίων και του εύρους της κατανομής των μεγεθών τους. (McClements 2016)

2.2.2 Διεπιφανειακές Ιδιότητες Γαλακτωμάτων

Η διεπιφάνεια ενός σφαιρικού σωματιδίου γαλακτώματος είναι μια περιοχή μικρού πάχους, η οποία περιλαμβάνει μίγμα της οργανικής και της υδατικής φάσης καθώς και του γαλακτωματοποιητή. Η διεπιφάνεια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ερμηνεία των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων των γαλακτωμάτων τροφίμων. Είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η σύσταση, η δομή, το πάχος και το φορτίο της διεπιφανειακής περιοχής για να καθοριστούν οι ιδιότητες των γαλακτωμάτων. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά σε μεγάλο βαθμό καθορίζονται από τα επιφανειοδραστικά μόρια που αποτελούν τη διεπιφανειακή περιοχή. Επιπλέον σε αυτή την περιοχή λαμβάνουν μέρος διάφορες αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα η οξειδωση των λιπιδίων που θα συζητηθεί παρακάτω. (McClements 2016)

2.2.3 Φορτίο σφαιρικών σταγονιδίων

Το επιφανειακό φορτίο των σφαιρικών σταγονιδίων προέρχεται από την προσρόφηση των γαλακτωματοποιητών, οι οποίοι έχουν αρνητικά ή θετικά φορτισμένες κεφαλές με αποτελέσματα να δημιουργείται ηλεκτρικό φορτίο στις διεπιφάνειες. Το ηλεκτρικό φορτίο καθορίζεται από το είδος του ιονισμένου μορίου και από το pH της υδατικής φάσης. Το φορτίο των σφαιρικών σταγονιδίων είναι σημαντικό γιατί καθορίζει το είδος των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους, αλλά και με διάφορα μοριακά συστατικά της συνεχούς φάσης. Συνήθως όλα τα σφαιρικά σταγονίδια έχουν το ίδιο φορτίο, λόγω του ότι καλύπτονται όλα από τον ίδιο ιονισμένο γαλακτωματοποιητή. Όταν αυτό το φορτίο είναι αρκετά μεγάλο, τότε αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των σταγονιδίων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η συσσωμάτωσή τους. (McClements 2016)

2.3 Σταθερότητα Γαλακτωμάτων

Η σταθερότητα ενός γαλακτώματος είναι μια σημαντική ιδιότητα και πρέπει να διατηρείται καθ' όλη την αναμενόμενη διάρκεια ζωής ενός προϊόντος που περιέχει γαλάκτωμα, αφού συμβάλλει στην επιθυμητή φυσικοχημική του κατάσταση, διατηρώντας τα επιθυμητά

χαρακτηριστικά όπως η εμφάνιση, η υφή, το άρωμα και η γεύση. Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων καθορίζεται από τις διεπιφανειακές δυνάμεις, το μέγεθος των σταγονιδίων της διασκορπισμένης φάσης, το ιξώδες της συνεχούς φάσης και τη διαφορά πυκνότητας μεταξύ των δύο φάσεων. Βασικές συνιστώσες της σταθερότητας γαλακτωμάτων είναι η θερμοδυναμική και η μηχανική σταθερότητά τους. Η θερμοδυναμική αστάθεια ενός γαλακτώματος προσδιορίζεται εύκολα, αν αναδευτούν μαζί μια υδατική και μια ελαιώδης φάση, και στη συνέχεια παρατηρηθεί η μεταβολή στην εμφάνιση του συστήματος με την πάροδο του χρόνου. Το οπτικώς αδιαφανές γαλάκτωμα, που σχηματίζεται αρχικά, καταρρέει με την πάροδο του χρόνου, έως ότου ένα στρώμα ελαίου αρχίζει να εμφανίζεται πάνω από το στρώμα νερού. (McClements 2016)

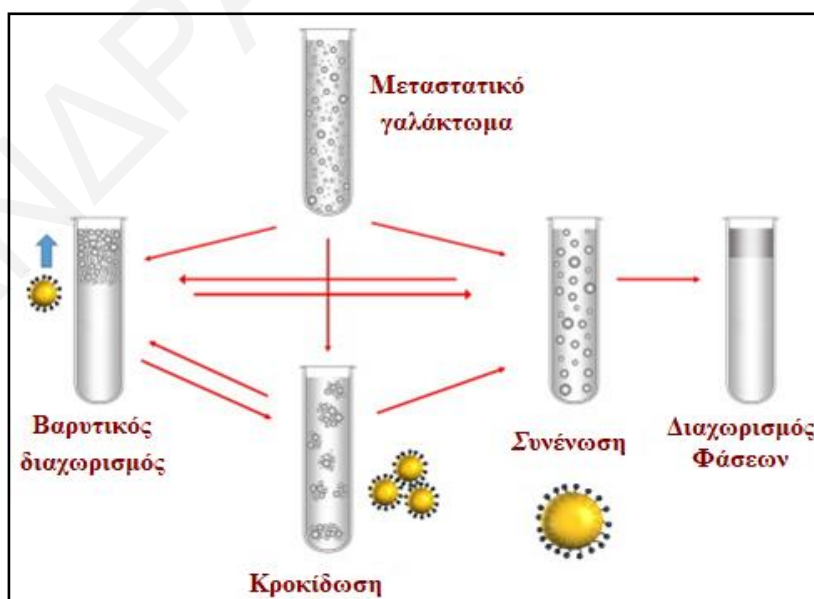
Εξ ορισμού η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας μεταξύ της τελικής και αρχικής κατάστασης (ΔG_I) είναι ίση με την αύξηση της επιφάνειας επαφής (ΔA) μεταξύ των φάσεων ελαίου και νερού πολλαπλασιαζόμενη με τη διεπιφανειακή τάση (γ), όπως φαίνεται και στην Εξίσωση 2.1. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας (ΔG_I) είναι πάντα θετική, εξαιτίας της αύξησης της επιφάνειας επαφής κατά την ομογενοποίηση, και ως εκ τούτου είναι αντίθετη στο σχηματισμό γαλακτώματος. Από την άλλη πλευρά ο όρος της εντροπίας διαμόρφωσης (ΔS) των σταγονιδίων είναι πάντοτε αρνητικός. Στα περισσότερα γαλακτώματα τροφίμων η μεταβολή της εντροπίας διαμόρφωσης των σταγονιδίων είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας διεπιφάνειας και θεωρείται αμελητέα. Έτσι κατά κύριο λόγο ο σχηματισμός ενός γαλακτώματος δεν ευνοείται θερμοδυναμικά, λόγω της αύξησης της διεπιφάνειας μετά τη γαλακτωματοποίηση. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως πως σε κάποιες περιπτώσεις που η επιφανειακή τάση είναι σχετικά μικρή, τότε ο όρος της εντροπίας διαμόρφωσης των σταγονιδίων είναι συγκριτικά μεγαλύτερος από τον όρο της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας και οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτωμάτων θερμοδυναμικά σταθερών (μικρογαλακτώματα). Γενικά, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας καθορίζει εάν ένα γαλάκτωμα είναι θερμοδυναμικά σταθερό ή ασταθές. Δεν δίνει όμως καμία πληροφορία σχετικά με το ρυθμό με τον οποίο μεταβάλλονται οι ιδιότητες του γαλακτώματος με το χρόνο και το είδος αυτών των μεταβολών. (McClements 2016)

$$\Delta G = \Delta G_I - T\Delta S = \gamma\Delta A - T\Delta S \quad \text{Εξίσωση 2.1}$$

Η έννοια της κινητικής σταθερότητας αναφέρεται ακριβώς σε αυτόν το ρυθμό και ελέγχεται με σύγκριση της μακροπρόθεσμης σταθερότητας δύο γαλακτωμάτων με την ίδια σύνθεση αλλά με διαφορετικό μέγεθος σταγονιδίων. Ένα γαλάκτωμα που περιέχει μικρότερα σταγονίδια συνήθως έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (μεγαλύτερη κινητική σταθερότητα) από το αντίστοιχο γαλάκτωμα που περιέχει μεγαλύτερα σταγονίδια, παρότι τα μικρά σταγονίδια λόγω

της μεγαλύτερης διεπιφάνειας μεταξύ των δύο φάσεων εμφανίζουν υψηλή θερμοδυναμική αστάθεια. Πολλές φορές στην τεχνολογία τροφίμων η κινητική σταθερότητα είναι σημαντικότερη της θερμοδυναμικής σταθερότητας ενός γαλακτώματος. Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα, όμως μπορούν να υπάρξουν σε μία μετασταθή κατάσταση που μπορούν να είναι κινητικά σταθερά. Η ερμηνεία της κινητικής σταθερότητας των γαλακτωμάτων στηρίζεται στη δυναμική φύση των σταγονιδίων. Τα σταγονίδια του γαλακτώματος βρίσκονται συνεχώς σε κίνηση μέσα στο γαλάκτωμα και συγκρούονται περιοδικά μεταξύ τους. Το κατά πόσον τα σταγονίδια απομακρύνονται μεταξύ τους, παραμένουν ως έχουν ή συνενώνονται μετά από μία σύγκρουσή τους, εξαρτάται από τη φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Η κινητική σταθερότητα λοιπόν των γαλακτωμάτων ερμηνεύεται τελικά από τη δυναμική των σταγονιδίων και τη φύση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. (McClements 2016)

Τα γαλακτώματα μπορεί να καταστούν ασταθή μέσω πολλών φυσικοχημικών διεργασιών, οι οποίες συχνά εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του συστήματος. Στα φαινόμενα φυσικής αστάθειας περιλαμβάνεται ο βαρυτικός διαχωρισμός, η κροκίδωση, η συσσωμάτωση, η ωρίμανση κατά Ostwald και η αναστροφή φάσεων. Τα φαινόμενα φυσικής αστάθειας περιγράφονται στο Σχήμα 2.2. Πέραν των φαινομένων αυτών, μπορεί να παρατηρηθούν και φαινόμενα χημικής αστάθειας όπως φαινόμενα οξείδωσης και υδρόλυσης τα οποία θα συζητηθούν στο Κεφάλαιο 3. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση φυσικοχημικών διεργασιών που καθιστούν φυσικά ασταθή τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό. (McClements D. J., Gumus C. E., 2016)

2.3.1 Βαρυτικός διαχωρισμός

Το φαινόμενο του βαρυτικού διαχωρισμού είναι το φυσικό φαινόμενο αποσταθεροποίησης κατά το οποίο συστατικά του γαλακτώματος τείνουν να διαχωριστούν λόγω της επίδρασης της βαρυτικής δύναμης πάνω τους. Η ταχύτητα (v) με την οποία κινούνται τα σταγονίδια λόγω των βαρυτικών δυνάμεων σε ένα αραιό γαλάκτωμα δίνεται από τον Νόμο του Stokes (Εξίσωση 2.2). Όπου g είναι το βαρυτικό πεδίο, d η διάμετρος των σταγονιδίων, ρ είναι πυκνότητα, η το ιξώδες διάτμησης, και οι δείκτες 1 και 2 αναφέρονται στις συνεχείς και διεσπαρμένες φάσεις, αντίστοιχα.

$$v_{Stokes} = \frac{g(\rho_2 - \rho_1)d^2}{18\eta_1}$$

Εξίσωση 2.2

Οι γαλακτωματοποιητές μπορούν να επηρεάσουν τον βαρυτικό διαχωρισμό, επειδή η μέση διάμετρος των σταγονιδίων σε ένα γαλάκτωμα επηρεάζεται από την αποτελεσματικότητα του γαλακτωματοποιητή κατά την ταχεία προσρόφησή του στις επιφάνειες των σταγονιδίων κατά την ομογενοποίηση. Ως εκ τούτου αναστέλλονται φαινόμενα βαρυτικού διαχωρισμού και συγχώνευσης των σταγονιδίων. Επιπλέον οι γαλακτωματοποιητές μπορούν να αλλάξουν την αποτελεσματική πυκνότητα των σταγονιδίων σχηματίζοντας μια πυκνή διεπιφανειακή επικάλυψη γύρω τους. Συνήθως, οι γαλακτωματοποιητές έχουν υψηλότερη πυκνότητα από το νερό, ενώ το λάδι έχει χαμηλότερη πυκνότητα. Κατά συνέπεια, η παρουσία ενός στρώματος γαλακτωματοποιητή τείνει να μειώσει τη διαφορά πυκνότητας μεταξύ των σταγονιδίων και του περιβάλλοντος μέσου, μειώνοντας έτσι την ταχύτητα βαρυτικού διαχωρισμού. Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο είναι πολύ σημαντικό μόνο σε γαλακτώματα που περιέχουν σχετικά μικρά σταγονίδια και παχιά διεπιφανειακά στρώματα. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

2.3.2 Συσσωμάτωση σταγονιδίων

Τα σταγονίδια σε ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό μπορεί να συσσωματωθούν μέσω ποικίλων μηχανισμών, με τους πιο συνηθισμένους να είναι η κροκίδωση, η συνένωση και η μερική συνένωση. Η κροκίδωση οφείλεται στη σύνδεση δύο ή περισσότερων σταγονιδίων σε ένα συσσωμάτωμα, με κάθε μεμονωμένο σταγονίδιο να διατηρεί τις αρχικές του διαστάσεις. Η συνένωση είναι η διαδικασία κατά την οποία δύο ή περισσότερα σταγονίδια συγχωνεύονται για να σχηματίσουν ένα μόνο μεγαλύτερο σταγονίδιο. Στη μερική συνένωση δύο ή περισσότερα μερικώς κρυσταλλικά σταγονίδια λιπιδίων σχηματίζουν ένα συσσωμάτωμα, το οποίο ξεκινά συχνά από την προεξοχή των κρυστάλλων ελαίου εντός ενός σταγονιδίου στην υγρή περιοχή των γειτονικών σταγονιδίων. Σε αυτήν την περίπτωση, τα σταγονίδια δεν

συγχωνεύονται πλήρως λόγω της μηχανικής αντοχής του τρισδιάστατου δικτύου κρυστάλλων ελαίου. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

Η φύση των γαλακτωματοποιητών που υπάρχουν σε ένα γαλάκτωμα μπορεί να επηρεάσει τη συνένωση σταγονιδίων με πολλούς τρόπους. Αρχικά, ο τύπος γαλακτωματοποιητή παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό των ελκτικών και απωστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σταγονιδίων. Τα σταγονίδια σε ένα γαλάκτωμα τείνουν να συνενώνονται όταν κυριαρχούν οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις, αλλά τείνουν να διατηρούνται σταθερά όταν κυριαρχούν οι απωστικές αλληλεπιδράσεις. Συνήθως, οι γαλακτωματοποιητές αναστέλλουν τη συνένωση των σταγονιδίων δημιουργώντας ισχυρές ηλεκτροστατικές ή /και στερικές απωστικές αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προάγουν τη συνένωση των σταγονιδίων δημιουργώντας ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σταγονιδίων, όπως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις όταν υπάρχουν υψηλά επίπεδα μη προσροφημένου γαλακτωματοποιητή. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

2.3.2.1 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Οι ηλεκτροστατικές απωστικές αλληλεπιδράσεις που δρουν μεταξύ των σταγονιδίων ελαίου που αιωρούνται στο νερό εξαρτώνται από την πυκνότητα του επιφανειακού φορτίου, καθώς και από συνθήκες του διαλύματος, όπως η ιοντική ισχύς και ο τύπος του διαλύτη. Συνήθως, όσο υψηλότερη είναι η πυκνότητα επιφανειακού φορτίου και όσο χαμηλότερη είναι η ιοντική ισχύς τόσο ισχυρότερη είναι η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Η φύση των μορίων του γαλακτωματοποιητή που περιβάλλουν τα σταγονίδια λιπιδίων σε ένα γαλάκτωμα επηρεάζει έντονα την πυκνότητα επιφανειακού φορτίου, καθώς και την εξάρτησή του από το pH. Γαλακτωματοποιητές όπως οι πρωτεΐνες είναι κατάλληλοι για την παρεμπόδιση της συνένωσης σταγονιδίων λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης σε τιμές pH αρκετά πάνω ή κάτω από το ισοηλεκτρικό τους σημείο. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

2.3.2.2 Στερικές απωστικές αλληλεπιδράσεις

Το μέγεθος και το εύρος της στερικής άπωσης μεταξύ των σταγονιδίων καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το πάχος και τη διεύθυνση των μορίων του γαλακτωματοποιητή στις επιφάνειές τους. Συνήθως, όσο πιο πυκνή είναι η διάταξη τόσο πιο ισχυρή είναι η στερική απώθηση. Οι γαλακτωματοποιητές διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τη μοριακή τους οργάνωση στις διεπιφάνειες ελαίου – νερού, η οποία επηρεάζει την ικανότητά τους να δημιουργούν στερική άπωση μεταξύ των σταγονιδίων. Για παράδειγμα, οι πολυσακχαρίτες που σχηματίζουν διεπιφανειακά στρώματα σημαντικού πάχους είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην αναστολή της συνένωσης των σταγονιδίων μέσα από στερεοχημικές

αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, οι σφαιρικές πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεΐνες ορού του γάλακτος, σχηματίζουν λεπτές διεπιφανειακές στιβάδες και δεν είναι αποτελεσματικές στην αποφυγή της συνένωσης των σταγονιδίων μόνο μέσω στερικής άπωσης, επειδή το εύρος των ελκτικών δυνάμεων Van der Waals μεταξύ των σταγονιδίων υπερβαίνει το εύρος της στερικής άπωσης. Σε αυτήν την περίπτωση, η συσσώρευση σταγονιδίων μπορεί να ανασταλεί διασφαλίζοντας ότι οι σφαιρικές πρωτεΐνες έχουν ισχυρό ηλεκτρικό φορτίο. Η απόσταση επαφής δύο σταγονιδίων και συνεπώς οι στερικές αλληλεπιδράσεις, μπορούν να αυξηθούν επιλέγοντας φυσικούς γαλακτωματοποιητές με μεγάλες και εκτεταμένες δομές ή χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατική εναπόθεση για τον σχηματισμό διεπιφανειών πολλαπλών στρωμάτων. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

2.3.2.3 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Μετά την προσρόφηση στις επιφάνειες των σταγονιδίων ελαίου, ορισμένοι τύποι γαλακτωματοποιητών έχουν μη πολικές περιοχές που παραμένουν εκτεθειμένες στο υδατικό περιβάλλον, γεγονός που δημιουργεί μια υδρόφοβη έλξη μεταξύ των σταγονιδίων που μπορεί να προωθήσει τη συνένωση. Οι αμφίφιλες πρωτεΐνες έχουν τόσο πολικές όσο και μη πολικές ομάδες στην εξωτερική επιφάνεια, και αφού προσροφηθούν στις επιφάνειες σταγονιδίων λιπιδίων, οι μη πολικές ομάδες τείνουν να προεξέχουν στη φάση ελαίου, ενώ οι πολικές ομάδες τείνουν να προεξέχουν στην υδατική φάση. Παρ' όλα αυτά, μερικές από τις μη πολικές ομάδες στις επιφάνειες των προσροφούμενων πρωτεϊνών μπορεί ακόμη να κατευθύνονται προς την υδατική φάση και επάγουν υδρόφοβο χαρακτήρα στις επιφάνειες σταγονιδίων. Επιπλέον, οι σφαιρικές πρωτεΐνες ενδέχεται να υποστούν αλλαγές διαμόρφωσης μετά από προσρόφηση σε επιφάνειες σταγονιδίων (επιφανειακή μετουσίωση) ή αφού θερμανθεί ένα γαλάκτωμα (θερμική μετουσίωση), γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των μη πολικών ομάδων που εκτίθενται στην περιβάλλουσα υδατική φάση. Ως αποτέλεσμα αυτής της αύξησης της επιφανειακής υδροφοβικότητας δημιουργείται συχνά μια ισχυρή υδρόφοβη έλξη μεταξύ επικαλυμμένων με πρωτεΐνη σταγονιδίων, που προάγει την κροκίδωση των σταγονιδίων. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι συνήθως λιγότερο σημαντικές για σταγονίδια ελαίου επικαλυμμένα με βιοεπιφανειοδραστικά ή φωσφολιπίδια επειδή τότε πολύ λίγες μη πολικές ομάδες εκτίθενται στις επιφάνειες των σταγονιδίων. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

2.3.2.4 Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

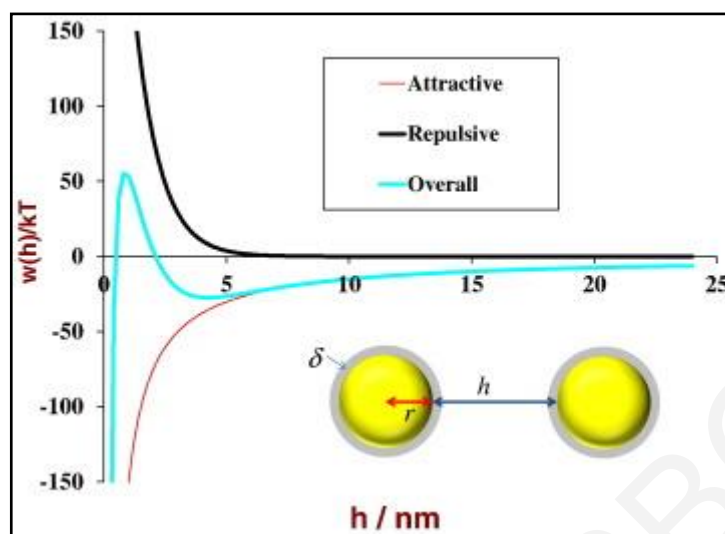
Ορισμένοι φυσικοί γαλακτωματοποιητές έχουν χημικά δραστικές λειτουργικές ομάδες ικανές να σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς με άλλους γαλακτωματοποιητές στο ίδιο ή σε

διαφορετικά σταγονίδια ελαίου ανάλογα με το διάλυμα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ένα από τα πιο κοινά παραδείγματα αυτού του φαινομένου είναι οι σφαιρικές πρωτεΐνες που έχουν ελεύθερες ομάδες σουλφυδρυλίου ($-SH$) ή δισουλφιδικούς δεσμούς ($-S-S-$) που μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους. Εάν σχηματιστούν ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ πρωτεϊνών που προσροφώνται στις ίδιες επιφάνειες σταγονιδίων, τότε αυτές μπορούν να βελτιώσουν τη σταθερότητα έναντι της συσσωμάτωσης των γαλακτωμάτων. Αντιστρόφως, εάν οι ομοιοπολικοί δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ πρωτεϊνών προσροφημένων σε διαφορετικά σταγονίδια, τότε μπορούν να οδηγήσουν σε κροκίδωση, καθώς τα σταγονίδια συγκρατούνται μαζί από ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς. Σε γενικές γραμμές, οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι σχετικά ισχυρές αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας και επομένως μπορούν να σχηματιστούν μόνο όταν οι δραστικές ομάδες βρίσκονται πολύ κοντά. Κατά συνέπεια, μπορεί να συνεργάζονται με άλλες φυσικές αλληλεπιδράσεις, όπως Van der Waals, ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες και αλληλεπιδράσεις υδρογόνου. Για παράδειγμα, σταγονίδια επικαλυμμένα με πρωτεΐνη μπορεί να έρθουν σε στενή επαφή λόγω της μείωσης της ηλεκτροστατικής απόθησης ή της αύξησης της υδρόφοβης έλξης, και στη συνέχεια σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των προσροφημένων στιβάδων σε διαφορετικά σταγονίδια. Ο σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών εξαρτάται από την παρουσία χημικά δραστικών λειτουργικών ομάδων, καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες του συστήματος. Αυτός ο τύπος αλληλεπίδρασης τείνει επομένως να είναι λιγότερο σημαντικός για πολλά φυσικά επιφανειοδραστικά, φωσφολιπίδια και πολυσακχαρίτες που έχουν λιγότερο χημικά δραστικές λειτουργικές ομάδες. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

2.3.2.5 Συνολικές αλληλεπιδράσεις

Η συνολική κολλοειδής αλληλεπίδραση εξαρτάται από τη συμβολή των διαφόρων τύπων ελκτικών και απωστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σταγονιδίων (Σχήμα 2.3). Υπάρχουν πάντα έλξεις Van der Waals μεταξύ των σταγονιδίων λιπιδίων που θα ευνοούν τη συνένωσή τους. Η έλξη αυτή μπορεί να ενισχύεται από άλλους τύπους ελκτικών αλληλεπιδράσεων όπως οι υδρόφοβες. Κατά συνέπεια, το στρώμα γαλακτωματοποιητή πρέπει να παράγει ένα είδος απωστικής δύναμης αρκετά ισχυρής για να υπερνικήσει αυτές τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις. Γαλακτωματοποιητές που μπορούν να δημιουργήσουν απωστικές αλληλεπιδράσεις που είναι ισχυρότερες και μεγαλύτερης εμβέλειας από τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αναστείλουν εντελώς τη συσώρευση σταγονιδίων εμποδίζοντάς τα να πλησιάσουν. Από την άλλη πλευρά, συσσωμάτωση σταγονιδίων μπορεί να συμβεί σε γαλακτώματα που περιέχουν γαλακτωματοποιητές που δεν είναι σε θέση να παράγουν απωστικές αλληλεπιδράσεις αρκετά ισχυρές ή μεγάλης εμβέλειας. Σε αυτήν την περίπτωση,

μπορεί να προκύψει ασθενής κροκίδωση, ισχυρή κροκίδωση ή συνένωση ανάλογα με τη φύση του στρώματος του γαλακτωματοποιητή.



Σχήμα 2.3: Οι συνολικές κολλοειδείς αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από το εύρος, το μέγεθος και την ύπαρξη ελκτικών και απωστικών δυνάμεων. h είναι ο διαχωρισμός μεταξύ επιφανειών σταγονιδίων, το r είναι η ακτίνα του σταγονιδίου και το δ είναι το πάχος του επιφανειακού στρώματος.

Η κατανόηση των κύριων τύπων κολλοειδών αλληλεπιδράσεων που λειτουργούν σε ένα συγκεκριμένο σύστημα σταθεροποιημένο με φυσικό γαλακτωματοποιητή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατανόηση των κύριων παραγόντων που θα επηρεάσουν τη σταθερότητα της συσσωμάτωσης. Σταγονίδια λιπιδίων με επικάλυψη γαλακτωματοποιητή, τα οποία σταθεροποιούνται κυρίως με ηλεκτροστατική άπωση, τείνουν να είναι πολύ ευαίσθητα στο pH και την ιοντική ισχύ. Τέτοιοι γαλακτωματοποιητές είναι οι πρωτεΐνες, τα φωσφολιπίδια και τα ιοντικά τασιενεργά. Αντίθετα, τα μόρια που σταθεροποιούν κυρίως με στερική απόθεση, όπως οι αμφίφιλοι πολυσακχαρίτες, είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητα σε αλλαγές περιβαλλοντικών συνθηκών. Οι γαλακτωματοποιητές που υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη θέρμανση (όπως οι σφαιρικές πρωτεΐνες) ενδέχεται να είναι ευαίσθητοι στη συσσώρευση σταγονιδίων λόγω αύξησης της υδρόφοβης έλξης. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

2.3.3. Ωρίμανση Ostwald

Η ωρίμανση Ostwald προκαλεί μια προοδευτική αύξηση στο μέσο μέγεθος σταγονιδίων με την πάροδο του χρόνου ως αποτέλεσμα της διάχυσης των μορίων ελαίου από μικρά έως μεγάλα σταγονίδια μέσω της παρεμβαλλόμενης υδατικής φάσης. Ο ρυθμός ανάπτυξης σταγονιδίων μέσω της ωρίμανσης Ostwald περιγράφεται από την Εξίσωση 2.3, όπου $S_{(\infty)}$ είναι η διαλυτότητα της ελαιώδους φάσης στην υδατική φάση, $d(t)$ είναι η διάμετρος των σταγονιδίων στο χρόνο t , d_0 είναι η αρχική διάμετρος των σταγονιδίων, V_m είναι ο μοριακός όγκος των

μορίων ελαίου και γ είναι η διεπιφανειακή τάση ελαίου – νερού. Αυτή η εξίσωση δείχνει ότι ο ρυθμός ωρίμανσης Ostwald επηρεάζεται έντονα από την υδατοδιαλυτότητα της λιπιδικής φάσης, αλλά εξαρτάται επίσης από ορισμένες ιδιότητες του γαλακτωματοποιητή.

$$d(t)^3 = d_0^3 + \left(\frac{64 \gamma V_m^2}{9 RT}\right) S_\infty Dt \quad \text{Εξίσωση 2.3}$$

Οι γαλακτωματοποιητές μπορούν να επηρεάσουν τον ρυθμό ωρίμανσης Ostwald στα γαλακτώματα ελαίου σε νερό μέσω διαφόρων μηχανισμών. Πρώτον, ο ρυθμός της ωρίμανσης Ostwald είναι ανάλογος με τη διεπιφανειακή τάση ελαίου – νερού (Εξίσωση 2.3) και έτσι όσο πιο αποτελεσματικός είναι ένας γαλακτωματοποιητής στη μείωση της διεπιφανειακής τάσης, τόσο πιο αποτελεσματικός θα πρέπει να είναι στην αναστολή της ανάπτυξης σταγονιδίων μέσω αυτού του μηχανισμού. Τα τασιενεργά που είναι μικρά μόρια τείνουν να είναι καλύτερα στη μείωση της διεπιφανειακής τάσης από τις πρωτεΐνες ή τους πολυσακχαρίτες, και μπορεί επομένως να είναι πιο αποτελεσματικά στην αναστολή της ωρίμανσης Ostwald. Δεύτερον, ορισμένοι γαλακτωματοποιητές μπορούν να σχηματίσουν άκαμπτα κελύφη γύρω από τα σταγονίδια ελαίου που μπορούν να εμποδίσουν την ωρίμανση Ostwald μέσω της μηχανικής επιβράδυνσης της συρρίκνωσης ή της ανάπτυξης σταγονιδίων. Τρίτον, ορισμένοι γαλακτωματοποιητές είναι ικανοί να σχηματίζουν κolloειδείς δομές (όπως μικκύλια) που μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα της ελαιώδους φάσης στην υδατική φάση, αυξάνοντας έτσι τον ρυθμό της ωρίμανσης Ostwald. Ο τύπος του φυσικού γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται μπορεί επομένως να επηρεάζει την τάση για εμφάνιση της ωρίμανσης Ostwald σε γαλακτώματα. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

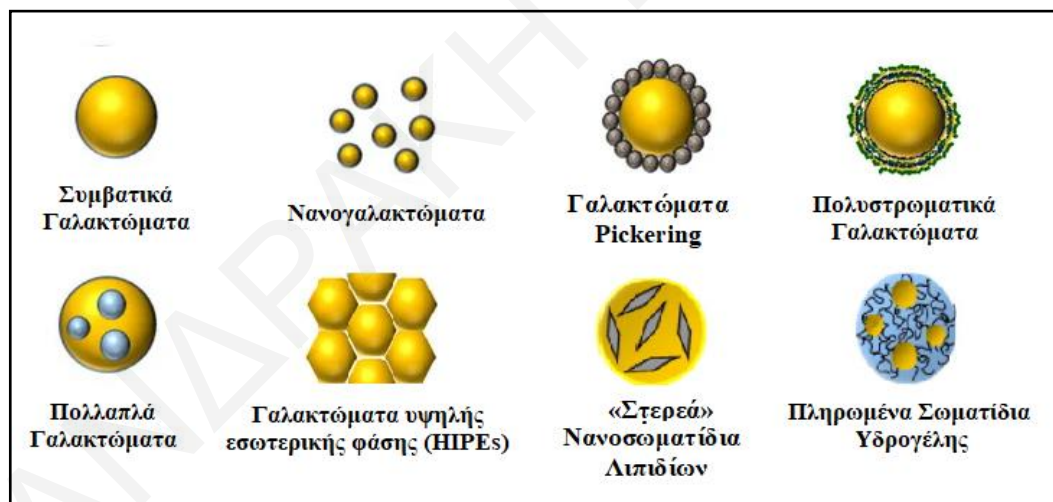
2.4 Κατηγορίες γαλακτωμάτων

Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι νέοι τύποι γαλακτωμάτων, που εντάσσονται στην ευρύτερη περιοχή της νανοτεχνολογίας, όπως τα νανογαλακτώματα, τα συμβατικά γαλακτώματα, τα γαλακτώματα υψηλής εσωτερικής φάσης (HIPEs), τα πολλαπλά γαλακτώματα, τα πολυστρωματικά γαλακτώματα (ΠΓ), τα γαλακτώματα Pickering, τα «στερεά» σωματίδια λιπιδίων (SLP) και τα πληρωμένα σωματίδια υδρογέλης. Μεταξύ των συστημάτων αυτών, τα ΠΓ είναι η μέθοδος που επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία. Τα γαλακτώματα με συνεχή υδατική φάση είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα γαλακτώματα στη βιομηχανία τροφίμων. Οι τύποι αυτών των γαλακτωμάτων συνοψίζονται στο Σχήμα 2.4.

2.4.1 Νανογαλακτώματα

Τα νανογαλακτώματα είναι παρόμοια με τα συμβατικά γαλακτώματα εκτός από το μέγεθός τους. Οι διάμετροι των σταγονιδίων τους είναι μικρότερες και κυμαίνονται από περίπου 20 έως

200 nm. Το μικρότερο μέγεθος των σταγονιδίων παρέχει πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών γαλακτωμάτων για συγκεκριμένες εφαρμογές, όπως η καλύτερη σταθερότητά τους στον βαρυτικό διαχωρισμό και στην συσσωμάτωση σταγονιδίων επειδή η ισχύς των ελκτικών δυνάμεων που δρουν μεταξύ των σταγονιδίων μειώνεται λόγω του μικρότερου μεγέθους σταγονιδίων, ενώ η ισχύς των απωστικών δυνάμεων εξαρτάται λιγότερο από το μέγεθος. (McClements & Yan 2010) Το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται μέσω διαφόρων τεχνικών κατά την παρασκευή τους. Συγκεκριμένα με αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή, με εξισορρόπηση του ιξώδους του ελαίου με το ιξώδες του νερού και όταν η ένταση και η διάρκεια ομογενοποίησης αυξάνεται. Τα νανογαλακτώματα έχουν διερευνηθεί σε εκτεταμένο βαθμό για την ικανότητά τους να ενθυλακώνουν, να προστατεύουν και να απελευθερώνουν υδρόφοβες βιοδραστικές ενώσεις σε προϊόντα τροφίμων και ποτών. Ωστόσο παρά την ικανότητά τους να αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα των υδρόφοβων βιοδραστικών ενώσεων, η εφαρμογή νανογαλακτωμάτων αντιμετωπίζει ορισμένες πρακτικές προκλήσεις. Λόγω της μεγάλης επιφάνειας των νανογαλακτωμάτων, απαιτείται υψηλή συγκέντρωση γαλακτωματοποιητών, η οποία μπορεί να αυξήσει το κόστος παραγωγής ή να μεταβάλει τη γεύση. (McClements & Yan 2010, Tan & McClements 2021)

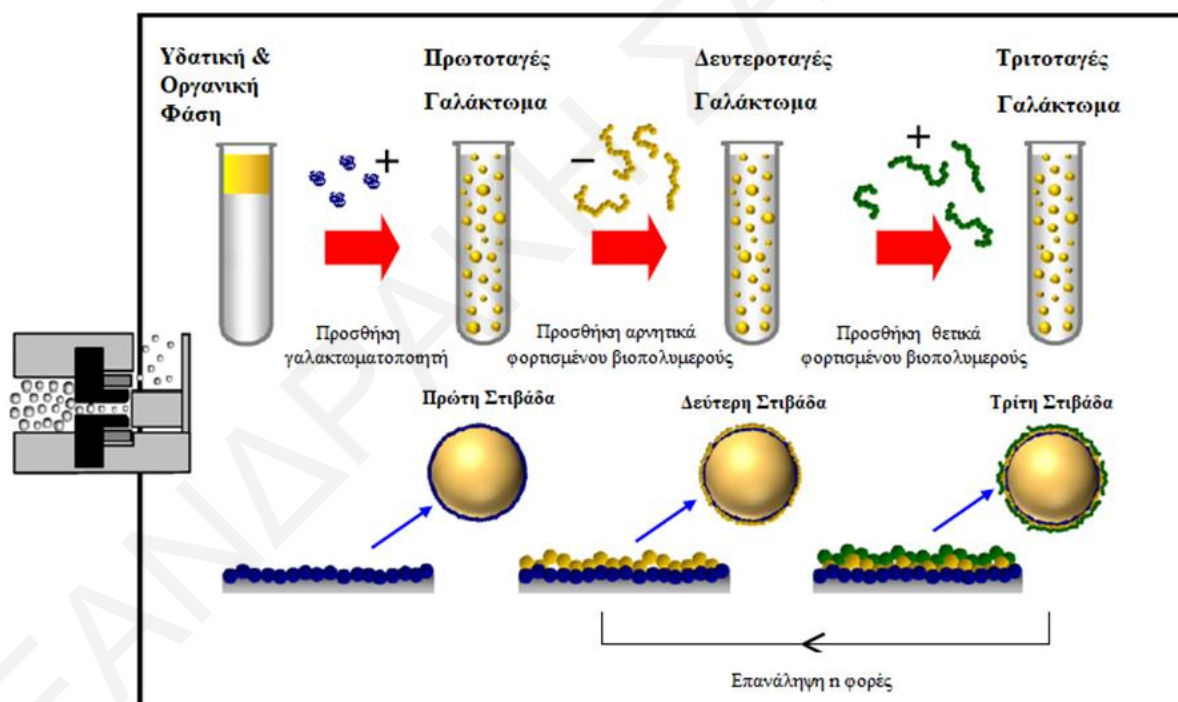


Σχήμα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση γαλακτωμάτων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. (Tan C., McClements D. J., 2021)

2.4.2 Πολυστρωματικά Γαλακτώματα (ΠΓ)

Τα πολυστρωματικά γαλακτώματα (ΠΓ) αποτελούνται από σταγονίδια ελαίου επικαλυμμένα με πολλαπλά στρώματα φορτισμένων πολυηλεκτρολυτών. Η παρασκευή των ΠΓ βασίζεται στη μέθοδο ηλεκτροστατικής εναπόθεσης στρώματος προς στρώμα (Layer-by-Layer – LBL). Αρχικά, ένα γαλακτώμα ελαίου σε νερό σχηματίζεται από ομογενοποιημένο έλαιο, νερό και έναν φορτισμένο γαλακτωματοποιητή. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ενός γαλακτώματος

που περιέχει φορτισμένα σταγονίδια ελαίου επικαλυμμένα με γαλακτωματοποιητή. Αυτό το γαλάκτωμα στη συνέχεια αναμιγνύεται με ένα διάλυμα που περιέχει αντίθετα φορτισμένα βιοπολυμερή, τα οποία προσροφούνται στις επιφάνειες των σταγονιδίων ελαίου και σχηματίζουν μια επιπλέον επικάλυψη. Αυτή η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές με τη διαδοχική εναπόθεση αντίθετα φορτισμένων βιοπολυμερών πάνω στις επιφάνειες των σταγονιδίων, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό σταγονιδίων ελαίου με επικάλυψη πολλαπλών στρώσεων. Η διαδικασία σχηματισμού ΠΓ παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.5. Η διαδικασία συναρμολόγησης LbL μπορεί να παρακολουθείται μετρώντας την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων και την αλλαγή στο δυναμικό μετά την απόθεση κάθε διαδοχικής στρώσης. Συχνά πραγματοποιείται ένα βήμα πλύσης μεταξύ κάθε σταδίου εναπόθεσης για την απομάκρυνση περίσσειας βιοπολυμερών από την υδατική φάση. Διαφορετικά, θα αλληλεπιδρούσαν με το επόμενο αντίθετα φορτισμένο βιοπολυμερές. Ωστόσο, αυτό το στάδιο πλύσης μπορεί μερικές φορές να αποφευχθεί εάν η συγκέντρωση του βιοπολυμερούς ελέγχεται προσεκτικά για να εξασφαλιστεί ότι τα σταγονίδια ελαίου είναι πλήρως επικαλυμμένα.



Σχήμα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας σχηματισμού ΠΓ μέσω της μεθόδου LbL. (McClements 2016, McClements 2012)

Ο επιτυχής σχηματισμός ΠΓ εξαρτάται από το συνδυασμό βιοπολυμερών που χρησιμοποιούνται, καθώς και από τις συνθήκες διαλύματος που χρησιμοποιούνται, όπως το pH και η ιοντική ισχύς. Πολλές πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη συναρμολόγηση πολυστρωματικών γαλακτωμάτων. Συχνά, οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται για

να σχηματίσουν το πρώτο στρώμα επειδή έχουν καλύτερη επιφανειακή δραστηριότητα από τους πολυσακχαρίτες. Η εναπόθεση πολυστρωματικών επικαλύψεων γύρω από τα σταγονίδια ελαίου μπορεί να έχει διάφορα οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της ηλεκτροστατικής και της στερικής άπωσης μεταξύ των σταγονιδίων, σχηματίζοντας ένα πυκνό δίκτυο βιοπολυμερών γύρω από τα σταγονίδια ελαίου που ρυθμίζει τις διαδικασίες διάχυσης και ενσωματώνοντας λειτουργικά βιοπολυμερή (όπως αντιοξειδωτικά) στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης πολυστρωματικών γαλακτωμάτων είναι ότι οι ιδιότητες (η σύνθεση, το φορτίο, το πάχος, η διαπερατότητα, η ρεολογία και η περιβαλλοντική απόκριση) της διεπιφανειακής στιβάδας που επικαλύπτουν τα σταγονίδια λιπιδίων μπορούν να ελεγχθούν συστηματικά. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με προσεκτικό έλεγχο της σύνθεσης του συστήματος και των συνθηκών παρασκευής (τύπος και συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή, τύπος και συγκέντρωση πολυηλεκτρολύτη, pH, ιοντική ισχύς, σειρά προσθήκης συστατικών και συνθήκες ανάμιξης) κατά την παραγωγή των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων. Η ικανότητα συστηματικού ελέγχου των διεπιφανειακών ιδιοτήτων με ορθολογικό τρόπο επιτρέπει τον σχεδιασμό επικαλυμμένων σταγονιδίων λιπιδίων με βελτιωμένη σταθερότητα και λειτουργική απόδοση. (McClements & Yan 2010) Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να βελτιώσουν τη σταθερότητα των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων στις περιβαλλοντικές «πιέσεις» καθώς και να αυξήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα της λιπιδικής φάσης. (McClements 2016, Tan & McClements 2021)

2.4.3 Γαλακτώματα Pickering

Τα γαλακτώματα Pickering αναφέρονται επίσης ως γαλακτώματα σταθεροποιημένα με σωματίδια. Σε αντίθεση με τα συμβατικά γαλακτώματα, τα οποία συνήθως σταθεροποιούνται από μοριακούς γαλακτωματοποιητές (όπως τασιενεργά, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες ή πολυσακχαρίτες), τα γαλακτώματα Pickering σταθεροποιούνται από κolloειδή σωματίδια, τα οποία μπορεί να είναι οργανικά ή ανόργανα. Τα γαλακτώματα Pickering είναι συνήθως πολύ πιο ανθεκτικά στην ωρίμανση και τη συνένωση Ostwald από τα συμβατικά γαλακτώματα λόγω της εξαιρετικά ισχυρής προσκόλλησης των κolloειδών σωματιδίων στις επιφάνειες των σταγονιδίων. Τα κolloειδή σωματίδια που μπορούν να λειτουργήσουν ως καλοί σταθεροποιητές για τα γαλακτώματα Pickering πρέπει να έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά: (α) να διαβρέχονται μερικώς τόσο από τη φάση ελαίου όσο και από το νερό και (β) το επιφανειακό δυναμικό τους δεν πρέπει να είναι πολύ υψηλό, διαφορετικά δεν θα προσροφηθούν έντονα στις διεπιφάνειες λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ τους. (Tan & McClements 2021)

2.4.4 «Στερεά» Νανοσωματίδια Λιπιδίων (SLNs)

Τα στερεά νανοσωματίδια λιπιδίων (SLNs) είναι κολλοειδείς διασπορές που περιέχουν σωματίδια με στερεοποιημένο λιπιδικό πυρήνα, επικαλυμμένο με στρώμα μορίων γαλακτωματοποιητή. Δομικά, επομένως, είναι παρόμοια με τα συμβατικά γαλακτώματα εκτός του ότι τα σταγονίδια είναι πλήρως κρυσταλλικά. Η στερεοποιημένη λιπιδική μήτρα των SLNs παρέχει μερικά πλεονεκτήματα, όπως καλύτερη προστασία των ενθυλακωμένων βιοδραστικών ενώσεων και παρατεταμένη απελευθέρωση και μεταβολές στη γαστρεντερική πεπτικότητα. Συνήθως, τα SLNs παρασκευάζονται με ομογενοποίηση μιας φάσης ελαίου και μιας υδατικής φάσης που περιέχει έναν υδρόφιλο γαλακτωματοποιητή σε θερμοκρασία πάνω από το σημείο τήξης των λιπιδίων. Το προκύπτον νανογαλάκτωμα μετά ψύχεται κάτω από τη θερμοκρασία κρυστάλλωσης της λιπιδικής φάσης για να το στερεοποιήσει. (McClements & Yan 2010, Tan & McClements 2021)

2.4.5 Πολλαπλά Γαλακτώματα

Τα πολλαπλά γαλακτώματα, γνωστά επίσης και ως διπλά γαλακτώματα, αποτελούνται από μια εσωτερική υδατική φάση (W_1) που διασπείρεται υπό τη μορφή μικρών σταγονιδίων εντός μεγαλύτερων σταγονιδίων λαδιού (O), τα οποία διασκορπίζονται τα ίδια σε μια εξωτερική υδατική φάση (W_2). Σε σύγκριση με τα συμβατικά γαλακτώματα με το ίδιο κλάσμα όγκου διεσπαρμένης φάσης (είτε O είτε W_1 / O), τα γαλακτώματα $W_1 / O / W_2$ έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά αλλά παρόμοια εμφάνιση, υφή και αίσθηση στο στόμα, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαταστάτες λίπους. Αυτός ο τύπος γαλακτώματος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να ενθυλακώσει υδρόφιλες βιοδραστικές ενώσεις εντός της εσωτερικής υδατικής φάσης και να τις απελευθερώσει με ελεγχόμενο τρόπο. Η τυποποιημένη διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παρασκευή αυτού του τύπου γαλακτώματος περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά μια υδατική φάση και μια ελαιώδης φάση που περιέχει ένα υδρόφοβο γαλακτωματοποιητή ομογενοποιούνται μαζί για να σχηματίσουν ένα W_1 / O γαλάκτωμα και ακολούθως αυτό το γαλάκτωμα και μία υδατική φάση που περιέχει ένα υδρόφιλο γαλακτωματοποιητή ομογενοποιούνται για να σχηματίσουν ένα $W_1 / O / W_2$ γαλάκτωμα. Για αποφυγή της ανεπιθύμητης διάσπασης των σταγονιδίων W_1 / O , το δεύτερο βήμα ομογενοποίησης θα πρέπει να είναι πιο ήπιο από το πρώτο. (McClements 2016, Tan & McClements 2021)

2.4.6 Πληρωμένα σωματίδια υδρογέλης

Τα πληρωμένα σωματίδια υδρογέλης αποτελούνται από σταγονίδια ελαίου παγιδευμένα μέσα σε ένα σωματίδιο υδρογέλης που διασπείρεται εντός ενός υδατικού μέσου. Τα σωματίδια

υδρογέλης αποτελούνται συνήθως από ένα μείγμα βιοπολυμερούς (πρωτεΐνη και / ή πολυσακχαρίτη) και νερό. Αυτός ο τύπος συστήματος μπορεί να θεωρηθεί ως ένα γαλακτώμα έλαιο-σε-νερό-σε-νερό ($O / W_1 / W_2$), όπου τα W_1 και W_2 αναφέρονται σε δύο υδατικές φάσεις με διαφορετικές συνθέσεις. Τυπικά, η εσωτερική υδατική φάση (W_1) είναι μια υδροκολλοειδής γέλη, ενώ η εξωτερική φάση νερού (W_2) είναι ένα υγρό που μπορεί να περιέχει ή να μην περιέχει υδροκολλοειδή.

Τα πληρωμένα σωματίδια υδρογέλης έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, (οπτικές, ρεολογία, σταθερότητα και χαρακτηριστικά απελευθέρωσης) από τα συμβατικά γαλακτώματα με παρόμοιες συγκεντρώσεις σταγονιδίων ελαίου. Τα πληρωμένα σωματίδια υδρογέλης τείνουν να είναι θολά επειδή τα σταγονίδια ελαίου εντός των σωματιδίων υδρογέλης έχουν μεγέθη που είναι της τάξης του μήκους κύματος του φωτός. Ωστόσο, η εμφάνιση πληρωμένων σωματιδίων υδρογέλης επηρεάζεται από το γεγονός ότι τα σταγονίδια τοποθετούνται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, και ότι η σκέδαση φωτός συμβαίνει τόσο από τα σωματίδια υδρογέλης όσο και από τα σταγονίδια ελαίου. (McClements & Yan 2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Συστατικά Γαλακτωμάτων

Τα γαλακτώματα αποτελούνται κυρίως από τρία απαραίτητα συστατικά: τη λιπιδική φάση, την υδατική φάση και το διεπιφανειακό υλικό που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του συστήματος. Ωστόσο, τα περισσότερα γαλακτώματα τροφίμων είναι πιο περίπλοκα από ότι ένα απλό μίγμα τριών συστατικών. Η υδατική φάση μπορεί να περιέχει μία ποικιλία υδατοδιαλυτών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων σακχάρων, αλάτων, οξέων, βάσεων, αλκοολών, τασιενεργών ουσιών, πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών. Η λιπιδική φάση περιέχει συνήθως ένα πολύπλοκο μίγμα από λιποδιαλυτά συστατικά, όπως τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, στερόλες και βιταμίνες. Η διεπιφανειακή περιοχή αποτελείται από πρωτεΐνες ή γαλακτωματοποιητές όπως μονογλυκερίδια, εστέρες, φωσφολιπίδια ή μίγματα αυτών των συστατικών. Επιπλέον, αυτά τα διεπιφανειακά συστατικά μπορούν να σχηματίσουν διάφορες οργανωμένες δομές στο έλαιο, στο νερό ή στη διεπιφάνεια. Ως εκ τούτου, για να γίνουν κατανοητές οι λειτουργικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων, είναι απαραίτητο να κατανοηθούν οι ιδιότητες των τριών επί μέρους περιοχών που τα απαρτίζουν. (McClements 2016)

3.1 Λιπιδική Φάση

Τα έλαια που απαρτίζουν τη λιπιδική φάση ανήκουν στην κατηγορία των λιπιδίων και είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες και αδιάλυτα σε υδατικούς διαλύτες. Αυτή η κατηγορία μορίων περιλαμβάνει τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, στερόλες και φωσφολιπίδια. Τα τριγλυκερίδια είναι το πιο κοινό είδος λιπιδίων στα τρόφιμα.

Τα λιπίδια υφίστανται μια ποικιλία χημικών μεταβολών κατά την επεξεργασία, την αποθήκευση και το χειρισμό των τροφίμων που μπορεί να είναι επιβλαβείς στη γεύση και σταθερότητα του τροφίμου. Η γεύση των γαλακτωμάτων τροφίμων επηρεάζεται έμμεσα από την παρουσία της λιπιδικής φάσης επειδή οι αρωματικές ουσίες μπορεί να διαχωριστούν προς την οργανική ή υδατική φάση ανάλογα με την πολικότητά τους. Επιπλέον η λιπιδική φάση μπορεί να δράσει και ως ένα σημαντικό μέσο ενθυλάκωσης για διάφορα άλλα συστατικά των τροφίμων, όπως είναι για παράδειγμα οι λιποδιαλυτές βιταμίνες, τα αιθέρια έλαια, τα αντιοξειδωτικά και τα συντηρητικά των τροφίμων. (Chaiyasit et al. 2007, McClements 2016)

3.1.1 ω-3 Λιπαρά Οξέα

Τα ω-3 λιπαρά οξέα ανήκουν στην κατηγορία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό με πολλαπλά οφέλη για την υγεία. Υπάρχουν τρία κύρια ω-3 λιπαρά οξέα, το α-λινολενικό οξύ (ALA), το εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ (DHA) και το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA). Δυστυχώς ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να μετατρέψει αποτελεσματικά το α-λινολενικό οξύ (ALA) στα EPA και DHA λιπαρά οξέα και ως εκ τούτου υπάρχει ανάγκη πρόσληψης αυτών των λιπαρών οξέων μέσω της διατροφής. Φυτικές τροφές όπως οι ξηροί καρποί και οι σπόροι είναι πλούσιοι σε ALA, ενώ τα ψάρια και τα θαλασσινά παρέχουν τα λιπαρά οξέα DHA και EPA. (Innis 2007)

Σύμφωνα με διαθέσιμα επιστημονικά δεδομένα, τα ω-3 λιπαρά έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες καθώς βελτιώνουν τους καρδιαγγειακούς δείκτες, όπως τα τριγλυκερίδια, τη LDL χοληστερόλη και την αρτηριακή πίεση. Επίσης βελτιώνουν την υγεία των ματιών, προστατεύοντας από παθήσεις όπως ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας και επίσης βελτιώνουν την υγεία των οστών και των αρθρώσεων. Παράλληλα έχουν αντικαρκινική δράση, κυρίως όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, τον καρκίνο του προστάτη και τον καρκίνο του μαστού, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι περιορίζουν τις κρίσεις άσθματος στα παιδιά. (Fioramonti et al. 2015, Hibbeln et al. 2006, Innis 2007)

Μοναδική πηγή ω-3 λιπαρών οξέων στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή αποτελεί το λινέλαιο. Το λινέλαιο (linseed oil) εξάγεται από ώριμους και αποξηραμένους λιναρόσπορους μέσω συμπίεσης. Το λινέλαιο περιέχει αρκετά λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένων του α-λινολενικού οξέος (51,9 ως 55,2%), του κορεσμένου παλμιτικού (7 %) και στεατικού οξέος (3,4 με 4,6%), του μονοακόρεστου ολεϊκού οξέος (18,5 ως 22,6 %) και του διακόρεστου λινολεϊκού οξέος (14,2 ως 17 %). (Vereshchagin & Novitskaya 1965) Έχει ιδιαίτερη διατροφική αξία εξαιτίας των υψηλών επιπέδων α-λινολενικού οξέος. Ωστόσο οι μεγάλες περιεκτικότητες του λινέλαιου σε διακόρεστους και τριακόρεστους εστέρες, το καθιστούν ιδιαίτερα ευαίσθητο σε αντιδράσεις πολυμερισμού όταν εκτίθεται στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο,

οπότε το λινέλαιο οξειδώνεται εύκολα και αποκτά μια δυσάρεστη οσμή. Η οξείδωση του λινελαίου αποτελεί μείζον εμπορικό ζήτημα και γι' αυτό προστίθενται αντιοξειδωτικά σε αυτό για να αποτρέψουν την οξείδωσή του. (Chaiyasit et al. 2007, Fioramonti et al. 2015)

3.1.2 Χημικές μεταβολές

Στο προηγούμενο κεφάλαιο (Υποκεφάλαιο 2.3) συζητήθηκε η αστάθεια των γαλακτωμάτων μέσω των φαινόμενων φυσικής αστάθειας, τα οποία εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του συστήματος. Ωστόσο, πέραν των φαινομένων φυσικής αστάθειας, είναι πιθανό να συμβούν και φαινόμενα χημικής αστάθειας όπως φαινόμενα υδρόλυσης και οξείδωσης της λιπιδικής φάσης. (McClements 2016)

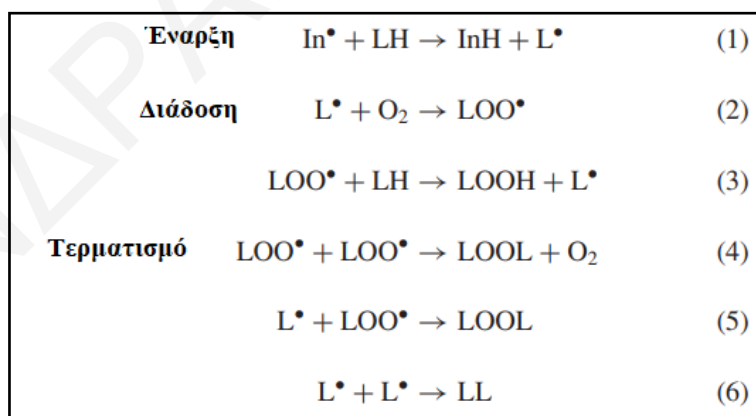
3.1.2.1 Υδρόλυση Λιπιδίων

Ο τύπος και η συγκέντρωση των μορίων στη λιπιδική φάση μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου λόγω της υδρόλυσης των λιπιδίων. Κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης, οι εστερικοί δεσμοί υδρολύονται στην παρουσία ορισμένων ενζύμων. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελευθέρων λιπαρών οξέων που μπορεί να είναι ανεπιθύμητα στα τρόφιμα με επιβλαβείς επιπτώσεις στην ποιότητα ορισμένων προϊόντων διατροφής. Ωστόσο η διαδικασία της υδρόλυσης εστέρων μπορεί να είναι ευεργετική σε κάποια τρόφιμα επειδή οδηγεί στο σχηματισμό επιθυμητών γεύσεων και αρωμάτων (τυρί και γιαούρτι). Ωστόσο, τα λιπαρά οξέα είναι πιο επιφανειοδραστικά από τις τριακυλογλυκερόλες και συνεπώς συσσωρεύονται κατά προτίμηση σε μια εξωτερική επιφάνεια, η οποία αυξάνει την ευαισθησία τους στην οξείδωση και κατά συνέπεια την τάση συσσωμάτωσης των σταγονιδίων του γαλακτώματος. (McClements 2016)

3.1.2.2 Οξείδωση Λιπιδίων

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μία από τις κύριες αιτίες υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων. Η οξειδωτική φθορά προκαλεί μεγάλη οικονομική ανησυχία στη βιομηχανία τροφίμων επειδή επηρεάζει πολλά ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως τη γεύση, το χρώμα, την υφή, τη θρεπτική αξία και την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς παράγονται και τοξικές ενώσεις. Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μία από τις κύριες διαδικασίες που περιορίζουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Επιπλέον, η οξειδωτική αστάθεια των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων περιορίζει συχνά τη χρήση τους ως θρεπτικά ευεργετικά λιπίδια σε λειτουργικές τροφές. (Chaiyasit et al. 2007) Η οξείδωση των λιπιδίων σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό είναι ένα ιδιαίτερο πρόβλημα όταν η φάση ελαίου περιέχει αξιόλογα επίπεδα πολυακόρεστων λιπιδίων, όπως τα ω-3 έλαια και τα καροτενοειδή. (McClements & Gumus 2016) Η διαδικασία της

οξειδωσης λιπιδίων αποτελείται από μια εξαιρετικά περίπλοκη σειρά χημικών αντιδράσεων μεταξύ ακόρεστων λιπιδίων και οξυγόνου που οδηγεί στο σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων και των προϊόντων διάσπασής τους. Η διαδικασία αυτή είναι αυτοκαταλυτική και ακολουθεί μηχανισμό ελευθέρων ριζών (Σχήμα 3.1). Η αντίδραση οξειδωσης λιπιδίων μπορεί να χωριστεί σε τρία κύρια στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Η διαδικασία αυτή μπορεί να ξεκινήσει με αυτοοξειδωση που προκαλείται από φωτοευαισθητοποιητή ή από ένζυμα ανάλογα με τη σύσταση του συστήματος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η διαδικασία έναρξης δημιουργεί ελεύθερες ρίζες επάνω στα λιπαρά οξέα μετά από απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου. Το πρώτο βήμα της διάδοσης περιλαμβάνει την αντίδραση μεταξύ της ελεύθερης ρίζας και μοριακού οξυγόνου για το σχηματισμό της ρίζας υπεροξειδίου (ROO•). Αυτές οι ρίζες είναι πολύ δραστικές και μπορούν να αντιδράσουν με άλλα άτομα υδρογόνου σχηματίζοντας υδροϋπεροξειδίο του λιπιδίου (ROOH) και νέα ρίζα αλκυλίου. Ο τερματισμός αυτών των διαδοχικών αντιδράσεων πραγματοποιείται όταν δύο ρίζες ενώνονται ομοιοπολικά προς το σχηματισμό μη ριζικών ενώσεων. Κατά τη διαδικασία οξειδωσης των λιπιδίων, πολλές αντιδράσεις πραγματοποιούνται ταυτόχρονα οδηγώντας στο σχηματισμό πολύπλοκων αλκοολών και καρβονυλικών ενώσεων. Τα σχηματιζόμενα προϊόντα είναι πτητικά και συμβάλλουν στη χαρακτηριστική οσμή του οξειδωμένου προϊόντος. Μερικά από τα προϊόντα είναι επιφανειοδραστικά και συνεπώς συσσωρεύονται σε διεπιφάνειες ελαίου – νερού των γαλακτωμάτων, ενώ άλλα είναι υδατοδιαλυτά και καταλήγουν στην υδατική φάση. (Chaiyasit et al. 2007, McClements 2016)



Σχήμα 3.1: Μηχανισμός ελευθέρων ριζών που ακολουθείται κατά την οξειδωση λιπιδίων. (Chaiyasit et al. 2007, McClements 2016)

Ο έλεγχος του ρυθμού οξειδωσης των λιπιδίων στα γαλακτώματα έχει αποδειχθεί σημαντική πρόκληση και έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές στρατηγικές, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου των περιβαλλοντικών συνθηκών (όπως οξυγόνο, φως και θερμοκρασία), ελέγχου της ποιότητας των συστατικών και της προσθήκης αντιοξειδωτικών ουσιών και χηλικών

παραγόντων. Η διεπιφανειακή στιβάδα που σχηματίζεται από γαλακτωματοποιητές γύρω από τα σταγονίδια λιπιδίων έχει σημαντική επίδραση στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων και την οξείδωση των λιπιδίων. Τα είδη των γαλακτωματοποιητών και η χημική τους συμπεριφορά θα συζητηθούν εκτεταμένα στο Υποκεφάλαιο 3.3. (McClements & Gumus 2016)

3.2 Υδατική φάση

Το νερό διαδραματίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό των φυσικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων των γαλακτωμάτων τροφίμων. Το μεγαλύτερο μέρος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νερού καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις των μορίων του νερού με άλλα συστατικά και την υψηλή διηλεκτρική σταθερά του. Η υδατική φάση των περισσότερων γαλακτωμάτων τροφίμων περιέχει μια ποικιλία υδατοδιαλυτών συστατικών συμπεριλαμβανομένων βιταμινών, ενώσεων που παρέχουν άρωμα, σακχάρων, πρωτεϊνών τα οποία επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις στην υδατική φάση και κατά συνέπεια τις οργανοληπτικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων τροφίμων. Μια από τις σημαντικές ιδιότητες της υδατικής φάσης είναι η διαλυτότητα των αντιοξειδωτικών σε αυτή. Υψηλή διαλυτότητα αντιοξειδωτικών στο νερό μπορεί να ενισχύσει έμμεσα την προστασία της ελαιώδους φάσης, ωστόσο όμως δεν επιτρέπει τη σημαντική παρουσία των αντιοξειδωτικών στις διεπιφάνειες των σταγονιδίων. (McClements 2016)

3.3 Γαλακτωματοποιητές

Τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα που αποτελούνται από μικρά σταγονίδια λιπιδίων διασκορπισμένα εντός ενός υδατικού μέσου. Για τη γενικότερη σταθεροποίησή τους, αλλά και για την παραγωγή εμπορικών προϊόντων με αρκετά μεγάλη διάρκεια ζωής και με αντίσταση στις περιβαλλοντικές πιέσεις που ενδέχεται να αντιμετωπίσουν κατά τη χρήση τους, είναι απαραίτητο να ενσωματωθούν στα γαλακτώματα σταθεροποιητές, που ονομάζονται γαλακτωματοποιητές. Ο όρος γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιείται για να περιγράψει οποιαδήποτε επιφανειοδραστική ουσία, η οποία είναι ικανή να προσροφάται στις διεπιφάνειες ελαίου-νερού και να σταθεροποιεί γαλακτώματα ελαίου σε νερό για αποφυγή φαινομένων αστάθειας και συσσωμάτωσης. Οι γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται σήμερα στη βιομηχανία για τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό είναι συνθετικά και φυσικά επιφανειοδραστικά μόρια και μεγάλος αριθμός αμφιφιλικών βιοπολυμερών. (Chaiyasit et al. 2007, McClements & Gumus 2016)

Στην ιδανική περίπτωση, ένας γαλακτωματοποιητής θα πρέπει να διασυνδέσει ταχέως το έλαιο με το νερό κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, να μειώσει την διεπιφανειακή τάση σε αξιοσημείωτο ποσοστό και να αποτρέψει την συσσωμάτωση των σταγονιδίων κατά τη διάρκεια

της ομογενοποίησης. Γενικότερα, είναι σημαντικό ο γαλακτωματοποιητής να σχηματίζει ένα διεπιφανειακό στρώμα που εμποδίζει τη συσσωμάτωση των σταγονιδίων κάτω από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που το προϊόν βιώνει κατά την παρασκευή, τη μεταφορά, την αποθήκευση και τη χρήση του. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016) Σε αυτήν την ενότητα, εξετάζονται συνοπτικά οι φυσικοί γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται σε προϊόντα διατροφής.

3.3.1 Επιφανειοδραστικά μόρια

3.3.1.1 Φωσφολιπίδια

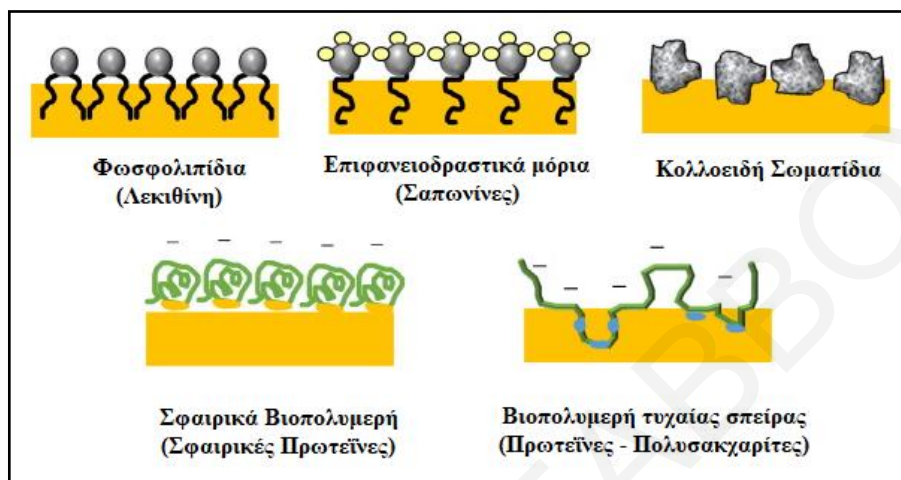
Τα φωσφολιπίδια αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης με δύο λιπαρά οξέα στο τμήμα του φωσφορικού οξέος. Οι αλυσίδες λιπαρών οξέων αποτελούν τη μη πολική λιπόφιλη ουρά του γαλακτωματοποιητή, ενώ το τμήμα φωσφορικού οξέος και τυχόν συνδεδεμένες ομάδες σχηματίζουν την πολική υδρόφιλη κεφαλή. Επειδή τα φωσφολιπίδια έχουν μη πολικές και πολικές περιοχές εντός του ίδιου μορίου, είναι αμφίφιλα μόρια που μπορούν να προσροφηθούν στις διεπιφάνειες ελαίου – νερού και να σταθεροποιήσουν τα σταγονίδια του ελαίου ή του νερού, ανάλογα ποια είναι η διεσπαρμένη φάση. Όταν ένα φωσφολιπίδιο προσροφάται σε μια διεπιφάνεια ελαίου – νερού, οι ουρές των μη πολικών λιπαρών οξέων προεξέχουν στη φάση του ελαίου, ενώ οι πολικές υδρόφιλες ομάδες κεφαλής προεξέχουν στην περιβάλλουσα υδατική φάση (Σχήμα 3.2). Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν μονοστιβάδες γύρω από τα σταγονίδια ελαίου, αλλά σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να σχηματίσουν πολλαπλές στιβάδες, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα και τις ιδιότητες των γαλακτωμάτων. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

Τα φωσφολιπίδια που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές στα εμπορικά προϊόντα ονομάζονται συνήθως λεκιθίνες. Οι λεκιθίνες μπορούν να απομονωθούν από πολλές βιολογικές πηγές, με τις πιο κοινές τη σόγια, τα αυγά, το γάλα, το βαμβακόσπορο και τον ηλιάνθο. Οι εμπορικές λεκιθίνες περιέχουν συνήθως έναν συνδυασμό διαφόρων φωσφολιπιδίων και άλλων λιπόφιλων συστατικών όπως τριγλυκερίδια, γλυκολιπίδια και στερόλες. (Gumus 2016)

3.3.1.2 Σαπωνίνες

Οι σαπωνίνες είναι φυσικά μικρομοριακά επιφανειοδραστικά συστατικά που απομονώνονται από το φλοιό του δέντρου *Quillaja Saponaria*. Αυτά τα βιοεπιφανειοδραστικά συνήθως περιέχουν ένα σύνθετο μείγμα διαφορετικών αμφίφιλων συστατικών που έχει αποδειχθεί ότι σχηματίζουν μικκύλια όταν διασκορπίζονται σε νερό, και που μπορούν να διευκολύνουν το σχηματισμό και τη σταθερότητα γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό. Οι σαπωνίνες είναι αμφίφιλες

επειδή έχουν περιοχές που είναι πολύ υδρόφιλες (π.χ. ομάδες σακχάρου) και περιοχές που είναι λιγότερο υδρόφιλες (π.χ. φαινολικές ομάδες). (McClements & Gumus 2016) Μπορούν να σχηματίσουν γαλακτώματα που περιέχουν μικρά σταγονίδια ελαίου που είναι σταθερά στη συσσωμάτωση σε ένα εύρος συνθηκών (pH, ιοντική ισχύς και θερμοκρασία), άρα είναι κατάλληλες για εφαρμογή σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων. (McClements 2016)



Σχήμα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση ειδών γαλακτωματοποιητών που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό. (McClements & Gumus 2016)

3.3.2 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι βιοπολυμερή που αποτελούνται από αμινοξέα ομοιοπολικά συνδεδεμένα με πεπτιδικούς δεσμούς. Ο τύπος, ο αριθμός και η θέση των αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα καθορίζουν τις μοριακές, φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών τροφίμων. Οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν ένα μείγμα πολικών και μη πολικών αμινοξέων και ως εκ τούτου είναι αμφίφιλα μόρια που μπορούν να προσκολληθούν στις διεπιφάνειες ελαίου – νερού και να σταθεροποιήσουν τα σταγονίδια ελαίου σε γαλακτώματα. Η σχετική ισορροπία των πολικών και μη πολικών ομάδων που εκτίθενται στις επιφάνειές τους διέπει την επιφανειακή δραστηριότητα των πρωτεϊνών. Εάν η επιφανειακή υδροφοβικότητα είναι πολύ χαμηλή, τότε η κινητήρια δύναμη για την προσρόφηση πρωτεΐνης δεν είναι αρκετά ισχυρή για να ξεπεράσει την απώλεια εντροπίας που σχετίζεται με την προσρόφηση. Αντίθετα, εάν η επιφανειακή υδροφοβικότητα είναι πολύ υψηλή, τότε οι πρωτεΐνες τείνουν να συσσωματώνονται, να γίνονται αδιάλυτες στο νερό και να χάνουν την επιφανειακή τους δραστηριότητα. Κατά συνέπεια συνήθως απαιτείται ένα βέλτιστο επίπεδο επιφανειακής υδροφοβικότητας για να είναι μια πρωτεΐνη καλός γαλακτωματοποιητής. (McClements 2004, McClements & Gumus 2016)

Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν επίσης ένα μείγμα ανιοντικών, ουδέτερων και κατιοντικών αμινοξέων κατά μήκος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων τους, το οποίο καθορίζει τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά τους υπό διαφορετικές συνθήκες pH. Τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά μιας πρωτεΐνης επηρεάζουν σημαντικά τις λειτουργικές της ιδιότητες στα γαλακτώματα. Συγκεκριμένα η ηλεκτροστατική άπωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της συσσωμάτωσης των σταγονιδίων ελαίου με επικάλυψη πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων στην οξείδωση των λιπιδίων, καθώς οι ανιοντικές επιφάνειες σταγονιδίων μπορεί να προσελκύσουν κατιόντα μετάλλων μετάπτωσης που καταλύουν την οξείδωση των σταγονιδίων ελαίου. Η κατανομή των φορτίων στις επιφάνειες των πρωτεϊνών είναι επίσης σημαντική, καθώς επηρεάζει την προσρόφηση άλλων φορτισμένων ειδών. Για παράδειγμα, τα φορτισμένα βιοπολυμερή μπορούν να προσροφηθούν στις επιφάνειες όμοια φορτισμένων σταγονιδίων, εάν διαθέτουν αρκετά μεγάλες περιοχές με αντίθετο φορτίο. (McClements 2014, Miller et al. 2000)

Οι πρωτεΐνες μπορούν να αποκτήσουν διάφορες διαμορφώσεις σε υδατικά διαλύματα και σε διεπιφάνειες ελαίου – νερού, ανάλογα με τις διαμοριακές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στα μόριά τους και στο περιβάλλον τους, καθώς και από κάποιες γεωμετρικές παραμέτρους (Σχήμα 3.2). Ο τρόπος με τον οποίο θα συμπεριφερθούν καθορίζεται από συνθήκες διαλύματος, όπως το pH, η ιοντική ισχύς, η διηλεκτρική σταθερά και η θερμοκρασία. Κατά συνέπεια, η διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης σε διάλυμα ή σε μια διεπιφάνεια μπορεί να μεταβληθεί όταν αλλάξουν αυτές οι συνθήκες. Οι δύο συνηθέστερες διαμορφώσεις των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές στη βιομηχανία τροφίμων είναι η σφαιρική (σφαιροειδής) και η διαμόρφωση τυχαίας σπείρας. Οι σφαιρικές πρωτεΐνες έχουν αρκετά συμπαγείς σφαιροειδείς δομές, όπου η πλειονότητα των μη πολικών ομάδων βρίσκονται εντός του εσωτερικού, και η πλειονότητα των πολικών ομάδων στην επιφάνεια. Ωστόσο, πολλές σφαιρικές πρωτεΐνες εξακολουθούν να έχουν επιφανειακή δραστηριότητα, επειδή ορισμένες από τις μη πολικές ομάδες παραμένουν εκτεθειμένες στις επιφάνειές τους, γεγονός που συνιστά κινητήρια δύναμη για προσρόφηση στις διεπιφάνειες ελαίου – νερού. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία επιφανειοδραστικών σφαιρικών πρωτεϊνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γαλακτωματοποιητές, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, σόγιας, αυγών και φυτών. Οι πρωτεΐνες με δομές τυχαίας σπείρας έχουν μια πιο ανοιχτή εύκαμπτη δομή, αν και μπορεί να υπάρχουν σε αυτές ακόμη ορισμένες οργανωμένες περιοχές, με διαμορφώσεις έλικας ή πτυχωτής επιφάνειας. Οι πιο κοινές πρωτεΐνες με διαμόρφωση τυχαίας σπείρας που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές σε τρόφιμα είναι η καζεΐνη και η ζελατίνη. (Gomez-Guillen et al. 2011, Luo & Wang 2014)

Οι πρωτεΐνες που είναι υδατοδιαλυτές και έχουν επαρκή επιφανειακή δραστικότητα εξακολουθούν να διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητά τους στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων, λόγω διαφορών στους ρυθμούς προσρόφησής τους, στις επιφανειακές δραστικότητες, στα επιφανειακά φορτία, στις επιφανειακές πιέσεις κορεσμού, στο πάχος της σχηματιζόμενης επιφάνειας, στην υδροφοβικότητα της επιφάνειας (Wierenga et al. 2006) Η δομή των πρωτεϊνών αλλάζει όταν προσροφηθούν στις διεπιφάνειες ελαίου – νερού, επειδή η προκύπτουσα αλλαγή στο περιβάλλον τους μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών μοριακών αλληλεπιδράσεων και των εντροπικών επιδράσεων που προκύπτουν. Για παράδειγμα, οι σφαιρικές πρωτεΐνες μπορεί να ξεδιπλωθούν αφού προσροφηθούν σε επιφάνειες σταγονιδίων και εκθέσουν ομάδες που βρίσκονται συνήθως στο εσωτερικό τους, όπως μη πολικές και σουλφυδρικές ομάδες. Ως αποτέλεσμα, οι πρωτεΐνες μπορεί να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες προσροφημένες στα ίδια ή διαφορετικά σταγονίδια λιπιδίων μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ή δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα των σταγονιδίων σε συγχώνευση και κροκίδωση. Μετά την προσρόφηση στις επιφάνειες σταγονιδίων ελαίου, τα πρωτεϊνικά μόρια τείνουν να υιοθετούν μια διαμόρφωση όπου πολλές από τις υδρόφιλες ομάδες προεξέχουν στην υδατική φάση, ενώ πολλές από τις υδρόφοβες ομάδες προεξέχουν στην ελαιώδη φάση. (Miller et al. 2000, Wierenga et al. 2006)

Έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες που προσροφώνται σε επιφάνειες σταγονιδίων ελαίου προστατεύουν την υποκείμενη φάση ελαίου ως προς την οξείδωση των λιπιδίων. Αυτό μπορεί να συμβεί λόγω ενός αριθμού φυσικοχημικών μηχανισμών που σχετίζονται με το προσροφημένο πρωτεϊνικό στρώμα, συμπεριλαμβανομένης της δέσμευσης ελευθέρων ριζών, της συμπλοκοποίησης, της στερικής παρεμπόδισης και της ηλεκτροστατικής άπωσης. Για παράδειγμα, η οξείδωση των λιπιδίων αναστέλλεται από προσροφημένες πρωτεΐνες σε τιμές pH κάτω από το ισοηλεκτρικό τους σημείο λόγω της ικανότητάς τους να απωθούν ηλεκτροστατικά τα κατιόντα μετάλλων μετάπτωσης. Ωστόσο πάνω από το ισοηλεκτρικό τους σημείο οι πρωτεΐνες μπορεί να ευνοούν την οξείδωση, καθώς τότε προσελκύουν ηλεκτροστατικά τα κατιόντα των μετάλλων μετάπτωσης. (Nielsen et al. 2013, Berton et al. 2011)

3.3.3 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι φυσικά πολυμερή που αποτελούνται από έναν ή περισσότερους τύπους μονοσακχαριτών και συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Τα μόρια πολυσακχαρίτη ποικίλλουν σημαντικά στα μοριακά τους βάρη, τον βαθμό διακλάδωσης, το ηλεκτρικό φορτίο, την υδροφοβικότητα και την πολικότητα, που μεταβάλλουν τις

φυσικοχημικές τους ιδιότητες (Σχήμα 3.2). Μερικοί πολυσακχαρίτες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι με πολυπεπίδια ή λιπίδια, τα οποία επηρεάζουν την ικανότητά τους να δρουν ως γαλακτωματοποιητές. Οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες δεν είναι καλοί γαλακτωματοποιητές, επειδή αποτελούνται κυρίως από υδρόφιλους μονοσακχαρίτες και επομένως δεν είναι ιδιαίτερα επιφανειοδραστικοί. Ορισμένοι περιέχουν ωστόσο ένα κατάλληλο μείγμα μη πολικών και πολικών ομάδων και επομένως είναι αμφίφιλα μόρια, που μπορούν να προσροφηθούν σε επιφάνειες σταγονιδίων ελαίου και έτσι να σταθεροποιήσουν τα γαλακτώματα. Οι μη πολικές ομάδες μπορεί να αποτελούν πλευρικές ομάδες των υδατανθράκων ή μπορεί να είναι τμήματα άλλων μορίων (λιπιδίων, πρωτεϊνών) που είναι ομοιοπολικά ή φυσικά συνδεδεμένα με τα μόρια υδατανθράκων. (McClements & Gumus 2016)

Ο πιο διαδεδομένος πολυσακχαρίτης που χρησιμοποιείται ως φυσικός γαλακτωματοποιητής στη βιομηχανία τροφίμων είναι το αραβικό κόμμι (Arabic Gum), που είναι αμφίφιλο, επειδή έχει μη πολικό σκελετό με έναν αριθμό συνδεδεμένων πολικών πολυσακχαριτικών αλυσίδων. Μετά την προσρόφηση στις επιφάνειες σταγονιδίων ελαίου, η αλυσίδα πολυπεπτιδίων προεξέχει στη φάση του ελαίου, ενώ οι αλυσίδες των πολυσακχαριτών αιωρούνται στην υδατική φάση. Έτσι σχηματίζεται μια σχετικά παχιά υδρόφιλη επικάλυψη γύρω από σταγονίδια ελαίου, η οποία τους δίνει καλή σταθερότητα έναντι της συσσωμάτωσης, λόγω ισχυρών στερικών απώσεων. (Patel et al. 2015, Nie et al. 2013) Δύο άλλοι πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές στη βιομηχανία τροφίμων είναι το τροποποιημένο άμυλο και η τροποποιημένη κυτταρίνη, που έχουν μη πολικές αλυσίδες υδρογονανθράκων ομοιοπολικά συνδεδεμένες με αλυσίδες πολυσακχαριτών. Ωστόσο, αυτοί οι γαλακτωματοποιητές δεν είναι φυσικά προϊόντα, καθώς η σύνθεσή τους περιλαμβάνει τη χημική τροποποίηση των μορίων αμύλου ή κυτταρίνης. (McClements & Gumus 2016)

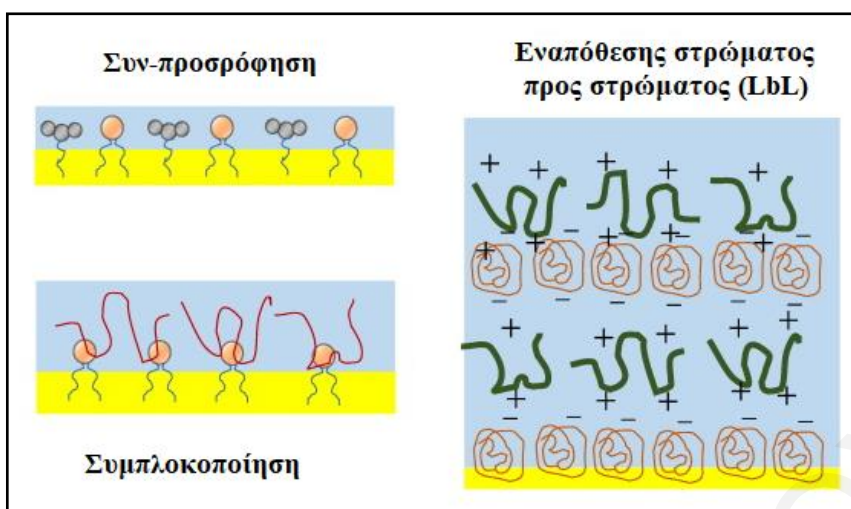
Τα τελευταία χρόνια μελετάται η χρήση της πηκτίνης στη γαλακτωματοποίηση. Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει πως η πηκτίνη παρουσία πρωτεϊνών δρα ως πιο αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής, σχηματίζοντας μικρά σταγονίδια κατά την ομογενοποίηση. (Piorowski et al. 2014) Η χιτοζάνη, ένας κατιονικός πολυσακχαρίτης, έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι ικανή να διευκολύνει το σχηματισμό και τη σταθερότητα γαλακτωμάτων, αν και από μόνη της δεν είναι ικανοποιητικός γαλακτωματοποιητής. (Wu et al. 2015) Τα σχετικά παχιά και υδρόφιλα στρώματα βιοπολυμερούς που σχηματίζονται από γαλακτωματοποιητές με βάση πολυσακχαρίτες σταθεροποιούνται κυρίως με στερικές απώσεις. Τέτοια γαλακτώματα τείνουν να επηρεάζονται πολύ λιγότερο από αλλαγές στο pH και την ιοντική ισχύ σε σχέση με επικαλυμμένα με πρωτεΐνη σταγονίδια. (Dickinson et al. 2003)

3.4 Συμπλέγματα γαλακτωματοποιητών

Η ικανότητα ορισμένων φυσικών γαλακτωματοποιητών να σχηματίζουν και να σταθεροποιούν γαλακτώματα μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση τους σε συνδυασμό με άλλους γαλακτωματοποιητές. Συνηθισμένοι συνδυασμοί τέτοιου τύπου είναι ζεύγη πρωτεϊνών – πολυσακχαριτών, επιφανειοδραστικών – πρωτεϊνών και επιφανειοδραστικών – πολυσακχαριτών. Οι συνδυασμοί γαλακτωματοποιητών επιτυγχάνονται χρησιμοποιώντας διάφορες προσεγγίσεις όπως η *συν-προσρόφηση*, η *συμπλοκοποίηση* και η *εναπόθεση* στοιβάδων με τη μέθοδο LbL.

Κατά τη διαδικασία της *συν-προσρόφησης* δύο γαλακτωματοποιητές προσροφώνται ταυτόχρονα στις επιφάνειες σταγονιδίων λιπιδίων ως μεμονωμένα μόρια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.3. Η προκύπτουσα διεπιφάνεια μπορεί να αποτελείται από ένα ομοιογενές μείγμα των δύο διαφορετικών γαλακτωματοποιητών ή μπορεί να έχει περιοχές πλούσιες σε έναν γαλακτωματοποιητή και να παρουσιάζει έλλειμα σε έναν άλλο. Οι γαλακτωματοποιητές μπορούν και οι δύο να ενσωματωθούν στο σύστημα πριν από την ομογενοποίηση με τη διασπορά τους στις φάσεις ελαίου και / ή νερού. Εναλλακτικά, ένας γαλακτωματοποιητής μπορεί να προστεθεί πριν από την ομογενοποίηση και ο άλλος γαλακτωματοποιητής να προστεθεί μετά την ομογενοποίηση. Η συνολική σύνθεση της διεπιφάνειας θα εξαρτηθεί από τη σχετική συγγένεια των δύο γαλακτωματοποιητών για τη διεπιφάνεια ελαίου – νερού καθώς και από τις σχετικές συγκεντρώσεις τους.

Στην περίπτωση της *συμπλοκοποίησης* τα δύο συστατικά (που μπορεί να είναι δύο αποτελεσματικοί γαλακτωματοποιητές ή ένας γαλακτωματοποιητής και ένα άλλο μόριο, όπως η χιτοζάνη που δεν είναι αποτελεσματική από μόνη της) σχηματίζουν ένα σύμπλοκο μέσω φυσικών ή χημικών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι οι δυνάμεις Coulomb, οι δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες δυνάμεις, αλλά και ομοιοπολική σύνδεση. Τα σύμπλοκα μπορούν να σχηματιστούν πριν ή μετά την ομογενοποίηση. Στην πρώτη περίπτωση, τα δύο συστατικά αναμιγνύονται μαζί στην υδατική φάση για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα, και στη συνέχεια η υδατική φάση ομογενοποιείται με μια φάση ελαίου. Στη δεύτερη περίπτωση, ένα από τα συστατικά (ένας γαλακτωματοποιητής) χρησιμοποιείται για να σχηματίσει ένα γαλάκτωμα που περιέχει σταγονίδια λιπιδίων επικαλυμμένα με γαλακτωματοποιητή, και στη συνέχεια το άλλο συστατικό προστίθεται για να σχηματίσει το σύμπλοκο.



Σχήμα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση διαφορετικών ειδών μικτής διεπιφανειακής στιβάδας που μπορεί να σχηματισθεί σε επιφάνειες σταγονιδίων λαδιού για τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων. (McClements & Gumus 2016)

Τέλος κατά τη μέθοδο ηλεκτροστατικής εναπόθεσης στρώματος προς στρώμα (LbL) ένα γαλάκτωμα κατασκευάζεται από ομογενοποιημένο έλαιο, νερό και γαλακτωματοποιητή μαζί. Ο γαλακτωματοποιητής που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει ορισμένες ιονιζόμενες ομάδες, έτσι ώστε τα σταγονίδια που θα προκύψουν να έχουν ηλεκτρικό φορτίο. Αυτό το γαλάκτωμα αναμιγνύεται έπειτα με ένα διάλυμα που περιέχει πολυμερή ή σωματίδια, τα οποία έχουν συνάφεια με τον γαλακτωματοποιητή των σταγονιδίων (ηλεκτροστατικής ή άλλης φύσης) και προσροφώνται στις επιφάνειες των σταγονιδίων μέσω ηλεκτροστατικής έλξης. Το προκύπτον πολυστρωματικό γαλάκτωμα έχει συνήθως αντίθετο φορτίο με το αρχικό γαλάκτωμα. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές για να σχηματιστεί μια σειρά στρώσεων γύρω από τα σταγονίδια, βελτιώνοντας τη σταθερότητα και τη λειτουργική απόδοση των επιστρωμάτων. Ωστόσο, η σύσταση και η δομή του συστήματος πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά κατά τη διαδικασία της ηλεκτροστατικής εναπόθεσης για να αποφευχθεί η συσσωμάτωση σταγονιδίων. (McClements & Gumus 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αντιοξειδωτικά

4.1 Εισαγωγή στα αντιοξειδωτικά

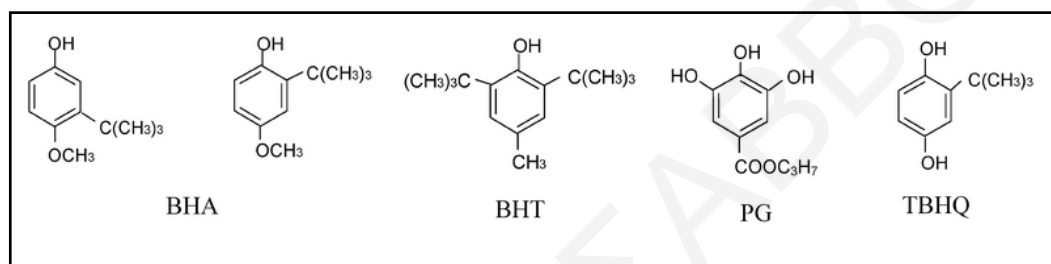
Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και αναστολή της οξείδωσης των τροφίμων με επιτυχία σε αρκετά σκευάσματα τροφίμων εδώ και χρόνια. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με εκείνες ενός οξειδώσιμου υποστρώματος και καθυστερούν σημαντικά ή αποτρέπουν την οξείδωσή του. (Shahidi & Zhong 2010) Έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την οξείδωση των λιπιδίων μέσω διαφορετικών μηχανισμών και με ποικίλες διεργασίες. Σε γενικές γραμμές ταξινομούνται με βάση τον τρόπο δράσης τους σε πρωτογενή αντιοξειδωτικά, που σπάνε την αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης με την απομάκρυνση των ενδιάμεσων ελευθέρων ριζών, και σε δευτερογενή αντιοξειδωτικά που εμποδίζουν ή καθυστερούν την οξείδωση μέσω της καταστολής του εκκινητή οξείδωσης ή των επιταχυντών ή της αναγέννησης των πρωτογενών αντιοξειδωτικών. (McClements & Decker E., 2018, Tsao 2015)

4.2 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Ανάλογα με τις πηγές των αντιοξειδωτικών, αυτά μπορούν να διακριθούν σε φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά. (Shahidi 2015) Ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών διαφορετικών τύπων μπορεί να είναι επωφελής, επειδή συχνά οδηγεί σε συνεργειακές αλληλεπιδράσεις, όχι μόνο αυξάνοντας σημαντικά την αποτελεσματικότητα της διατήρησης των τροφίμων, αλλά και μειώνοντας την ποσότητα των πρόσθετων που απαιτούνται, ιδιαίτερα δε των συνθετικών αντιοξειδωτικών για τα οποία συχνά υπάρχουν ανησυχίες για την υγεία. (Tsao 2015)

4.2.1 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά εισήχθησαν στη βιομηχανία τροφίμων τη δεκαετία του 1940, όταν βρέθηκε ότι η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) επιβραδύνει την οξείδωση και αποκαλύφθηκε η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα αρκετών αλκυλεστέρων του γαλλικού οξέος. Τα κοινά συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα από τη βιομηχανία τροφίμων περιλαμβάνουν τη BHA, το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), τον γαλλικό προπυλεστέρα (PG) και την ισοβουτυλοϋδροκινόνη (TBHQ) (Σχήμα 4.1). Ωστόσο, η χρήση συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι πλέον περιορισμένη λόγω της αυξανόμενης ανησυχίας για τις πιθανές καρκινογόνες επιπτώσεις τους. (McClements & Decker 2018, Shahidi 2015, Shahidi & Zhong 2010)



Σχήμα 4.1: Χημικές δομές κοινών συνθετικών αντιοξειδωτικών. (Shahidi & Zhong 2010)

4.2.2 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Οι φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες κατανέμονται ευρέως σε φυτικούς – ζωικούς ιστούς και μικροοργανισμούς, προστατεύοντας τους οργανισμούς από το οξειδωτικό στρες και παρέχοντας φυσική αντιοξειδωτική προστασία. Τα αντιοξειδωτικά αυτά μπορούν να απομονωθούν ως καθαρές ενώσεις ή μίγματα από φυσικές πηγές και να χρησιμοποιηθούν για συντήρηση τροφίμων και ως συμπληρώματα διατροφής. Μεταξύ αυτών είναι οι τοκοφερόλες, το ασκορβικό οξύ, τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες και διάφορα πεπτίδια, πρωτεΐνες και ένζυμα. Στον Πίνακα 4.1 συνοψίζονται οι κύριες φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες και οι πηγές από τις οποίες προέρχονται. (Shahidi 2015, Shahidi & Zhong 2010)

Οι τοκοφερόλες είναι λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ενίσχυση της οξειδωτικής σταθερότητας των τροφίμων. Οι τοκοφερόλες είναι πρωταρχικά αντιοξειδωτικά που μπορούν να απομακρύνουν αποτελεσματικά τις ρίζες υπεροξειδίου των λιπιδίων και να παράγουν σταθερότερες ρίζες τοκοφεροξυλίου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των τοκοτριενολών γενικά υπερβαίνει αυτή των αντίστοιχων τοκοφερόλων.

Πίνακας 4.1: Κύρια αντιοξειδωτικά από φυσικές πηγές. (Shahidi 2015, Shahidi & Zhong 2010)

Αντιοξειδωτικά	Παράδειγμα	Πηγή
Τοκοφερόλες	α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλες	Σπόροι, δημητριακά, ξηροί καρποί, φυτικά έλαια
Τοκοτριενόλες	α-, β-, γ- και δ-τοκοτριενόλες	Φοινικέλαιο, έλαιο ρυζιού
Ασκορβικό οξύ	Ασκορβικό οξύ	Φρούτα, λαχανικά
Καροτενοειδή	β-καροτένιο, λυκοπένιο, ασταξανθίνη, φουκοξανθίνη	Καρότα, ντομάτα, ψάρια / οστρακοειδή, θαλάσσια φύκια
Φαινολικά	Φερουλικό οξύ, κουερσετίνη, κατεχίνη, ρεσβερατρόλη, κυανιδίνη	Φρούτα, λαχανικά, ξηροί καρποί, δημητριακά
Πεπτίδια	Φερριτίνη, τρανσφερίνη, λακτοφερίνη	Γάλα, αυγά
Ένζυμα	Υπεροξο-δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης	Οργανισμοί φυτών και ζώων

Τα καροτενοειδή, συμπεριλαμβανομένων των καροτενίων και των ξανθοφυλλών, εμφανίζονται ευρέως σε φυτά, φρούτα και λαχανικά ως κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες λιποδιαλυτές χρωστικές. Είναι επίσης δευτερεύοντα συστατικά σε πολλά φυτικά έλαια. Εκτός από τη δράση τους στην προβιταμίνη Α, τα καροτενοειδή είναι σημαντικά αντιοξειδωτικά συστατικά κατά της οξείδωσης των λιπιδίων. Δρουν κυρίως ως δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά αποσβένοντας το οξυγόνο και μπορούν επίσης να αποτρέψουν την οξείδωση παγιδεύοντας τις ελεύθερες ρίζες. Η β-καροτίνη, η λουτεΐνη, το λυκοπένιο είναι τυπικά καροτενοειδή που επιβραδύνουν αποτελεσματικά την οξείδωση στα τρόφιμα. (Shahidi 2015, Shahidi & Zhong 2010)

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια άλλη σημαντική ομάδα αντιοξειδωτικών. Η αντιοξειδωτική τους δράση προκύπτει από τις δομές τους, οι οποίες αποτελούν δότες υδρογόνου έναντι πολλών άλλων ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών οξέων, των στιλβενών, των φλαβονοειδών και των λιγνανών δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, δρουν ως χηλικοί υποκαταστάτες μετάλλων, ή ως αναγωγικοί παράγοντες και συνεργάζονται αποτελεσματικά με άλλα αντιοξειδωτικά. Επομένως παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες αναστολής της οξείδωσης των τροφίμων και των βιολογικών συστημάτων. (Shahidi & Zhong 2010)

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες ουσίες, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά. Το ασκορβικό οξύ ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της απόσβεσης διαφόρων μορφών οξυγόνου, της μείωσης των ελεύθερων ριζών και της αναγέννησης των πρωτογενών αντιοξειδωτικών. Η επίδραση του ασκορβικού οξέος στη σταθερότητα των λιπιδίων οφείλεται κυρίως στις συνεργειακές του αλληλεπιδράσεις με άλλα αντιοξειδωτικά. Σε βιολογικά συστήματα, το ασκορβικό οξύ προστατεύει ενώσεις στα υδατοδιαλυτά τμήματα των κυττάρων και των ιστών και αναγεννά τις τοκοφερόλες στις κυτταρικές μεμβράνες. (Shahidi 2015, Shahidi & Zhong 2010)

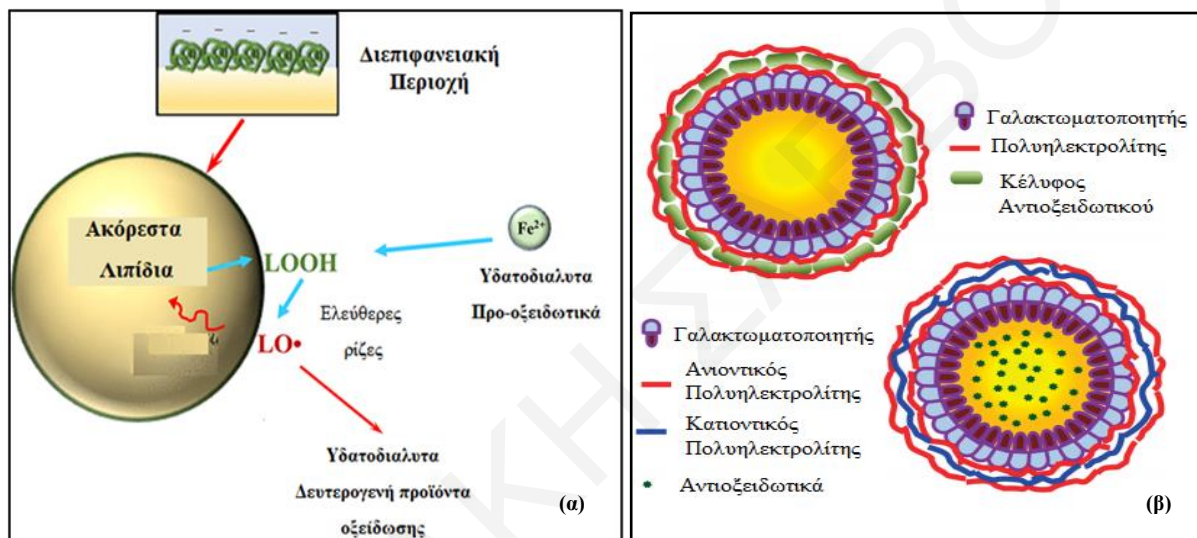
Τέλος ορισμένες πρωτεΐνες και τα προϊόντα υδρόλυσής τους έχουν αποδειχθεί ότι έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των πρωτεϊνών εξαρτώνται από τη δομή τους, αφού η παρουσία αρωματικών δακτυλίων, ιμιδαζολών, αμινοξέων που περιέχουν άτομα θείου φαίνεται να βελτιώνουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των πρωτεϊνών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών από πρωτεΐνες που περιέχουν αρωματικά αμινοξέα πιθανότατα οφείλεται στην ικανότητά τους να δρουν ως δότες ατόμων υδρογόνου των φαινολικών και ινδολικών ομάδων και στην υψηλότερη σταθερότητα των ριζών φαινοξυλίου και ινδολυλίου που σχηματίζονται, από εκείνη της απλής ρίζας υπεροξυλίου. (McClements & Decker 2018)

4.3 Θέση αντιοξειδωτικού στο γαλάκτωμα

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές εξετάζουν τον τρόπο με τον οποίο η θέση του αντιοξειδωτικού επηρεάζει τη χημική σταθερότητα του ελαίου σε γαλακτώματα ο/ω. Πολλά συστατικά των τροφίμων που μπορούν να προωθήσουν την οξείδωση των λιπιδίων βρίσκονται στην υδατική φάση, όπως τα μέταλλα μετάπτωσης, ένζυμα και φωτοευαίσθητοποιητές. Για το λόγο αυτό, η επιφάνεια ενός σταγονιδίου γαλακτώματος, που βρίσκεται σε στενότερη επαφή με επιβλαβείς παράγοντες της περιβάλλουσας υδατικής φάσης, είναι η περιοχή όπου συνήθως αρχίζει η αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Σχήμα 4.2 (α)). (Lomova et al. 2010) Περιορισμένος αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι η εναπόθεση αντιοξειδωτικών στη διεπιφάνεια πλεονεκτεί έναντι της παρουσίας τους στη συνεχή λιπιδική φάση (Σχήμα 4.2 (β)), ειδικότερα όταν αυτά είναι θετικά φορτισμένα, αφού θα απωθούν τα μεταλλικά ιόντα από τις διεπιφάνειες των σταγονιδίων, αλλά και όταν η μακροπρόθεσμη αποθήκευση του ελαίου στηρίζεται στην απομάκρυνση της συνεχούς υδατικής φάσης (όπως π.χ. στη ξήρανση με ψεκασμό). (McClements & Decker E., 2018, Lomova et al. 2010, Mei et al. 1998)

Ωστόσο, πολλά χρήσιμα φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως οι ανθοκυανίνες και οι πολυφαινόλες, είναι πολύ υδατοδιαλυτά με αποτέλεσμα μικρό μόνο κλάσμα τους να βρίσκεται στη

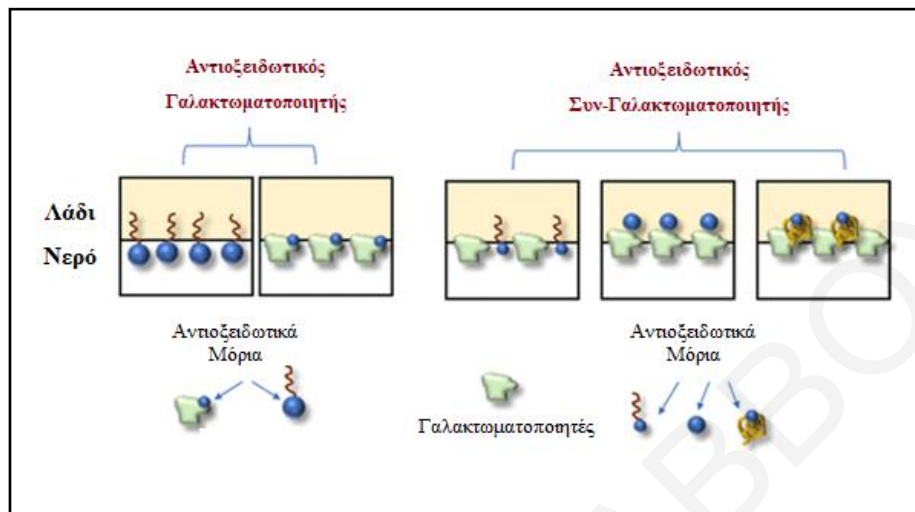
διεπιφάνεια. (Viljanen et al. 2005) Για να αυξηθεί αυτό το ποσοστό είναι χρήσιμη η σύζευξη των αντιοξειδωτικών με γαλακτωματοποιητές ή συν-γαλακτωματοποιητές. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών στις διεπιφάνειες επιτυγχάνεται είτε μέσω της φυσικής σύζευξής τους με γαλακτωματοποιητές ή πολυηλεκτρολύτες, σχηματίζοντας μη-ομοιοπολικές διεπιφανειακές συζεύξεις, είτε μέσω ομοιοπολικής τους σύζευξης με γαλακτωματοποιητές ή πολυηλεκτρολύτες. Οι μελέτες στην παρούσα Δ.Δ επικεντρώνονται αποκλειστικά στη φυσική σύζευξη των αντιοξειδωτικών με τους γαλακτωματοποιητές και τους πολυηλεκτρολύτες μέσω μιας ποικιλίας αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων υδρόφοβων, ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου. (McClements & Decker 2018)



Σχήμα 4.2: (α) Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της διεπιφάνειας σε διεργασίες οξείδωσης λιπιδίων που συμβαίνουν σε γαλακτώματα ελαίου / νερό. (McClements et al. 2018) και (β) Σχηματική αναπαράσταση ενθυλακωμένων σταγονιδίων ελαίου σε προστατευτικό αντιοξειδωτικό κέλυφος (πάνω) και αντιοξειδωτικό στην λιπιδική φάση (κάτω μέρος) (Lomova et al. 2010).

Ως αντιοξειδωτικός γαλακτωματοποιητής ορίζεται μια ουσία που μπορεί να προσροφηθεί στις διεπιφάνειες ελαίου / νερού και να ενισχύσει το σχηματισμό και τη φυσική σταθερότητα των γαλακτωμάτων, αναστέλλοντας ταυτόχρονα και την οξείδωση των λιπιδίων. Αντίθετα, ως αντιοξειδωτικός συν-γαλακτωματοποιητής ορίζεται μια ουσία που μπορεί να προσροφηθεί σε επιφάνειες σταγονιδίων και να αναστέλλει την οξείδωση των λιπιδίων, αλλά δεν είναι ικανή να σχηματίζει από μόνη της φυσικά σταθερά γαλακτώματα. Κατά συνέπεια, ένας αντιοξειδωτικός συν-γαλακτωματοποιητής συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν γαλακτωματοποιητή. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλά φυσικά μόρια που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, συμπεριλαμβανομένων φωσφολιπιδίων, πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών και πολυφαινολών. Μερικά από αυτά τα μόρια λειτουργούν ως αντιοξειδωτικοί γαλακτωματοποιητές, αφού έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν και να

σταθεροποιήσουν γαλακτώματα, σε αντίθεση με τα περισσότερα μόρια που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση χωρίς να έχουν επιφανειοδραστικές δυνατότητες και για να λάβουν επιφανειοδραστική μορφή πρέπει να συνδυάζονται με γαλακτωματοποιητές, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.3.



Σχήμα 4.3: Τύποι των επιφανειακών αντιοξειδωτικών. (McClements & Decker 2018)

Μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος, των πρωτεϊνών της σόγιας, της καζεΐνης κλπ., φαίνεται ότι εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες, κυρίως λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσουν οι φορτισμένες πρωτεΐνες. (McClements & Decker 2018) Πέραν αυτών, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός πολυσακχαριτών που παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, όπως η κυτταρίνη και η πηκτίνη, η κατανομή των οποίων σε ένα γαλάκτωμα δεν είναι γνωστή λόγω της μεγάλης υδατοδιαλυτότητάς τους. Τέλος οι πολυφαινόλες είναι πολύ αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά αλλά δεν μπορούν να σχηματίσουν και να σταθεροποιήσουν γαλακτώματα από μόνες τους, συνεπώς είναι απαραίτητη η σύζευξή τους με ένα επιφανειακά ενεργό μόριο. Μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση έχει γίνει από τους Qui et al. που μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης όταν αυτή συνδέεται φυσικά με γλιαδίνη μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η φυσική σύζευξη ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση διατηρώντας παράλληλα τις γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες της πρωτεΐνης. (Qui 2017) Με παρόμοια λογική οι Wan et al. βελτιστοποίησαν την οξειδωτική σταθερότητα του αραβοσιτέλαιου με τη βοήθεια ρεσβερατρόλης–στεβιοσίδης συμπλοκοποιημένης με πρωτεΐνη σόγιας και οι Staszewski et al. σταθεροποίησαν ιχθυέλαιο με πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού συζευγμένες με β-γαλακτοσφαιρίνη. (Wan et al., 2014, Staszewski et al., 2014) Στην παρούσα Δ.Δ μελετάται με ανάλογο τρόπο η αντιοξειδωτική δράση του ταννικού οξέος και των βηταλαϊνών.

4.4. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την οξειδωση των λιπιδίων μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων της χηλικής δέσμευσης, της εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, της δέσμευσης προϊόντων δευτερογενούς οξειδωσης λιπιδίων και μέσω φαινομένων φυσικής παρεμπόδισης. (McClements & Decker 2018)

4.4.1 Χηλική δέσμευση

Τα κατιόντα μετάλλων μετάπτωσης, όπως π.χ Fe^{3+} ή Cu^{2+} είναι πολύ αποτελεσματικοί προαγωγοί της οξειδωσης των λιπιδίων. Κατά συνέπεια, ουσίες που μπορούν να δεσμεύσουν ισχυρά και να απενεργοποιήσουν τέτοια κατιόντα μπορούν να δρουν και ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά. Μόρια ή ιόντα που έχουν λειτουργικές ομάδες με μη δεσμικά ηλεκτρόνια και αρνητικά φορτία μπορούν να προσελκύσουν με δυνάμεις Coulomb τα μεταλλικά κατιόντα. Ωστόσο, αυτά τα μόρια ή ιόντα πρέπει να έχουν κατάλληλη γεωμετρική διαμόρφωση έτσι ώστε να δεσμεύουν έντονα τα μεταλλοϊόντα. (McClements & Decker 2018) Ορισμένα επιφανειοδραστικά μόρια, όπως οι καζεΐνες, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ισχυρά μέταλλα μετάπτωσης, λόγω των υδρόφιλων περιοχών που περιέχουν πολλές φωσφορικές ομάδες που μπορούν να δεσμεύσουν πολυσθενή μεταλλικά ιόντα. (Li et al., 2020, Zhao et al., 2020) Η αποτελεσματικότητα ενός χηλικού αντιοξειδωτικού στην αναστολή ή την προώθηση της οξειδωσης εξαρτάται από τη θέση του και την επίδρασή του στη χημική αντιδραστικότητα των μετάλλων. Ένα χηλικό αντιοξειδωτικό που προσροφάται στις επιφάνειες των σταγονιδίων μπορεί να συμπλοκοποιήσει μέταλλα μετάπτωσης και να τα φέρει κοντά στα λιπίδια, προωθώντας έτσι την οξειδωση. Αντίθετα, ένας χηλικός παράγοντας που διασπείρεται στην υδατική συνεχή φάση μπορεί να απομακρύνει τα μεταλλοϊόντα από τα λιπίδια. Συνεπώς η θέση του χηλικού αντιοξειδωτικού αποτελεί σημαντικό παράγοντα. (Anestopoulos 2020)

4.4.2. Δέσμευση ελευθέρων ριζών

Πολλά αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την οξειδωση των λιπιδίων αντιδρώντας με ελεύθερες ρίζες λιπιδίων. Η αποτελεσματικότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από την ικανότητά τους να δίνουν υδρογόνο σε μια ρίζα λιπιδίων. Οι φαινολικές ενώσεις είναι ιδιαίτερα καλά αντιοξειδωτικά για δύο βασικούς λόγους: (α) δίνουν αποτελεσματικά ένα υδρογόνο σε μια λιπιδική ρίζα και (β) η προκύπτουσα φαινολική ρίζα έχει χαμηλή δραστηριότητα καθώς η ρίζα μετατοπίζεται στην δομή του φαινολικού δακτυλίου. Οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών στα γαλακτώματα ελαίου σε νερό πιστεύεται ότι συμβαίνουν κυρίως στη διεπιφάνεια ελαίου / νερού, δεδομένου ότι τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων είναι επιφανειοδραστικά και επειδή τα υδατικά ή τα διεπιφανειακά μέταλλα μπορούν να διασπάσουν αυτά τα υδροϋπεροξειδία σε

ελεύθερες ρίζες. Επομένως, τα επιφανειοδραστικά μόρια που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες θεωρούνται πολύ αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά επειδή συγκεντρώνονται στη περιοχή παραγωγής ελευθέρων ριζών. (Cheng et al., 2020)

4.4.3 Δέσμευση προϊόντων δευτερογενούς οξείδωσης λιπιδίων

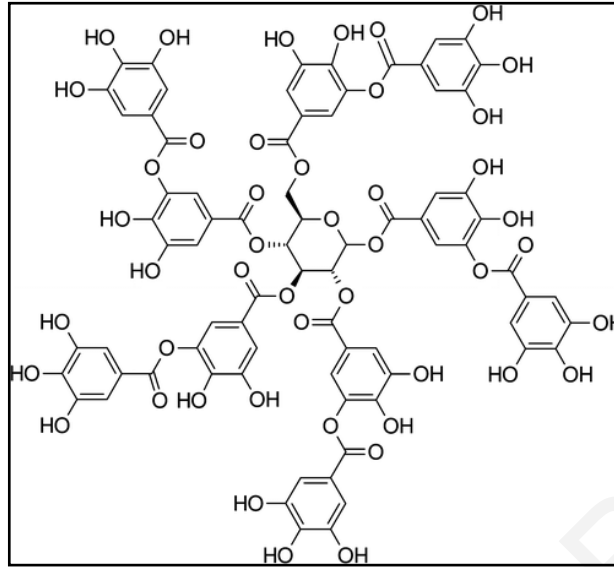
Οι πρωτεΐνες που προσροφώνται σε επιφάνειες σταγονιδίων ελαίου είναι ικανές να αντιδρούν χημικά και φυσικά με προϊόντα δευτερεύουσας αντίδρασης που δημιουργούνται από οξείδωση λιπιδίων, όπως οι αλδεϋδες. Αυτές οι αντιδράσεις μπορεί να διαταράξουν την αντίδραση οξείδωσης των λιπιδίων και να αλλάξουν τον ρυθμό και την πορεία της. Επιπλέον, αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να αλλάξουν τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα την ικανότητά τους να σταθεροποιούν τα σταγονίδια ελαίου έναντι της συσσωμάτωσης. (McClements & Decker 2018)

4.4.4 Φυσική παρεμπόδιση

Ορισμένοι τύποι ουσιών που υπάρχουν στη διεπιφάνεια ελαίου – νερού μπορεί να είναι σε θέση να αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων μέσω φυσικών παρεμποδίσεων. Για παράδειγμα, μια ουσία που σχηματίζει ένα παχύ πυκνό διεπιφανειακό στρώμα μπορεί να είναι σε θέση να εμποδίσει στερικτά την κίνηση των προ-οξειδωτικών από το νερό προς τη λιπιδική φάση, βελτιώνοντας έτσι την οξειδωτική σταθερότητα. Τέτοιες ουσίες είναι μη ιοντικά επιφανειοδραστικά με σχετικά μεγάλη υδρόφιλη ομάδα κεφαλής. Παρομοίως, μια ουσία που σχηματίζει ένα ισχυρά κατιοντικό στρώμα μπορεί να είναι σε θέση να απωθεί ηλεκτροστατικά τα κατιόντα των μετάλλων μετάπτωσης από τις επιφάνειες των σταγονιδίων, αναστέλλοντας έτσι την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τη φάση των λιπιδίων. (McClements & Decker 2018)

4.5 Ταννικό Οξύ

Το ταννικό οξύ είναι μια συγκεκριμένη εμπορική μορφή τανίνης υψηλού MB (1701,19) η οποία είναι υδρολυόμενη λόγω των πολλαπλών φαινολικών ομάδων που υπάρχουν στη δομή της. Το ταννικό οξύ περιέχει έναν κεντρικό πυρήνα γλυκόζης, ο οποίος εστεροποιείται από μόρια γαλλικού οξέος (Σχήμα 4.4). Το ταννικό οξύ μπορεί να ληφθεί σε καθαρή μορφή και σε μεγάλες ποσότητες από φυσικές πηγές, όπως από ξύλο καστανίας ή βελανιδιάς. (Shutava et al. 2005)



Σχήμα 4.4: Χημική δομή ταννικού οξέος. (Lomova et al., 2010)

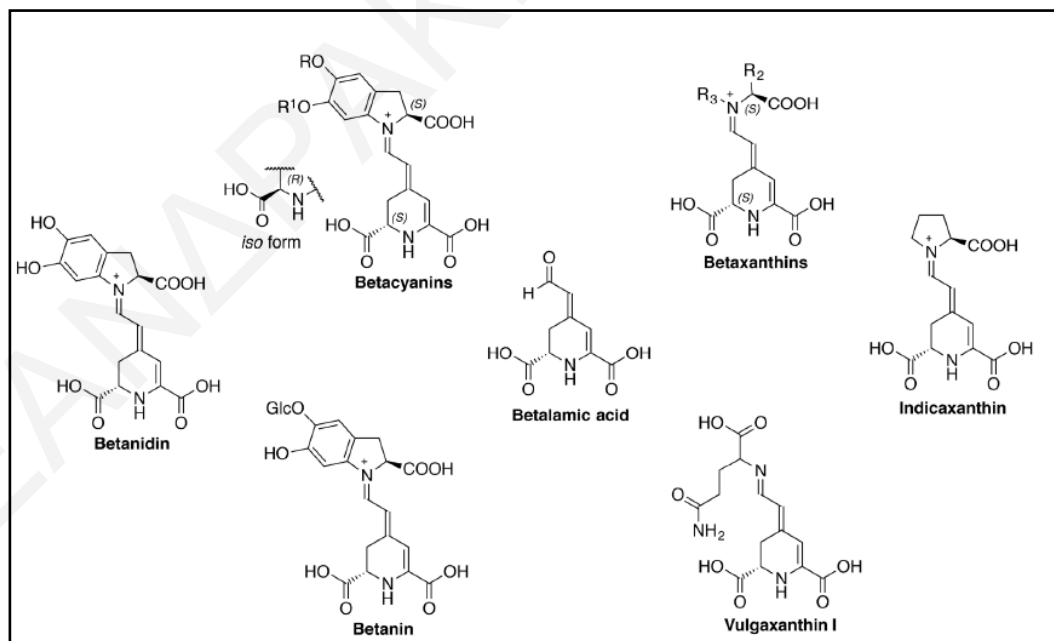
Ο μεγάλος αριθμός υδροξυλίων στη δομή του ταννικού οξέος επιτρέπει να αναπτύσσονται ισχυρές αλληλεπιδράσεις με μακρομόρια συμπεριλαμβανομένων πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά πολυστρωματικών γαλακτωμάτων. (Shutava et al. 2005, Wang et al. 2016, Xie et al. 2017) Σε πολλές περιπτώσεις το ταννικό οξύ χρησιμοποιείται συχνά ως παράγοντας δικτύωσης πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών για σχηματισμό σταθερών νανοσωματίδιων. Το ταννικό οξύ είναι γνωστό ότι σχηματίζει σταθερά πολυστρωματικά υμένα με μεγάλη ποικιλία πολυμερών και πρωτεϊνών σε στερεά υποστρώματα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο στρώματος προς στρώμα. (Erel-Unal 2008, Shutava et al. 2005). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η χρήση του ταννικού οξέος και σε γαλακτώματα. (Wang et al. 2021, Yang et al. 2021, Lomova et al., 2010) Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει το ταννικό οξύ σε διεπιφάνειες οφείλονται κυρίως στο σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων του και των καρβοξυλομάδων των πρωτεϊνών. Επιπλέον, το σύμπλοκο ταννικού οξέος – πρωτεΐνης μπορεί να σταθεροποιηθεί μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου των τανινών και υδρόφοβων περιοχών των πρωτεϊνών. (Wang et al. 2016, Xie et al. 2017).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ταννινών έχει προσελκύσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον και έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετά συστήματα για αύξηση της οξειδωτικής σταθερότητας. (Wang et al. 2021, Yang et al. 2021, Lomova et al. 2010) Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών αποδίδεται στην ανασταλτική τους δράση έναντι των μετάλλων μετάπτωσης και της ικανότητάς τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. (Pantoja-Castroa & González-Rodrígueza 2011)

Η χρήση του ταννικού οξέος ως στρώμα σε κέλυφος πολυστρωματικού γαλακτώματος αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Lomona et al., οι οποίοι παρασκεύασαν τριτοταγές γαλάκτωμα για την ενθυλάκωση λινελαίου χρησιμοποιώντας ως γαλακτωματοποιητή την πρωτεΐνη BSA και αντιοξειδωτικό στρώμα ταννικού οξέος μεταξύ στρώσεων BSA και πολυαργινίνης. (Lomona et al. 2010) Η παρουσία του ταννικού οξέος στο πολυστρωματικό κέλυφος οδήγησε σε σημαντικά αυξημένη σταθερότητα στην οξείδωση της λιπιδικής φάσης σε σχέση με την περίπτωση απουσίας της στοιβάδας του ταννικού οξέος, ή με την παρουσία αντιοξειδωτικής ουσίας στο εσωτερικό της λιπιδικής φάσης.

4.6 Βηταλαΐνες

Οι βηταλαΐνες είναι μια κατηγορία φυσικών αντιοξειδωτικών που προέρχονται από διάφορες πηγές, με κυριότερες τα κόκκινα τεύτλα, τον αμάραθο, τις φραγκοσυκιές και το dragon fruit. Τα τελευταία χρόνια οι βηταλαΐνες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά χρώματα καθώς είναι ιδιαίτερα ασφαλείς από άποψη υγείας. (Nemzer et al. 2011) Οι βηταλαΐνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές που περιέχουν άζωτο και έχουν ως βασικό δομικό στοιχείο το βηταλαμικό οξύ, γεγονός που υποδηλώνει την όξινη φύση των βηταλαϊνών. Σύμφωνα με την χημική τους δομή διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες τις βητακυανίνες και τις βηταξανθίνες (Σχήμα 4.5). (Quina & Bastos 2018, Gandía-Herrero et al. 2010)



Σχήμα 4.5: Γενικές δομές βητακυανίνων και βηταξανθινών από το πρόδρομο μόριο του βηταλαμικού οξέος. (Quina & Bastos 2018)

Οι βητακυανίνες (betacyanins) είναι χρωστικές ουσίες με ερυθρό – ιώδες χρώμα, λόγω της αρωματικής δομής τους, με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και μήκος κύματος διέγερσης κοντά στα 540 nm και μήκος κύματος εκπομπής κοντά στα 610 nm. Η βασική δομή των βητακυανινών είναι η βητανιδίνη (betanidin) (Σχήμα 4.5), η οποία σχηματίζεται από συμπύκνωση βηταλαμικού οξέος με cyclo-DOPA. Υπάρχουν και άλλα είδη βητακυανινών αλλά οι πιο ευρέως μελετημένες είναι η βητανιδίνη και η βητανίνη (Betanin). Οι βηταξανθίνες (betaxanthins) είναι χρωστικές ουσίες με κίτρινο – πορτοκαλί χρώμα με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και μήκος κύματος διέγερσης στα 460 nm και μήκος κύματος εκπομπής στα 510 nm. Ο φθορισμός των βηταξανθινών είναι ισχυρότερος από το φθορισμό των βητακυανινών. Στις βηταξανθίνες η μονάδα cyclo-DOPA των βητακυανινών αντικαθίσταται από μία αμίνη ή ένα αμινοξύ. Οι βηταξανθίνες κατηγοριοποιούνται σε βουλγαξανθίνη (Vulgaanthin I), που αποτελεί το 95% των χρωστικών αυτών, με υποκαταστάτη γλουταμίνης και ινδικοξανθίνη (Indicaxanthin) με υποκαταστάτη προλίνης. Υπάρχουν και άλλα είδη βηταξανθινών, αλλά οι πιο ευρέως μελετημένες είναι η ινδικοξανθίνη και η βουλγαξανθίνη τύπου I. Με βάση την κίτρινη – πορτοκαλί απόχρωσή τους διαχωρίζονται σε κίτρινες και κόκκινες βηταξανθίνες, όπου οι κίτρινες βηταξανθίνες αποδείχθηκαν λιγότερο σταθερές από τις αντίστοιχες κόκκινες. Οι κυριότεροι τύποι βηταλαϊνών που απομονώνονται από τα κόκκινα τεύτλα είναι η βητανίνη και η βουλγαξανθίνη. (Choo 2018, Gandía-Herrero et al., 2010, Quina Bastos 2018, Slimen 2017)

4.6.1 Αντιοξειδωτική δράση βηταλαϊνών

Τα τελευταία χρόνια οι βηταλαϊνες προσελκύουν σημαντικό ενδιαφέρον ως νέα φυσικά αντιοξειδωτικά. Αρκετές μελέτες επιβεβαίωσαν την δραστικότητα των βηταλαϊνών στη δέσμευση ελευθέρων ριζών. Το βηταλαμικό οξύ ανάγει Fe^{+3} σε Fe^{+2} , άρα είναι σε θέση να προσφέρει δύο ηλεκτρόνια σε ένα οξειδωτικό παράγοντα. Επίσης, το βηταλαμικό οξύ έχει pK_a ίσο με 6,8 οδηγώντας έτσι σε μια εξάρτηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βηταλαϊνών από το pH. (Slimen 2017) Η δραστικότητα των μορίων βηταλαϊνης ποικίλλει ανάλογα με τις χημικές τους δομές. Η βητανίνη παρουσιάζει δραστικότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών σε pH μεγαλύτερο του 4, ενώ η βητανιδίνη εμφανίζει δραστικότητα σε τιμές pH 2 έως 4. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η βητανίνη σε pH 4 είναι δίπολο ιόν, ενώ σε pH 7 είναι αρνητικά φορτισμένη. (Wylter 1969) Στην κατηγορία των βηταξανθινών, η παρουσία μιας ομάδας κατεχόλης οδηγεί σε αυξημένη αντιοξειδωτική δραστικότητα σε υψηλότερο pH. (Slimen 2017)

Μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση έχει γίνει από τους Kanner et al. που μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση της βητανίνης και της βητανιδίνης συγκριτικά με αυτή της κατεχίνης και της τοκοφερόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η βητανίνη και ακολούθως η βητανιδίνη

παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την κατεχίνη και την τοκοφερόλη που είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση. Σύμφωνα με τους ερευνητές, αυτές οι διαφορές φαίνεται να προέρχονται από διαφορετικούς μηχανισμούς προστασίας από αυτές τις δύο ενώσεις. Η βητανίνη που περιέχει μια γλυκόζη στην όρθο θέση προς το υδροξύλιο, φαίνεται να εμποδίζει την φαινολική ομάδα να αλληλεπιδρά με τη λιπιδική ρίζα, αφήνοντας την αμίνη να δράσει ως δότης υδρογόνου σχηματίζοντας μια σχετικά σταθερή ρίζα ή ένα διμερές σε αντίθεση με τις βηταξανθίνες που περιέχουν μόνο μια κυκλική ενεργή αμίνη. Η βητανιδίνη, που είναι μια ο-διφαινόλη, μετά τη δράση της ως αντιοξειδωτικό φαίνεται ότι σχηματίζει μία ρίζα φαινοξυλίου, ημικινόνες και πολυμερείς ενώσεις. (Kanner 2001)

4.6.2 Σταθερότητα βηταλαϊνών

Γενικά οι βηταλαΐνες επηρεάζονται από πολλαπλούς παράγοντες υποβάθμισης, όπως είναι το pH, η υδρόλυση, το φως, τα ιόντα μετάλλων, η παρουσία οξυγόνου, η συγκέντρωση και η θερμοκρασία. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να επιλεγθούν οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για τη μεγιστοποίηση της σταθερότητας των βηταλαϊνών και αποτελεσματική τους χρήση ως λειτουργικά συστατικά σε προϊόντα διατροφής. (Martins et al. 2017)

Οι βηταλαΐνες είναι σχετικά σταθερές σε ένα εύρος pH που κυμαίνεται μεταξύ 4 – 6. Η παρουσία ορισμένων ενώσεων όπως του ασκορβικού οξέος, φαίνεται να ενισχύει την σταθερότητά τους. Ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει την σταθερότητα των βηταλαϊνών είναι η παρουσία νερού. Συγκεκριμένα η σταθερότητα των βηταλαϊνών μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε υγρασία καθώς και με αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Επιπλέον, οι βηταλαΐνες επηρεάζονται άμεσα από την έκθεσή τους στο φως, επειδή το φως διεγείρει τα ηλεκτρόνια των χρωμοφώρων της βηταλαΐνης οδηγώντας σε χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης και κατά συνέπεια σε υψηλότερο επίπεδο δραστηριότητας των μορίων. Τέλος, η θερμική επεξεργασία θεωρείται ο πιο κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει άμεσα τη σταθερότητα των βηταλαϊνών. Η θερμοκρασία προκαλεί δομικές μεταβολές, οι οποίες επηρεάζουν τα φάσματα απορρόφησης και τις ιδιότητες του χρώματος. (Martins et al. 2017)

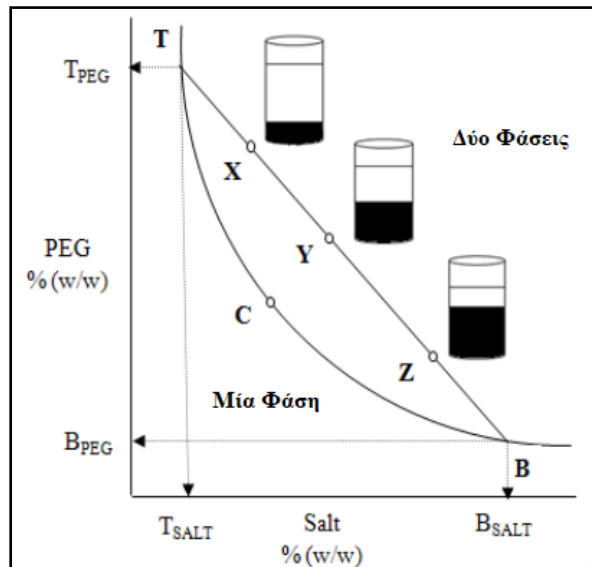
4.6.3 Εκχύλιση δύο υδατικών φάσεων: Μέθοδος απομόνωσης βηταλαϊνών

Η εκχύλιση σε υδατικό σύστημα δύο φάσεων (Aqueous two-phase system – ATPS) είναι μία τεχνική εκχύλισης υγρού-υγρού. Η τεχνική χρησιμοποιεί δύο υδατικές στοιβάδες και στον τομέα της βιοτεχνολογίας εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό βιολογικών μορίων, όπως οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα νουκλεϊνικά οξέα. Αυτή η μέθοδος διαχωρισμού παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, καθώς είναι γρήγορη λόγω των λιγότερων βημάτων που απαιτεί, είναι απλή και περιβαλλοντικά φιλική τεχνική (παρουσία περισσότερου από 80%

νερού και στις δύο φάσεις), οδηγεί σε γρήγορο διαχωρισμό με μικρή μετουσίωση (δεν χρησιμοποιούνται πτητικά οργανικά συστατικά), επιτυγχάνει ταχεία μεταφορά μάζας, επιλεκτικό και αποδοτικό διαχωρισμό και τέλος παρουσιάζει χαμηλό κόστος. (Raja et al. 2012)

Τα πιο κοινά διφασικά συστήματα είναι αυτά που βασίζονται σε δύο διαφορετικά υδατοδιαλυτά πολυμερή ή σε ένα πολυμερές και ένα ανόργανο άλας. Δημιουργούνται με την ανάμιξη δύο διαφορετικών υδατοδιαλυτών πολυμερών ή ενός υδατοδιαλυτού πολυμερούς και άλατος σε νερό. Όταν ξεπεραστούν οι οριακές συγκεντρώσεις αναμιξιμότητας, σχηματίζονται δύο μη αναμίξιμες υδατικές φάσεις. Στο υδατικό σύστημα δύο φάσεων συνήθως χρησιμοποιείται ως ένα από τα πολυμερή η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) διαφορετικών μοριακών βαρών, λόγω χαμηλής τοξικότητας, χαμηλής τιμής και χαμηλής πτητικότητας. Λόγω του υψηλού κόστους και του υψηλού ιξώδους των συστημάτων με δύο πολυμερή προτιμώνται συνήθως τα υδατικά συστήματα πολυμερούς – άλατος, τα οποία έχουν μεγαλύτερες διαφορές στην πυκνότητα, μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, χαμηλότερο ιξώδες, χαμηλότερο κόστος και μεγαλύτερο μέγεθος σταγόνων. Τα φωσφορικά και τα θειικά είναι τα κοινώς χρησιμοποιούμενα άλατα σε συστήματα πολυμερούς – άλατος. (Raja et al. 2012) Στην παρούσα Δ.Δ χρησιμοποιήθηκε το σύστημα πολυμερούς – άλατος, όπου το πολυμερές ήταν η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) μοριακού βάρους 10.000 και το άλας ήταν το θειικό αμμώνιο. (Chethana et al. 2007)

Το υδατικό σύστημα δύο φάσεων αναλύεται με διάγραμμα φάσεων το οποίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις συγκεντρώσεις των συστατικών που απαιτούνται για τον σχηματισμό ενός διφασικού συστήματος, τις συγκεντρώσεις των συστατικών στις δύο φάσεις που σχηματίζονται και την αναλογία όγκων των δύο φάσεων (Σχήμα 4.6). Στο Σχήμα 4.6 η καμπύλη συνύπαρξης T-C-B διαιρεί το διάγραμμα φάσεων σε δύο περιοχές, την πάνω από την καμπύλη που σχηματίζονται δύο μη αναμίξιμες υδατικές φάσεις και τη κάτω από την καμπύλη όπου το σύστημα είναι μονοφασικό. Τα τρία συστήματα X, Y και Z στην εικόνα διαφέρουν στις αρχικές συστάσεις και στις αναλογίες όγκων. Ωστόσο, έχουν όλα την ίδια σύσταση ισορροπίας πάνω φάσης (T_{PEG} , T_{salt}) και την ίδια σύσταση ισορροπίας κάτω φάσης (B_{PEG} , B_{salt}). Αυτό συμβαίνει γιατί τα σημεία X, Y και Z βρίσκονται στην ίδια ευθεία (T-B) γραμμή σύνδεσης, της οποίας τα τελικά σημεία καθορίζουν τις συστάσεις των φάσεων σε ισορροπία. Το σημείο C στην καμπύλη αναμιξιμότητας ονομάζεται ως κρίσιμο σημείο. Στο σημείο αυτό οι όγκοι των δύο φάσεων που συνυπάρχουν είναι θεωρητικά ίσοι. Το μήκος της γραμμής σύνδεσης και η συγκέντρωση των συστατικών έχουν τις ίδιες μονάδες (% w/w). (Chethana et al. 2007, Raja et al. 2012)



Σχήμα 4.6: Διάγραμμα φάσεων συστήματος με δύο υδατικές φάσεις (TCB = Καμπύλη συνύπαρξης, C = Κρίσιμο σημείο, TB = Γραμμή σύνδεσης, T = Σύσταση της άνω φάσης, B = Σύσταση της κάτω φάσης και X, Y και Z = συνολική σύσταση ATPS.) (Raja S., et al. 2012)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συστατικά των τοιχωμάτων των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων και αλληλεπιδράσεις τους με επιλεγμένα αντιοξειδωτικά

Σημαντικά ερωτήματα κατά τη μελέτη των γαλακτωμάτων και ειδικότερα των ΠΓ είναι κατά πόσο τα συστατικά του τοιχώματος, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας σταθερά γαλακτώματα αλλά και σε ποιο βαθμό τα αντιοξειδωτικά καταφέρνουν να διατηρούν την επιφανειοδραστική τους συμπεριφορά παρόλη την υδατοδιαλυτότητά τους. Για το σχηματισμό των ΠΓ είναι απαραίτητη η χρήση βιοδιαθέσιμων ουσιών εγκεκριμένων για χρήση σε τρόφιμα. Ως πρωτοταγείς γαλακτωματοποιητές στην παρούσα Δ.Δ χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη BSA (Bovine Serum Albumin) και το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα του όρου του γάλακτος (Whey protein isolate – WPI). Η χιτοζάνη χρησιμοποιείται ως κατιοντικό στρώμα, ενώ η θευική χονδροϊτίνη, το αλγινικό νάτριο, το καζεϊνικό νάτριο και η πηκτίνη ως ανιοντικά στρώματα ανάλογα με την τιμή του pH. Στο παρόν κεφάλαιο δίδονται πληροφορίες για τα παραπάνω βιομόρια και εξετάζονται οι αλληλεπιδράσεις τους με το ταννικό οξύ και τις βηταλαΐνες (τα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία).

5.1 Πρωτεΐνες που λειτουργούν ως γαλακτωματοποιητές

5.1.1 Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin – BSA)

Η αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη που αποτελείται από 583 κατάλοιπα αμινοξέων, με 17 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και μια μόνο ελεύθερη

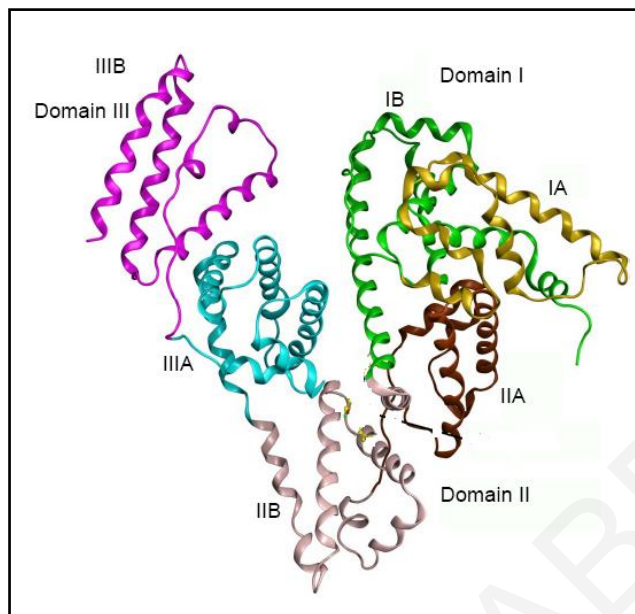
θειόλη στο κατάλοιπο 34. Η BSA περιέχει 20 κατάλοιπα τυροσίνης και δύο κατάλοιπα τρυπτοφάνης, τα οποία, βρίσκονται στις θέσεις 134 και 213. Η Trp-134 βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου και η Trp-213 βρίσκεται στο εσωτερικό του μορίου. Η πιο σημαντική ιδιότητα της BSA είναι η ικανότητά της να συνδέεται αντιστρεπτά με μια μεγάλη ποικιλία μικρών μορίων, μια ικανότητα που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη μοριακή της δομή. Η μοριακή δομή της πρωτεΐνης αποτελείται από τρεις περιοχές που ονομάζονται I, II και III και χωρίζονται σε έξι υποπεριοχές, δύο υποπεριοχές A και B για κάθε περιοχή όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1. (Pal & Saha 2014)

Η χρήση της πρωτεΐνης BSA ως γαλακτωματοποιητής σε γαλακτώματα έχει αναφερθεί τα τελευταία 20 χρόνια. (Al-Malah et al. 2000, Lomova et al. 2010, Rangsansarid & Fukada 2007, Sadoonoy et al. 2011, Trentin et al. 2010) Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν πως η πρωτεΐνη BSA δρα ως αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής σχηματίζοντας σταθερά γαλακτώματα σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH. Η μοναδική περιοχή pH στην οποία η πρωτεΐνη BSA σχηματίζει γαλακτώματα μεγάλου μεγέθους, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε συγχώνευση κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, είναι η περιοχή του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης $pI = 4,7$. (Salis et al. 2011) Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται στο γεγονός πως η ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ σταγονιδίων ελαίου είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την καθυστέρηση της συγχώνευσης των σταγονιδίων. (Rangsansarid & Fukada 2007)

Ο φθορισμός που παρουσιάζει η πρωτεΐνη BSA οφείλεται στα κατάλοιπα της τρυπτοφάνης, της τυροσίνης και της φαινυλαλανίνης. Το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης της BSA είναι περίπου 280 nm και με διέγερση στο μέγιστο αυτό η πρωτεΐνη φθορίζει με μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής περίπου στα 340 nm. Ο φθορισμός της BSA επηρεάζεται ισχυρά από τις αλλαγές στο τοπικό μικροπεριβάλλον της πρωτεΐνης, οι οποίες μπορεί να προκύψουν λόγω πρόσδεσης ή αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια που οδηγούν σε διαμορφωτικές αλλαγές στην δομή της. Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί μεγάλος αριθμός μελετών όσο αφορά τον φθορισμό της πρωτεΐνης BSA και πως αυτός μεταβάλλεται στην παρουσία άλλων μορίων.

Πέρα από τον τεράστιο αριθμό μορίων με φαρμακευτικές ιδιότητες έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης BSA με μια ποικιλία αντιοξειδωτικών μορίων όπως οι πολυφαινόλες (Soares et al. 2007, Zhang et al. 2019) συμπεριλαμβανομένου του ταννικού οξέος (Ishtikhar et al. 2018, Xie 2017), των φλαβονοειδών (Ma et al. 2012, Pal & Saha 2014) και των ανθοκυανινών (Wei et al. 2018). Επιπλέον έχει αναφερθεί και η αλληλεπιδράση της πρωτεΐνης BSA με τη ρεσβερατρόλη (Cheng et al. 2018) και την α -τοκοφερόλη (Li et al. 2014). Σε όλες τις μελέτες αυτές επιβεβαιώνεται η μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών με την πρωτεΐνη BSA, η οποία διερευνάται μέσω της απόσβεσης του φθορισμού των ομάδων Trp της πρωτεΐνης, με αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού.

Επιπλέον παρατηρείται μετατόπιση του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπής προς μεγαλύτερα ή μικρότερα μήκη κύματος ανάλογα με την πολικότητα της προσδεμένης ουσίας.



Σχήμα 5.1: Τριδιάστατη δομή πρωτεΐνης BSA (Pal & Saha 2014)

Οι ιδιότητες της BSA εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την δευτεροταγή δομή της, που περιέχει 67% ελικοειδείς δομές, 10% αναστροφές και 23% αποδιαταγμένες αλυσίδες. Το φάσμα CD της πρωτεΐνης BSA έχει δύο αρνητικά ελάχιστα στα 208 και 222 nm τα οποία είναι χαρακτηριστικά της δομής α -έλικας. Η δευτεροταγής δομή της BSA μπορεί να επηρεαστεί από μια σειρά φυσικών και χημικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η πίεση, το pH και η παρουσία ουσιών που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη. (Pal & Saha 2014) Όλες οι μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού που αναφέρθηκαν πιο πάνω συνδυάστηκαν και με τη μέθοδο του κυκλικού διχρωισμού. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού α -έλικας και ταυτόχρονη αύξηση της β -πτυχωτής επιφάνειας κατά την αλληλεπίδραση με τον προσδέτη. (Cheng et al. 2018, Ishtikhar, et al. 2018, Pal & Saha 2014, Soares et al. 2007, Xie 2017, Zhang et al. 2019)

Αρκετές μελέτες διερευνούν τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης BSA με τη μέθοδο της θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC), είναι αμφίβολης όμως ποιότητας. Συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης BSA με πολυφαινόλες, (Pal et al. 2012, Precupas et al. 2017) φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες (Pal & Saha 2014). Επιπλέον έχει αναφερθεί και η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης BSA με α -τοκοφερόλη (Li et al. 2014). Σε όλες τις μελέτες αυτές παρατηρήθηκε αυθόρμητη ($\Delta G < 0$) και εξώθερμη αλληλεπίδραση ($\Delta H < 0$). Αυτή η θερμοδυναμική συμπεριφορά οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις Van der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης και του προσδέτη. Η γραμμομοριακή αναλογία προσδέτη

ως προς BSA κατά το σχηματισμό του συμπλέγματος υπολογίστηκε κοντά στη μονάδα. Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης BSA με το ταννικό οξύ. (Frazier et al. 2010, Frazier et al. 2003, Ishtikhar et al. 2018) Όπως και με τα υπόλοιπα μόρια, έτσι και σε αυτή την περίπτωση, παρατηρήθηκε αυθόρμητη ($\Delta G < 0$) και εξώθερμη αλληλεπίδραση ($\Delta H < 0$), ωστόσο η τιμή της ΔS κυμαινόταν από αρνητικές μέχρι θετικές τιμές ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μορίων. Σε αυτές τις μελέτες η γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA})$ κυμαίνεται σε μεγαλύτερες τιμές (30 – 50).

5.1.2 Πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος (Whey Protein – WP)

Ο όρος πρωτεΐνες ορού του γάλακτος έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει μια ομάδα πρωτεϊνών γάλακτος που παραμένουν διαλυτές στον ορό του γάλακτος. Κύρια συστατικά του κλάσματος θεωρούνται η β-γαλακτοσφαιρίνη (β-lactoglobulin) (~ 65%), η α-γαλακτοαλβουμίνη (α-lactalbumin) (~ 25%), η αλβουμίνη του ορού (serum albumin) (~ 8%) και οι ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins). Εμπορικά προϊόντα που ονομάζονται πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα ορού γάλακτος (Whey Protein Isolate – WPI) υποβάλλονται σε επεξεργασία για την απομάκρυνση του λίπους και της λακτόζης. Η β-γαλακτοσφαιρίνη είναι μια σχετικά μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από 162 κατάλοιπα αμινοξέων. Το μοριακό της βάρος είναι 18,4 και το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι 5,2. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στην φυσική πρωτεΐνη προσδιορίζονται στις θέσεις Cys-66 έως Cys-160 και Cys-106 έως Cys-119, με το Cys-121 ως πηγή της ελεύθερης θειόλης. Σε συνθήκες pH μεγαλύτερες του 3 βρίσκεται κυρίως σε διμερή μορφή, αλλά αποσυνδέεται και σε μονομερές σε τιμές pH κάτω από 3. Η β-γαλακτοσφαιρίνη μπορεί να δεσμεύσει πολλά υδρόφοβα μόρια στην επιφάνειά της. Η α-γαλακτοαλβουμίνη αποτελείται από 123 αμινοξέα και 4 δισουλφιδικές γέφυρες. Το μοριακό βάρος είναι 14,2 και το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι μεταξύ 4,2 και 4,5. Μία από τις κύριες διαφορές με τη β-γαλακτοσφαιρίνη είναι ότι δεν έχει καμία ελεύθερη ομάδα θειόλης. (Ach et al. 2015, Farrell et al. 2004)

Η χρήση της πρωτεΐνης WP (β-γαλακτοσφαιρίνης & α-γαλακτοαλβουμίνης) ως γαλακτωματοποιητής σε γαλακτώματα έχει αναφερθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών. (Charoen et al. 2012, Fioramonti et al. 2015, Guzey et al. 2004, Hu et al. 2003, Kastuda et al. 2008, Li et al. 2010, Sandra et al. 2008, Wei et al. 2015, Yuan et al. 2013) Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν πως η πρωτεΐνη WPI δρα ως αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής σχηματίζοντας σταθερά γαλακτώματα σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH. Επιπλέον, βρέθηκε ότι βελτιώνει την οξειδωτική σταθερότητα της λιπιδικής φάσης ιδιαίτερα σε τιμές pH κάτω από το pI λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων που δημιουργούνται με ιόντα μετάλλων.

Ο φθορισμός που παρουσιάζει η πρωτεΐνη WPI οφείλεται στα κατάλοιπα της τρυπτοφάνης και τυροσίνης όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης BSA. Η β-γαλακτοσφαιρίνη περιέχει δύο κατάλοιπα τρυπτοφάνης (Trp-19) και (Trp-61) και τέσσερα κατάλοιπα τυροσίνης ανά μονομερές. (Liang et al., 2008) Ο φθορισμός της α-γαλακτοαλβουμίνης οφείλεται στα κατάλοιπα Trp-26 και Trp-60, τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό της δομής σε υδρόφοβες περιοχές, και στο κατάλοιπο Trp-104. (Al-Hanish et al. 2016) Το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης είναι περίπου 280 nm και με διέγερση στο μέγιστο αυτό η πρωτεΐνη φθορίζει με μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής περίπου στα 340 nm. (Shang et al., 2020) Ο αριθμός των μελετών της βιβλιογραφίας που αφορούν τον φθορισμό της πρωτεΐνης WPI και πως αυτός μεταβάλλεται κατά την παρουσία άλλων μορίων είναι πολύ μικρός. Συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης WPI με ταρτραζίνη (Patel et al. 2019) και κουρκουμίνη (Fu et al. 2014) που είναι χρωστικές ουσίες. Επιπλέον έχει αναφερθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης WPI με τη ρεσβερατρόλη (Hemar et al. 2011, Liang et al. 2008) και με μόρια επιγαλλοκατεχίνης. (Al-Hanish et al. 2016) Σε όλες αυτές τις μελέτες επιβεβαιώνεται η μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση των μορίων με την πρωτεΐνη WPI, κατά την οποία αποσβένεται ο φθορισμός των ομάδων Trp-61, ενώ η Trp19 που βρίσκεται σε απολικό περιβάλλον συνεχίζει να συμβάλει στον συνολικό φθορισμό. (Liang et al., 2008) Επιπλέον στην περίπτωση της ρεσβερατρόλης παρατηρείται μετατόπιση του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Ωστόσο για την πρωτεΐνη WPI δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν οι συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης, όπως στην περίπτωση της BSA, επειδή είναι μίγμα πρωτεϊνών και όχι καθαρή πρωτεΐνη.

Το φάσμα CD της πρωτεΐνης WPI εμφανίζει ένα τυπικό αρνητικό ελάχιστο περίπου στα 220 nm, υποδεικνύοντας ότι κυριαρχεί η δομή β-πτυχωτής επιφάνειας. Σε μερικές από τις μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού που αναφέρθηκαν πιο πάνω έγινε διερεύνηση και με τη μέθοδο του κυκλικού διχρωισμού. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού β-πτυχωτής επιφάνειας κατά την αλληλεπίδραση με τον προσδέτη. (Al-Hanish et al. 2016, Patel et al. 2019) Τέλος, οι Al-Hanish et al. μελέτησαν και τη θερμοδυναμική συμπεριφορά της αλληλεπίδρασης μεταξύ της α-γαλακτοαλβουμίνης και της επιγαλλοκατεχίνης, η οποία ήταν εξώθερμη.

5.1.3 Καζεΐνη και Καζεϊνικό Νάτριο (Sodium Caseinate – SC)

Η καζεΐνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του γάλακτος σε ποσοστό 80 % της συνολικής πρωτεΐνης. (Zhan et al. 2018) Η καζεΐνη είναι ένα μείγμα τεσσάρων διαφορετικών καζεϊνών και βρίσκονται υπό τη μορφή πολυδιασκορπισμένων σφαιρικών συμπλόκων με κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Η πρωτεΐνη αποτελείται από την αs1-καζεΐνη (45 %), την αs2-καζεΐνη (12 %), τη β-

καζεΐνη (34 %) και την κ-καζεΐνη (10 %). Το ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης είναι περίπου 4,6. (Yan et al. 2009) Με την προσθήκη οξέος στο γάλα επιτυγχάνεται αποσταθεροποίηση και καθίζηση των καζεϊνών και παράγονται αρκετά προϊόντα όπως η όξινη καζεΐνη, η καζεΐνη πυτίας ή το συν-καθίζημα. Ωστόσο, με την προσθήκη αλκάλειου σε όξινη καζεΐνη δημιουργείται υδατοδιαλυτό καζεϊνικό άλας. Οι καζεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην μορφή που υπάρχουν στο γάλα, είτε ως καζεϊνικά άλατα ή ως μερικώς υδρολυόμενα πεπτίδια. Οι μορφές αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων λόγω των διαφόρων τεχνολογικών ιδιοτήτων όπως η διαλυτότητα και η ικανότητα σχηματισμού και σταθεροποίησης γαλακτωμάτων. (Farrell et al. 2004, Zhan et al. 2018)

Τα καζεϊνικά άλατα δεν μοιάζουν με τα μικκύλια καζεΐνης, καθώς η κολλοειδής φωσφορική δομή έχει καταστραφεί κατά την εξουδετέρωση της όξινης καζεΐνης, και σχηματίζονται συσσωματώματα. Τα καζεϊνικά άλατα νατρίου, καλίου και αμμωνίου είναι διαλυτά για pH μεγαλύτερο από 5.5. (Farrell et al. 2004) Το καζεϊνικό νάτριο είναι η πιο συνηθισμένη μορφή καζεϊνικών αλάτων και περιέχει της μορφές α-, β- και κ-καζεΐνη σε αναλογία 5:4:1. (Casanova et al. 2008) Οι τρεις τύποι καζεΐνης έχουν παρόμοια μοριακά βάρη, περίπου 24 kDa, και περιέχουν μεγάλο ποσοστό καταλοίπων προλίνης. Η α-καζεΐνη περιέχει δύο κατάλοιπα τρυπτοφάνης (Trp-37 και Trp-66 σε αs1- καζεΐνη και Trp-193 και Trp-109 σε αs2- καζεΐνη), ενώ η β-καζεΐνη έχει ένα υπόλειμμα Trp (Trp-143) και είναι πιο υδρόφοβη από την α-καζεΐνη και την κ-καζεΐνη (He et al. 2016). Επιπλέον, όλες οι καζεΐνες έχουν διαφορετικές υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Αυτές οι δομικές διαφορές υποδεικνύουν μια διαφορετική συμπεριφορά για τις καζεΐνες όσον αφορά τις υδρόφιλες και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μελέτες αλληλεπίδρασης του καζεϊνικού νατρίου με διάφορες κατηγορίες μορίων, όπως οι πολυφαινόλες (Zhan et al. 2018) τα φλαβονοειδή (Yuksel et al. 2010) και οι ανθοκυανίνες (Casanova et al. 2008, He et al. 2016). Με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας φθορισμού μελετήθηκε ο ενδογενής φθορισμός του καζεϊνικού νατρίου με διέγερση στα 280 nm και ισχυρή εκπομπή φθορισμού στα 338 nm. Μελέτες σύγχρονου φθορισμού έδειξαν απόσβεση του φθορισμού τόσο των καταλοίπων τρυπτοφάνης όσο και των καταλοίπων τυροσίνης και ταυτόχρονη μετατόπιση του μεγίστου προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, γεγονός που δηλώνει πως τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται σε ένα λιγότερο υδρόφοβο περιβάλλον, άρα συμβαίνει αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Οι He et al. υποστηρίζουν πως η α-καζεΐνη δεσμεύει ισχυρότερα τα μόρια κυανιδίνης σε σχέση με την β-καζεΐνη. (He et al. 2016) Επιπλέον, οι Casanova et al. χρησιμοποιώντας τα δεδομένα φθορισμού υπολόγισαν τον αριθμό θέσεων δέσμευσης του καζεϊνικού νατρίου με μόρια ανθοκυανίνων μέσω

διαγραμμάτων Scatchard. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την ύπαρξη φθοροφόρων περιοχών στο καζεϊνικό νάτριο με διαφορετική προσβασιμότητα. (Casanova et al. 2008)

Οι καζεΐνες εμφανίζονται ως μια μη αναδιπλούμενη δομή λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε προλίνη. Αυτό φαίνεται και μέσω των μελετών του κυκλικού διχρωισμού. Τα φάσματα CD του καζεϊνικού νατρίου έδειξαν μια δομή τυχαίας σπείρας με αρνητική ζώνη περίπου στα 200 nm και ώμο περίπου στα 220 nm. Κατά την αλληλεπίδραση του καζεϊνικού νατρίου με μικρά μόρια παρατηρείται συχνά αύξηση της αρνητικής κορυφής στα 200 nm και μικρή μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η αρνητική ελλειπτικότητα της α-καζεΐνης στα 220 nm μειώνεται μετά την προσθήκη προσδέτη, υποδηλώνοντας μείωση της α-έλικας και αύξηση της β-πτυχωτής επιφάνειας. (He et al. 2016, Zhan et al. 2018) Η χρήση του καζεϊνικού νατρίου ως πρωτοταγούς γαλακτωματοποιητή σε γαλακτώματα έχει αναφερθεί σε μικρό αριθμό μελετών συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του γάλακτος. (Jiménez-Martín et al. 2016, Lesmes et al. 2010, Zinoviadou et al. 2012)

5.2 Οι πολυσακχαρίτες των ΠΓ και οι αλληλεπιδράσεις τους με μικρο- και μακρομόρια

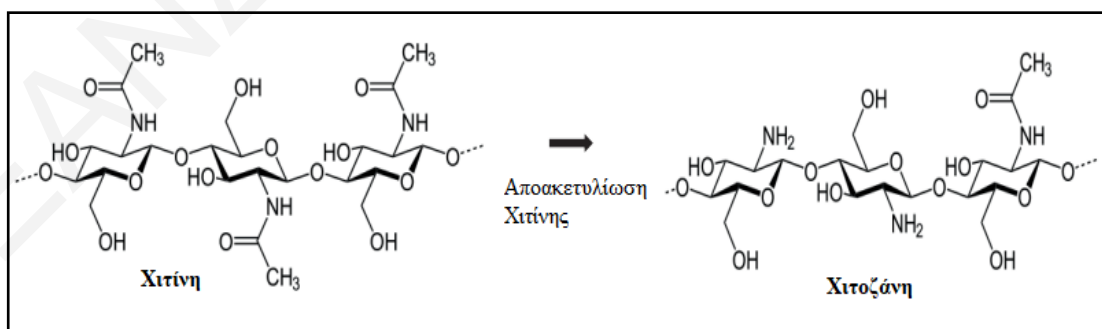
Η γνώση που προκύπτει από τα πειράματα μελέτης των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με πολυσακχαρίτες ή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυσακχαριτών, ως υλικά του τοιχώματος των γαλακτωμάτων, είναι χρήσιμη για τον ορθολογικό σχεδιασμό συστημάτων ενθυλάκωσης και απόδοσης βασισμένων στη μέθοδο εναπόθεσης ανά στρώμα. Ανάλογα με τη δομή του κάθε πολυσακχαρίτη και τις χαρακτηριστικές του ομάδες, το τελευταίο στρώμα ενός πολυστρωματικού γαλακτώματος καθορίζει την σταθερότητά του κατά την ενθυλάκωση αλλά και την απόδοση. Για παράδειγμα, το στρώμα αυτό καθορίζει σε μεγάλο βαθμό εάν ένα σύστημα απόδοσης θα παραμείνει σταθερό υπό όξινες συνθήκες αλλά θα διασπαστεί σε ουδέτερο pH.

5.2.1 Χιτοζάνη (Chitosan – CH)

Η χιτοζάνη είναι η μερικώς αποακετυλιωμένη μορφή της χιτίνης και έχει χημική δομή που αποτελείται από μονομερή 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D γλυκόζης, που συνδέονται μέσω ενός συνδέσμου (Σχήμα 5.2). Η χιτίνη και η χιτοζάνη αποτελούν τα κύρια δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων οργανισμών. Η χιτοζάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των δυνατοτήτων χρήσης του σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό και βιοαποικοδομήσιμο βιοπολυμερές, που παράγεται ευρέως από τα κέλυφη των καβουριών και από απορρίμματα γαρίδας. (Zargar et al. 2015, Zhou et al. 2019, Zinoviadou et al. 2012) Η χρήση της χιτοζάνης στη βιομηχανία τροφίμων σχετίζεται με τη λειτουργικότητά της σε διατροφικές

δραστηριότητες. Η χιτοζάνη παρουσιάζει ικανότητα δέσμευσης νερού, λιπαρών ουσιών και χρωστικών ουσιών, γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και αντιμικροβιακή ικανότητα. Η χιτοζάνη, σε αντίθεση με την χιτίνη, έχει σημαντική διαλυτότητα στο νερό που εξαρτάται από το pH. Σε χαμηλό pH, η χιτοζάνη είναι θετικά φορτισμένη ($pK_a=6.5$). (Zhang et al. 2021) Είναι αδιάλυτη στο νερό, όμως διαλύεται σε ασθενή οργανικά οξέα. Σε υψηλότερο pH, οι αμινομάδες κατά μήκος του πολυμερούς χιτοζάνης αποπρωτονιώνονται και τα αφόρτιστα πολυμερή συσσωματώνονται. (Wang & Heuzey 2016)

Η χιτοζάνη αποδείχθηκε χρήσιμη στην παρασκευή σταθερών γαλακτωμάτων με σύζευξη με διαφορετικές πρωτεΐνες ή σε πολλαπλά στρώματα με ιοντικά συστατικά. Η σύζευξη της χιτοζάνης με την πρωτεΐνη BSA έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές. (Li et al. 2017, Zhou et al. 2019) Αφού επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση των μορίων χιτοζάνης και πρωτεΐνης BSA σε διάλυμα τους Li. et al. στην συνέχεια παρασκευάστηκαν γαλακτώματα BSA – χιτοζάνης. (Li et al. 2017) Οι μελέτες έδειξαν ότι σχηματίζονται σταθερά γαλακτώματα σε pH 3 και 4, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές pH τα γαλακτώματα αποσταθεροποιούνται (σε $pH > pK_a$). Τα συσσωματώματα που σχηματίζονται σε αυτές τις συνθήκες έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με το έλαιο ως αποτέλεσμα της αυξημένης υδροφοβικότητας, ενώ η κροκίδωση ή η συνένωση των σταγονιδίων ελαίων που φέρουν BSA συμβαίνει λόγω χαμηλότερης ηλεκτροστατικής άπωσης, όταν η τιμή του pH πλησίασε το ισοηλεκτρικό σημείο της BSA (pI 4.7) (Zhou et al. 2019) Επιπλέον, σε γαλακτώματα όπου τα σταγονίδια σταθεροποιούνται από μόρια καζεϊνικού νατρίου, η χρήση της χιτοζάνης διεύρυνε προς υψηλότερες τιμές το εύρος pH όπου τα σταγονίδια αυτά παραμένουν σταθερά (Zinoviadou et al. 2012), ενώ στα γαλακτώματα όπου τα σταγονίδια σταθεροποιούνται από πρωτεΐνη WPI η κατιοντική χιτοζάνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε $pH > 5$. (Yuan et al. 2013)

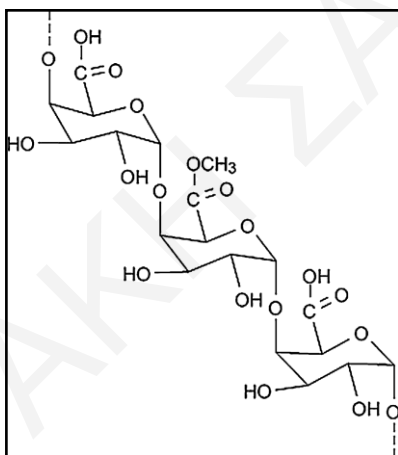


Σχήμα 5.2: Χημική δομή χιτίνης και χιτοζάνης. (Zargar et al. 2015)

5.2.2 Πηκτίνη (Pectin – PE)

Η πηκτίνη είναι ένα φυσικό πολυμερές υδατανθράκων, που αποτελεί συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των περισσότερων φυτών. Η πηκτίνη είναι ένα διακλαδισμένο

μακρομόριο με υψηλό μοριακό βάρος, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε υδρογέλες, που είναι ευέλικτο δίκτυο αλυσίδων πολυμερούς που μπορούν να διογκωθούν με νερό αλλά να μην διαλύονται σε αυτό. Η δομή της πηκτίνης αποτελείται από τουλάχιστον τρεις περιοχές πολυσακχαρίτη, γνωστές ως ομογαλακτουρονάνη (homogalacturonan – HG), ραμνογαλακτουρονάνη- I (rhamnogalacturonan -I – RG- I) και ραμνογαλακτουρονάνη - II (rhamnogalacturonan - II RG – II). Η ομογαλακτουρονάνη είναι το κύριο συστατικό και αποτελείται από μονάδες γαλακτουρονικού οξέος (Gal A) που συνδέονται με α-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η αλυσίδα του γαλακτουρονικού οξέος είναι μερικώς εστεροποιημένη με μεθανόλη (Σχήμα 5.3). Η πηκτίνη είναι διαλυτή στο νερό αλλά αδιάλυτη στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Η διαλυτότητα της στο νερό σχετίζεται με τον βαθμό πολυμερισμού και τον αριθμό και την κατανομή των ομάδων μεθυλεστέρα. Το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς του διαλύματος έχουν μεγάλη σημασία για την διαλυτότητα της πηκτίνης. Η τιμή pK_a της πηκτίνης είναι > 4 . (Orpanasopit et al. 2008)



Σχήμα 5.3: Χημική δομή πηκτίνης. (Orpanasopit P., et al., 2008)

Η διεπιφανειακή δραστηριότητα της πηκτίνης έχει αποδοθεί κυρίως στην παρουσία των υδρόφοβων ομάδων όπως το φουρουλικό οξύ και οι ακετυλομάδες. Η διάταξη της πηκτίνης στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού είναι διαφορετική σε τιμές pH κάτω και πάνω από το pK_a του γαλακτουρονικού οξέος. Σε τιμές χαμηλού pH ($< 3,5$), η πηκτίνη σχηματίζει μια συμπαγή διαμόρφωση λόγω της πρωτονίωσης του καρβοξυλικού ανιόντος. Αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης διευκολύνει την ικανότητα των υδρόφοβων περιοχών στα μόρια για να έρθουν κοντά στη διεπιφάνεια, προωθώντας έτσι την προσρόφηση. Σε υψηλές τιμές pH ($> \sim 4,5$), η πηκτίνη έχει μια πιο εκτεταμένη διαμόρφωση με λιγότερες ομάδες προσροφημένες στη διεπιφάνεια. Αυτή η διαμόρφωση τείνει να προκαλεί εκρόφηση της πηκτίνης και οδηγεί σε συνένωση των σταγονιδίων ελαίου. (Li et al. 2020)

Η πηκτίνη έχει μελετηθεί για τις αλληλεπιδράσεις τις με τις πρωτεΐνες BSA, β-γαλακτοσφαιρίνη, α-γαλακτοαλβουμίνη και καζεϊνικό νάτριο. Οι μελέτες αυτές εξέτασαν τη σχέση μεταξύ της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας των συμπλεγμάτων πρωτεΐνης / πολυσακχαρίτη και πως αυτά οδηγούν στη δημιουργία σταθερών συμπλόκων ανάλογα με τις τιμές pH. Σε τιμές pH όπου η πηκτίνη και η πρωτεΐνη έχουν όμοια φορτία, στο διάλυμα συνυπάρχουν μικτά μεμονωμένα διαλυτά μόρια πολυμερών. Σε αυτές τις συνθήκες κυριαρχεί η ανταγωνιστική προσρόφηση, η οποία οδηγεί σε μείωση της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας. Σε τιμές pH όπου η πηκτίνη και η πρωτεΐνη έχουν αντίθετα φορτία αλλά όχι πολύ μεγάλες τιμές ζ-δυναμικού, δημιουργούνται σταθερά ενδομοριακά ή διαμοριακά διαλυτά σύμπλοκα και λαμβάνει χώρα συνεργιστική προσρόφηση, η οποία οδηγεί σε βελτίωση της λειτουργικότητας γαλακτωματοποίησης. Η βελτίωση οφείλεται στο σχηματισμό παχιάς και συμπαγούς διεπιφανειακής στιβάδας γύρω από την επιφάνεια των σταγονιδίων ελαίων η οποία παρέχει ισχυρή στερική σταθεροποίηση έναντι συσσωμάτωσης, κροκίδωσης και συνένωσης. (Benjamin et al. 2013, Guzey et al. 2007, Li et al. 2012, Surh et al. 2006)

Η χιτοζάνη και η πηκτίνη σχηματίζουν σύμπλοκα μεταξύ τους λόγω της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλομάδων της πηκτίνης και των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της χιτοζάνης. Τα σύμπλοκα αυτά ενισχύονται μέσω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των δύο μακρομορίων. Μελέτη της Kowalonek αναφέρει πως το συμπλέγμα χιτοζάνης / πηκτίνης είναι σταθερότερο στις οξειδωση και στη διάδοση ελευθέρων ριζών συγκριτικά με συμπλέγματα όμοιων πολυσακχαριτών λόγω της αλλαγμένης δομής των βιοπολυμερών στα συμπλέγματα. (Kowalonek 2017)

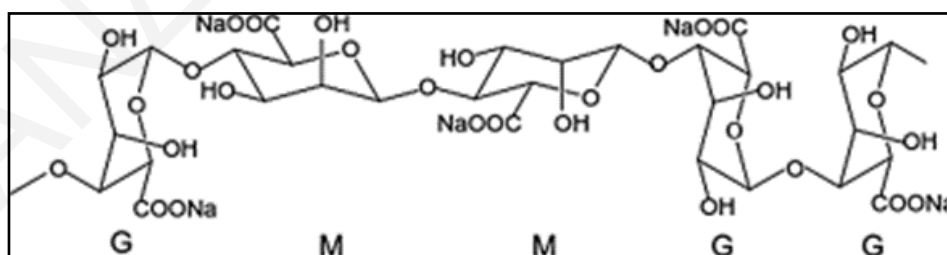
Οι Marchuk M., et al., μελέτησαν πως οι βητακυανίνες αλληλεπιδρούν με πηκτίνη τεύτλων, κόμμι ξανθάνης, αραβικό κόμμι και αλγινικό νάτριο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το αλγινικό νάτριο σχηματίζει σταθερότερα σύμπλοκα με τα μόρια της βητακυανίνης λόγω του ότι σε χαμηλό pH, οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις του αλγινικού καθίστανται ασθενέστερες και οι διαμοριακοί δεσμοί αρχίζουν να κυριαρχούν. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση αυτή ενισχύεται από την παρουσία μικρών ποσοτήτων πολυσθενών κατιόντων, τα οποία είναι ικανά να σχηματίσουν γέφυρες μεταξύ των καρβοξυλομάδων και να αυξήσουν τη σταθερότητα του συμπλέγματος. Πέραν αυτού η δομή των πολυσακχαριτών φαίνεται να επηρεάζει, αφού οι γραμμικοί πολυσακχαρίτες παρουσιάζουν μικρότερη στερική παρεμπόδιση. (Marchuk et al. 2019)

5.2.3 Αλγινικό Νάτριο (Sodium Alginate – SA)

Το αλγινικό νάτριο είναι ένα γραμμικό ανιοντικό συμπολυμερές στο οποίο το β-D-μανουρονικό οξύ (M) και το α-1-γουλουρονικό οξύ (G) συνδέονται δημιουργώντας

ετεροπολυμερείς ομάδες (MG) ή / και ομοπολυμερείς (M ή G) ομάδες. Το μανουρονικό οξύ σχηματίζει β (1-4) συνδέσμους δημιουργώντας M-ομάδες με γραμμική και εύκαμπτη διαμόρφωση. Το γουλουρονικό οξύ δημιουργεί α (1-4) δεσμούς σχηματίζοντας ένα στερικό εμπόδιο γύρω από τις καρβοξυλικές ομάδες. Οι G-ομάδες που δημιουργούνται οδηγούν σε διπλωμένες και άκαμπτες δομικές διαμορφώσεις, που είναι υπεύθυνες για μια έντονη ακαμψία των μοριακών αλυσίδων (Σχήμα 5.4). Το αλγινικό νάτριο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλούς τομείς καθώς και σε εφαρμογές τροφίμων ως σταθεροποιητικό και πηκτικό μέσο. (Sellimi et al. 2015)

Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί οι φασματοσκοπικές ιδιότητες του αλγινικού νατρίου. Το αλγινικό νάτριο εμφανίζει φάσμα εκπομπής φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης στα 334 nm. (Neumann et al. 2003) Επιπλέον δίνει σήμα κυκλικού διχρωισμού όπου στο φάσμα εμφανίζεται μια αρνητική κορυφή στα 196 nm και μια στα 205 nm. (Sellimi et al. 2015) Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μελέτες αλληλεπίδρασης του αλγινικού νατρίου με πρωτεΐνες και συγκεκριμένα με τη BSA, τη β-γαλακτοσφαιρίνη και το καζεϊνικό νάτριο. Μελετήθηκε η γαλακτωματοποιητική και αντιοξειδωτική ικανότητα του αλγινικού νατρίου και πως συμβάλει στη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το αλγινικό νάτριο σε γαλακτώματα τροφίμων μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως βελτιωτικός αλλά και ως ανασταλτικός παράγοντας ανάλογα με τη συγκέντρωση του αλγινικού νατρίου που χρησιμοποιείται, γιατί μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα αποσταθεροποίησης. Ο τρόπος με τον οποίο το αλγινικό νάτριο βελτιώνει την οξειδωτική σταθερότητα ενός γαλακτώματος είναι μέσω δέσμευσης των ελευθέρων ανιόντων μετάλλων λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει (pK ~ 3). (Harnsilawat et al. 2016, Neemann et al. 2013, Salvia-Trujillo et al. 2016, Sellimi et al. 2015)



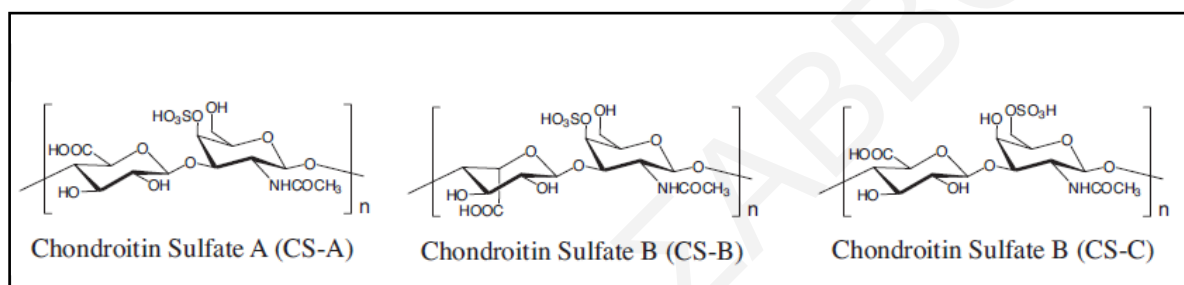
Σχήμα 5.4: Χημική δομή αλγινικού νατρίου. (Sellimi et al., 2015)

5.2.4 Θεϊκή Χονδροϊτίνη (Chondroitin Sulfate – CS)

Η θεϊκή χονδροϊτίνη είναι μια φυσική ουσία που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία οστεοαρθρικών παθήσεων. Είναι ένα πολυμερές με μεγάλο εύρος μοριακού βάρους που αποτελείται από εναλλασσόμενη αλληλουχία d-γλυκουρονικού οξέος (GlcA) και υπολειμμάτων N-ακετυλο-d-γαλακτοζαμίνης (GalNAc) που συνδέονται μέσω

εναλλασσόμενων β- (1 → 3) και β- (1 → 4) δεσμών. Τα δύο κύρια είδη θειικής χονδροϊτίνης είναι η A και C και διαφέρουν μεταξύ τους στη θέση των θειικών όπως φαίνεται στις δομές του Σχήματος 5.5. Η παρουσία θειικών ομάδων καθιστά τα μόρια της θειικής χονδροϊτίνης εξαιρετικά υδρόφιλα. (Matsuo et al. 2009)

Οι δομές των μορίων θειικής χονδροϊτίνης σε διάλυμα έχουν μελετηθεί μέσω διαφόρων φασματοσκοπικών τεχνικών. Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD) χρησιμοποιείται ευρέως για τη ανάλυση διαμόρφωσης της θειικής χονδροϊτίνης στο διάλυμα και γενικότερα των γλυκοζαμίνων. Το φάσμα CD της θειικής χονδροϊτίνης A (CS-A) στο νερό έχει δύο χαρακτηριστικές ζώνες CD αμιδίου και καρβοξυλίου από 300 έως 185 nm, ενώ η θειική χονδροϊτίνη C (CS-C) έως 175 nm. (Matsuo et al. 2009)



Σχήμα 5.5: Χημική δομή θειικής χονδροϊτίνης. (Matsuo K., et al, 2009)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Τεχνικές Χαρακτηρισμού

Στο κεφάλαιο 6 περιγράφεται το θεωρητικό υπόβαθρο των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των πρωτεϊνών – πολυσακχαριτών και αντιοξειδωτικών ουσιών στα τρία επίπεδα μελέτης της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Αρχικά γίνεται αναφορά στο θεωρητικό υπόβαθρο της φασματοσκοπίας φθορισμού, φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού, θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης και πειραμάτων διαπίδυσης. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων σε διάλυμα. Στη συνέχεια, ακολουθούν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας ανάκλασης απορρόφησης υπερύθρου και μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες σε επιφάνειες. Τέλος παρουσιάζονται οι τεχνικές χαρακτηρισμού των γαλακτωμάτων, η μέθοδος μέτρησης ζ-δυναμικού και η δυναμική σκέδαση φωτός.

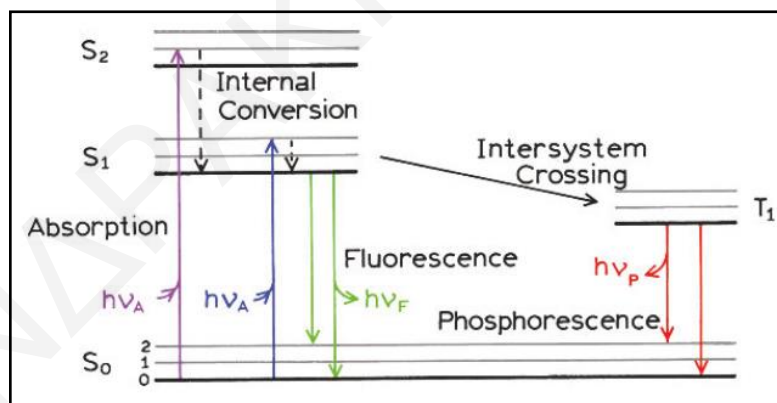
6.1 Φασματοσκοπία Φθορισμού

6.1.1 Γενικές αρχές φασματοσκοπίας φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού αποτελεί ένα απαραίτητο εργαλείο μελέτης της χημικής και φυσικής συμπεριφοράς των μορίων τόσο σε μικροσκοπικό όσο και σε μακροσκοπικό επίπεδο. Αποτελεί μια από τις κυρίαρχες μεθόδους μελέτης στη βιοχημεία, βιοφυσική και βιοτεχνολογία και τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει ραγδαία ανάπτυξη σε τομείς της βιοτεχνολογίας και της γενετικής ανάλυσης. Μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τη δομή και τις ιδιότητες των υλικών με μεγάλη ακρίβεια εξαιτίας της υψηλής της ευαισθησίας.

Με τον όρο φωταύγεια περιγράφεται η εκπομπή φωτός από οποιαδήποτε ουσία, η οποία οφείλεται σε ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις. Ο όρος φωταύγεια αναφέρεται σε δύο

διεργασίες, το φθορισμό και το φωσφορισμό, ανάλογα με τη φύση της διεγερμένης κατάστασης. Στις διεγερμένες απλές καταστάσεις, το ηλεκτρόνιο που βρίσκεται στο διεγερμένο τροχιακό είναι συζευγμένο με δεύτερο ηλεκτρόνιο στο τροχιακό της θεμελιώδους κατάστασης. Κατά συνέπεια η επιστροφή του διεγερμένου ηλεκτρονίου στη θεμελιώδη κατάσταση είναι spin-επιτρεπτή και συμβαίνει γρήγορα με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φθορισμός. Οι ρυθμοί εκπομπής του φθορισμού είναι της τάξης του 10^8 s^{-1} και συνεπώς ο χρόνος ημιζωής (τ) φθορισμού είναι περίπου στα 10 ns. Ως χρόνος ημιζωής ενός φθοροφόρου μορίου ορίζεται ο μέσος χρόνος μεταξύ της διέγερσης και της επιστροφής του στη θεμελιώδη κατάσταση. Όταν η εκπομπή του φωτός γίνεται από τριπλές διεγερμένες καταστάσεις στις οποίες το διεγερμένο ηλεκτρόνιο έχει το ίδιο spin με το ηλεκτρόνιο της θεμελιώδους κατάστασης, τότε πραγματοποιείται φωσφορισμός. Οι μεταβάσεις στη θεμελιώδη κατάσταση είναι απαγορευμένες και έτσι οι ρυθμοί εκπομπής είναι πιο αργοί ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$), με αποτέλεσμα οι χρόνοι ζωής του φωσφορισμού να κυμαίνονται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως και μερικά δευτερόλεπτα. Τα φαινόμενα αυτά παρουσιάζονται στο διάγραμμα του Σχήματος 6.1. Ο φθορισμός συμβαίνει συνήθως από αρωματικά μόρια, εκ των οποίων αρκετά εμφανίζουν χρόνους ημιζωής μικρότερους από 1 ns. Η μέτρηση του χρόνου ημιζωής τέτοιων μορίων απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων οπτικών και ηλεκτρολογικών συστημάτων ώστε να μελετηθεί ο χρονοεξαρτημένος φθορισμός. (Lakowicz 2006)



Σχήμα 6.1: Διάγραμμα Jablonski. (Lakowicz 2006)

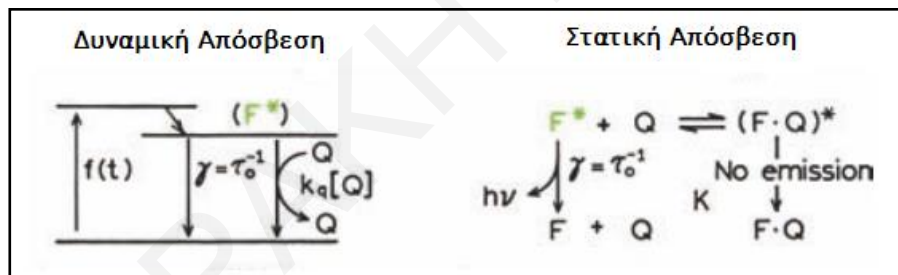
6.1.2 Στατικός Φθορισμός

6.1.2.1 Απόσβεση Φθορισμού

Η απόσβεση φθορισμού αναφέρεται σε οποιαδήποτε διαδικασία η οποία οδηγεί στη μείωση της έντασης του φθορισμού ενός φθοροφόρου. Διάφορες μοριακές αλληλεπιδράσεις μπορεί να οδηγήσουν σε απόσβεση, συμπεριλαμβανομένων των αντιδράσεων διεγερμένης κατάστασης, των μοριακών αναδιατάξεων, της μεταφοράς ενέργειας, του σχηματισμού συμπλόκου με τη θεμελιώδη κατάσταση της ουσίας και της απόσβεσης μέσω συγκρούσεων. Η απόσβεση

φθορισμού μπορεί να χαρακτηριστεί ως δυναμική απόσβεση είτε ως στατική απόσβεση, ανάλογα με το φαινόμενο στο οποίο οφείλεται. Δυναμική απόσβεση ονομάζεται η απόσβεση που προκύπτει από τις συγκρούσεις μεταξύ του φθοροφόρου μορίου και του μορίου ενός αποσβέστη, ενώ η στατική απόσβεση οφείλεται στην σύζευξη του φθοροφόρου και του αποσβέστη, κατά κύριο λόγο μέσω διαμοριακών δυνάμεων.

Κατά τη δυναμική απόσβεση, ο φθορισμός του φθοροφόρου αποσβένεται από τον αποσβέστη κατά το χρόνο ζωής του στη διεγερμένη του κατάσταση. Μετά την σύγκρουση το φθοροφόρο επιστρέφει στη θεμελιώδη του κατάσταση χωρίς την εκπομπή φωτονίου και χωρίς τα δύο μόρια να έχουν υποστεί οποιαδήποτε μόνιμη αλλαγή. Κατά συνέπεια στη δυναμική απόσβεση ο όγκος του συστήματος και οι αποστάσεις των μορίων εντός του διαλύματος επηρεάζουν τον φθορισμό τους. Ο μηχανισμός στατικής απόσβεσης οφείλεται στην δημιουργία του συμπλόκου φθοροφόρου – αποσβέστη, το οποίο δεν φθορίζει ή φθορίζει πολύ λιγότερο με αποτέλεσμα την μείωση του συνολικού φθορισμού. Οι μηχανισμοί της δυναμικής και στατικής απόσβεσης απεικονίζονται στο διάγραμμα του Σχήματος 6.2. Οι μελέτες απόσβεσης δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο τα μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. (Lakowicz 2006)



Σχήμα 6.2: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού δυναμικής και στατικής απόσβεσης. (Lakowicz 2006)

Η απόσβεση του φθορισμού των φθοροφόρων μορίων περιγράφεται από την εξίσωση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_Q\tau_0[Q] \quad \text{Εξίσωση 6.1}$$

όπου F_0 και F οι εντάσεις φθορισμού απουσία και παρουσία αποσβέστη αντίστοιχα και $[Q]$ είναι η συγκέντρωση αποσβέστη. Η K_{SV} είναι η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer, K_Q είναι η διμοριακή σταθερά ρυθμού απόσβεσης και το τ_0 είναι ο χρόνος ημιζωής φθορισμού απουσία αποσβέστη. Όταν η μορφή της γραφικής παράστασης $\frac{I_0}{I}$ ως προς τη συγκέντρωση του αποσβέστη $[Q]$ είναι γραμμική τότε από την κλίση της ευθείας υπολογίζεται η K_{SV} . Η γραμμική μορφή της εξίσωσης μπορεί να οφείλεται είτε σε στατική είτε σε δυναμική απόσβεση. Για να

διακριθεί η στατική από τη δυναμική απόσβεση μπορεί να μετρηθεί ο χρόνος ημιζωής του φθορισμού του φθοροφόρου μορίου παρουσία (τ) και απουσία (τ_0) του αποσβέστη και να δημιουργηθεί μια εναλλακτική γραφική παράσταση Stern-Volmer η οποία περιγράφεται από την Εξίσωση 6.2. Εάν η σταθερά K_D (σταθερά δυναμικής απόσβεσης) ισούται με K_{SV} τότε η απόσβεση είναι δυναμική.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D[Q] \quad \text{Εξίσωση 6.2}$$

Σε περίπτωση που η σχέση I_0/I και $[Q]$ δεν είναι γραμμική τότε συχνά η καμπύλη περιγράφεται από την Εξίσωση 6.3 η οποία ισχύει όταν στην απόσβεση συνεισφέρουν η δυναμική και η στατική απόσβεση.

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_D[Q]) \quad \text{Εξίσωση 6.3}$$

Πάλι όταν η σχέση I_0/I ως προς $[Q]$ φαίνεται να αυξάνεται εκθετικά, μπορεί να εφαρμοσθεί μια τροποποιημένη μορφή της εξίσωσης Stern-Volmer (Εξίσωση 6.4), η οποία λαμβάνει υπόψη την απόσβεση που συμβαίνει όταν μόρια του αποσβέστη βρίσκονται πολύ κοντά στο φθοροφόρο μόριο κατά τη στιγμή της διέγερσης.

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D[Q]) \exp(N_{AV}[Q]V_q) \approx \exp(N_{AV}[Q]V_q) \quad \text{Εξίσωση 6.4}$$

όπου το V_q είναι ο όγκος της «σφαίρας απόσβεσης» και η τελική προσέγγιση ισχύει όταν το $K_D [Q] \ll 1$. (Lakowicz 2006)

Όταν η γραμμικότητα του διαγράμματος Stern-Volmer οφείλεται αποδεδειγμένα σε στατική απόσβεση του φθορισμού, τότε η Εξίσωση 6.5 περιγράφει την αλληλεπίδραση ενός μορίου φθοροφόρου με n μόρια αποσβέστη με βάση την χημική ισορροπία $P + nQ \rightleftharpoons PQ_n$.

$$\log\left(\frac{I_0 - I}{I}\right) = \log K_s + n \log[Q] \quad \text{Εξίσωση 6.5}$$

όπου K_s είναι η σταθερά πρόσδεσης, και ο αριθμός των μορίων αποσβέστη $[Q]$ που προσδένονται σε ένα φθοροφόρο μόριο P . Η συγκέντρωση των ελευθέρων φθοροφόρων περιγράφεται από το πιο κάτω ισοζύγιο μάζας. (Wei et al. 2018)

$$\begin{aligned} [Q] &= [Q]_{tot} - n[PQ_n] = [Q]_{tot} - n([P]_0 - [P]) = \\ [Q]_{tot} - n[P]_{tot} \frac{([P]_{tot} - [P])}{[P]_{tot}} &= [Q]_{tot} - n[P]_{tot} \frac{(I_0 - I)}{I_0} \end{aligned} \quad \text{Εξίσωση 6.6}$$

όπου $[Q]_{tot}$ και $[P]_{tot}$ είναι οι συνολικές συγκεντρώσεις του αποσβέστη και του φθοροφόρου στο σύστημα. Η 6.5 και η 6.6 βασίζονται στην παραδοχή ότι το σύμπλοκο φθοροφόρου-αποσβέστη δεν εκπέμπει καθόλου φθορισμό.

Στην περίπτωση που το φθοροφόρο μόριο ή ο αποσβέστης παρουσιάζουν απορρόφηση στην περιοχή διέγερσης ή εκπομπής παρατηρείται μείωση της έντασης διέγερσης του δείγματος είτε μείωση της παρατηρούμενης έντασης κατά την εκπομπή λόγω της απορρόφησης. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου (inner filter effect). Για να εξαλειφθούν οι επιδράσεις του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου, πραγματοποιούνται μετρήσεις απορρόφησης στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής των μετρήσεων φθορισμού. Η ένταση φθορισμού διορθώνεται χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 6.7.

$$I_{cor} = I_{obsd} 10^{\frac{(A_1+A_2)}{2}} \quad \text{Εξίσωση 6.7}$$

όπου I_{cor} και I_{obsd} η διορθωμένη και η πειραματικά παρατηρούμενη ένταση φθορισμού αντιστοίχως, A_1 και A_2 είναι η απορρόφηση του διαλύματος στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, αντίστοιχα. (Lakowicz 2006)

6.1.2.2 Ενίσχυση Φθορισμού

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η εκπομπή ενός φθοροφόρου μπορεί να αυξηθεί παρουσία άλλων μορίων. Η ενίσχυση φθορισμού μπορεί να προέρχεται από μηχανισμούς μεταφοράς ενέργειας φθορισμού, από αύξηση της απορρόφησης των δεσμευμένων μορίων ή από αλλαγή της γεωμετρίας ή της σταθερότητας της διεγερμένης κατάστασης. (Lakowicz 2006) Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, η κβαντική απόδοση φθορισμού αυξάνεται. Η κβαντική απόδοση, ϕ , μπορεί να μοντελοποιηθεί ως:

$$\phi = \frac{\tau}{\tau_0} \quad \text{Εξίσωση 6.8}$$

όπου τ_0 και τ είναι διάρκεια ζωής απουσία και παρουσία του δεσμευμένου μορίου, και το τ_0 σχετίζεται με την απορρόφηση στο μήκος κύματος διέγερσης.

Ένας έμμεσος τρόπος μοντελοποίησης τέτοιων δεδομένων βασίζεται στην εξίσωση Benesi-Hildebrand, (Kuntz et al. 1968) που χρησιμοποιείται αρχικά για να ερμηνεύσει πειράματα απορρόφησης UV-Vis και τροποποιήθηκε αργότερα για τον φθορισμό (Karr et al. 1990, Bhattacharyya et al. 1994, Ma et al. 2012). Η εξίσωση ισχύει όταν η συσχέτιση του φθοροφόρου (B) και του δεσμευμένου μορίου (P) γίνεται με αναλογία 1:1.

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{K\Delta F_{\max}} \times \frac{1}{[P]} \quad \text{Εξίσωση 6.9}$$

όπου $\Delta F = F - F_0$ είναι η ενίσχυση φθορισμού, το ΔF_{\max} είναι το μέγιστο αυτής της ποσότητας, και K είναι η σταθερά σύνδεσης. Η Εξίσωση 6.9 είναι στην πραγματικότητα η περιοριστική μορφή μιας πιο γενικής εξίσωσης τριών παραμέτρων:

$$n[P]_{\text{tot}} = [B]_{\text{tot}} \frac{\Delta F}{\Delta F_{\max}} \left(1 + \frac{1}{K \left\{ [B]_{\text{tot}} \left(1 - \frac{\Delta F}{\Delta F_{\max}} \right) \right\}^n} \right) \quad \text{Εξίσωση 6.10}$$

όπου n είναι η στοιχειομετρία της αντίδρασης $P + nB \rightleftharpoons PB_n$, $[B]_{\text{tot}}$ και $[P]_{\text{tot}}$ είναι οι συνολικές συγκεντρώσεις φθορισμού δεσμευμένου μορίου στο σύστημα. Η Εξίσωση 6.9 προέρχεται από την Εξίσωση 6.10 με τις ακόλουθες προϋποθέσεις: $n = 1$, $K \times [B]_{\text{tot}} \ll 1$ και $[P] \approx [P]_{\text{tot}}$. Το μειονέκτημα της Εξίσωσης 6.10 είναι ότι περιέχει τρεις παραμέτρους που πολλές φορές είναι στατιστικά συσχετισμένες και δεν μπορούν να εξαχθούν εύκολα από τα πειραματικά δεδομένα.

6.1.2.3 Σύγχρονος Φθορισμός Σταθερού Μήκους Κύματος (Constant-Wavelength Synchronous Fluorescence – CWSF)

Τα τελευταία χρόνια η φασματοσκοπία του σύγχρονου φθορισμού (Synchronous fluorescence spectroscopy – SFS) έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα λόγω των πλεονεκτημάτων που μπορεί να προσφέρει. Έχει τη δυνατότητα απλοποίησης της φασματικής πολυπλοκότητας, βελτίωσης της επιλεκτικότητας και μείωσης της παρεμβολής της σκέδασης του φωτός. (Li et al. 1999) Η SFS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την μελέτη μειγμάτων πολλών συστατικών χωρίς να υπάρξει προηγούμενος φυσικός διαχωρισμός. Στη μέθοδο σύγχρονου φθορισμού σταθερού μήκους κύματος, τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής σαρώνεται συνεχώς διατηρώντας σταθερή τη διαφορά μεταξύ τους, $\Delta\lambda$. Η επιλογή του $\Delta\lambda$ σε συγχρονισμένους φασματοφθορομετρικούς προσδιορισμούς είναι πολύ σημαντική. Η επίδραση του $\Delta\lambda$ μπορεί να είναι σημαντική για το σχήμα, τη θέση και την ένταση του σήματος μιας κορυφής φθορισμού καθώς και για τις παρεμβολές που αποδίδονται στη σκέδαση φωτός. Γενικότερα, η επιλογή της τιμής $\Delta\lambda$ προσδιορίζεται εμπειρικά. Μια ακριβέστερη μέθοδος προσδιορισμού της βέλτιστης τιμής $\Delta\lambda$ είναι μέσω της τρισδιάστατης φασματοσκοπίας σύγχρονου φθορισμού κατά την οποία λαμβάνονται τρισδιάστατα φάσματα όπου καταγράφεται η τιμή του $\Delta\lambda$, ως συνάρτηση της έντασης και του μήκους κύματος. (Ni et al. 2006) Τα φάσματα που προκύπτουν από τη τεχνική σύγχρονου φθορισμού είναι πολύ απλούστερα από τα συμβατικά φάσματα

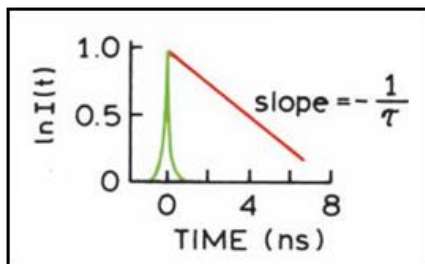
διέγερσης και εκπομπής και έχουν στενότερα πλάτη ζώνης, καθώς σε αυτά παρατηρείται υψηλή ένταση μόνο όταν το $\Delta\lambda$ αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ του μήκους κύματος της ισχυρής ζώνης εκπομπής και της απορρόφησης. (Bobone et al. 2014)

Πρόσφατα έχει μελετηθεί μεγάλος αριθμός αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – με διάφορα μικρά μόρια χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του σύγχρονου φθορισμού, με σκοπό τη μελέτη του περιβάλλοντος της τυροσίνης - Tyr και αυτού της τρυπτοφάνης - Trp. Ο φθορισμός της Trp οφείλεται στο τμήμα ινδόλης που υπάρχει στην πλευρική αλυσίδα με μέγιστη απορρόφηση στα 280 nm. Η εκπομπή του είναι πολύ ευαίσθητη στην πολικότητα του περιβάλλοντος και η κορυφή φθορισμού μετατοπίζεται από τα 350 nm στο νερό έως περίπου 305 nm σε πολύ απολικά περιβάλλοντα ή όταν αυξηθεί η υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης. Ο φθορισμός της Tyr οφείλεται στην ομάδα της φαινόλης. Τα φάσματα απορρόφησης των δύο αμινοξέων σε μεγάλο βαθμό αλληλεπικαλύπτονται, ωστόσο η Trp παρουσιάζει ακόμη μια σημαντική κορυφή απορρόφησης σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από 295 nm. Επιπλέον, η εκπομπή της Tyr είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητη στην πολικότητα του περιβάλλοντός της με το μέγιστο των εκπομπών της να βρίσκεται πάντα περίπου στα 303–305 nm. Αυτό είναι συνέπεια της αδυναμίας αναπροσανατολισμού του διπόλου μετά από διέγερση, λόγω των ιδιοτήτων συμμετρίας του μορίου της φαινόλης. Ωστόσο, ο φθορισμός της Tyr μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με μεταβολές διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, με εξέταση της έντασης και του χρόνου ημιζωής του φθορισμού, χαρακτηριστικά που είναι πολύ ευαίσθητα σε οποιαδήποτε αλλαγή στο περιβάλλον τη πρωτεΐνης. Για τον σύγχρονο φθορισμό των πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί πως αν το $\Delta\lambda$ ισούται με 15 nm τότε διεγείρονται τα κατάλοιπα Tyr, ενώ όταν το $\Delta\lambda$ ισούται με 50 nm τότε διεγείρονται τα κατάλοιπα Trp. (Bobone et al. 2014)

6.1.2.4 Χρονοεξαρτημένος Φθορισμός

Οι μετρήσεις χρονοεξαρτημένου φθορισμού χρησιμοποιούνται ευρέως στη φασματοσκοπία φθορισμού για μελέτες βιολογικών μακρομορίων. Οι μελέτες χρονοεξαρτημένου φθορισμού παρέχουν περισσότερες πληροφορίες από τις μετρήσεις στατικού φθορισμού καθώς επιτρέπουν τη διάκριση της στατικής και της δυναμικής απόσβεσης μελετώντας το χρόνο ζωής των φθοροφόρων. Κατά τη δημιουργία του συμπλόκου φθοροφόρου – προσδέτη, ο χρόνος ζωής αποδιέγερσης των μη συμπλοκοποιημένων φθοροφόρων δεν μειώνεται, σε αντίθεση με τη δυναμική απόσβεση όπου μελετάται ο χρόνος ημιζωής όλων των φθοροφόρων. Η δυναμική απόσβεση είναι μια διαδικασία που δρα σε ολόκληρο τον πληθυσμό της διεγερμένης κατάστασης και έτσι ο μέσος χρόνος αποδιέγερσης μειώνεται ταυτόχρονα για όλα τα διεγερμένα μόρια. (Lakowicz 2006)

Στις μετρήσεις χρονοεξαρτημένου φθορισμού η συνεχής ακτινοβολία του δείγματος αντικαθίσταται από παλμική ακτινοβολία με τη βοήθεια πηγής παλμικού φωτός. Το δείγμα διεγείρεται με έναν παλμό φωτός μικρής διάρκειας, όπου το πλάτος παλμού είναι συνήθως μικρότερο από τον χρόνο αποδιέγερσης του δείγματος. Ακολούθως, καταγράφεται η χρονικά εξαρτώμενη ένταση του φθορισμού $I(t)$ και μέσω της γραφικής παράστασης $\log I(t)$ συναρτήσει του t υπολογίζεται ο χρόνος αποδιέγερσης όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.3.



Σχήμα 6.3: Υπολογισμός χρόνου αποδιέγερσης μετά από έκθεση σε παλμικό φως. (Lakowicz 2006)

Όταν υπάρχει ένα και μοναδικό φθοροφόρο που εκπέμπει και μια μοναδική διεργασία αποδιέγερσης, η ένταση του φθορισμού κατά την αποδιέγερση $I(t)$ ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, η οποία περιγράφεται από την Εξίσωση 6.11:

$$I(t) = I_0 e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \quad \text{Εξίσωση 6.11}$$

όπου τ είναι ο υπολογιζόμενος χρόνος ημιζωής και I_0 είναι η ένταση σε $t = 0$. Ωστόσο αρκετά συχνά παρατηρούνται αποκλίσεις της αποδιέγερσης από την εκθετική συμπεριφορά πρώτης τάξης, λόγω παρουσίας περισσότερων του ενός είδους φθοροφόρων στο δείγμα ή λόγω περισσότερων μηχανισμών αποδιέγερσης του ίδιου φθοροφόρου (π.χ BSA – HAS). Σε αυτή την περίπτωση η ένταση του φθορισμού μπορεί να διαμορφωθεί ως άθροισμα των εκθετικών συναρτήσεων αποδιέγερσης (Εξίσωση 6.12), αφού πρώτα αφαιρεθεί ο παλμός που δίνει το λείζερ.

$$I(t) = \sum_k A_k e^{-t/\tau_k} \quad \text{Εξίσωση 6.12}$$

όπου A_k είναι το πλάτος της συνεισφοράς k στην απόσβεση και τ_k είναι η χαρακτηριστική διάρκεια ζωής του φθοροφόρου για τη διεργασία k . Μπορεί να υπολογιστεί η μέση διάρκεια ζωής ($\langle \tau \rangle$) του φθοροφόρου χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 6.13: (Lakowicz J. R., 2006)

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_k A_k \tau_k^2}{\sum_k A_k \tau_k} \quad \text{Εξίσωση 6.13}$$

6.2 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Microcalorimetry – ITC)

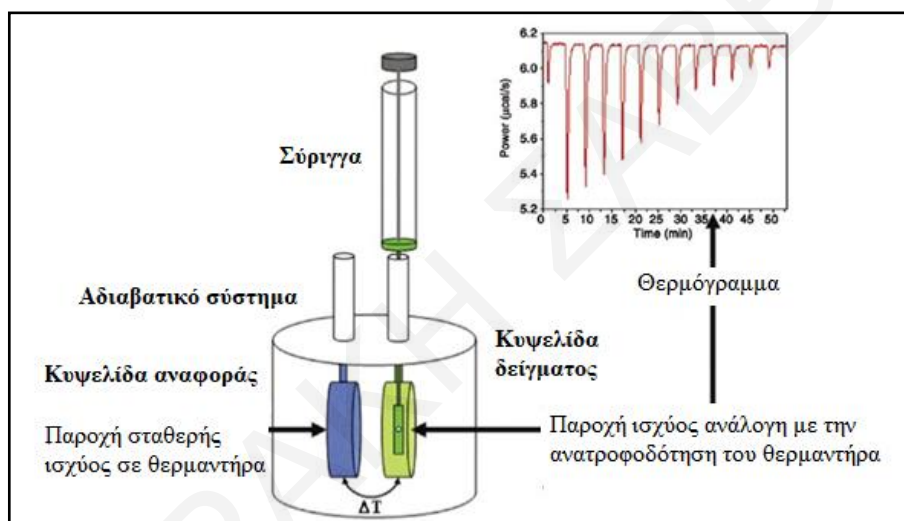
6.2.1 Γενικά για τη θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης έχει συμβάλει σημαντικά στη κατανόηση των μηχανισμών και δομών διαφόρων βιολογικών μορίων και αντιδράσεων σε μοριακό επίπεδο. (Freire et al 1990) Σχεδόν οποιαδήποτε χημική αντίδραση ή φυσική αλλαγή συνοδεύεται από μεταβολές της ενθαλπίας. Η θερμότητα που λαμβάνεται από το περιβάλλον (για μια ενδόθερμη αντίδραση) και η θερμότητα που απελευθερώνεται στο περιβάλλον (για μια εξώθερμη αντίδραση), είναι ανάλογη της έκτασης της αντίδρασης που έχει συμβεί και της γραμμομοριακής μεταβολής της ενθαλπίας της αντίδρασης, ΔH (kcal/mol ή kJ/mol). Επομένως ένα θερμιδόμετρο είναι ιδανικό εργαλείο για τη μελέτη του θερμικού περιεχομένου και του ποσοστού πραγματοποίησης μιας αντίδρασης, ενώ υπό όρους μπορεί να δώσει κάποιες πληροφορίες ακόμα και για τον ρυθμό της. Οι θερμιδομετρικές μετρήσεις σε αντίθεση με τις οπτικές μεθόδους μπορούν να γίνουν χωρίς την παρουσία κάποιου χρωμοφόρου ή φθοροφόρου μορίου και μπορούν να πραγματοποιηθούν σε αδιαφανή θολά διαλύματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες και εύρη pH. Το ITC αποτελεί την ιδανική τεχνική διερεύνησης της ενεργειακής πρόσδεσης ή συμπλοκοποίησης, αφού μπορεί να παρέχει ένα πλήρη θερμοδυναμικό χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεων μορίου - υποκαταστάτη επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της μεταβολής ενέργειας κατά τη μετάβαση από την ελεύθερη στην δεσμευμένη κατάσταση, τη μέτρηση της ικανότητας συμπλοκοποίησης καθώς και των μεταβολών της ενθαλπίας και εντροπίας κατά τη διάρκεια της συμπλοκοποίησης. (Freyer & Lewis 2008)

6.2.2 Οργανολογία ITC

Ένα όργανο ITC αποτελείται από δύο πανομοιότυπες κυψελίδες οι οποίες βρίσκονται μέσα σε ένα αδιαβατικό περίβλημα (Σχήμα 6.4). Η μια κυψελίδα είναι η κυψελίδα του δείγματος μέσα στην οποία πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση και η δεύτερη είναι η κυψελίδα αναφοράς η οποία περιέχει νερό και είναι σφραγισμένη. Η ισχύς που εφαρμόζεται στη κυψελίδα αναφοράς για να διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία της μετριέται και αποτελεί την τιμή της γραμμής αναφοράς στη θερμική ισορροπία μεταξύ των δύο ουσιών. Η θερμοκρασία των δύο κυψελίδων παρακολουθείται συνεχώς ώστε να διατηρούνται σε θερμική ισορροπία. Η κυψελίδα του δείγματος είναι ανοικτή από πάνω με μια οπή, μέσω της οποίας τοποθετείται με τη βοήθεια σύριγγας η μια από τις δύο αλληλοεπιδρούσες ουσίες στην αρχή (V_0). Η δεύτερη ουσία εγχέεται στην κυψελίδα του δείγματος (v) μέσω μια κάθετης σύριγγας από το όργανο του ITC κατά τη διάρκεια του πειράματος. Όταν γίνεται μια έγχυση στην κυψελίδα του

δείγματος και οι δύο ουσίες αλληλεπιδρούν εμφανίζονται μεταβολές των θερμοδυναμικών παραμέτρων του συστήματος. Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος ITC μετρείται η αλλαγή της απαίτησης ισχύος για ένα δεδομένο χρονικό διάστημα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε θερμόγραμμα της ισχύος (θερμότητα) συναρτήσεως του χρόνου (Σχήμα 6.4). Καθώς η αλληλεπίδραση φτάνει σε ισορροπία η ισχύς επιστρέφει στην αρχική της τιμή. Σε ένα πείραμα ITC με διαδοχικές εγχύσεις επέρχεται σταδιακά ο κορεσμός των θέσεων πρόσδεσης που είναι διαθέσιμες στα μόρια που βρίσκονται στο διάλυμα της κυψελίδας του δείγματος, με αποτέλεσμα η κύρια θερμότητα που παρατηρείται να είναι αυτή που αντιστοιχεί στην αραίωση του διαλύματος που εισάγεται σταδιακά από την σύριγγα έγχυσης του θερμιδόμετρου. Μετά από κάθε έγχυση ολοκληρώνονται οι κορυφές και προκύπτει η θερμότητα (μJ) της κάθε έγχυσης. (Ladbury et al. 2004)



Σχήμα 6.4: Σχηματικό διάγραμμα μια τυπικής διάταξης κυψελίδων ενός οργάνου ITC για την εκτέλεση μιας τιτλοδότησης. (Ladbury et al. 2004)

6.2.3 Διόρθωση των μη επεξεργασμένων δεδομένων του ITC

Για κάθε ολοκληρωμένο πείραμα αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο ουσιών με τη μέθοδο του ITC είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται οι εξής διεργασίες ώστε να ληφθεί η σωστή θερμότητα αλληλεπίδρασης των δύο διαλυμάτων. Αρχικά λαμβάνονται οι θερμότητες για το πείραμα αλληλεπίδρασης μεταξύ του διαλύματος 1 και του διαλύματος 2, στο οποίο γινόταν έγχυση του διαλύματος από την κάθετη σύριγγα στη κυψελίδα του δείγματος (Q_T). Ακολούθως γίνεται το πείραμα αραίωσης του διαλύματος το οποίο εγχέεται από τη σύριγγα στην κυψελίδα δείγματος που τώρα περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ή νερό ($Q_{dil, Ant.}$). Επιπλέον, γίνεται πείραμα αραίωσης του διαλύματος που βρίσκεται μέσα στη κυψελίδα του δείγματος, με έγχυση ρυθμιστικού διαλύματος ή νερού μέσω της σύριγγας ($Q_{dil, P}$). Τέλος χρησιμοποιείται το πείραμα αραίωσης

διαλύτη με διαλύτη, που καθορίζει τον θόρυβο αναφοράς του οργάνου ($Q_{w,w}$). Η διορθωμένη θερμότητα αλληλεπίδρασης υπολογίζεται από την Εξίσωση 6.14:

$$Q_{tot} = Q_r - Q_{dil,Ant} - Q_{dil,P} - Q_{w,w} \quad \text{Εξίσωση 6.14}$$

Η Q_{tot} μετατρέπεται σε γραμμομοριακή ενθαλπία αντίδρασης ΔH_r , διαιρώντας με τα γραμμομόρια που προστίθενται με κάθε έγχυση. Τελικά λαμβάνεται ένα θερμόγραμμα της ΔH_r συναρτήσει του γραμμομοριακού λόγου της ουσίας της σύριγγας ως προς τα γραμμομόρια της ουσίας που βρίσκεται στη κυψελίδα (Σχήμα 6.4). Εφαρμόζοντας μη γραμμική ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων των δεδομένων του γραφήματος, είναι δυνατό να προκύψουν οι θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης. (Freyer & Lewis 2008)

Καθώς η διαδικασία της τιτλοδότησης προχωρά, η συγκέντρωση του μακρομορίου μειώνεται ελαφρώς μετά από κάθε έγχυση επειδή ένα μέρος του διαλύματος εκτοπίζεται από την κυψελίδα, που είναι τελείως γεμάτη. Για την θερμοδυναμική ανάλυση της αλληλεπίδρασης είναι απαραίτητη η διόρθωση λόγω τέτοιων απωλειών μέσω των Εξισώσεων 6.15 και 6.16.

$$[X]_{t,i} = [X]_0 \left(1 - \left(1 - \frac{u}{V_0} \right)^i \right) \quad \text{Εξίσωση 6.15}$$

$$[M]_{t,i} = [M]_0 \left(1 - \frac{u}{V_0} \right)^i \quad \text{Εξίσωση 6.16}$$

Όπου $[X]_t$ και $[M]_t$ είναι οι συνολικές συγκεντρώσεις υποκαταστάτη και μακρομορίου στη θερμοδομετρική κυψελίδα μετά από κάθε έγχυση και $[M]_0$ και $[X]_0$ είναι οι αρχικές συγκεντρώσεις του μακρομορίου και του υποκαταστάτη αντίστοιχα. Η θερμότητα που μετριέται είναι ανάλογη με το ποσό δέσμευσης του υποκαταστάτη στο μακρομόριο. Καθώς το μακρομόριο κορένεται με τον υποκαταστάτη η θερμότητα μειώνεται με αποτέλεσμα να προκύπτει μια κλασική σιγμοειδής καμπύλη. Η συνολική (ολοκληρωτική) θερμότητα Q μέχρι και το βήμα έγχυσης i δίνεται από:

$$Q_i = [M]_t V_0 n \Delta H \Theta_i \quad \text{Εξίσωση 6.17}$$

όπου n είναι ο αριθμός θέσεων σύνδεσης ανά μακρομόριο, ΔH είναι η ενθαλπία πρόσδεσης και το Θ_i είναι το κλάσμα θέσεων που έχουν κορεσθεί από το υποκαταστάτη X μέχρι το βήμα i . Ακολούθως εφαρμόζεται μη γραμμική ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων στα δεδομένα και το κατάλληλο μοντέλο που περιγράφει την υπό μελέτη αλληλεπίδραση. Το πιο απλό μοντέλο είναι εκείνο όπου όλες οι n θέσεις πρόσδεσης ενός μακρομορίου είναι ανεξάρτητες και ισοδύναμες.

Το μοντέλο αυτό περιγράφεται από την Εξίσωση 6.18, όπου c είναι μια αδιάστατη παράμετρος που ορίζεται από την Εξίσωση 6.19 και K_b είναι η σταθερά πρόσδεσης. (Brown 2009)

$$Q = \frac{n[M]_t V_0 \Delta H}{2} \left[1 + \frac{[X]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{c} - \sqrt{\left(1 + \frac{[X]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{c} \right)^2 - \frac{4[X]_t}{n[M]_t}} \right] \quad \text{Εξίσωση 6.18}$$

$$c = nK_b [M]_t = n \frac{[M]_t}{K_d} \quad \text{Εξίσωση 6.19}$$

Η τιμή της σταθεράς c καθορίζει την ακρίβεια με την οποία μπορούν να εξαχθούν οι θερμοδυναμικές σταθερές ΔH , K_b και n από ένα πείραμα ITC. Συνήθως επιδιώκεται να ισχύει $1 < c < 10^5$.

6.2.4 Θερμοδυναμική της συμπλοκοποίησης

Η θερμότητα της αλληλεπίδρασης που προκύπτει από ένα πείραμα ITC αποτελεί μέτρο του μεγέθους της πρόσδεσης. Γνωρίζοντας τη θερμότητα της αλληλεπίδρασης και τις συγκεντρώσεις των αλληλεπιδρώντων συστατικών σε οποιοδήποτε σημείο της τιτλοδότησης είναι δυνατός ο υπολογισμός της σταθεράς ή των σταθερών πρόσδεσης, K_b . Αν οι ποσότητες ΔH και K_b είναι γνωστές, τότε μπορεί να γίνει ένας πλήρης θερμοδυναμικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης με βάση τις Εξισώσεις 6.20 και 6.21.

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad \text{Εξίσωση 6.20}$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad \text{Εξίσωση 6.21}$$

Όπου ΔG είναι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, R η παγκόσμια σταθερά αερίων, T η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα και ΔS η μεταβολή της εντροπίας του συστήματος. Η παράμετρος ΔH είναι το μέτρο της θερμότητας που συνοδεύει την μεταβολή από την ελεύθερη στη δεσμευμένη κατάσταση σε μια δεδομένη θερμοκρασία. Παρόλη την ευκολία λήψης αυτών των παραμέτρων, η ανάλυση και η ερμηνεία των θερμογραμμάτων που προκύπτουν είναι συχνά πολύπλοκη, λόγω των πολλών και αλληλοσυνδεδεμένων φαινομένων που πραγματοποιούνται. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις των υπό εξέταση βιομορίων, ωστόσο δεν μπορούν να διακριθούν από εκείνες που προέρχονται από την αναδιάταξη των μορίων του διαλύτη ή εκείνες που προέρχονται από αλλαγές διαμόρφωση και φαινόμενα συσσωμάτωσης, καθιστώντας την

ερμηνεία της παραμέτρου ΔH δύσκολη. Η παράμετρος ΔG καθορίζει την «ένταση» ισορροπίας πρόσδεσης ή των αλληλεπιδράσεων σε μια δεδομένη θερμοκρασία. Τέλος ο όρος ΔS μειώνεται κατά τη μετάβαση μορίων από την ελεύθερη στη δεσμευμένη κατάσταση, αλλά αυξάνεται κατά την απελευθέρωση μορίων νερού από μια θέση πρόσδεσης προς το διάλυμα. Συνεπώς και η παράμετρος ΔS είναι δύσκολο να ερμηνευθεί. (Freyer & Lewis 2008) Σύμφωνα με τους Ross et al. (Ross et al. 1981) θετικές μεταβολές ΔH και ΔS δηλώνουν ότι υπερισχύουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ αρνητικές μεταβολές ΔH και ΔS συνήθως υποδεικνύουν ότι επικρατούν αλληλεπιδράσεις Van der Waals και δεσμών υδρογόνου. Τέλος αν η ΔH δεν είναι σημαντικά θετική ή αρνητική και η ΔS είναι θετική, τότε η πρόσδεση καθορίζεται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των υπό εξέταση βιομορίων.

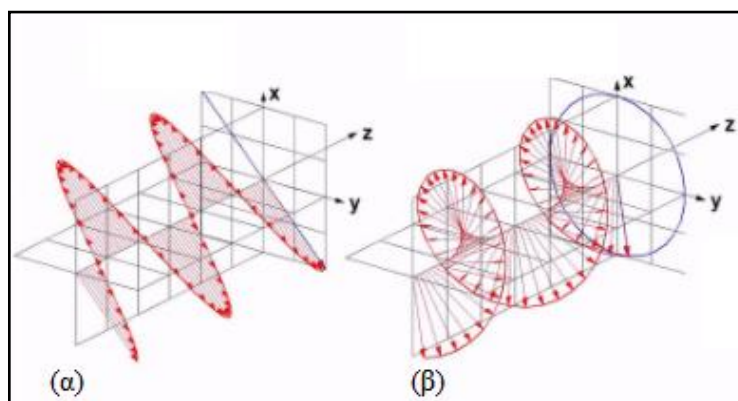
6.3 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism – CD)

6.3.1 Γενικές αρχές φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD) είναι μια ισχυρή μέθοδος για το δομικό χαρακτηρισμό βιοπολυμερών, όπως οι πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν ασύμμετρα άτομα άνθρακα. Τα εξεταζόμενα μόρια πρέπει να παρουσιάζουν χειρομορφία, επειδή η φασματοσκοπία CD μετρά τη διαφορά στροφής μεταξύ του αριστερά και του δεξιά πολωμένου φωτός όταν αυτό περνά μέσα από το διάλυμα που περιέχει τα μόρια. Τα φάσματα CD αυτών των μορίων στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας είναι χαρακτηριστικά της δευτεροταγούς δομής τους και δίνουν πληροφορίες για τις δομικές αλλαγές που είναι πιθανό να υφίστανται, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η δευτεροταγής δομή επηρεάζεται από το pH, τον διαλύτη, τις θερμικές αλλαγές και την παρουσία άλλων μορίων. Συνεπώς η φασματοσκοπία CD μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για θερμοδυναμικά και κινητικά φαινόμενα που πραγματοποιούνται στο περιβάλλον του βιοπολυμερούς.

6.3.2 Αρχή φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι κύματα ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου που ταλαντεύονται κάθετα προς την κατεύθυνση της διάδοσης μιας φωτεινής δέσμης. Ο τρόπος ταλάντωσης αυτών των πεδίων καθορίζει την πόλωση των κυμάτων. Σε μη πολωμένο φως τα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία διακυμαίνονται σε τυχαίες κατευθύνσεις. Στο γραμμικά πολωμένο φως, το ηλεκτρομαγνητικό κύμα ταλαντεύεται επάνω σε συγκεκριμένο επίπεδο (Σχήμα 6.5 (α)), ενώ στο κυκλικά πολωμένο φως (CPL) η κατεύθυνση της ταλάντωσης περιστρέφεται σε επίπεδο κάθετο προς τη διάδοση διαγράφοντας έναν πλήρη κύκλο (Σχήμα 6.5 (β)). Συνεπώς το ηλεκτρικό διάνυσμα του κυκλικά πολωμένου φωτός διαγράφει ως μια δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη έλικα. (Holde et al. 2006)



Σχήμα 6.5: Το ηλεκτρικό διάνυσμα (α) του γραμμικά πολωμένου φωτός και (β) του κυκλικά πολωμένου φωτός ως συνάρτηση της θέσης και του χρόνου.

Ο διχρωσμός είναι το φαινόμενο, στο οποίο η απορρόφηση του φωτός από ένα υλικό διαφέρει για διαφορετικές κατευθύνσεις περιστροφής του διανύσματος του ηλεκτρικού πεδίου. Ο κυκλικός διχρωσμός διερευνά την διαφορά απορρόφησης των δύο ειδών κυκλικά πολωμένου φωτός που έχουν αντίθετη φορά περιστροφής. Τόσο το δεξί όσο και το αριστερά κυκλικά πολωμένο φως υπακούν στο νόμο Beer (Εξίσωση 6.22) και ο κυκλικός διχρωσμός (CD) ορίζεται ως η διαφορά του συντελεστή απόσβεσης των δύο πολώσεων:

$$\Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda) = [\varepsilon_L(\lambda) - \varepsilon_R(\lambda)] l c = \Delta \varepsilon l c \quad \text{Εξίσωση 6.22}$$

Το παρατηρούμενο αποτέλεσμα σε ένα πείραμα CD εκφράζεται ως ελλειπτικότητα σε μοίρες και συνδέεται με τη διαφορά απορρόφησης μέσω του τύπου $\Delta A = \theta / 32,98$, για ένα βιομόριο (π.χ πρωτεΐνη, νουκλεϊκό οξύ) που περιέχει n κατάλοιπα. Από τη θ ορίζεται η μέση ελλειπτικότητα των καταλοίπων (mean residue ellipticity – MRE):

$$MRE = \frac{\theta_{obs}}{10 n c l} \quad \text{Εξίσωση 6.23}$$

όπου θ_{obs} η παρατηρούμενη ελλειπτικότητα σε deg, C είναι η μοριακότητα του διαλύματος σε M , n είναι ο αριθμός των καταλοίπων του βιομορίου που μελετάται και l είναι το μήκος διαδρομής του φωτός σε cm . Η MRE εκφράζεται σε $\frac{deg \cdot cm^2}{dmol}$.

Ο προσδιορισμός των δευτεροταγών δομικών στοιχείων πρωτεϊνών από φάσματα CD επιτυγχάνεται με την χρήση προγραμμάτων, τα οποία χρησιμοποιούν τη μέθοδο διαγωνοποίησης πινάκων Singular value decomposition - SVD. Δεν είναι εύκολος ο προσδιορισμός των δευτεροταγών δομικών στοιχείων των πρωτεϊνών, επειδή το κάθε δομικό στοιχείο δεν συνεισφέρει τελείως ανεξάρτητα από άλλα και πάντα υπάρχει επικάλυψη των φασμάτων από διαφορετικές δευτεροταγείς δομές. Συνεπώς είναι λάθος να εκφρασθεί το φάσμα CD μιας άγνωστης πρωτεΐνης ως γραμμικός συνδυασμός φασμάτων των δευτεροταγών δομικών στοιχείων, αν και αυτό κάποιες φορές γίνεται στη βιβλιογραφία. Η καλύτερη μέθοδος

Ο S έχει μόνο διαγώνια στοιχεία και ελέγχουμε πόσα από αυτά είναι απαραίτητα για την αναπαραγωγή των φασμάτων CD. (Holde et al. 2006)

6.4 Αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών με μακρομόρια σε ισορροπία μέσω πειραμάτων διαπίδυσης

Οι αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών με βιολογικά μακρομόρια είναι ένα από τα περισσότερο μελετημένα φαινόμενα στη βιοχημική έρευνα. Πειραματικά, η μέτρηση της δέσμευσης είναι απλή και αξιολογεί τη δομή και λειτουργία του μακρομορίου. Ωστόσο, η ερμηνεία των δεδομένων απαιτεί διαφορετικά μοντέλα ανάλυσης που εξαρτώνται από διάφορα χαρακτηριστικά της διαδικασίας δέσμευσης. Ο πιο κοινός τρόπος παρουσίασης των δεδομένων που προκύπτουν από τα πειράματα τέτοιου τύπου είναι τα διαγράμματα Scatchard. Ανάλογα με τη μορφή ενός διαγράμματος Scatchard προσδιορίζεται ο τύπος πρόσδεσης των υποκαταστατών, ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης του μακρομορίου καθώς και ο αριθμός των υποκαταστατών που προσδένονται σε αυτό. (Bordbar et al. 1996, Cantor & Schimmel 1980)

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τα πειράματα διαπίδυσης αναλύονται καταρχήν με κατάλληλα ισοζύγια μάζας. Για τον υπολογισμό της ποσότητας της προσδεμένης ουσίας στο μακρομόριο είναι απαραίτητος πρώτα ο υπολογισμός της ποσότητας της προσδεμένης ουσίας που τυχόν προσροφάται στη χρησιμοποιούμενη μεμβράνη. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκτέλεση ενός πειράματος απουσία μακρομορίου. Η Εξίσωση 6.29 περιγράφει το ισοζύγιο μάζας της εξεταζόμενης ουσίας, εκφράζοντας τη συγκέντρωση ισορροπίας $[L]_{eq}$ συνάρτησε της αρχικής συγκέντρωσης $[L]_{in}$ μέσα στο σακούλι διαπίδυσης και χρησιμοποιώντας μοντέλο Langmuir για τη ρόφηση του L στη μεμβράνη:

$$[L]_{in} V_{in} = [L]_{eq} V_{tot} + n_{ads} = [L]_{eq} V_{tot} + \Gamma_{ads} S_m = [L]_{eq} V_{tot} + \frac{\Gamma_{ads}^{max} K_a [L]_{eq}}{1 + K_a [L]_{eq}} S_m \quad \text{Εξίσωση 6.29}$$

Όπου n_{ads} , Γ_{ads} και Γ_{ads}^{max} είναι τα γραμμομόρια της ουσίας L που προσροφώνται στη μεμβράνη, η επιφανειακή ρόφηση που πραγματοποιείται (mol/m^2) και η τιμή κορεσμού της ρόφησης αντίστοιχα. Η προσρόφηση διαμορφώνεται ως ισόθερμος Langmuir, όπου η K_a είναι η σταθερά ισορροπίας προσρόφησης. Εάν η προσρόφηση στη μεμβράνη απέχει πολύ από τον κορεσμό, $K_a [L]_{eq} \ll 1$, τότε η Εξίσωση 6.29 μετατρέπεται στην Εξίσωση 6.30:

$$[L]_{eq} \approx \left(\frac{V_{in}}{V_{tot} + \Gamma_{ads}^{max} K_a S_m} \right) [L]_{in} = \left(\frac{V_{in}}{V_{tot} + D} \right) [L]_{in} \quad \text{Εξίσωση 6.30}$$

Από τη γραμμική σχέση μεταξύ $[L]_{in}$ και $[L]_{eq}$ λαμβάνεται η παράμετρος D , η οποία έχει διαστάσεις όγκου. Στο επόμενο πείραμα παρουσία μακρομορίου γίνεται η παραδοχή ότι η παράμετρος D δεν μεταβάλλεται και έτσι προκύπτει η Εξίσωση 6.31:

$$[L]_{in} V_{in} = [L]_{eq} V_{tot} + n_{ads} + n_b = [L]_{eq} V_{tot} + D[L]_{eq} + n_b \Rightarrow n_b = [L]_{in} V_{in} - (V_{tot} + D)[L]_{eq}$$

Εξίσωση 6.31

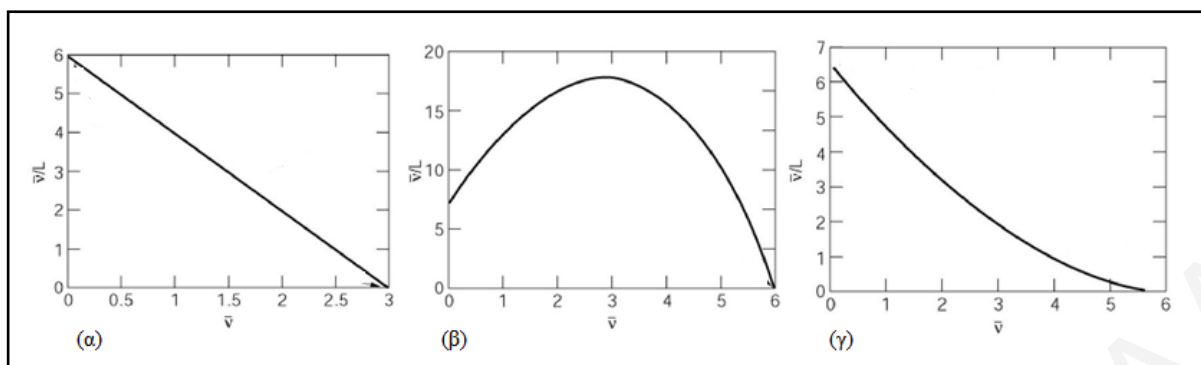
Σε αυτή την εξίσωση τα n_b είναι τα συνολικά γραμμομόρια της προσδεμένης ουσίας που προσδένονται στα μακρομόρια εντός της μεμβράνης διαπίδωσης. Εάν n_M είναι τα συνολικά mol μακρομορίων στο σύστημα τότε ορίζεται η ποσότητα $r = \frac{n_b}{n_M}$ (mol προσδεμένης ουσίας ανά mol μακρομορίου). Το διάγραμμα Scatchard είναι διάγραμμα $\frac{r}{[L]_{eq}}$ ως προς r και η μορφή μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δέσμευσης των υποκαταστατών στα μακρομόρια. (Cantor & Schimmel, 1980)

Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της κάθε διαδικασίας δέσμευσης, τη φύση των μακρομορίων και τη μορφή του διαγράμματος Scatchard απαιτούνται διαφορετικά μοντέλα ανάλυσης. Η Εξίσωση 6.32 περιγράφει το μοντέλο πανομοιότυπων ανεξάρτητων θέσεων πρόσδεσης. Σε αυτή την περίπτωση το διάγραμμα Scatchard είναι γραμμικό (Σχήμα 6.6, α) και η κλίση της ευθείας ισούται με $-K^{-1}$, η τετμημένη με το n και η τεταγμένη με $\frac{n}{K}$, όπου K είναι η σταθερά πρόσδεσης και n οι θέσεις πρόσδεσης του υποκαταστάτη στο μακρομόριο.

$$\frac{r}{[L]_{eq}} = \frac{n}{K} - \frac{r}{K}$$

Εξίσωση 6.32

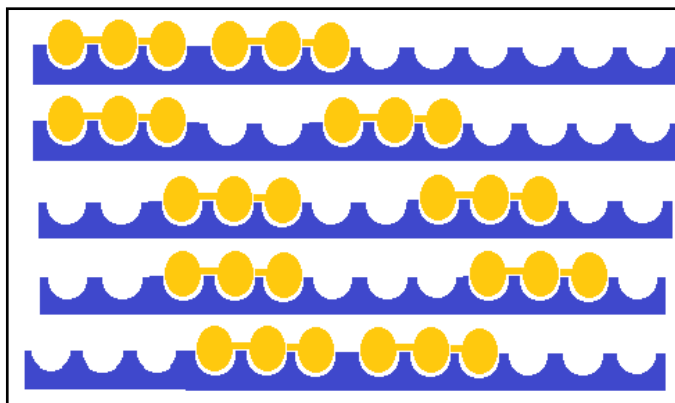
Σε αρκετές περιπτώσεις η μορφή ενός διαγράμματος Scatchard δεν είναι γραμμική αλλά καμπύλη με θετική ή αρνητική κλίση. Αυτό οφείλεται είτε στην ύπαρξη διαφορετικών μη ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης στο μακρομόριο, είτε στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών που προσδένονται στο μακρομόριο. Επιπλέον σημαντικό ρόλο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων έχει η δομή και το μέγεθος του υποκαταστάτη και του μακρομορίου. Το μακρομόριο μπορεί να αποτελείται από επαναλαμβανόμενες όμοιες μονάδες που σχηματίζουν εύκαμπτες αλυσίδες (όπως συμβαίνει με τους πολυσακχαρίτες) ή να είναι ένα συμπαγές ετεροπολυμερές διαφορετικών υπομονάδων, όπως οι πρωτεΐνες.



Σχήμα 6.6: Διάγραμμα Scatchard που περιγράφει την πρόσδεση (α) σε πανομοιότυπες ανεξάρτητες θέσεις πρόσδεσης, (β) σε πανομοιότυπες ανεξάρτητες θέσεις πρόσδεσης με το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των υποκαταστάτων που προσδένονται και (γ) μεταξύ μακρομορίων και μεγάλων μορίων υποκαταστατών, τα οποία συμπεριφέρονται σαν αλυσίδες επαναλαμβανόμενων ομάδων. (Cantor & Schimmel, 1980)

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι περιπτώσεις στις οποίες μελετάται η αλληλεπίδραση μεταξύ μεγάλων μορίων τα οποία έχουν όμοιες επαναλαμβανόμενες μονάδες (N) και μορίων υποκαταστάτη L που μπορούν να μοντελοποιηθούν ως διαδοχικές μονάδες l . Στο Σχήμα 6.7 απεικονίζονται οι πιθανοί τρόποι δέσμευσης ενός υποκαταστάτη με 3 διαδοχικές μονάδες ($l = 3$) σε ένα μακρομόριο με 12 επαναλαμβανόμενες μονάδες ($N=12$). Η Εξίσωση 6.33 περιγράφει το διάγραμμα Scatchard που προκύπτει από τέτοιου τύπου αλληλεπίδραση. Όταν $l = 1$ η Εξίσωση 6.33 συμπίπτει με την Εξίσωση 6.32. Στο Σχήμα 6.6 (γ) απεικονίζεται διάγραμμα Scatchard που προκύπτει από την Εξίσωση 6.33. Από την τεταγμένη του διαγράμματος υπολογίζεται ο λόγος $\frac{N}{k}$ και από την τεταγμένη ο λόγος $\frac{N}{l}$, ο οποίος δίνει και τον πλήρη κορεσμό. Καθώς η παράμετρος l αυξάνεται, η καμπυλότητα του διαγράμματος γίνεται εμφανέστερη καθώς το σύστημα «αντιστέκεται εντροπικά» στην επίτευξη κορεσμού.

$$\frac{r}{[L]_{eq}} = \frac{N(1-lr/N)}{k} \left(\frac{1-lr/N}{1-(l-1)r/N} \right)^{l-1} \quad \text{Εξίσωση 6.33}$$



Σχήμα 6.7: Πιθανοί τρόποι δέσμευσης ενός υποκαταστάτη με 3 διαδοχικές μονάδες σε ένα μακρομόριο με 12 επαναλαμβανόμενες μονάδες. (Cantor & Schimmel, 1980)

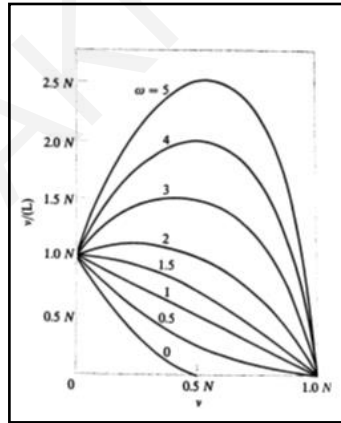
Σε κάποιες περιπτώσεις, κατά τη δέσμευση του υποκαταστάτη L με l διαδοχικές μονάδες σε μακρομόριο με N επαναλαμβανόμενες μονάδες αναπτύσσεται το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των υποκαταστατών που προσδένονται. Αυτός ο τύπος αλληλεπίδρασης περιγράφεται από την Εξίσωση 6.34, στην οποία υπάρχει η επιπλέον παράμετρος ω , η οποία προσδιορίζει την αλληλεπίδραση υποκαταστάτη – υποκαταστάτη, ενώ η παράμετρος R δίνεται από την Εξίσωση 6.35. Όταν η παράμετρος ω ισούται με 1 τότε η Εξίσωση 6.34 ταυτίζεται με την Εξίσωση 6.33. Ο τρόπος με τον οποίο η παράμετρος ω επηρεάζει την μορφή του διαγράμματος Scatchard φαίνεται στο Σχήμα 6.8. Όταν η παράμετρος ω παίρνει τιμές μικρότερες του 1, που αντιστοιχούν σε απωστική αλληλεπίδραση των υποκαταστατών, τότε η γραφική πέφτει κάτω από την αντίστοιχη για τιμή ίση με 1, ενώ όταν η παράμετρος ω παίρνει τιμές μεγαλύτερες του 1 η γραφική έχει μορφή κοίλη προς τα κάτω.

$$\frac{r}{[L]_{eq}} = \frac{N(1-lr/N)}{k} \left(\frac{(2\omega+1)(1-lr/N)+r/N-R}{2(\omega-1)(1-lr/N)} \right)^{l-1} \left(\frac{1-(l+1)r/N+R}{2(1-lr)/N} \right)^2$$

Εξίσωση 6.34

$$R = \left\{ \left[1 - (l+1)r/N \right]^2 + (4\omega r/N)(1-lr/N) \right\}^{1/2}$$

Εξίσωση 6.35



Σχήμα 6.8: Διάγραμμα Scatchard που περιγράφει την πρόσδεση του υποκαταστάτη L , με l διαδοχικές μονάδες στο μακρομόριο με N επαναλαμβανόμενες μονάδες όταν μεταξύ των υποκαταστατών αναπτύσσεται το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης. (Cantor & Schimmel, 1980)

Γενικότερα, το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης περιγράφεται με απλούστερο φαινομενολογικό τρόπο από τις εξισώσεις και τα διαγράμματα Hill. Στην εξίσωση Hill (Εξίσωση 6.36) υπάρχει η σταθερά Hill (a_H) η οποία είναι ένας δείκτης του βαθμού συνεργείας των υποκαταστατών. Η σταθερά αυτή παίρνει τιμές $1 \leq a_H \leq n$, με το 1 να υποδεικνύει την ανεξαρτησία (μη αλληλεπίδραση) των υποκαταστατών, ενώ η τιμή n αντιστοιχεί στο μέγιστο βαθμό συνέργειας. Το διάγραμμα Scatchard αυτού του τύπου συμπεριφοράς φαίνεται στο Σχήμα 6.6 (β). Μια τροποποιημένη μορφή της Εξίσωσης 6.36 είναι η Εξίσωση 6.37, από την

οποία μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά a_H μέσω της κλίσης $-1/a_H$ του διαγράμματος $\ln(L)$ συνάρτηση του $\ln [(n/r) - 1]$ και από την τεταγμένη $-\ln K$ υπολογίζεται η σταθερά πρόσδεσης. (Cantor & Schimmel 1980)

$$K^{a_H} = (L)^{a_H} [n(M)_o - n_b] / n_b \quad \text{Εξίσωση 6.36}$$

$$\ln(L) = -\left(\frac{1}{a_H}\right) \ln\left[\left(\frac{n}{r}\right) - 1\right] + \ln K \quad \text{Εξίσωση 6.37}$$

6.5 Φασματοσκοπία Ανάκλασης Απορρόφησης Υπερύθρου (Infrared Reflection Absorption Spectrometry – IRRAS)

Η δονητική φασματοσκοπία έχει εξελιχθεί σε μια από τις ισχυρότερες μεθόδους για τη μελέτη προσροφημένων μοριακών στιβάδων σε στερεά υποστρώματα. Η τεχνική της φασματοσκοπίας ανάκλασης απορρόφησης υπερύθρου που αποτελεί εξειδικευμένη εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερύθρου – IR σε επιφάνειες περιγράφει την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπερύθρου με την ύλη. Η λήψη δομικών πληροφοριών προκύπτει από τις δονήσεις μορίων και μοριακών ομάδων που παρουσιάζουν διακριτά χαρακτηριστικά φάσματα. (Mendelsohn R. et al 1995)

6.5.1 Αρχές και θεωρία της Φασματοσκοπίας Ανάκλασης Απορρόφησης Υπερύθρου

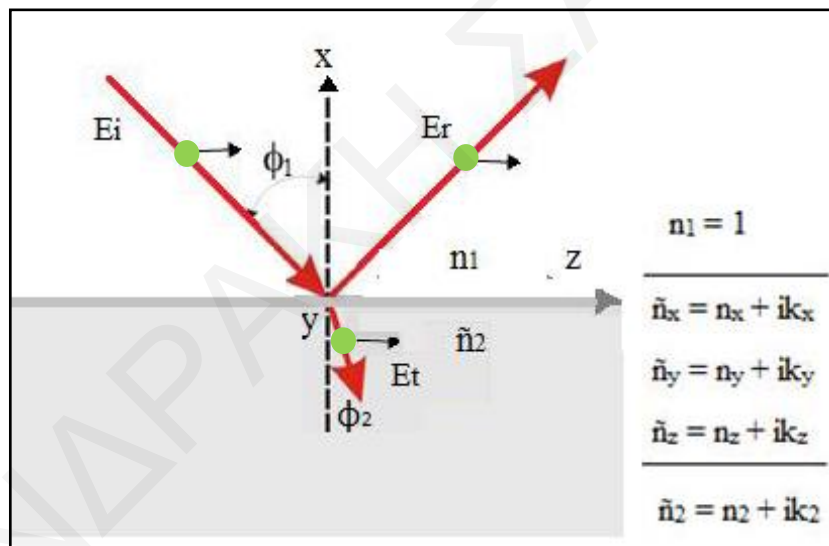
Η τεχνική IRRAS βασίζεται στις ανακλαστικές ιδιότητες του υποστρώματος στην περιοχή του μέσου υπερύθρου του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το φυσικό φως καθώς και άλλες μορφές τεχνητού φωτός είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, που περιλαμβάνει ηλεκτρικό (E) και μαγνητικό (B) πεδίο. Οι πλείστες φασματοσκοπικές μέθοδοι για επιφάνειες βασίζονται στη συμπεριφορά του ηλεκτρικού πεδίου κατά τη διέλευση από μια επιφάνεια. Όταν το ηλεκτρομαγνητικό κύμα διέλθει από τη διεπιφάνεια μεταξύ δύο οπτικών μέσων, τότε μπορεί να ανακλασθεί ή να διαθλασθεί ή/και τα δύο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.9. Σε ένα οπτικό σύστημα η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου (E) χρησιμοποιείται για να ορισθεί η κατεύθυνση πόλωσης του ηλεκτρομαγνητικού κύματος. Κατά την πρόσπτωση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε διεπιφάνεια, το διάνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου μπορεί να αναλυθεί σε δύο αυθαίρετες ορθογώνιες συνιστώσες πόλωσης. Για λόγους απλότητας αυτές οι συνιστώσες είναι συνήθως κατά μήκος αξόνων (E_x και E_z) που ο ένας είναι παράλληλος και ο άλλος είναι κάθετος προς το επίπεδο πρόσπτωσης (E_p και E_s). Χρησιμοποιούμε την ονομασία p-πολωμένη και s-πολωμένη συνιστώσα για την παράλληλη και κάθετη συνιστώσα αντίστοιχα

προς το επίπεδο πρόσπτωσης. Σε ένα καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων το επίπεδο zx αντιστοιχεί στο επίπεδο πρόσπτωσης. (Mendelsohn et al. 1995)

Οι οπτικές ιδιότητες ενός απορροφητικού ισότροπου μέσου περιγράφονται από δύο παραμέτρους, οι οποίες είναι απαραίτητες δεδομένου ότι το φως ταξιδεύει με διαφορετικό ρυθμό σε ένα μέσο σε σχέση με το κενό. Η μια παράμετρος είναι ο δείκτης διάθλασης n του μέσου, ο οποίος περιγράφει την ταχύτητα με την οποία ταξιδεύει το κύμα και η δεύτερη παράμετρος είναι η απόσβεση που περιγράφεται από το συντελεστή απόσβεσης ή απορρόφησης k , ο οποίος υποδεικνύει την εξασθένηση του ηλεκτρομαγνητικού κύματος όταν αυτό διαδίδεται μέσω του μέσου. Συνδυάζοντας αυτούς τους δυο συντελεστές δημιουργείται ένας σύνθετος δείκτης διάθλασης, με τη μορφή μιγαδικού αριθμού, όπου ο δείκτης διάθλασης αποτελεί το πραγματικό μέρος ενώ ο συντελεστής απόσβεσης αποτελεί το φανταστικό μέρος: (Mendelsohn et al 1995)

$$\tilde{n} = n + ik$$

Εξίσωση 6.38



Σχήμα 6.9: Η ανάκλαση και η διάθλαση που μπορεί να υφίσταται η εισερχόμενη δέσμη φωτός όταν προσπίπτει στη διεπιφάνεια δύο μέσων με δείκτες διάθλασης n_1 και n_2 . Τα μαύρα τόξα (\Rightarrow) συμβολίζουν την p-πολωμένη κατάσταση του φωτός, ενώ οι πράσινοι κύκλοι (\bullet) συμβολίζουν την s-πολωμένη κατάσταση. (Mendelsohn et al. 1995)

6.5.2 Θεωρητικό Υπόβαθρο Φασματοσκοπίας Ανάκλασης Απορρόφησης Υπερύθρου

Κατά τη φασματοσκοπία υπερύθρου, φωτόνια συγκεκριμένης ενέργειας, που αντιστοιχούν σε περιοχή κυματαριθμών μεταξύ 10^2 και 10^4 cm^{-1} , επάγουν μετάβαση του υπό μελέτη μορίου από το χαμηλότερο θεμελιώδες δονητικό επίπεδο σε μια διεγερμένη κατάσταση. Ακολουθώς το διεγερμένο μόριο επιστρέφει πολύ γρήγορα στη βασική του κατάσταση μέσω θερμικής χαλάρωσης. Όταν υπέρυθη ακτινοβολία διαπερνά ή ανακλάται από το δείγμα, ορισμένες

συχνότητες της απορροφούνται από τα μόρια της ουσίας καταλήγοντας σε μοριακή δόνηση. Εξετάζοντας το μεταδιδόμενο-ανακλώμενο φως, προκύπτουν πληροφορίες για το ποσό της ενέργειας που απορροφήθηκε σε κάθε κυματαριθμό. Η ποσότητα αυτή μπορεί να συσχετιστεί με τη μοριακή δομή του δείγματος, δεδομένου ότι κάθε υλικό έχει το δικό του φασματικό «αποτύπωμα». (Atkins & Paula 2010)

Αναφορικά με τον προσδιορισμό του συντελεστή ανάκλασης r (Εξίσωση 6.39 και 6.40) και κατ' επέκταση υπολογισμό της ποσότητας RA (reflectance – absorbance), που προκύπτει από μια μέτρηση IRRAS, έχουν αναπτυχθεί διάφορες προσεγγίσεις από αρκετούς ερευνητές. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, δεν θα γίνει οποιαδήποτε επιπλέον αναφορά στις προσεγγίσεις αυτές, λόγω του ότι οι εξισώσεις που προκύπτουν από αυτές τις προσεγγίσεις σπάνια χρησιμοποιούνται στη χημική βιβλιογραφία για να εξαχθούν συμπεράσματα. (Telesford 2012)

Ο προσδιορισμός του συντελεστή ανάκλασης r περιγράφεται από τις εξισώσεις Fresnel και ορίζεται ως το μέτρο της έντασης του κύματος που ανακλάται από μια επιφάνεια. Η Εξίσωση 6.39 αφορά το p-πολωμένο φως, ενώ η Εξίσωση 6.40 αφορά το s-πολωμένο φως (Petty 1996):

$$r_p = \frac{E_{rp}}{E_{ip}} = \frac{n_2 \cos(\varphi_1) - n_1 \cos(\varphi_2)}{n_2 \cos(\varphi_1) + n_1 \cos(\varphi_2)} \quad \text{Εξίσωση 6.39}$$

$$r_s = \frac{E_{rs}}{E_{is}} = \frac{n_1 \cos(\varphi_1) - n_2 \cos(\varphi_2)}{n_1 \cos(\varphi_1) + n_2 \cos(\varphi_2)} \quad \text{Εξίσωση 6.40}$$

όπου r είναι το μέτρο του συντελεστή ανάκλασης (r-reflection), E το πλάτος του ηλεκτρικού πεδίου r για ανάκλαση και i για πρόσπτωση. Χρησιμοποιώντας το νόμο του Snell (Εξίσωση 6.41) που συνδέει τις γωνίες πρόσπτωσης (φ_1) και διάθλασης (φ_2) της εισερχόμενης δέσμης, οι Εξισώσεις 6.39 και 6.40 μετασχηματίζονται στις εξισώσεις 6.42 και 6.43:

$$n_1 \sin(\varphi_1) = n_2 \sin(\varphi_2) \quad \text{Εξίσωση 6.41}$$

$$r_p = \frac{\tan(\varphi_1 - \varphi_2)}{\tan(\varphi_2 + \varphi_1)} \quad \text{Εξίσωση 6.42}$$

$$r_s = -\frac{\sin(\varphi_1 - \varphi_2)}{\sin(\varphi_2 + \varphi_1)} \quad \text{Εξίσωση 6.43}$$

Τα ποσοστά της έντασης του προσπίπτοντος φωτός που ανακλώνται από την επιφάνεια δίνονται από τους συντελεστές ανάκλασης:

$$R^\alpha = \frac{I_r^\alpha}{I_i^\alpha} = |r_\alpha(\varphi_1)|^2, \quad \alpha: p, s \quad \text{Εξίσωση 6.44}$$

όπου I_r είναι η ένταση του φωτός που ανακλάται από την επιφάνεια και I_i είναι η ένταση του φωτός που προσπίπτει στην επιφάνεια. Συνεπώς προκύπτει η ανακλαστικότητα για την s και p πόλωση του ηλεκτρικού πεδίου:

$$R_p = \frac{\tan^2(\varphi_1 - \varphi_2)}{\tan^2(\varphi_2 + \varphi_1)} \quad \text{Εξίσωση 6.45}$$

$$R_s = \frac{\sin^2(\varphi_1 - \varphi_2)}{\sin^2(\varphi_2 + \varphi_1)} \quad \text{Εξίσωση 6.46}$$

Η ποσότητα RA (Εξίσωση 6.47) που εμφανίζεται ως σήμα στα φάσματα IRRAS, ορίζεται ως ο δεκαδικός λογάριθμος του λόγου της ανακλαστικότητας, R (Εξίσωση 6.45 ή 6.46), που προκύπτει από επιφάνεια που καλύπτεται από υμένιο ως προς την ανακλαστικότητα της καθαρής επιφάνειας (π.χ μετάλλου) στην παρουσία υμενίου, R^F :

$$RA = \log \frac{R}{R^F} \quad \text{Εξίσωση 6.47}$$

Τα δεδομένα που προκύπτουν από ένα πείραμα IRRAS παρουσιάζονται ως η ποσότητα RA συναρτήσεως του κυματάρθμου. Η ποσότητα RA μπορεί να είναι θετική είτε αρνητική, ανάλογα με την κατάσταση πόλωσης της προσπίπτουσας δέσμης, την εγγύτητα της γωνίας πρόσπτωσης με την γωνία Brewster της ανακλαστικής επιφάνειας και την κατεύθυνση αλλαγής της διπολικής ροπής κατά τη διάρκεια της κίνησης. (Mendelsohn et al 1995)

6.5.3 Κανόνες επιλογής τεχνικής IRRAS για επιφάνειες

Ο γενικός κανόνας επιλογής για μια μοριακή δόνηση είναι ότι η διπολική ροπή του μορίου πρέπει να μεταβάλλεται κατά τη διέγερση, ανεξάρτητα αν τα μόρια έχουν ή όχι μόνιμη διπολική ροπή. Το κλασικό ανάλογο του πιο πάνω κανόνα είναι ότι το μόριο μπορεί να προκαλέσει ταλάντωση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου μόνο αν το δίπολο του μορίου μεταβάλλεται κατά την ταλάντωση και αντιστρόφως. Οι δονήσεις αυτές ονομάζονται ενεργές στο υπέρυθρο και ικανοποιούν την σχέση $\left(\frac{d\bar{\mu}}{dx}\right) \neq 0$, όπου μ είναι η διπολική ροπή και x η μετατόπιση. (Atkins & Paula 2010)

Συγκεκριμένα κατά την τεχνική IRRAS όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία ανακλασθεί από μια μεταλλική επιφάνεια υφίσταται μετατόπιση φάσης, η οποία καθορίζεται από τη γωνία πρόσπτωσης, την κατάσταση πόλωσης και τον κυματάρθμο του προσπίπτοντος φωτός. Η μετατόπιση φάσης για την s-πολωμένη κατάσταση είναι κοντά στις 180° , ανεξάρτητα της γωνίας πρόσπτωσης και του κυματάρθμου. Συνεπώς το άθροισμα του ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας και της ανακλώμενης ακτινοβολίας της s-πολωμένης κατάστασης σχεδόν εκμηδενίζεται στην επιφάνεια. Δεδομένου ότι η απορρόφηση IR είναι ανάλογη του $(\mu E)^2$, η

ακύρωση που υφίσταται το ηλεκτρικό πεδίο στην επιφάνεια ($E \approx 0$) οδηγεί σε ελάχιστη αναμενόμενη απορρόφηση για την s-πολωμένη κατάσταση της ακτινοβολίας IR, ανεξαρτήτως από τον προσανατολισμό της διπολικής ροπής.

Στην περίπτωση της p-πολωμένης υπέρυθρης ακτινοβολίας η μετατόπιση φάσης που παρατηρείται είναι από λίγες μοίρες μέχρι τη μέγιστη τιμή των 180° . Στις πλείστες περιπτώσεις η πρόσπτωση της ακτινοβολίας γίνεται υπό μικρή γωνία και η παρατηρούμενη μετατόπιση είναι σε εύρος από 0° μέχρι 90° . Σε αυτές τις συνθήκες η προσπίπτουσα και η ανακλώμενη ακτινοβολία συνήθως παράγουν ένα πεπερασμένο ηλεκτρικό πεδίο κάθετο ως προς την επιφάνεια. Συνεπώς η p-πολωμένη ακτινοβολία απορροφάται ισχυρά από επιφανειακά μόρια με προσανατολισμό διπολικής ροπής κάθετο προς την ανακλαστική επιφάνεια.

Συνοψίζοντας, για να επιτευχθούν ισχυρές απορροφήσεις σε ένα πείραμα IRRAS είναι απαραίτητη η χρήση p-πολωμένης προσπίπτουσας ακτινοβολίας υπό σχετικά μικρή γωνία. Στο Σχήμα 6.10 φαίνονται τα ηλεκτρικά πεδία για s και p πολωμένο φως πριν και μετά την ανάκλαση. (Mendelsohn & Flach 2002)



Σχήμα 6.10: Αναπαράσταση των κανόνων επιλογής για επιφάνειες κατά την τεχνική IRRAS.

6.5.4 Αρχές λειτουργίας τεχνικής PM-IRRAS

Η τεχνική της διαμόρφωσης πόλωσης βασίζεται στη διαμόρφωση της γραμμικά πολωμένης IR ακτινοβολίας, η οποία χωρίζεται στην s-πολωμένη και p-πολωμένη δέσμη. Η πόλωση του φωτός γίνεται εξαρτώμενη από το χρόνο με τη βοήθεια ενός φωτοελαστικού διαμορφωτή (PEM). Βασικό στοιχείο του PEM είναι ένας κρύσταλλος ZnSe. (Kosters 1972) Η λειτουργία του PEM βασίζεται στο φωτοελαστικό φαινόμενο (photoelastic effect), κατά το οποίο ο κρύσταλλος υποβάλλεται σε περιοδική μηχανική τάση μέσω δυνάμεων συμπίεσης και εφελκυσμού. Προκύπτει τότε ένα διπλοθλαστικό (birefringence) υλικό, καθώς ο δείκτης διάθλασης του κρυστάλλου μεταβάλλεται κατά την κατεύθυνση-y όταν στον κρύσταλλο εφαρμόζεται πίεση εξαρτώμενη από το χρόνο, ενώ ο δείκτης διάθλασης στην κατεύθυνση-x παραμένει σταθερός. Μετά την έξοδο του φωτός από το PEM, το φως κατευθύνεται προς το δείγμα, όπου πραγματοποιείται ανάκλασή του. (Flach et al. 1997) Τα προκύπτοντα ποσοστά

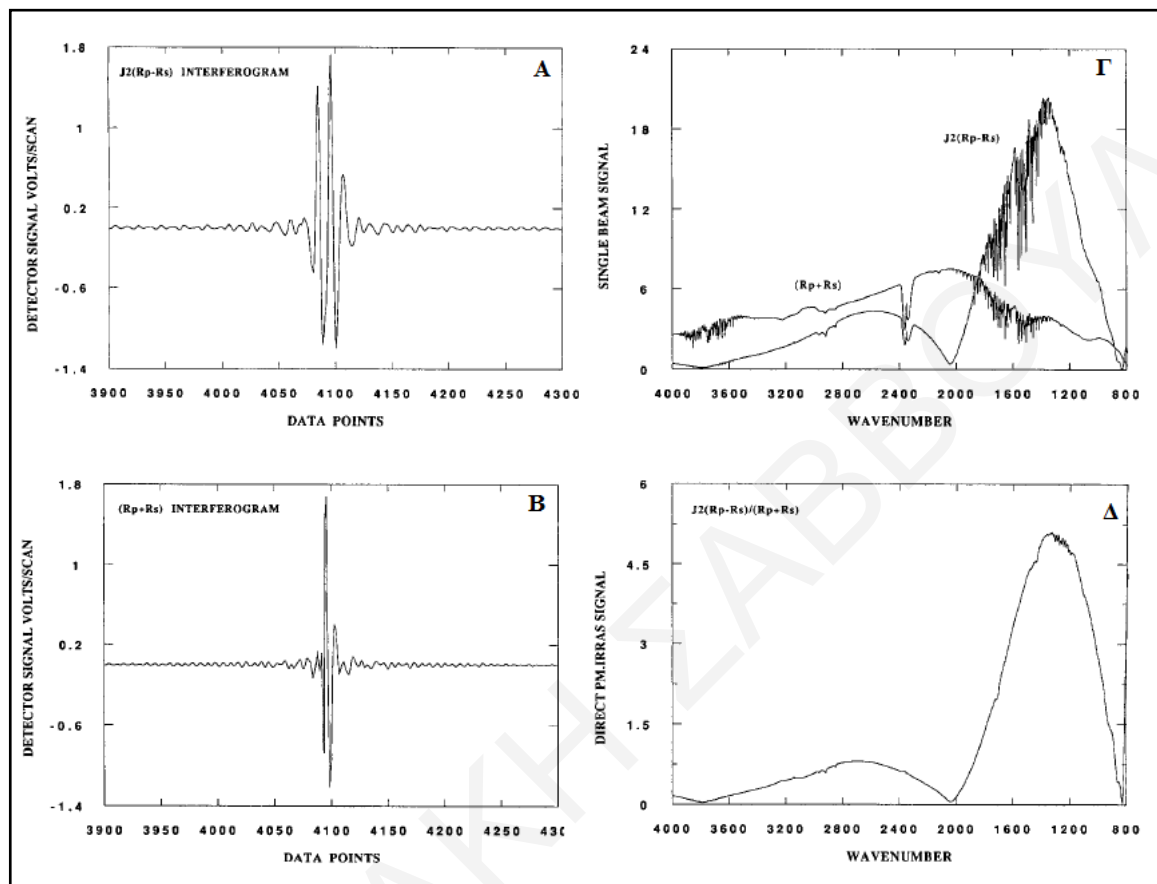
ανάκλασης R_p και R_s που αντιστοιχούν στην p- και s-πολωμένη κατάσταση αντίστοιχα, εξαρτώνται από τη γωνία πρόσπτωσης και το δείκτη διάθλασης του υποστρώματος, ενώ η απορρόφηση του φωτός εξαρτάται από τις ιδιότητες του υμενίου που είναι προσροφημένο στο υπόστρωμα. Το σήμα που μετριέται από τον ανιχνευτή είναι το άθροισμα της έντασης του σήματος για την οριζόντια και την κάθετη κατεύθυνση πόλωσης. Για να ληφθεί το επιθυμητό φάσμα, το σήμα του ανιχνευτή τυγχάνει ηλεκτρονικής επεξεργασίας, χρησιμοποιώντας έναν μετατροπέα αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC), μια ηλεκτρονική μονάδα multiplexing (IR multiplexing), ένα διαχειριστή φωτοελαστικής διαμόρφωσης (PEM 90D) και έναν σύγχρονο αποδιαμορφωτή δείγματος. Με τη βοήθεια αυτών των εξειδικευμένων στοιχείων επιτυγχάνεται το επιθυμητό συμβολόγραμμα μέσω ψηφιοποίησης δυο σημάτων ταυτόχρονα. Το σήμα που μετριέται από τον ανιχνευτή αποτελείται από δύο μέρη· το ένα περιέχει υψηλές και το άλλο χαμηλές συχνότητες. Συγκεκριμένα το σήμα χαμηλής συχνότητας αντιστοιχεί στο συμβολογράφημα «αναφοράς» που περιέχει συχνότητες Fourier, ενώ το σήμα υψηλής συχνότητας αντιστοιχεί στις συχνότητες PEM και περιέχει τη διαφορά απορρόφησης για το s- και p-πολωμένο φως. Τα δύο αυτά σήματα περιέχουν διαφορετικές πληροφορίες για το δείγμα και πρέπει να αποσυνελιχθούν ξεχωριστά. (Skoog et al. 2005)

Για το σκοπό αυτό το σήμα του ανιχνευτή ακολουθεί δύο διαφορετικά κανάλια επεξεργασίας, όπου υποβάλλεται σε διαφορετικές διαδικασίες. Στο ένα κανάλι το σήμα περνά διαμέσου ενός φίλτρου διέλευσης χαμηλών συχνοτήτων (LP) για να απομακρυνθούν οι υψηλές PEM συχνότητες και να παραμείνουν μόνο οι χαμηλές συχνότητες Fourier. Το σήμα αυτό ψηφιοποιείται και ακολούθως καταγράφεται για να προκύψει το συμβολογράφημα, το οποίο αργότερα μετατρέπεται σε ένα φάσμα απλής δέσμης δίνοντας τον μέσο όρο της απορρόφησης του s- και p-πολωμένου φωτός από το δείγμα (Σχήμα 6.11 Β και Γ). Στο δεύτερο κανάλι γίνεται επεξεργασία του σήματος του ανιχνευτή, μέσω ενός σύγχρονου αποδιαμορφωτή που συντονίζεται στις συχνότητες PEM. Το προϊόν αυτής της ειδικής lock-in επεξεργασίας ακολούθως ψηφιοποιείται και προκύπτει φάσμα που δίνει τη διαφορά της απορρόφησης για το s- και p-πολωμένο φως από το δείγμα (Σχήμα 6.11 Α και Γ). Συνδυάζοντας τα δύο αυτά φάσματα προκύπτει το φάσμα PM-IRRAS (Σχήμα 6.11 Δ) γνωστό και ως φάσμα διαφορικής ανάκλασης ($\Delta R/R$): (Bin et al. 2005; Buffeteau et al. 1991)

$$\frac{\Delta R}{R} = J_2(\phi_{PEM}) \left[\frac{I_p - I_s}{I_p + I_s} \right] \quad \text{Εξίσωση 6.48}$$

Όπου J_2 είναι μια συνάρτηση Bessel δεύτερας τάξης. Το PEM θα πρέπει να ρυθμιστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε η μέγιστη τιμή της συνάρτησης Bessel δεύτερης τάξης να λαμβάνεται στην περιοχή κυματαριθμών που παρουσιάζει ενδιαφέρον (Skoog et al. 2005).

Με την ταυτόχρονη λήψη των φασμάτων $I_p + I_s$ και $I_p - I_s$ και κατόπιν τη διαίρεσή τους, αποφεύγονται οι παρεμβολές των δονήσεων των μορίων του περιβάλλοντος και ταυτόχρονα επιτυγχάνεται η λήψη δομικών πληροφοριών για τα προσροφημένα επιφανειακά μόρια.



Σχήμα 6.11: Σχηματική αναπαράσταση των διάφορων βημάτων ανάλυσης δεδομένων PM-IRRAS. (α) Συμβολόγραμμα $J_2(R_p-R_s)$, (β) Συμβολόγραμμα (R_p+R_s) , (γ) Μετασχηματισμός Fourier των δύο συμβολογραφημάτων A και B, (δ) Φάσμα διαφορικής ανάκλασης ($\Delta R/R$). (Buffeteau et al. 1991)

6.6 Μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance – QCM)

Τις τελευταίες δεκαετίες ο μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία (QCM) έχει καταστεί ένα ισχυρό και μη επεμβατικό εργαλείο για την διερεύνηση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων λόγω της υψηλής ευαισθησίας του και του χαμηλού του κόστους, καθώς και της δυνατότητας μελέτης αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο. Η αρχή λειτουργίας του QCM βασίζεται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, όπου η εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου σε ένα πιεζοηλεκτρικό υλικό προκαλεί την παραμόρφωσή του. Συνήθως, ο QCM έχει τη μορφή μιας λεπτής πλάκας χαλαζία (μm), που καλύπτεται και από τις δύο πλευρές από μεταλλικά ηλεκτρόδια, συνήθως χρυσό, πάχους περίπου $0,1 \mu\text{m}$. (Tsionsky 2007) Η μεταβολή της συχνότητας δόνησης (Δf) του κρυστάλλου προσδιορίζεται με βάση την εξίσωση Sauerbrey (Εξίσωση 6.49), κατά την οποία η μετατόπιση της συχνότητας είναι γραμμικά ανάλογη με την μεταβολή της επιφανειακής

μάζας (Δm) στον κρύσταλλο. Όπου Δf (Hz) είναι η μετρούμενη μεταβολή συχνότητας, f_0 είναι η βασική συχνότητα συντονισμού του χαλαζία (9.00 MHz), Δm (g) είναι η μεταβολή της μάζας στην επιφάνεια του χαλαζία, A (εδώ 0.196 cm^2) είναι η επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ρ_d η πυκνότητα χαλαζία (2.648 g/cm^3) και μ_q η σταθερά του κρυστάλλου χαλαζία ($2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm s}^2$). Το αρνητικό πρόσημο δείχνει ότι η συχνότητα ταλάντωσης μειώνεται με αύξηση της μάζας. (Maglio et al. 2017)

$$\Delta f = \left(-\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}} \right) \Delta m \quad \text{Εξίσωση 6.49}$$

Η Εξίσωση 6.49 εφαρμόζεται με μεγάλη ακρίβεια για ρόφηση μορίων από φάση ατμών. Αν και η τεχνική QCM έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε υγρά, η ποσοτικοποίηση της ρόφησης από την υγρή φάση είναι περίπλοκη. Η συμπεριφορά ταλάντωσης QCM στα υγρά εξαρτάται όχι μόνο από τις ιδιότητες του ηλεκτροδίου του χαλαζία και του υγρού, αλλά και από την ποσότητα και τις ιδιότητες του προσροφημένου υλικού. Σε πολλές περιπτώσεις στην υγρή φάση, ο QCM δεν συμπεριφέρεται όπως προβλέπει η εξίσωση Sauerbrey. Η συχνότητα ταλάντωσης εξαρτάται από την πυκνότητα και το ιξώδες του υγρού σε επαφή με τον κρύσταλλο. Η Εξίσωση 6.50 εκφράζει τη μεταβολή της συχνότητας συντονισμού ενός QCM ως συνάρτηση των παραμέτρων του χαλαζία και της πυκνότητας και του ιξώδους του υγρού.

$$\Delta f = \left(-\frac{f_0^{3/2}}{\sqrt{\pi\mu_q\rho_q}} \right) \sqrt{\rho_L\eta_L} \quad \text{Εξίσωση 6.50}$$

Όπου ρ_L και η_L είναι η πυκνότητα και το ιξώδες του υγρού, αντίστοιχα. Οι μεταβολές συχνότητας που προβλέπονται από την Εξίσωση 6.50 συμφωνούν αρκετά καλά με τα πειραματικά δεδομένα, αν και έχει παρατηρηθεί κάποια απόκλιση για πολύ ιξώδη μέσα και για QCM με σημαντική τραχύτητα επιφάνειας ($0,1 \mu\text{m}$). (Caruso et al. 1996)

6.7 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS)

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που προσπίπτει σε ένα σύστημα με κolloειδή σωματίδια σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από τη γωνία σκέδασης (θ) και τον χρόνο παρατήρησης (t). Αυτό οδηγεί σε δύο τύπους πειραμάτων σκέδασης, τη στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering – SLS), όπου η μέση χρονική ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μετριέται σε διάφορες γωνίες σκέδασης, και τη δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS), κατά την οποία μετριέται η χρονική εξάρτηση της έντασης. Η DLS είναι μια καθιερωμένη τεχνική για τον προσδιορισμό

του μέσου μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους κολλοειδών σωματιδίων που βρίσκονται σε διαλύματα. Για να ληφθούν πληροφορίες για το μέγεθος των σωματιδίων χρησιμοποιώντας το SLS, η διάσταση των κολλοειδών πρέπει να είναι στην ίδια περιοχή με εκείνη του μήκους κύματος (λ) του φωτός ή τουλάχιστον μεγαλύτερη από το $\lambda / 20$. Ωστόσο, το DLS μπορεί να μετρήσει σωματίδια που είναι πολύ μικρότερα από το μήκος κύματος του φωτός. Το DLS έχει εξελιχθεί σε ένα γρήγορο εργαλείο για την ανάλυση μεγέθους σφαιρικών κολλοειδών σωματιδίων που δεν αλληλεπιδρούν και παρέχει πληροφορίες για τη συνολική μέση εκτίμηση του μεγέθους των σωματιδίων σε εναιωρήματα.

Η χρονική εξάρτηση της σκεδαζόμενης έντασης προκύπτει από το γεγονός ότι σε συνθήκες περιβάλλοντος τα κολλοειδή σωματίδια δεν είναι ακίνητα στο μέσο αιωρήματος, αλλά κινούνται με τυχαίο τρόπο με τη διαδικασία κίνησης Brown. Όταν μια συνεκτική μονοχρωματική ακτινοβολία προσκρούει σε μια συλλογή σωματιδίων, κάθε σωματίδιο δρα ως δευτερεύουσα πηγή ακτινοβολίας λόγω της διασποράς της ακτινοβολίας. Δεδομένου ότι τα σωματίδια κινούνται τυχαία στο διάλυμα και η θέση τους μεταβάλλεται, η απόσταση που διανύουν τα σκεδαζόμενα κύματα από το σωματίδιο στον ανιχνευτή ποικίλλει ανάλογα με το χρόνο. Λόγω της παρεμβολής των σκεδαζόμενων από διάφορες θέσεις κυμάτων από σωματίδια, η συνολική ένταση διακυμαίνεται τυχαία στο χρόνο. Η παρατηρούμενη διακύμανση του φωτός παράγει τυχαία "στίγματα" στο διάλυμα, τα οποία εμφανίζονται ως τυχαία διακυμαινόμενα σκοτεινά ή φωτεινά σημεία σε έναν ανιχνευτή. Προκειμένου να παρατηρηθούν τέτοια στίγματα, είναι απαραίτητο η χωρική ανάλυση του φωτοανιχνευτή να είναι αρκετά υψηλή ώστε να μετρά αυτές τις διακυμάνσεις. Η περιοχή (ή το μέγεθος) ενός μεμονωμένου στίγματος γνωστή ως «επιφάνεια συνοχής» (A_{coh}) εξαρτάται από το λ και την απόσταση μεταξύ του αντικειμένου που σκεδάζει και του ανιχνευτή (r), όπως δίνεται από τη Εξίσωση 6.51, όπου x είναι η ακτίνα του όγκου σκέδασης.

$$A_{coh} = \frac{\lambda^2 r^2}{\pi x^2} \quad \text{Εξίσωση 6.51}$$

Στο DLS μετριέται ο χαρακτηριστικός χρόνος των διακυμάνσεων της έντασης, που εξαρτάται από τον συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων που υφίστανται κίνηση Brown. Τα μικρά σωματίδια διαχέονται στο μέσο σχετικά γρήγορα με αποτέλεσμα ένα ταχέως διακυμαινόμενο σήμα έντασης, σε αντίθεση με τα μεγάλα σωματίδια, τα οποία διαχέονται πιο αργά. Οι ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τη χρονική κλίμακα αυτών των διακυμάνσεων έντασης λαμβάνονται με μια τεχνική επεξεργασίας σήματος γνωστή ως αυτοσυσχέτιση. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που φτάνει στον ανιχνευτή είναι χρονικά μεταβαλλόμενη $I(t)$ και παρακολουθείται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Στην Εξίσωση 6.52 περιγράφεται η

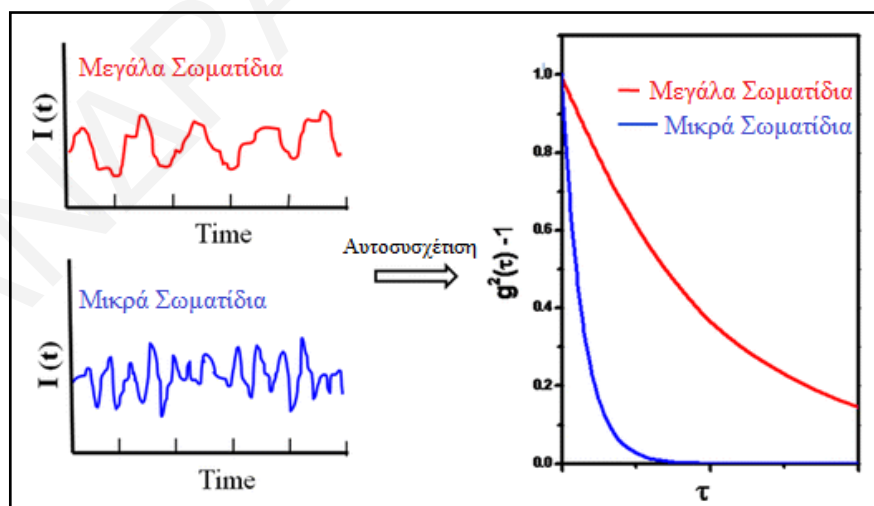
κανονικοποιημένη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της έντασης, $g^{(2)}(\tau)$, όπου η $I(t)$ είναι η ένταση που ανιχνεύεται σε αυθαίρετο χρόνο και $I(t + \tau)$ είναι η ένταση που μετρείται μετά από χρόνο καθυστέρησης τ .

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{Εξίσωση 6.52}$$

Όταν ο χρόνος καθυστέρησης τ είναι μηδέν, το σήμα μπορεί να συσχετιστεί τέλεια και ισούται με $\langle I(t)^2 \rangle$, ενώ όταν το τ είναι άπειρο, το σήμα είναι απολύτως ασυσχέτιστο αποδίδοντας μια τιμή ίση με μηδέν. Η άριστη συσχέτιση μεταξύ των σημάτων υποδεικνύεται με τιμή της $g^{(2)}(\tau)$ ίση με ένα, ενώ η μη ύπαρξη συσχέτισης με την τιμή μηδέν. Όσο πιο μεγάλα είναι τα σωματίδια, τόσο μικρότερη είναι η ταχύτητα κίνησης τους, συνεπώς η αρχική συσχέτιση της θέσης τους μειώνεται πολύ πιο αργά. Όλες οι πιο πάνω παρατηρήσεις αντικατοπτρίζονται στα διαγράμματα συσχέτισης στο Σχήμα 6.12. Ο χρόνος στον οποίο η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μειώνεται δραστικά αποτελεί ένα δείκτη του μέσου μεγέθους των σωματιδίων.

Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης έντασης, $g^{(2)}(\tau)$, μπορεί να συσχετιστεί ποσοτικά με τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του ηλεκτρικού πεδίου, $g^{(1)}(\tau)$ σύμφωνα με την Εξίσωση 6.53.

$$g^{(1)}(\tau) = \sqrt{g^{(2)}(\tau) - 1} \quad \text{Εξίσωση 6.53}$$



Σχήμα 6.12: Σχηματική αναπαράσταση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης της έντασης, $g^{(2)}(\tau)$.
(Puthusserickal et al. 2015)

Για μονοδιάσπαρτες σφαίρες η συνάρτηση της αυτοσυσχέτισης του ηλεκτρικού πεδίου, $g^{(1)}(\tau)$, μειώνεται εκθετικά με τον χρόνο καθυστέρησης τ και δίνεται από την Εξίσωση 6.54, όπου A είναι το πλάτος της συνάρτησης συσχέτισης, το B είναι το υπόβαθρο, το D είναι ο

συντελεστής μεταφορικής διάχυσης των σωματιδίων και το q είναι το μέγεθος του διανύσματος σκέδασης ($q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$),

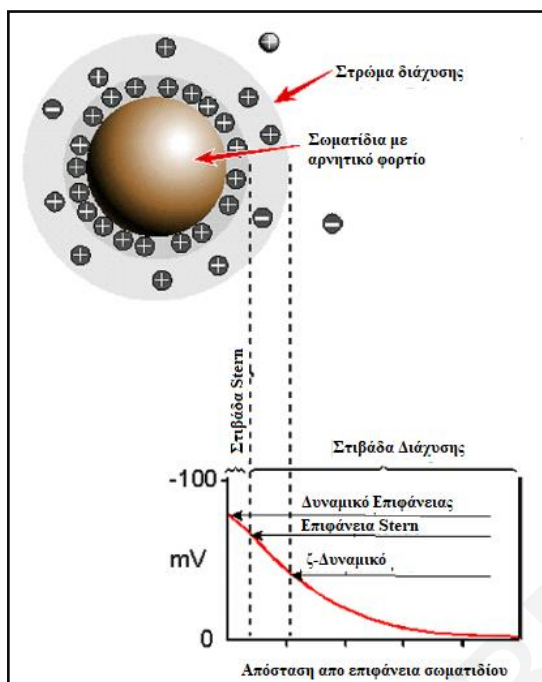
$$g^{(1)}(\tau) = Ae^{-Dq^2\tau} + B \quad \text{Εξίσωση 6.54}$$

Για σφαιρικά σωματίδια, η υδροδυναμική ακτίνα R_h μπορεί να ληφθεί από τον συντελεστή μεταφορικής διάχυσης D χρησιμοποιώντας τη σχέση Stokes-Einstein (Εξίσωση 6.55) όπου k είναι η σταθερά του Boltzmann, η είναι το ιξώδες του διαλύτη και το T είναι η απόλυτη θερμοκρασία. Εάν το σωματίδιο είναι μη σφαιρικό, τότε το R_h θεωρείται συχνά ως η φαινομενική υδροδυναμική ακτίνα ή ακτίνα ισοδύναμης σφαίρας. (Puthusserickal et al. 2015)

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Εξίσωση 6.55}$$

6.8 Ζήτα – Δυναμικό (ζ – Δυναμικό)

Το ζήτα δυναμικό είναι το ηλεκτροκινητικό δυναμικό που μετρείται σε ένα κολλοειδές σύστημα. Η επιφάνεια ενός φορτισμένου σωματιδίου προσελκύει ένα λεπτό στρώμα αντισταθμιστικού φορτίου που δεσμεύεται σταθερά σε αυτό, σχηματίζοντας ένα λεπτό υγρό στρώμα που ονομάζεται στιβάδα Stern. Όταν το σωματίδιο διαχέεται σε διάλυμα, περιβάλλεται και από ένα εξωτερικό στρώμα διάχυσης που αποτελείται από χαλαρά συνδεδεμένα ιόντα, ως αποτέλεσμα του οποίου δημιουργείται μια ηλεκτρική διπλοστιβάδα (Σχήμα 6.13). Ζήτα δυναμικό ονομάζεται το ηλεκτρικό δυναμικό στο όριο της διπλοστιβάδας και προσδιορίζεται μέσω της μέτρησης της ταχύτητας των φορτισμένων σωματιδίων που κινούνται προς ένα ηλεκτρόδιο κατά μήκος του υπό μελέτη διαλύματος παρουσία εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Από θεωρητική άποψη, το ζήτα δυναμικό είναι το ηλεκτρικό δυναμικό στο διεπιφανειακό διπλό στρώμα ενός διασπαρμένου σωματιδίου ή σταγονιδίου σε σχέση με ένα σημείο στη συνεχή φάση μακριά από τη διεπιφάνεια. (Kulkarni 2010)



Σχήμα 6.13: Σχηματική αναπαράσταση εντοπισμού του ζ δυναμικού. (Kulkarni 2010)

Το μέγεθος του ζήτα δυναμικού δίνει μια πρόβλεψη για την βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη σταθερότητα των σωματιδίων. Εάν όλα τα σωματίδια σε εναιώρημα έχουν μεγάλο αρνητικό ή θετικό ζήτα δυναμικό, τότε θα τείνουν να απωθούν το ένα το άλλο και δεν θα υπάρχει τάση για συνένωση. Ωστόσο, εάν τα σωματίδια έχουν χαμηλές τιμές ζήτα δυναμικού, τότε δεν θα υπάρχει ισχυρή απωστική δύναμη, με αποτέλεσμα να ενώνονται τα σωματίδια και να κροκιδώνονται. Ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το ζήτα δυναμικό είναι το pH του μέσου (αν τα σωματίδια έχουν φορτισμένες ομάδες που επηρεάζονται από το pH), ωστόσο και η ιοντική ισχύς, η συγκέντρωση τυχόν πρόσθετων ουσιών και η θερμοκρασία μπορούν να επηρεάσουν το επιφανειακό φορτίο ενός σωματιδίου. Όταν ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμοσθεί κατά μήκος διαλύματος με φορτισμένα σωματίδια τότε τα σωματίδια μαζί με τα πιο κοντινά τους αντισταθμιστικά ιόντα (στιβάδα Stern) κινούνται ως ενιαία μονάδα και έλκονται προς το ηλεκτρόδιο αντίθετης πολικότητας. Οι δυνάμεις ιξώδους που δρουν στα σωματίδια τείνουν να αντισταθούν σε αυτή την κίνηση. Όταν επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ των ηλεκτροστατικών δυνάμεων και των δυνάμεων τριβής, τα σωματίδια κινούνται αποκτώντας σταθερή οριακή ταχύτητα (U_E). Η ταχύτητα εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου (ϵ), το ιξώδες του μέσου (η) και το ζήτα δυναμικό. Ο λόγος της ταχύτητας ενός σωματιδίου ως προς την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου αναφέρεται ως ηλεκτροφορητική κινητικότητα U_E . Το ζήτα δυναμικό σχετίζεται με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα με την Εξίσωση Henry (Εξίσωση 6.56), όπου $f(\kappa a)$ η συνάρτηση Henry, κ το αντίστροφο μήκος Debye και a η ακτίνα του σωματιδίου. Το γινόμενο

κα είναι ο λόγος της ακτίνας του σωματιδίου ως προς το πάχος της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας. (Kulkarni 2010)

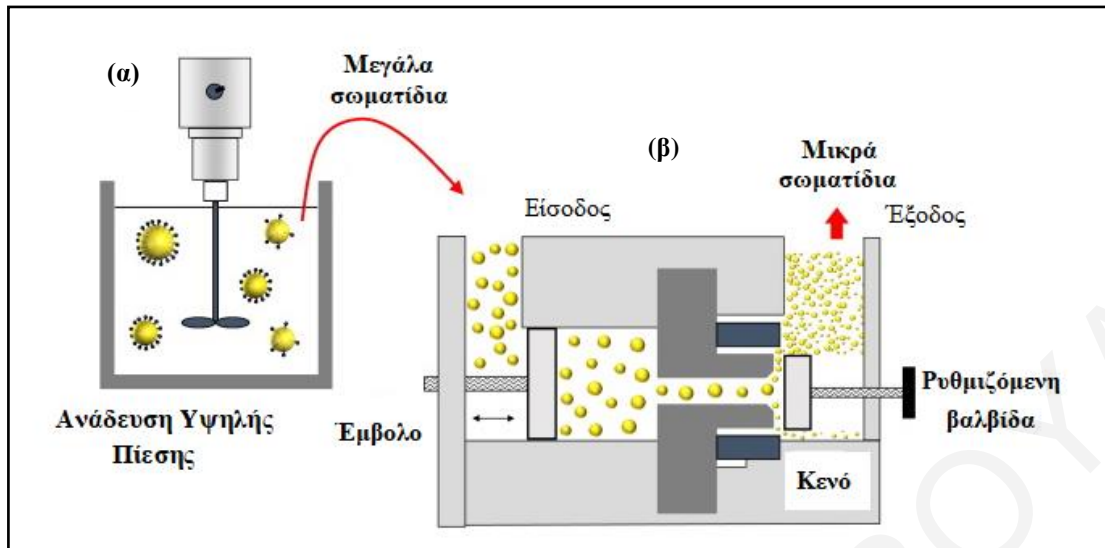
$$U_E = \frac{2\epsilon z f(\kappa a)}{3\eta}$$

Εξίσωση 6.56

6.9 Ομογενοποιητής Υψηλής Πίεσης

Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι μια μηχανική διαδικασία, κατά την οποία ένα ρευστό δείγμα συμπιέζεται μέσα από ένα στενό διάκενο κάτω από υψηλές πιέσεις (150 – 200 MPa) προκαλώντας το σχηματισμό πολύ μικρών σφαιρικών σταγονιδίων γαλακτώματος. Η μεγάλη τάση που ασκείται στο δείγμα οφείλεται στον ξαφνικό περιορισμό της ροής υπό υψηλή πίεση μέσω μίας περιοριστικής βαλβίδας. Τα σταγονίδια που παράγονται είναι στην κλίμακα των nm και μm ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων. Ο ομογενοποιητής υψηλής πίεσης είναι ικανός να παράγει γαλακτώματα με στενή κατανομή μεγέθους και να βελτιώσει τη διάρκεια ζωής των γαλακτωμάτων. Η διεπιφανειακή τάση (πίεση Laplace) προκαλεί αντίσταση στην παραμόρφωση των σταγονιδίων και για να επιτευχθεί η ομογενοποίηση πρέπει να ξεπεραστεί η πίεση αυτή. Η πίεση Laplace αυξάνεται όταν μειώνεται η διάμετρος του σταγονιδίου και συνεπώς είναι μεγαλύτερη για τα νανογαλακτώματα σε σχέση με τα συμβατικά γαλακτώματα. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

Η αναπαράσταση της λειτουργίας ενός ομογενοποιητή υψηλής πίεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.14. Ο ομογενοποιητής υψηλής πίεσης αποτελείται από ένα έμβολο υψηλής πίεσης και ακροφύσιο ομογενοποίησης. Το έμβολο συμπιέζει το ακατέργαστο γαλάκτωμα στην απαιτούμενη πίεση. Κατά τη διάρκεια της αποσυμπίεσης, οι σταγόνες διασπώνται στο ομοιογενοποιητικό ακροφύσιο διάσπασης. Το ακροφύσιο είναι καθοριστικό για την αποτελεσματικότητα της διάσπασης των γαλακτωμάτων. Ο μηχανισμός διάσπασης των σταγονιδίων εξαρτάται από τις παραμέτρους λειτουργίας, που είναι ο ρυθμός ροής, η πίεση, ο αριθμός κύκλων, η θερμοκρασία, οι παράμετροι της συσκευής (γεωμετρία ακροφυσίων και σχεδιασμός πρόσκρουσης), καθώς και από τις παραμέτρους του προϊόντος, όπως η σύσταση (λίπος, νερό, πρωτεΐνη) και το ιζώδες. Οι υψηλές πιέσεις που εφαρμόζονται προκαλούν αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της θερμότητας που προκαλεί η συμπίεση. Αυτή η αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύεται από τις διατμητικές τάσεις και τη μερική μετατροπή της μηχανικής ενέργειας σε θερμότητα. Το αποτέλεσμα είναι μια συνολική αύξηση της θερμοκρασίας κατά 17 – 21 °C ανά 100 MPa. Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης ενισχύει επίσης την υφή του προϊόντος και την αίσθηση στο στόμα. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)



Σχήμα 6.14: Σχηματική αναπαράσταση παρασκευής γαλακτώματος μέσω της διαδικασίας της ομογενοποίησης. (α) Παρασκευή γαλακτώματος μέσω ανάδευσης υπό ισχυρή διατμητική τάση και (β) σχηματισμός γαλακτωμάτων μικρότερου μεγέθους μέσω ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. (McClements 2016, McClements & Gumus 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Πειραματικό Μέρος

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και περιγράφονται οι πειραματικές διαδικασίες που έλαβαν χώρα στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Τα πειράματα διακρίνονται σε τρία κύρια μέρη. Αρχικά γίνεται μελέτη σε διαλύματα των αλληλεπιδράσεων των αντιοξειδωτικών με τους γαλακτωματοποιητές και πολυηλεκτρολύτες που θα χρησιμοποιηθούν ως συστατικά των ΠΓ, ακολουθεί η μελέτη της παρασκευής πολυστρωμάτων σε επιφάνειες και τέλος η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός των ΠΓ.

7.1 Υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές μελέτες της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Για το σχηματισμό των ΠΓ είναι απαραίτητη η χρήση φυσικών προϊόντων εγκεκριμένων για χρήση σε τρόφιμα. Στην εργασία αυτή εξετάζονται ως αντιοξειδωτικές ουσίες το ταννικό οξύ, οι βηταλαΐνες που απομονώνονται από τα κόκκινα τεύτλα (Cardoso-Ugarte et al. 2014, Chethana et al. 2007) και σε μικρότερο βαθμό οι ανθοκυανίνες που απομονώνονται από το κόκκινο λάχανο (Chandrasekhar et al. 2012). Ως πρωτοταγείς γαλακτωματοποιητές χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος (Whey protein isolate – WPI) και η αλβουμίνη του βόειου ορού (BSA - Bovine Serum Albumin). Η χιτοζάνη χρησιμοποιείται ως κατιοντικό στρώμα, ενώ η θειική χονδροϊτίνη, το αλγινικό νάτριο, το καζεϊνικό νάτριο, η πηκτίνη και το ταννικό οξύ ως ανιοντικά στρώματα, ανάλογα με την τιμή του pH. Στον Πίνακα 7.1 συνοψίζονται τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το ρόλο τους κατά το σχηματισμό των ΠΓ. Τα διαλύματα των χημικών ουσιών παρασκευάζονται με χρήση υπερκαθαρού νερού (ειδική αντίσταση 18,2 MΩ cm) από συσκευή Arrium 611UV της εταιρίας Sartorius. Τα διαλύματα ρυθμίζονται σε pH

ίσο με 4 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος οξικών συγκέντρωσης 0,01 M και σε pH ίσο με 7 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 0,01 M.

Πίνακας 7.1: Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως γαλακτωματοποιητές, πολυηλεκτρολύτες και αντιοξειδωτικά κατά τις μελέτες αλληλεπίδρασης και σχηματισμού των ΠΓ.

Γαλακτωματοποιητές	Πολυηλεκτρολύτες	Αντιοξειδωτικά
Πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος (WPI)	Χιτοζάνη (CH)	Ταννικό οξύ (TA)
Αλβουμίνη του βόειου ορού (BSA)	Θειική Χονδροϊτίνη (CS)	Βηταλαΐνες (BE)
Καζεϊνικό Νάτριο (SC)	Πηκτίνη (PE)	
	Αλγινικό Νάτριο (SA)	

7.1.1 Πληροφορίες για τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Τα υλικά και χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια διεκπεραίωσης των πειραμάτων της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν τα ακόλουθα:

- Κόκκινα τεύτλα, (τοπική καλλιέργεια)
- Λινέλαιο (KTC - 100% Pure Cold-Pressed Linseed / Flaxseed Oil)
- Πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα ορού γάλακτος (85% β-γαλακτοσφαιρίνη), (MB 14.000 – 18.000 g/mol, Agropur Ingredients)
- Αλβουμίνη του βόειου ορού Fraction V, (MB 66.500 g/mol, Roche Diagnostics)
- Καζεϊνικό νάτριο (α-s₁ καζεΐνη, β-καζεΐνη), (MB 22.000 – 24.000 g/mol, Sigma Aldrich)
- Χιτοζάνη, C₅₆H₁₀₃N₉O₃₉, (MB 120.000 – 190.000 g/mol και 190.000 – 310.000 g/mol, Sigma Aldrich)
- Θειική Χονδροϊτίνη, (C₁₃H₂₁NO₁₅S)_n, (MB 150.000 – 200.000 g/mol, Xi'an Huisun Bio-Tech Co. Ltd)
- Πηκτίνη, (C₆H₁₀O₇)_n, (MB 150.000 g/mol, Acros Organics)
- Αλγινικό Νάτριο, (C₆H₉NaO₇)_n, (MB 12.000 – 40.000 g/mol, Sigma Aldrich)
- Ταννικό οξύ, C₇₆H₅₂O₄₆, (MB 1701,19 g/mol, Fluka)
- L-Ασκορβικό οξύ, C₆H₈O₆, (MB 176,12 g/mol, Sigma Aldrich)
- Πολυαιθυλενογλυκόλη-10.000, H(OCH₂CH₂)_nOH, (MB 10.000 g/mol, Merck)
- Θεϊκό αμμώνιο, (NH₄)₂SO₄, (MB 132,14 g/mol, Sigma Aldrich)
- Χλωροφόρμιο, CHCl₃, (MB 119,38 g/mol, Merck)
- Υδροχλωρικό οξύ 37%, HCl, (MB 36,46 g/mol, Merck)

- Οξικό οξύ 100%, $C_2H_4O_2$, (MB 60,05 g/mol, Merck)
- Οξικό νάτριο, $C_2H_3NaO_2$, (MB 82,03 g/mol, Merck)
- Μονοβασικό φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4 , (MB 136,09 g/mol, Sigma Aldrich)
- Διβασικό φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4 , (MB 174,18 g/mol, Sigma Aldrich)
- Nile Red 99%, $C_{20}H_{18}N_2O_2$, (MB 318,37 g/mol, Acros Organics)
- 2,2'-Azobis(2-aminodinopropane) dihydrochloride 97%, AAPH, (MB 271,19 g/mol, Sigma Aldrich)

7.2 Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιοξειδωτικών με βιολογικά μόρια σε υδατικά διαλύματα

Οι αλληλεπιδράσεις των αντιοξειδωτικών με τις πρωτεΐνες και τους βιολογικούς πολυηλεκτρολύτες που δρουν ως γαλακτοματοποιητές και υλικά του τοιχώματος του γαλακτώματος αντίστοιχα, εξετάζονται αρχικά σε διάλυμα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές και θερμοδυναμικές μεθόδους, όπως φασματοσκοπία UV-Vis, φασματοσκοπία φθορισμού, φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού, θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry – ITC) και πειράματα διαπίδυσης. Στη συνέχεια διερευνάται ο «βαθμός συνέργειας» των αντιοξειδωτικών με τα συστατικά του τοιχώματος των ΠΓ σε επίπεδες επιφάνειες όπου εναποτίθενται με τη μέθοδο Layer-by-Layer (LbL). Ο χαρακτηρισμός των υμενίων γίνεται με τη χρήση μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία (QCM) και φασματοσκοπικών μεθόδων, όπως της φασματοσκοπίας ανάκλασης απορρόφησης υπέρυθρου (PM-IRRAS) και της φασματοσκοπίας ορατού – υπεριώδους (UV-Vis).

Τέλος τα καταλληλότερα συστήματα προωθούνται για το σχηματισμό γαλακτωμάτων, των οποίων η σταθερότητα εξετάζεται χρησιμοποιώντας σκέδαση φωτός και μετρήσεις ζ-δυναμικού. Η ικανότητα των γαλακτωμάτων να διατηρούν την οξειδωτική σταθερότητα των συστατικών της ελαιώδους φάσης εξετάζεται ως συνάρτηση της σύστασης και της γεωμετρίας των στρωμάτων μετρώντας τη διαπερατότητα των ριζών υδροξυλίου από την υδατική έως τη λιπιδική φάση των γαλακτωμάτων.

7.2.1 Πειραματικές μεθοδολογίες απομόνωσης φυσικών αντιοξειδωτικών

Στη φύση υπάρχει μεγάλος αριθμός φυσικών χημικών ουσιών που παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Στην εργασία αυτή εξετάζονται οι βηταλαΐνες που απομονώνονται από τα κόκκινα τεύτλα.

7.2.1.1 Απομόνωση βηταλαϊνών από κόκκινα τεύτλα

Τα φρέσκα κόκκινα τεύτλα πλύθηκαν, ξεφλουδίστηκαν και κόπηκαν σε μικρά κομμάτια. Στη συνέχεια αλέστηκαν με τη βοήθεια μίξερ και απομακρύνθηκε από αυτά η υγρασία μέσω της διαδικασίας της λυοφιλίωσης (Cardoso-Ugarte et al. 2014). Το προϊόν ξήρανσης αποθηκεύεται σε θερμοκρασία $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ακολούθως ζυγίστηκαν $0,1\text{ g}$ ξηρού προϊόντος και αναμίχθηκαν με 25 mL υδατικού διαλύματος ασκορβικού οξέος $0,1\text{ }\%$ κ.ο. Το μίγμα που προέκυψε αναδεύθηκε σε θερμοστατούμενο τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) για 2 ώρες σε θερμοκρασία $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ώστε να μεγιστοποιηθεί η διάχυση των βηταλαϊνών στο μέσο εκχύλισης. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 9500 στροφές και διαχωρίστηκε το εκχύλισμα από τον πολτό με διήθηση. Το εκχύλισμα στο σημείο αυτό αποθηκεύτηκε στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Κατόπιν αναμίχθηκαν $73,18\text{ g}$ από το λαμβανόμενο διήθημα, $16,02\text{ g}$ PEG-10.000 και $10,80\text{ g}$ θεικού αμμωνίου και αναδεύθηκαν μέχρι διάλυσης των στερεών (Murari et al. 2015). Το σύστημα αυτό διαχωρίζεται σε δύο υδατικές φάσεις, μεταξύ των οποίων κατανέμονται οι βηταλαΐνες. Απομακρύνθηκε η πάνω στιβάδα που είναι πλούσια σε βηταλαΐνες από την κάτω στιβάδα που είναι πλούσια σε σάκχαρα. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν 5 g θεικού αμμωνίου μαζί με την στιβάδα των βηταλαϊνών και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία εκχύλισης δύο υδατικών φάσεων, ώστε να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Ακολούθως συλλέχθηκε η πάνω στιβάδα και αναμίχθηκε με ίσο όγκο χλωροφορμίου σε τρίτο στάδιο εκχύλισης. Τέλος συλλέχθηκε η πάνω φάση των εκχυλιζόμενων βηταλαϊνών, που έχουν απαλλαγθεί από το PEG-10.000. Στο διάλυμα αυτό έγινε αερισμός με N_2 και τελικά αποθηκεύτηκε στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, όπου και παραμένει σταθερό για 4 βδομάδες (Chethana et al. 2007).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των εκχυλιζόμενων βηταλαϊνών έγινε με φασματοφωτομετρία UV-Vis (UV-1601, Shimadzu) με βάση τις Εξισώσεις 7.1 και 7.2.

$$x = 1,095 \times A_{537} - A_{600} \quad \text{Εξίσωση 7.1}$$

$$y = -0,258 \times A_{537} + A_{476} - 0,742 \times A_{600} \quad \text{Εξίσωση 7.2}$$

Όπου, « x » είναι η απορρόφηση της βητανίνης και « y » η απορρόφηση της βουλγαξανθίνης-I. Η συγκέντρωση των βηταλαϊνών υπολογίστηκε σε $\text{mg}/100\text{ mL}$ από τον νόμο του Beer-Lambert, χρησιμοποιώντας τις τιμές $E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 1120$ και $E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 750$ για τους συντελεστές απόσβεσης της βητανίνης και της βουλγαξανθίνης-I αντίστοιχα. (Cardoso-Ugarte et al. 2014).

7.2.2 Πειραματικές μεθοδολογίες των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιοξειδωτικών με βιολογικά μόρια σε διαλύματα

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται στη συνέχεια οι αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=4 με ιοντική ισχύ 0,01 mol/L και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7 με ιοντική ισχύ 0,01 mol/L.

7.2.2.1 Πειράματα θολερότητας

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, στην υδατική φάση, έγιναν μετρήσεις θολερότητας με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο τα αντιοξειδωτικά επάγουν συσσωμάτωση των πρωτεϊνών ή των πολυηλεκτρολυτών που χρησιμοποιούνται στα ΠΓ.

Για τις μελέτες θολερότητας χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο ορατού - υπεριώδους Shimadzu UV-1900 (Σχήμα 7.1). Το συγκεκριμένο φασματόμετρο είναι διπλής δέσμης με τη χρήση της τεχνολογίας περίθλασης LO-RAY-LIGHT™.

Στα πειράματα θολερότητας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής χημικές ουσίες: η πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος (WPI), η αλβουμίνη του βόειου ορού (BSA), το καζεϊνικό νάτριο (SC), η χιτοζάνη (CH), η θειϊκή χονδροϊτίνη (CS), η πηκτίνη (PE), το αλγινικό νάτριο (SA), το ταννικό οξύ (TA) και οι βηταλαΐνες (BE). Μελετήθηκαν οι μεταβολές της θολερότητας ως συνάρτηση της αναλογίας moles του αντιοξειδωτικού / σταθεροποιητή ή πολυηλεκτρολύτη στα 600 nm για τα συστήματα TA και στα 700 nm για τα συστήματα BE.

Παρασκευάστηκαν μίγματα αντιοξειδωτικής ουσίας και σταθεροποιητή ή πολυηλεκτρολύτη, όπου η αντιοξειδωτική ουσία προς τίθεται σε μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος (pH 4 και 7) και σταθεροποιητή ή πολυηλεκτρολύτη ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 1,5 mL και οι συγκεντρώσεις από 1 mg/mL μέχρι 6 mg/mL, σε διαφορετικούς συνολικούς λόγους μαζών. Στον Πίνακα 6.2 συνοψίζονται οι συγκεντρώσεις των σταθεροποιητών και πολυηλεκτρολύτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε τιμή pH. Οι συγκεντρώσεις του TA και της BE στα μίγματα κυμαίνονται από 0-1,2 mM και 0-0,10 mM αντίστοιχα. Στη συνέχεια το μίγμα ανακινείται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσδιορίζεται φωτομετρικά η θολερότητα.



Σχήμα 7.1: Φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1900, Διδακτικά Εργαστήρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κόπρου.

Πίνακας 7.2: Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών που μελετήθηκαν στα συστήματα σταθεροποιητή ή πολυηλεκτρολύτη – ΤΑ ή ΒΕ σε pH 4 και 7.

Σταθεροποιητής ή πολυηλεκτρολύτης	Συγκέντρωση	Σταθεροποιητής ή πολυηλεκτρολύτης	Συγκέντρωση
Συστήματα σταθεροποιητής ή πολυηλεκτρολύτης - ΤΑ			
pH 4		pH 7	
BSA	(0.5, 2, 2.5, 3, 4) mg/mL	BSA	(2, 3) mg/mL
WPI	(2, 3, 4) mg / mL	WPI	(2, 3) mg/mL
CH	3 mg/mL (low molecular weight), (0.5, 1) mg/mL (medium molecular weight)	SC	(0.5, 1, 2, 3) mg/mL
PE	(1, 3) mg/mL	PE	(1, 3) mg/mL
SA	(1, 3) mg/mL	SA	(1, 3) mg/mL
CS	(1, 3) mg/mL	CS	(1, 3) mg/mL
Συστήματα σταθεροποιητής ή πολυηλεκτρολύτης - ΒΕ			
pH 4		pH 7	
BSA	(1, 2, 3, 4) mg/mL	BSA	(1, 2, 3, 4) mg/mL
WPI	(1, 2, 3, 4) mg/mL	WPI	(1, 2, 3, 4) mg/mL
CH	3 mg/mL (low molecular weight), 1 mg/mL (medium molecular weight)	SC	(2, 3, 4) mg/mL
PE	(1, 2) mg/mL	PE	(1, 2) mg/mL
SA	(1, 3) mg/mL	SA	(1, 3) mg/mL
CS	(1, 3) mg/mL	CS	(1, 3) mg/mL

7.2.2.2 Πειράματα φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι μια ευαίσθητη τεχνική για τη διερεύνηση αρχικά των τοπικών μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών, εφόσον τα δεσμευόμενα μόρια οδηγούν σε απόσβεση του φθορισμού των αμινοξέων που περιέχονται στα μόρια των πρωτεϊνών. Επιπλέον οι μέθοδοι φθορισμού επιτρέπουν την έμμεση διερεύνηση των δομικών αλλαγών της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης κατά τη σύνδεσή της με κάποιο αντιοξειδωτικό. Πέραν των πειραμάτων απόσβεσης φθορισμού, έγιναν μετρήσεις ενίσχυσης φθορισμού, σύγχρονου φθορισμού σταθερού μήκους κύματος (CWSF) και χρονοεξαρτημένου φθορισμού.

Για τα πειράματα φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα φασματοφωτόμετρα φθορισμού, Jasco FP-6300 και FP-8300 (Σχήμα 7.2) τα οποία διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα εξαρτημάτων παρέχοντας τη δυνατότητα πολύπλευρης μελέτης συστημάτων. Διαθέτουν πηγή διέγερσης ξένου (Xe). Το εύρος της ταινίας μηκών κύματος (bandwidth) της ακτινοβολίας της δέσμης κυμαίνεται από 2,5 nm μέχρι 20 nm για το FP-6300 και από 1 nm μέχρι 20 nm για το FP-8300. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής είναι στην περιοχή 200-900 nm. Η σάρωση των δειγμάτων μπορεί να γίνει σε διάφορες ταχύτητες από 20 έως 20.000 nm/min.

Στα πειράματα φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν: η πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος, η αλβουμίνη του βόειου ορού, το καζεϊνικό νάτριο, η χιτοζάνη, η θειϊκή χονδροϊτίνη, η πηκτίνη, το αλγινικό νάτριο, το ταννικό οξύ και οι βηταλαΐνες.

Πειράματα απόσβεσης φθορισμού

Μετρήθηκε η απόσβεση του φθορισμού των πρωτεϊνών που δρουν ως γαλακτωματοποιητές ή πολυηλεκτρολύτες, σε διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/mL μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας σε pH 4 και 7. Οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών που μελετήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 7.3. Οι παράμετροι του φθορισμού (εύρος ζώνης ακτινοβολίας διέγερσης, εύρος ζώνης ακτινοβολίας εκπομπής, απόκριση, ευαισθησία, εύρος σάρωσης) εξετάστηκαν λεπτομερώς με σκοπό να βελτιστοποιηθεί το φάσμα εκπομπής για κάθε σύστημα. Τα φάσματα εκπομπής των πρωτεϊνών μετρήθηκαν στο εύρος 290 έως 550 nm με μήκος κύματος διέγερσης 280 nm, εύρος ζώνης εκπομπής ίσο με 2,5 nm και εύρος ζώνης διέγερσης 5,0 nm. Η ταχύτητα σάρωσης των φασμάτων ήταν 50 nm/min.

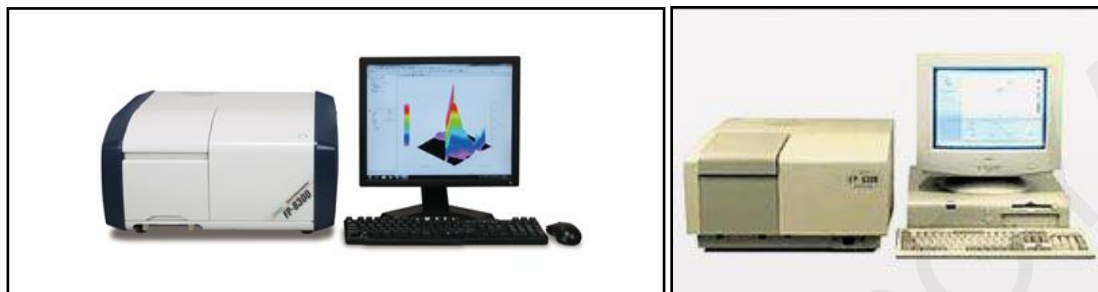
Πειράματα ενίσχυσης φθορισμού

Μελετήθηκε η ενίσχυση του φθορισμού των βηταλαϊνών σε διαλύματα συγκέντρωσης 0,5 μM μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών – πολυηλεκτρολυτών σε pH 4 και 7. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στα πειράματα ενίσχυσης φθορισμού των βηταλαϊνών συνοψίζονται στον Πίνακα 7.3. Τα φάσματα εκπομπής μετρήθηκαν στην περιοχή 450 έως 750 nm με μήκος κύματος διέγερσης 440 nm, εύρος ζώνης εκπομπής ίσο με 5,0 nm και εύρος ζώνης διέγερσης 5,0 nm. Η ταχύτητα σάρωσης των φασμάτων ήταν 50 nm/min.

Πειράματα σύγχρονου φθορισμού

Για τα συστήματα πρωτεϊνών παρουσία βηταλαϊνών μετρήθηκε ο σύγχρονος φθορισμός σταθερού μήκους κύματος ούτως ώστε να συγκριθεί η απόσβεση των ομάδων τυροσίνης και τρυπτοφάνης στις πρωτεΐνες. Τα φάσματα εκπομπής σύγχρονου φθορισμού μετρήθηκαν σε εύρος 260 έως 400 nm με Δλ ίσο με 15 nm για τη μελέτη του φθορισμού της τυροσίνης και 50

nm για τη μελέτη του φθορισμού της τρυπτοφάνης. Το εύρος ζώνης εκπομπής ήταν ίσο με 1,0 nm και το εύρος ζώνης διέγερσης ίσο με 2,5 nm. Η ταχύτητα σάρωσης των φασμάτων ήταν 50 nm/min. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 1 mg/mL σε ρυθμιστικά διαλύματα οξικών και φωσφορικών, και η συγκέντρωση των βηταλαϊνών ήταν από $1,4 \times 10^{-6}$ mol/L μέχρι $1,1 \times 10^{-5}$ mol/L.



Σχήμα 7.2: Φασματοφωτόμετρο φθορισμού, Jasco FP-8300 (αριστερά) Διδακτικά Εργαστήρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κύπρου και Φασματοφωτόμετρο φθορισμού, Jasco FP-6300 (δεξιά) Ερευνητική Ομάδα Φυσικοχημείας και Κολλοειδών, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κύπρου.

Πειράματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού

Μελετήθηκε ο χρονοεξαρτημένος φθορισμός των πρωτεϊνών στην παρουσία βηταλαϊνών στα συστήματα BE / BSA και BE / SC στο όργανο FluoroLog-3 χρησιμοποιώντας έναν μετρητή χρονοσυσχετισμένων μεμονωμένων φωτονίων TCSPC (Time Correlated Single Photon Counter) και ένα ανιχνευτή φωτοπολλαπλασιαστή της εταιρίας Horiba Jobin Yvon (Σχήμα 7.3). Η πηγή διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας ενισχυτής λέιζερ Ti/Sapphire με ψηλό ρυθμό επανάληψης που παράγει παλμούς 1 W, 70 fs στα 250 kHz συντονισμένα στα 800 nm. Η δημιουργία του μήκους κύματος διέγερσης των 266 nm έγινε χρησιμοποιώντας θεμελιώδεις ενισχυτικούς παλμούς (800 nm, 1,54 eV) και μη γραμμικούς κρυστάλλους BBO (β -BaB₂O₄). Οι παλμοί στα 266 nm συγχρονίστηκαν με το σύστημα TCSPC χρησιμοποιώντας ένα γρήγορο ανιχνευτή με αποτέλεσμα η διέγερση του δείγματος με παλμούς της τάξης fs να επιτυγχάνει ανάλυση 100 ps κατά την μέτρηση της φωτάυγειας (PL). Η συγκέντρωση της BSA και του SC ήταν 1 mg/mL, σε pH 4 και 7. Η συγκέντρωση της BE ήταν από $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L μέχρι $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

Ο χρονοεξαρτημένος φθορισμός των βηταλαϊνών στην παρουσία πρωτεϊνών μετρήθηκε σε όργανο FluoroLog-3 (Horiba). Η συγκέντρωση των βηταλαϊνών ήταν $2,0 \times 10^{-6}$ mol/L, της BSA από $3,0 \times 10^{-6}$ mol/L μέχρι $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L σε pH 4 και pH 7 και του SC από $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L μέχρι $2,7 \times 10^{-5}$ σε pH 7. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 405 nm.



Σχήμα 7.3: Φασματοφωτόμετρο φθορισμού, Fluorolog 3 (Horiba) Τμήματος Φυσικής, Πανεπιστημίου Κύπρου.

Πίνακας 7.3: Συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών ουσιών που μελετήθηκαν στα πειράματα απόσβεσης και ενίσχυσης φθορισμού σε pH 4 και 7.

<i>Απόσβεση Φθορισμού Πρωτεϊνών</i>			
Πρωτεΐνη	Συγκέντρωση	Πρωτεΐνη	Συγκέντρωση
Ταννικό οξύ			
pH 4		pH 7	
BSA	$1,2 \times 10^{-6} - 7,1 \times 10^{-6} \text{ M}$	BSA	$2,4 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ M}$
WPI	$1,2 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^{-5} \text{ M}$	WPI	$2,4 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ M}$
		CS	$4,1 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ M}$
Βηταλαΐνες			
pH 4		pH 7	
BSA	$0,5 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-6} \text{ M}$	BSA	$0,5 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-6} \text{ M}$
WPI	$0,5 \times 10^{-6} - 7,0 \times 10^{-6} \text{ M}$	WPI	$0,5 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-6} \text{ M}$
		SC	$0,5 \times 10^{-6} - 6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$
Ενίσχυση Φθορισμού Βηταλαΐνών			
BSA	$1,5 \times 10^{-6} - 2,4 \times 10^{-5} \text{ M}$	BSA	$1,1 \times 10^{-6} - 1,8 \times 10^{-5} \text{ M}$
WPI	$4,2 \times 10^{-6} - 6,7 \times 10^{-5} \text{ M}$	WPI	$4,2 \times 10^{-6} - 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$
CH	$8,3 \times 10^{-7} - 7,5 \times 10^{-6} \text{ M}$	SC	$1,7 \times 10^{-5} - 6,7 \times 10^{-5} \text{ M}$
PE	$4,0 \times 10^{-7} - 3,2 \times 10^{-6} \text{ M}$	PE	$4,0 \times 10^{-7} - 3,2 \times 10^{-6} \text{ M}$
CS	$5,7 \times 10^{-7} - 4,6 \times 10^{-6} \text{ M}$	CS	$5,7 \times 10^{-7} - 4,6 \times 10^{-6} \text{ M}$
SA	$7,7 \times 10^{-6} - 6,2 \times 10^{-5} \text{ M}$	SA	$7,7 \times 10^{-6} - 6,2 \times 10^{-5} \text{ M}$

7.2.2.3 Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD)

Μελετήθηκε η επίδραση των συζεύξεων αντιοξειδωτικού – πρωτεΐνης στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού.

Παρασκευάστηκαν μίγματα πρωτεΐνης, αντιοξειδωτικής ουσίας και ρυθμιστικού διαλύματος συνολικού όγκου 10 mL και συγκέντρωσης πρωτεΐνης 0,05 mg / mL σε εύρος συγκεντρώσεων από 0 έως 10 μ M για το TA και για τις BE. Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού των πρωτεϊνών μετρήθηκαν σε όργανο J-815, Jasco (Σχήμα 7.4) στο εύρος 190 έως 450 nm και συλλέχθηκαν με ταχύτητα σάρωσης 50 nm/min και εύρος ζώνης 0,1 nm. Κάθε φάσμα αποτελεί τον μέσο όρο 5 σαρώσεων.

Τα φάσματα CD αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SELCON3 από το σύνολο προγραμμάτων Dicroprot για τον υπολογισμό των δευτερευόντων δομικών στοιχείων. Το φάσμα του ρυθμιστικού διαλύματος καταγράφηκε ως αναφορά και ακολούθως αφαιρέθηκε από το φάσμα μίγματος βηταλαΐνης / πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και αναλύονται ως η μέση ελλειπτικότητα καταλοίπων (MRE), που ορίζεται ως MRE.



Σχήμα 7.4: Όργανο κυκλικού διχρωισμού, J-815, Jasco, Ερευνητικό Εργαστήριο Ομάδας Φουλερενίων και Υπερμοριακής Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου.

7.2.2.4 Πειράματα Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC)

Για τις θερμοδυναμικές μελέτες της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών – αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε το θερμιδόμετρο ισοθερμικής τιτλοδότησης Nano-ITC της εταιρίας TA (Σχήμα 7.5). Το θερμιδόμετρο διαθέτει κυψελίδα δείγματος όγκου 1 mL, σύριγγες έγχυσης δείγματος όγκων 100 και 250 μ L και μπορεί να ανιχνεύσει θερμότητες από 0,1 μ J μέχρι 5000 μ J. Το όργανο λειτουργεί σε εύρος θερμοκρασιών 2 $^{\circ}$ C – 80 $^{\circ}$ C και η ανάδευση του δείγματος καλύπτει εύρος 0 – 400 rpm.

Στον Πίνακα 7.4 συνοψίζονται τα συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με ITC. Αρχικά όλα τα διαλύματα πριν τοποθετηθούν στο θερμιδόμετρο απαερόντονται στο σταθμό απαέρωσης στους 25 $^{\circ}$ C κάτω από κενό και ανάδευση με σκοπό να αφαιρεθούν τυχόν φυσαλίδες που περιέχονται στο διάλυμα. Η κυψελίδα του δείγματος γεμίζονταν με 1 mL του δείγματος της πρωτεΐνης ή με ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθως η σύριγγα έγχυσης χωρητικότητας 250 μ L γεμιζόταν με το διάλυμα του αντιοξειδωτικού ή ρυθμιστικού διαλύματος, γινόταν τοποθέτηση της σύριγγας στο έμβολο του οργάνου και ακολούθως

τοποθέτηση του εμβόλου στο θερμιδόμετρο. Πριν την έναρξη του πειράματος ρυθμίζονται οι επιθυμητές παράμετροι διεξαγωγής του πειράματος. Όλα τα πειράματα περιλαμβάναν 62 εγχύσεις των 4 μL και ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών εγχύσεων ήταν 600 s. Οι μετρήσεις γίνονταν με συνεχή ανάδευση του δείγματος στην κυψελίδα. Με το τέλος του κάθε πειράματος λαμβανόταν το συνολικό θερμογράμμα και καταγραφόταν η θερμότητα κάθε έγχυσης από την ολοκλήρωση των κορυφών θερμογράμματος από το λογισμικό του προγράμματος.



Σχήμα 7.5: Θερμιδόμετρο ισοθερμικής τιτλοδότησης Nano-ITC, Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κολλοειδών, Πανεπιστημίου Κύπρου.

Πίνακας 7.4: Συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με ITC σε pH 4 και 7.

pH 4		pH 7	
Πρωτεΐνη	Αντιοξειδωτικό	Πρωτεΐνη	Αντιοξειδωτικό
0,0497 mM BSA	9,7610 mM TA	0,0481 mM BSA	9,4808 mM TA
0,0111 mM BSA	8,2664 mM TA	0,0111 mM BSA	8,9115 mM TA
0,2234 mM BSA	9,1025 mM TA	0,2234 mM BSA	9,2002 mM TA
0,0320 mM WPI	2,4848 mM TA	0,0323 mM WPI	2,4788 mM TA
0,0331 mM WPI	9,7611 mM TA	0,0323 mM WPI	9,4808 mM TA
0,1021 mM WPI	9,7610 mM TA	0,0498 mM SC	9,4808 mM TA
---	---	0,0098 mM SC	8,2664 mM TA
0,0251 mM BSA	0,1647 mM BE	0,0100 mM BSA	0,1647 mM BE
0,0100 mM BSA	0,1647 mM BE	0,0101 mM SC	0,1647 mM BE
0,0274 mM WPI	0,1647 mM BE	0,0274 mM WPI	0,1647 mM BE

Για κάθε πείραμα μελέτης της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών ήταν απαραίτητα τέσσερα πειράματα:

1. Πείραμα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης – αντιοξειδωτικού, στο οποίο γινόταν έγχυση του διαλύματος της αντιοξειδωτικής ουσίας από τη σύριγγα στην κυψελίδα δείγματος που περιείχε διάλυμα πρωτεΐνης (Q_T).
2. Πείραμα αραίωσης αντιοξειδωτικής ουσίας κατά το οποίο γινόταν έγχυση της αντιοξειδωτικής ουσίας από τη σύριγγα στην κυψελίδα δείγματος που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα ($Q_{dil, Ant.}$). Η θερμότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τον υπολογισμό του Q_{tot} λόγω της υψηλής αραίωσης κάθε έγχυσης.
3. Πείραμα αραίωσης πρωτεΐνης στο οποίο γινόταν έγχυση του ρυθμιστικού διαλύματος από τη σύριγγα στην κυψελίδα δείγματος που περιείχε διάλυμα πρωτεΐνης (Q_{dil}). Η θερμότητα αυτή συχνά είναι αρκετά μικρή ώστε να μπορεί να παραλειφθεί.
4. Πείραμα αραίωσης διαλύτη στο οποίο γινόταν έγχυση του ρυθμιστικού διαλύματος από τη σύριγγα στην κυψελίδα δείγματος που περιείχε επίσης ρυθμιστικό διάλυμα ($Q_{w,w}$). Η θερμότητα αυτή είναι πολύ μικρή.

7.2.2.5 Πειράματα διαπίδυσης

Η ισόθερμη ρόφησης των αντιοξειδωτικών ουσιών στις πρωτεΐνες μελετήθηκε επίσης μέσω πειραμάτων διαπίδυσης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μεμβράνες διαπίδυσης κυτταρίνης (33 mm) και μέγεθος πόρων 14.000 D (Sigma Aldrich). Τα συστήματα που μελετήθηκαν, ήταν αυτά τα οποία έδειξαν κάποιου είδους αλληλεπίδραση στις προηγούμενες μελέτες σε διάλυμα. Ωστόσο τα συστήματα του καζεϊνικού νατρίου, παρόλο που εμφανίζουν ενδιαφέροντα αποτελέσματα στις μετρήσεις θολερότητας και φθορισμού, δεν κατέστη δυνατό να μελετηθούν με πειράματα διαπίδυσης λόγω του σχετικά μικρού μοριακού βάρους της πρωτεΐνης που της επιτρέπει να διαπερνά τη μεμβράνη διαπίδυσης. Η συγκέντρωση της BSA και της CH ήταν 1 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών. Η συγκέντρωση του TA ήταν από $1,8 \times 10^{-5}$ M μέχρι $8,8 \times 10^{-5}$ M για την πρωτεΐνη BSA, της BE ήταν από $3,3 \times 10^{-6}$ M μέχρι $1,6 \times 10^{-5}$ M για την πρωτεΐνη BSA από $2,7 \times 10^{-7}$ M μέχρι $1,4 \times 10^{-6}$ M και για τη CH. Παρασκευάστηκαν διαλύματα πρωτεΐνης – πολυηλεκτρολύτη και αντιοξειδωτικού συνολικού όγκου 10 mL τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα στο σακουλάκι διαπίδυσης. Ο συνολικός όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος γύρω από τη σακούλα διαπίδυσης ήταν 10 mL ώστε να καλύπτεται πλήρως όλη η επιφάνεια της μεμβράνης. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαπίδυσης παρουσία μόνο της αντιοξειδωτικής ένωσης στις ίδιες συγκεντρώσεις όπως περιγράφεται πιο πάνω, με σκοπό να ελεγχθεί πιθανή ρόφηση του αντιοξειδωτικού στη μεμβράνη.

Αφού ελέγχθηκε ο χρόνος για να επιτευχθεί θερμική ισορροπία στο σύστημα, μετρήθηκε η απορρόφηση (Shimadzu, UV-1900) του ΤΑ στα 275 nm και της ΒΕ στα 538 nm στο εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα, μετά από 3 μέρες σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς οποιαδήποτε ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης.

7.2.3 Πειραματικές μεθοδολογίες των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιοξειδωτικών με βιολογικά μόρια σε επιφάνειες

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούν οι αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4 με ιοντική ισχύ 0,01 mol/L και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 με ιοντική ισχύ 0,01 mol/L.

7.2.3.1 Πειράματα Layer-by-Layer (LbL) και διερεύνηση με φασματοσκοπία UV-Vis

Στα πειράματα LbL μελετάται ο βαθμός συμβατότητας των συστατικών που μελετήθηκαν σε διάλυμα πάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια. Εναποτίθεται πολυστρωματικό υμένιο σε υπόστρωμα χαλαζία (5 x 3 cm) με τη χρήση συσκευής dip coating. Αρχικά το πλακίδιο καθαρίζεται με υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος (50%) για 30 λεπτά ακολούθως ξεπλένεται με υπερκαθαρό νερό και στη συνέχεια ξηραίνεται στον αέρα. Κάθε εμφύσηση διαρκεί 15 λεπτά και στη συνέχεια το πλακίδιο ξηραίνεται στον αέρα για 15 λεπτά. Οι εναποθέσεις γίνονται διαδοχικά στα υπό μελέτη διαλύματα. Η ταχύτητα εμφύσησης ήταν 100 mm / s και η ταχύτητα ανύψωσης του πλακιδίου ήταν 25 mm / s. Τέλος λαμβάνεται φάσμα UV-Vis για κάθε εναπόθεση στρώματος μεταξύ δύο εμφυτίσεων. Για τον προσδιορισμό της εναποθεθείσας ποσότητας ΤΑ στην επιφάνεια χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση UV-Vis στα 280-310 nm, ενώ για τις βηταλαΐνες χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση UV-Vis στα 538 nm. Τα συστήματα που μελετήθηκαν με φασματοσκοπία UV-Vis συνοψίζονται στον Πίνακα 7.5. Η επιλογή των μοριακών λόγων ΤΑ / πρωτεΐνης και ΒΕ / πρωτεΐνης έγιναν με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων θολερότητας ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα συσσωμάτωσης μεταξύ των συστατικών στο διάλυμα εναπόθεσης.

Πίνακας 7.5: Συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με μέθοδο LbL-UV-Vis σε pH 4 και 7.

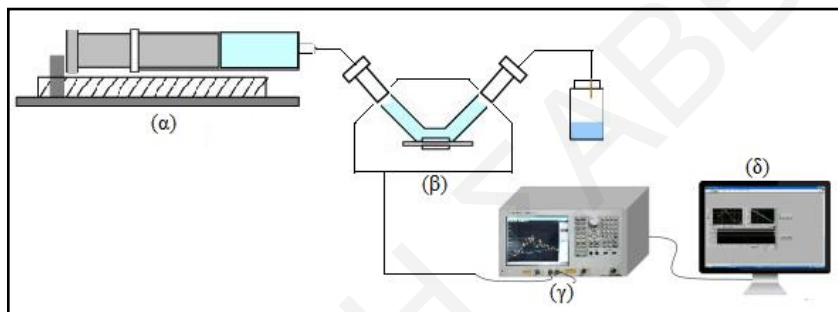
Πρωτεΐνη - πολυηλεκτρολύτης περιττής στιβάδας	Γραμμομοριακή αναλογία αντιοξειδωτικού/πρωτεΐνης άρτιας στιβάδας	pH
CH 1 mg/mL	TA/ BSA = 7.5, 15, 30	4

CH 1 mg/mL	TA/ WPI = 10	4
PE 1 mg/mL	TA/ BSA = 15, 30	4, 7
PE 1 mg/mL	TA/ WPI = 10	4
SC 1 mg/mL	TA/ BSA = 30	7
CS 1 mg/mL	TA/ BSA = 15	4
CS 1 mg/mL	TA/ BSA = 30	7
CS 1 mg/mL	TA/ WPI = 10	4, 7
SA 1 mg/mL	TA/BSA = 15	4
SA 1 mg/mL	TA/ WPI = 10	4
PE 1 mg/mL	TA/ SC = 12	7
CH 1 mg/mL	BE/ SC = 2, 4	4, 7
CH 1 mg/mL	BE/ CH = 10, 40	4
PE 1 mg/mL	BE/ CH = 10, 40	4
PE 1 mg/mL	BE/ BSA = 10	4, 7
PE 1 mg/mL	BE/ SC = 2, 4	7
SC 1 mg/mL	BE/ SC = 2, 4	7
SC 1 mg/mL	BE/ CH = 10, 40	4, 7

7.2.3.2 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με μικροζυγό κρυστάλλου χαλαζία-QCM

Με τη μέθοδο QCM είναι δυνατό να ελεγχθεί σε πραγματικό χρόνο η δημιουργία πολυστρωματικών υμενίων σε επιφάνεια χρυσού, που αποτελεί ηλεκτρόδιο συσκευής μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία (QCM-922, Princeton Applied Research). Το ηλεκτρόδιο της συσκευής ενσωματώνεται σε ειδική κυψελίδα ροής συνδεδεμένη με αντλία ρύθμισης ροής, ούτως ώστε να επιτυγχάνεται ρυθμός ροής 0,5 mL/min. Για την επιλογή του ρυθμού ροής μελετήθηκαν τρεις ρυθμοί ροής 4,5 mL/min, 1,0 mL/min και 0,5 mL/min. Η επιλογή έγινε με βάση το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί κορεσμός της επιφάνειας του χρυσού. Ο μικροζυγός QCM συνδέεται με όργανο μέτρησης συχνοτήτων, το οποίο καταγράφει συνεχώς τις συχνοτήτες δόνησης του ηλεκτροδίου και τις εμφανίζει στην οθόνη του ηλεκτρονικού

υπολογιστή. Η διάταξη της συσκευής φαίνεται στο Σχήμα 7.6. Για τη δημιουργία κάθε στρώματος χρησιμοποιούνται διάφοροι όγκοι διαλυμάτων CH και πηκτικής συγκέντρωσης 1 mg/mL σε pH 4 μέχρι να επιτευχθεί κορεσμός της επιφάνειας του χρυσού και η συχνότητα του οργάνου να σταθεροποιηθεί. Γίνεται συνεχής μέτρηση της συχνότητας δόνησης του κρυστάλλου στους 25 °C καθώς προχωρά η εναπόθεση. Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές εναποθέσεις πολυηλεκτρολύτη και TA κατ' αναλογία με τα προηγούμενα πειράματα UV-Vis (Υποκεφάλαιο 7.2.3.1) μέχρις ότου σχηματιστούν οκτώ στιβάδες. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη σε δονήσεις του περιβάλλοντος και οι ανεπιθύμητες δονήσεις στο όργανο μέτρησης των συχνοτήτων οδηγούν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Δεν κατέστη δυνατό να μελετηθούν αρκετά συστήματα με τη μέθοδο QCM επειδή η αλλαγή των δειγμάτων στη αντλία παροχής γινόταν χειρωνακτικά και οδηγούσε σε ανεπιθύμητες δονήσεις του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 7.6: Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διάταξης μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία – QCM. (α) Σύριγγα, (β) ηλεκτρόδιο συσκευής ενσωματωμένο σε ειδική κυψελίδα ροής, (γ) όργανο μέτρησης συχνοτήτων και (δ) ηλεκτρονικός υπολογιστής καταγραφής αποτελεσμάτων, Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κολλοειδών, Πανεπιστημίου Κύπρου.

7.2.3.3 Πειράματα φασματοσκοπίας ανάκλασης απορρόφησης υπέρυθρου (PM-IRRAS)

Για τις φασματοσκοπικές μελέτες των πολυστρωματικών υμένων χρησιμοποιήθηκε το όργανο KSV NIMA PM-IRRAS. Είναι ένα πολύ ευαίσθητο όργανο, εξειδικευμένο για τη μελέτη επιφανειών, που επιτρέπει τη λήψη δεδομένων σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Η δέσμη που παράγεται από το laser του οργάνου διέρχεται από φωτοελαστικό διαμορφωτή (PEM). Τα όργανα αυτά περιέχονται στην αριστερή πλευρά του οργάνου PM-IRRAS (Σχήμα 7.7 (1)). Ακολούθως η δέσμη προσπίπτει στην υπό μελέτη επιφάνεια υπό μια συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης. Ανάλογα με την οργάνωση και τη διαμόρφωση των μορίων στην επιφάνεια απορροφούνται διάφορες υπέρυθρες συχνότητες. Η υπόλοιπη ακτινοβολία ανακλάται από την επιφάνεια και συλλέγεται υπό γωνία ίση με τη γωνία πρόσπτωσης και οδηγείται στον ανιχνευτή MCT (Mercury Cadmium Telluride), ο οποίος βρίσκεται στη δεξιά πλευρά του οργάνου (Σχήμα 7.7 (2)). Στο πάνω μέρος του οργάνου (Σχήμα 7.7 (3)) βρίσκεται το γωνιόμετρο με εύρος γωνιών από 40 ° έως 90 ° σε σχέση με την κατακόρυφη, με το οποίο ρυθμίζεται η γωνία

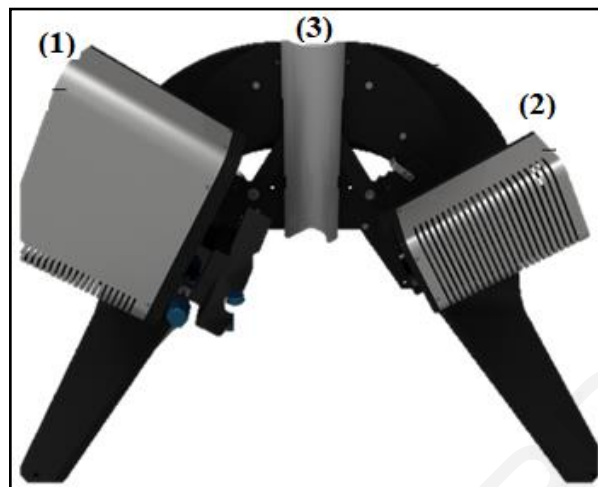
πρόσπτωσης. Το γωνιόμετρο περιλαμβάνει δύο κοχλίες για τη ρύθμιση της υψομετρικής θέσης ολόκληρου του συστήματος laser – ανιχνευτή και της γωνίας μεταξύ του ανιχνευτή και του laser, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η γωνία πρόσπτωσης. Στην παρούσα μελέτη η γωνία πρόσπτωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν γύρω στις 80° .

Στο πίσω μέρος του οργάνου, το οποίο δεν φαίνεται στο Σχήμα 7.7, υπάρχει ένα κιβώτιο ηλεκτρονικών, στο οποίο πραγματοποιείται η διαδικασία της αποσυνέλιξης του σήματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται ένας μετατροπέας αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC), μια ηλεκτρονική μονάδα multiplexing, ένας διαχειριστής φωτοελαστικής διαμόρφωσης (PEM 90D) και ένας σύγχρονος αποδιαμορφωτής δείγματος. Με τη βοήθεια αυτών των εξειδικευμένων στοιχείων επιτυγχάνεται το επιθυμητό συμβολογράφημα μέσω προσθαφαίρεσης των εντάσεων των s- και p-πολωμένων ακτινών, από το οποίο τελικά προκύπτει το φάσμα διαφορικής ανάκλασης ($\Delta R/R$).

Το όργανο έχει διαστάσεις (73,5 x 46,1 x 50,6) cm, καλύπτει την φασματική περιοχή από 800 έως 4000 cm^{-1} και η φασματική του ανάλυση φτάνει μέχρι τους 8 cm^{-1} . Ολόκληρο το σύστημα είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή από τον οποίο καθορίζονται οι παράμετροι για τη διεξαγωγή του πειράματος. Η λήψη των φασμάτων PM-IRRAS επιτυγχάνεται τελικά μέσω κατάλληλου λογισμικού.

Με τη μέθοδο LbL σχηματίστηκαν τα πολυστρωματικά υμένια σε επιφάνεια χρυσού και στη συνέχεια γίνεται μέτρηση υπέρυθρου φάσματος ανάκλασης. Πριν το στάδιο της μέτρησης προηγούνται μερικά στάδια ελέγχου. Αρχικά ελέγχεται ότι η δέσμη της ακτινοβολίας προσπίπτει κοντά στο κέντρο του δείγματος και μετέπειτα καθορίζονται ορισμένα χαρακτηριστικά της μέτρησης, όπως ο κυματαριθμός ρύθμισης του PEM (2500 cm^{-1}), η ενίσχυση του σήματος κατά την αφαίρεση και πρόσθεση των εντάσεων του s και p πολωμένου φωτός (δ και σ αντίστοιχα) καθώς και η ένταση του σήματος της εισόδου σε τιμές 5, 2 και 1 αντίστοιχα. Ακολούθως επιλέγεται ο τρόπος υπολογισμού Mertz, με μήκος διαίρετη 4 και ως μέθοδος προσέγγισης / αποσυνέλιξης του φάσματος η μέθοδος Blackman. Επίσης πριν αρχίσει η μέτρηση καθορίζονται το ύψος και η γωνία ανάκλασης που σχετίζονται με τη βελτιστοποίηση της έντασης της ανακλώμενης δέσμης, η οποία επιδιώκουμε να κυμαίνεται στην περιοχή 80 - 90 % της μέγιστης έντασης κορεσμού του ανιχνευτή, για να γίνει λήψη ικανοποιητικών φασμάτων και να περιορισθεί ο θόρυβος. Η γωνία ανάκλασης επάνω σε επιχρυσωμένο υποστρώματα είναι 83° και ο χρόνος μέτρησης είναι 360 s. Αρχικά λαμβάνεται φάσμα IRRAS της καθαρής επιφάνειας μετάλλου και στην συνέχεια τα φάσματα IRRAS για κάθε στρώμα υμενίου που προκύπτει από την μέθοδο LbL. Πρωτίστως, έγιναν πειράματα διερεύνησης για να μελετηθεί η σειρά εναπόθεσης των στρωμάτων, δηλαδή αν η πρωτεΐνη εναποτίθεται σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν ως πρώτη στιβάδα χρησιμοποιείται ένας ευέλικτος

πολυσακχαρίτης ή μια πρωτεΐνη. Τα συστήματα που παρουσίασαν ενδιαφέρον κατά τη διερεύνηση με τη μέθοδο UV-Vis, μελετήθηκαν με την φασματοσκοπία PM-IRRAS και συνοψίζονται στον Πίνακα 7.6.



Σχήμα 7.7: Σχηματική αναπαράσταση του οργάνου KSV NIMA PM-IRRAS, Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κολλοειδών, Πανεπιστημίου Κύπρου. (1): Πρώτο τμήμα του οργάνου που περιλαμβάνει το laser και τον φωτοελαστικό διαμορφωτή (PEM), (2): Δεύτερο τμήμα του οργάνου που περιλαμβάνει τον ανιχνευτή MCT και (3): Γωνιόμετρο.

Πίνακας 7.6: Συστήματα και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με μέθοδο LbL-PM-IRRAS σε pH 4.

Πρωτεΐνη - πολυηλεκτρολύτης περιττής στιβάδας	Γραμμομοριακή αναλογία αντιοξειδωτικού/πρωτεΐνης άρτιας στιβάδας	pH
CH 1 mg/mL	TA/BSA = 7,5, 15, 22,5 και 30	4
PE 1 mg/mL	TA/BSA = 15	4
CS 1 mg/mL	TA/BSA = 15	4
CH 1 mg/mL	TA/ WPI = 10	4

7.2.4 Πειραματικές μεθοδολογίες των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη πολυστρωματικών γαλακτωμάτων

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούν οι αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4 με ιοντική ισχύ 0,01 mol/L και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 με ιοντική ισχύ 0,01 mol/L.

7.2.4.1 Παρασκευή πολυστρωματικών γαλακτωμάτων

Απαραίτητη διαδικασία πριν από την χρήση οποιασδήποτε ελαιώδους φάσης για την παρασκευή του γαλακτώματος, είναι η απομάκρυνση των αντιοξειδωτικών που περιέχουν τα λάδια του εμπορίου για να αυξάνεται η σταθερότητά τους ως προς την οξείδωση. Κατά τη διαδικασία αυτή 60 g Al_2O_3 θερμαίνονται στους 200 °C για τρεις ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία ενεργοποίησης του Al_2O_3 , 70 g λάδι αφήνεται να περάσει μέσα από 20 g στήλης Al_2O_3 που είχε τοποθετηθεί σε χωνί Buchner, στο οποίο εφαρμόζεται κενό. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά για την αποτελεσματικότερη απομάκρυνση των αντιοξειδωτικών (Hernández Sánchez et al. 2016).

Αρχικά παρασκευάστηκε μεγάλος αριθμός γαλακτωμάτων μέχρι να βρεθούν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των συστατικών τους, ώστε να σχηματίζονται σταθερά γαλακτώματα. Για την παρασκευή των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε μια διαδικασία τριών σταδίων. Αρχικά παρασκευάστηκαν 100 mL διαλύματος 10% κ.ο λινελαίου σε υδατικό διάλυμα γαλακτωματοποιητή (BSA 4 g / L από μόνη της ή παρουσία TA ή BE έτσι ώστε $n(TA) / n(BSA) = 9$ και $n(BE) / n(BSA) = 0,7$, σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος οξικού 0,01 M σε pH = 4), το οποίο αναδεύονταν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως το διάλυμα αυτό περνά μέσα από ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (Avestin, EmulsiFlex-C5) (Σχήμα 7.8) με πίεση 15000 psi. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πέντε φορές. Στη συνέχεια 30 mL του πρωτοταγούς γαλακτώματος αναδεύονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με 60 mL του πολυηλεκτρολύτη (CH 0,5 g / L από μόνη της ή παρουσία TA ή BE έτσι ώστε $n(TA) / n(CH) = 130$ και $n(BE) / n(CH) = 10,45$ σε ένα ρυθμιστικό οξικού 0,01 M σε pH = 4), ή αντιοξειδωτικού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του δευτεροταγούς γαλακτώματος (το TA ή η BE προστέθηκε στο δευτερεύον γαλάκτωμα μόνο εάν δεν είχε ήδη ενσωματωθεί στο πρωτογενές γαλάκτωμα). Το διάλυμα αυτό περνά μέσα από ομογενοποιητή υψηλής πίεσης όπως και κατά την παρασκευή του πρωτοταγούς γαλακτώματος. Τέλος 30 mL του δευτεροταγούς γαλακτώματος αναδεύονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με 15 mL διαλύματος πολυσακχαρίτη (PE 0,25 g / L από μόνη της ή παρουσία TA ή BE έτσι ώστε $n(TA) / n(PE) = 90$ και $n(BE) / n(PE) = 7$) και με 45 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού. Το TA ή η BE προστέθηκε στο τριτογενές γαλάκτωμα μόνο εάν δεν είχε ήδη ενσωματωθεί στα πρωτογενή και δευτερεύοντα γαλακτώματα. Το διάλυμα αυτό περνά μέσα από τον ομογενοποιητή υψηλής πίεσης τρεις φορές. Για όλα αυτά τα γαλακτώματα τριών στρωμάτων, η τελική σύνθεση ήταν BSA (0,44 g / L), TA (0,1 g / L), CH (0,16 g / L) και PE (0,16 g / L). Η ισότητα των συνολικών συγκεντρώσεων συστατικών σε αυτά τα συστήματα είναι απαραίτητη για την άμεση σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης του TA και των BE σε αυτά τα γαλακτώματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις η PE χρησιμοποιήθηκε ως το δεύτερο

στρώμα των ΠΓ και η CH ως το τρίτο στρώμα. Όλα τα γαλακτώματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου, όπου είναι σταθερά για περίπου δύο εβδομάδες.

Στον Πίνακα 7.7 που ακολουθεί συγκεντρώνονται όλα τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν και οι συγκεντρώσεις των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τους. Οι γαλακτωματοποιητές και οι πολυηλεκτρολύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή των γαλακτωμάτων προέκυψαν με βάση τα βέλτιστα αποτελέσματα στις μελέτες διαλυμάτων και επιφανειών για τα συστήματα που παρατηρήθηκε υψηλή συμβατότητα μεταξύ των αντιοξειδωτικών με τις πρωτεΐνες και τους πολυηλεκτρολύτες ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή επιφανειακή εναπόθεση αντιοξειδωτικών.



Σχήμα 7.8: Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης (Avestin, EmulsiFlex-C5), Ερευνητικό Εργαστήριο Φυσικοχημείας Κολλοειδών, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου.

Πίνακας 7.7: Συστατικά και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων σε pH 4.

Πρωτοταγές γαλάκτωμα	Δευτεροταγές γαλάκτωμα	Τριτοταγές γαλάκτωμα
BSA 4,0 mg / mL	CH 0,5 mg/mL	PE 0,25 mg/mL
BSA 4,0 mg / mL	PE 0,5 mg/mL	CH 0,25 mg/mL
BSA 4,0 mg / mL	PE 0,4 mg/mL	TA 3,0 mg/mL
BSA 4,0 mg / mL	CH 1,0 mg/mL	TA 3,0 mg/mL
n(TA)/n(BSA) = 9	CH 0,5 mg/mL	PE 0,25 mg/mL
BSA 4,0 mg / mL	n(TA)/n(CH) = 130	PE 0,25 mg/mL
BSA 4,0 mg/mL	CH 0,5 mg/mL	n(TA)/n(CH) = 90

n(BE)/n(BSA) = 0,7	CH 0,5 mg/mL	PE 0,25 mg/mL
BSA 4,0 mg / mL	n (BE) / n (CH) = 10,45	PE 0,25 mg/mL
BSA 4,0 mg/mL	CH 0,5 mg/mL	n (BE) / n (PE) = 7

7.2.4.2 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης πολυστρωματικών γαλακτωμάτων μετρώντας τη διαπερατότητα των ριζών υδροξυλίου από την υδατική έως τη λιπιδική φάση των γαλακτωμάτων

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής σταθερότητας των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε η ένωση AAPH ως εκκινητής ριζών υδροξυλίου στην υδατική φάση. Το διάλυμα του AAPH παρασκευάστηκε διαλύοντας 0,1 g AAPH σε 10 mL υπερκαθαρού νερού. Δείγματα γαλακτώματος 2,75 mL αναμίχθηκαν με 0,25 mL διαλύματος AAPH ή 0,25 mL νερού όταν γινόταν η μέτρηση του προτύπου αναφοράς. Για να μετρηθούν οι μεταβολές της οξειδωτικής σταθερότητας της λιπιδικής φάσης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη μιας χρωστικής ευαίσθητης στην παρουσία των ριζών υδροξυλίου στην λιπιδική φάση κατά την παρασκευή του γαλακτώματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Nile Red συγκέντρωσης 5 mg/mL σε χλωροφόρμιο και ποσότητας 250 μ L σε 10 mL λιπιδικής φάσης. Μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης φθορισμού των γαλακτωμάτων παρουσία και απουσία διαλύματος AAPH χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο φθορισμού FP-8300. Η μέτρηση γινόταν κάθε 20 λεπτά για συνολικό χρονικό διάστημα 12 ωρών. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής για μετρήσεις φθορισμού ήταν 535 nm και 582 nm, αντίστοιχα (Pan et al. 2015). Ανάλογα με το είδος του γαλακτώματος γίνονταν οι απαραίτητες αραιώσεις πριν από κάθε μέτρηση ώστε η αρχική ένταση φθορισμού των γαλακτωμάτων να είναι για όλα τα συστήματα περίπου η ίδια. Για τα πρωτοταγή γαλακτώματα γινόταν αραιώση 2000 φορές, για τα δευτεροταγή 720 φορές και για τα τριτοταγή 240 φορές ώστε η συνολική συγκέντρωση χρωστικής σε όλα τα γαλακτώματα να είναι η ίδια.

Η σχετική ένταση φθορισμού (RFI – relative fluorescence intensity) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$RFI = \frac{I_{t,AAPH} / I_{0,AAPH}}{I_{t,control} / I_{0,control}} \quad \text{Εξίσωση 7.3}$$

όπου $I_{t,AAPH}$ είναι η ένταση φθορισμού του γαλακτώματος μετά από «t» min έκθεσης σε AAPH, I_0 η ένταση φθορισμού του γαλακτώματος αμέσως μετά την προσθήκη του AAPH, και $I_{t,control}$ και $I_{0,control}$ είναι οι αντίστοιχες ποσότητες για το διάλυμα ελέγχου. Τα πειράματα εκτελέστηκαν

τρεις φορές για το κάθε συνδυασμό τοιχώματος γαλακτώματος για να ελεγχθεί η αναπαραγωγισιμότητα.

7.2.4.3 Μετρήσεις ζήτα - δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων

Το μέγεθος και το ζ-δυναμικό των γαλακτωμάτων μετρήθηκε με το όργανο Nano ZS (Malvern) (Σχήμα 7.9). Σε όλα τα γαλακτώματα έγινε αραιώση 2000 φορές χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα οξικών. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες πολυστυρολίου μίας χρήσης και η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 3 φορές για χρονική περίοδο 2000 s. Η διάμετρος των σωματιδίων και το ζήτα – δυναμικό των σταγονιδίων προκύπτει από τον μέσο όρο των μετρήσεων αυτών.



Σχήμα 7.9: Όργανο Nano ZS (Malvern), Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Λευκωσίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Σχεδιασμός πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με ταννικό οξύ: Η κολλοειδής προσέγγιση

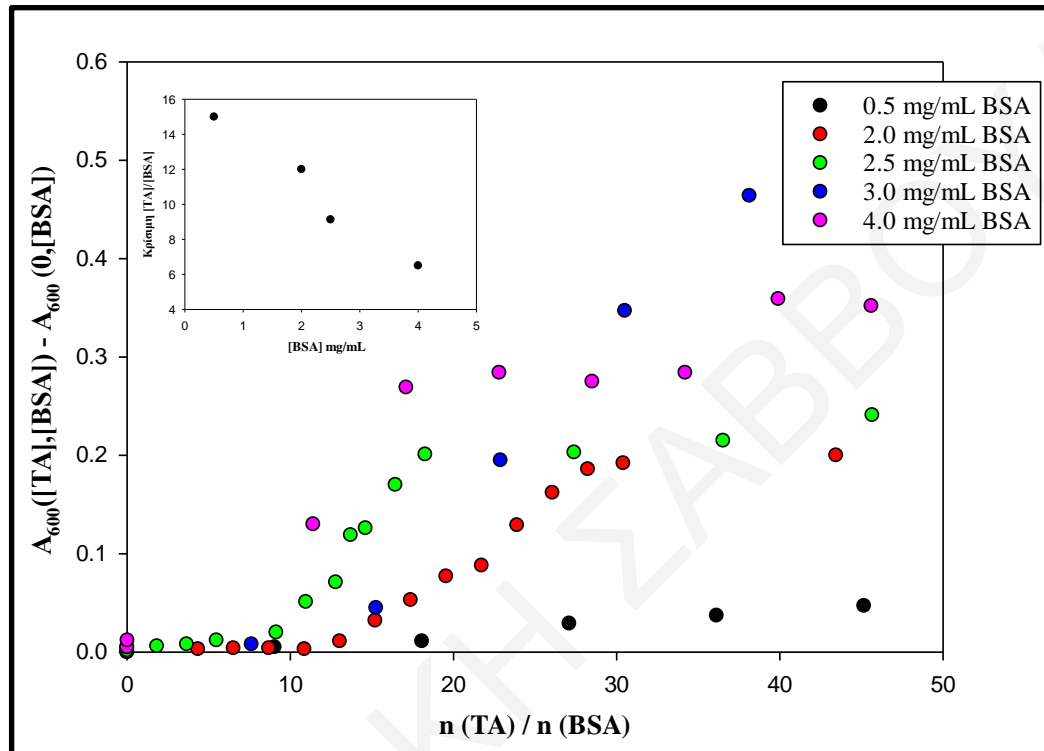
Στο κεφάλαιο αυτό εφαρμόζεται η κολλοειδής προσέγγιση τριών βημάτων για τον συστηματικό σχεδιασμό πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με ταννικό οξύ ως αντιοξειδωτικό συστατικό. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μελέτες αλληλεπίδρασης σε διάλυμα και από τη δημιουργία πολυστρωμάτων σε επίπεδες στερεές επιφάνειες. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στην τελική μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης του ταννικού οξέος σε πολυστρωματικά γαλακτώματα, όπου ελέγχεται η επίδραση της ακριβούς γεωμετρικής τοποθέτησης του αντιοξειδωτικού στις διεπιφάνειες.

8.1. ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

8.1.1 Πειράματα θολερότητας

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις θολερότητας διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη και μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του ταννικού οξέος. Αυτές οι μετρήσεις δίνουν σημαντικές πληροφορίες, αφού καθορίζουν το εύρος συγκέντρωσης πάνω από το οποίο πραγματοποιείται συσσωμάτωση μεγάλης κλίμακας μεταξύ ΤΑ και βιοπολυμερών. Τα πειράματα θολερότητας είναι απαραίτητα, επειδή το ΤΑ χρησιμεύει συχνά ως παράγοντας διασύνδεσης πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών, λόγω της ικανότητάς του να δημιουργεί γέφυρες μεταξύ των βιομακρομορίων. (Marchuk et al. 2019) Στο Σχήμα 8.1 παρουσιάζεται το διάγραμμα θολερότητας στα 600 nm για διάφορες συγκεντρώσεις BSA σε $pH = 4$. Η πρωτεΐνη BSA χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπος γαλακτωματοποιητής, επειδή έχει

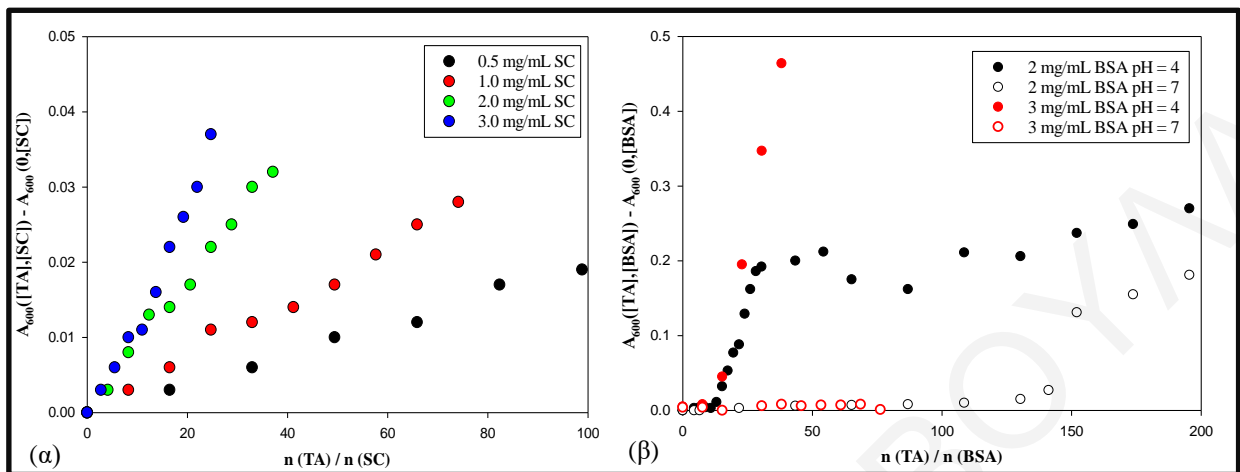
χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πολλά γαλακτώματα και μάλιστα σε πολυστρωματικά γαλακτώματα με ταννικό οξύ. (Lomova et al. 2010) Ο άξονας y είναι στην πραγματικότητα η ποσότητα $\Delta A_{600} = A_{600}([TA],[BSA]) - A_{600}(0,[BSA])$ για οποιαδήποτε συγκέντρωση BSA (A αντιστοιχεί στην απορρόφηση). Αυτή η ποσότητα είναι ίση με μηδέν, εκτός εάν η παρουσία ταννικού οξέος προκαλεί μετρήσιμη αύξηση της θολερότητας ενός διαλύματος βιοπολυμερούς.



Σχήμα 8.1: Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων TA / BSA σε pH = 4 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις BSA. Ένθετο: Κρίσιμες τιμές γραμμομοριακής αναλογίας στην οποία παρατηρείται έναρξη της αύξησης θολερότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης BSA.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η θολερότητα εξαρτάται τόσο από τους λόγους συγκέντρωσης των δύο συστατικών όσο και από τις απόλυτες τιμές των συγκεντρώσεων. Για κάθε συγκέντρωση BSA υπάρχει μια διαφορετική κρίσιμη συγκέντρωση TA στην οποία αρχίζει να εμφανίζεται θολερότητα λόγω μεγαλύτερης κλίμακας συσσωμάτωσης (Σχήμα 8.1 Ένθετο). Στο Σχήμα 8.2 παρουσιάζονται τα διαγράμματα θολερότητας του TA στα 600 nm παρουσία μεταβαλλόμενων συγκεντρώσεων SC σε pH = 7 (Σχήμα 8.2 α) και BSA σε pH = 4 και 7 (Σχήμα 8.2 β). Όπως φαίνεται στο ένθετο του Σχήματος 8.1 οι κρίσιμοι μοριακοί λόγοι σε pH = 4 είναι κοντά στο 10. Για τη BSA σε pH = 7 οι λόγοι αυτοί είναι στην περιοχή του 100 (Σχήμα 8.2 β). Επίσης στην περίπτωση του καζεϊνικού νατρίου (SC) (Σχήμα 8.2 α) δεν παρατηρείται να υπάρχουν κρίσιμοι λόγοι, συμπεριφορά που όπως θα σχολιαστεί και στη συνέχεια παρουσιάζουν οι πολυσακχαρίτες. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για την

πρωτεΐνη WPI σε pH = 7, ενώ σε pH = 4 φαίνεται να υπάρχουν για την WPI κρίσιμοι λόγοι κοντά στο 5. (Σχήμα 8.3 (α)).

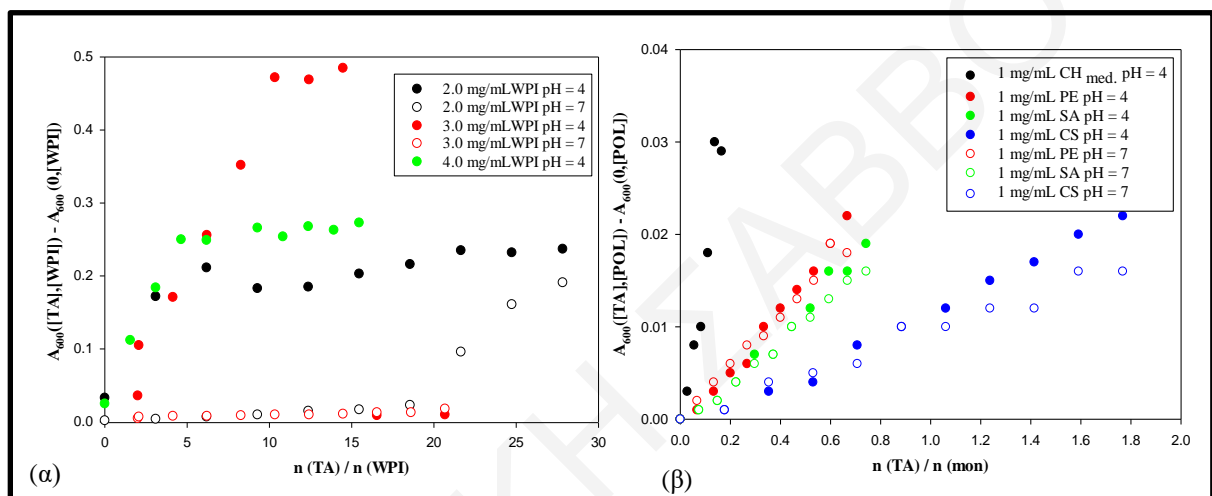


Σχήμα 8.2: Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων, (α) TA / SC σε pH = 7 και (β) TA / BSA σε pH = 4 και 7, ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις SC και BSA.

Η θολερότητα οφείλεται σε πολύπλοκες διαδικασίες και καθορίζεται από παράγοντες όπως το μέγεθος των σωματιδίων, το χρώμα του δείγματος, ο δείκτης διάθλασης και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων. (Wang et al. 2016, Zhan et al. 2018) Στα συστήματα που μελετάμε η αύξηση της θολερότητας πρέπει να αποδοθεί κυρίως στην συσσωμάτωση μεταξύ πρωτεϊνών όταν αυξηθεί η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που δρα γεφυρωτικά. Συγκεκριμένα κατά την αλληλεπίδραση του TA ($pK \approx 8.5$) με WPI ($pI_{\beta-Lg} = 5.3$ και $pI_{\alpha-Lg} = 5.1$) και BSA ($pI = 4.8$) σε pH 4 παρατηρείται ισχυρή σύζευξη WPI / TA και BSA / TA, λόγω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται, αφού σε αυτό το εύρος pH οι πρωτεΐνες είναι θετικά φορτισμένες και το TA βρίσκεται σε ουδέτερη μορφή. (Evdokimova et al. 2015) Εντούτοις το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται σε τιμή pH = 7, όπου οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες και το ταννικό οξύ έχει επίσης αρνητικό φορτίο, γεγονός που εμποδίζει την προσέγγιση και εξασθενίζει την αλληλεπίδραση. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται στην περίπτωση του SC ($pI \approx 5$) που σε pH = 7 παρουσιάζει αρνητικό φορτίο.

Στο Σχήμα 8.3 (β) παρουσιάζεται το διάγραμμα θολερότητας για τους τέσσερις πολυσακχαρίτες που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα. Παρατηρείται μια διαφορετική συμπεριφορά ως προς αυτή των πρωτεϊνών BSA και WPI. Τα δεδομένα που εμφανίζονται είναι για διαλύματα πολυσακχαριτών 1 mg/mL σε pH = 4 και 7. Μετρήσεις έχουν γίνει και για διαφορετικές συγκεντρώσεις, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν παρουσίαζαν αξιοσημείωτες διαφορές. Η τετμημένη είναι η αναλογία γραμμομορίων ταννικού οξέος ανά γραμμομόριο μονομερούς του πολυσακχαρίτη. Ο λόγος για αυτήν την επιλογή είναι ότι για αυτά τα φυσικά

βιοπολυμερή η κατανομή μοριακού βάρους είναι αρκετά ευρεία και αβέβαιη. Σε αυτά τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι η θολερότητα αυξάνεται σχεδόν γραμμικά ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ταννικού οξέος και δεν είναι ορατή κάποια κρίσιμη τιμή συγκέντρωσης όπως στην περίπτωση BSA. Οι ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις του ταννικού οξέος παρατηρήθηκαν με τη χιτοζάνη ($pK = 6.3$) και λιγότερο με την πηκτίνη ($pK = 3.5$). Η χιτοζάνη είναι σχεδόν αδιάλυτη σε $pH = 7$, αλλά οι υπόλοιποι πολυσακχαρίτες παρουσιάζουν παρόμοια θολερότητα σε $pH = 7$. Σε $pH = 4$ η θειική χονδροϊτίνη εξακολουθεί να είναι έντονα αρνητικά φορτισμένη, εξ ου και η σημαντικά ασθενέστερη αλληλεπίδρασή της με το ταννικό οξύ συγκριτικά με τους υπολοίπους πολυσακχαρίτες.



Σχήμα 8.3: Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων (α) TA / WPI σε $pH = 4$ και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις WPI και (β) TA / πολυσακχαρίτη σε $pH = 4$ και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαλύματα πολυσακχαρίτη $1 \text{ mg} / \text{mL}$ σε $pH = 4$ και 7 .

Από τα πειράματα αυτά φαίνεται ότι εκτός από ηλεκτροστατικά φαινόμενα οι αλληλεπιδράσεις καθορίζονται και από τις γεωμετρίες των μορίων. Το TA είναι μεγάλο και αρκετά επίπεδο μόριο που αλληλεπιδρά καλύτερα με συμπαγείς πρωτεΐνες που παρέχουν επιφάνεια ρόφησης, παρά με ευέλικτους πολυσακχαρίτες με διαμόρφωση σπείρας στο διάλυμα. Τα προηγούμενα πειράματα θολερότητας έχουν καθοδηγητικό ρόλο, αφού προσδιορίζουν την ένταση των αλληλεπιδράσεων των αντιοξειδωτικών με τους πολυηλεκτρολύτες και τις πρωτεΐνες στα υδατικά διαλύματα. Από τα πειράματα αυτά προκύπτει πως η BSA και η WPI αναπτύσσουν ισχυρές συζεύξεις με το TA σε $pH = 4$, καθώς επίσης και η χιτοζάνη και σε λιγότερο βαθμό η πηκτίνη. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με εκείνα που θα προκύψουν από τις υπόλοιπες μεθόδους, θα χρησιμοποιηθούν σε στοχευμένα πειράματα στις επιφάνειες και στα γαλακτώματα.

8.1.2 Αποτελέσματα πειραμάτων φθορισμού

8.1.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων απόσβεσης φθορισμού πρωτεϊνών

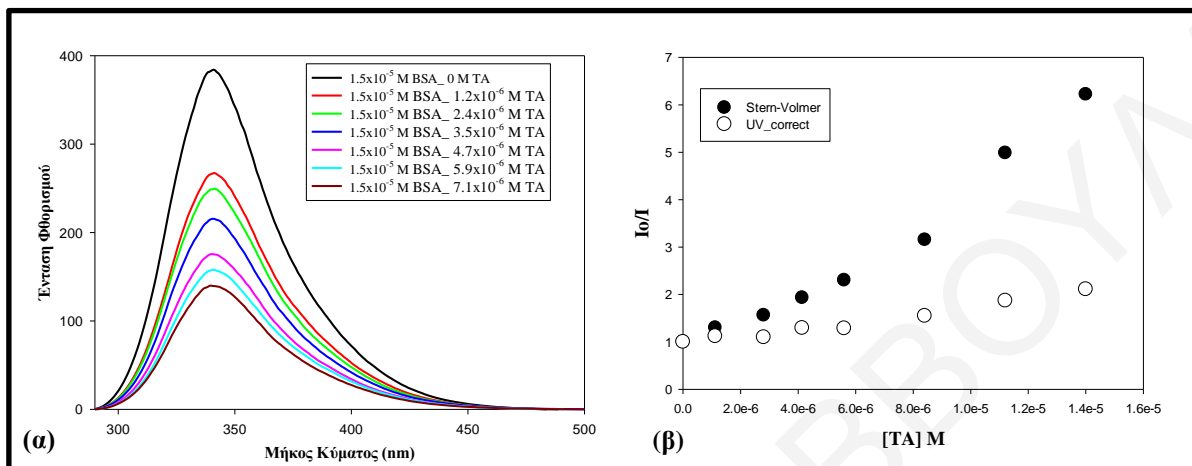
Μετρήθηκε ο φθορισμός των πρωτεϊνών BSA, WPI και SC παρουσία TA σε pH 4 και 7. Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.4 (α) φαίνονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού της BSA συγκέντρωσης 1.5×10^{-5} M σε διαφορετικές συγκεντρώσεις TA σε pH = 4. Με την διέγερση της πρωτεΐνης στα 280 nm προκύπτει κορυφή εκπομπής περίπου στα 340 nm, της οποίας η ένταση μειώνεται με τη διαδοχική προσθήκη TA. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις TA παρατηρείται σημαντική μείωση της έντασης εκπομπής, το οποίο αποτελεί ένδειξη κορεσμού του σημείου δέσμευσης του TA στην πρωτεΐνη. Επιπλέον παρουσία TA σε pH = 7 (Σχήμα Π.1 Παραρτήματος) παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση της κορυφής μέγιστης έντασης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (ερυθρή μετατόπιση). Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στη μείωση της υδροφοβικότητας γύρω από τα μόρια της πρωτεΐνης, πιθανώς λόγω της δημιουργίας επιφανειακών συζεύξεων που μεταβάλλουν το μικροπεριβάλλον γύρω από τα φθορίζοντα κατάλοιπα. (Li et al. 2017) Τα δεδομένα που ελήφθησαν από τις μετρήσεις φθορισμού έχουν αναλυθεί με την εξίσωση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) καθώς και με την Εξίσωση 6.5, αφού πρώτα έγινε διόρθωση λόγω του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου που συμβαίνει, μέσω της Εξίσωσης 6.7. Ο λόγος που καθιστά απαραίτητη τη διόρθωση αυτή είναι επειδή το TA παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στα 280 nm με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση της παρατηρούμενης έντασης κατά την εκπομπή λόγω αυτής της απορρόφησης. Αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό από τα αποτελέσματα του διαγράμματος I_0/I ως προς τη συγκέντρωση του TA που φαίνονται στο Σχήμα 8.4 (β). Η άμεση εφαρμογή της εξίσωσης Stern-Volmer στα αποτελέσματα φθορισμού δίνει πολύ μεγαλύτερες τιμές λόγου έντασης I_0/I συγκριτικά με τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά τη διόρθωση του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου. Επίσης πριν τη διόρθωση το διάγραμμα Stern Volmer δεν είναι γραμμικό και οδηγεί σε εσφαλμένα συμπεράσματα για πιθανό διπλό μηχανισμό απόσβεσης. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στις μετρήσεις φθορισμού της πρωτεΐνης BSA με TA σε pH = 7, που παρουσιάζονται στο Σχήμα Π.1 και Π.2 του Παραρτήματος. Στα διάγραμμα του Σχήματος 8.5 φαίνονται τα αποτελέσματα των Εξισώσεων 6.1 και 6.5 αντίστοιχα. Οι σταθερές φθορισμού K_{SV} ή K_Q , K_S και ο αριθμός n όλων των συστημάτων που μελετήθηκαν συγκεντρώνονται στον Πίνακα 8.1. Επίσης δίνονται και οι Εξισώσεις 6.1, 6.5 και 6.7 που χρησιμοποιούνται. Οι χρόνοι ημιζωής που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν από πειράματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού των πρωτεϊνών BSA και SC, των οποίων τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 9.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_Q\tau_0[Q]$$

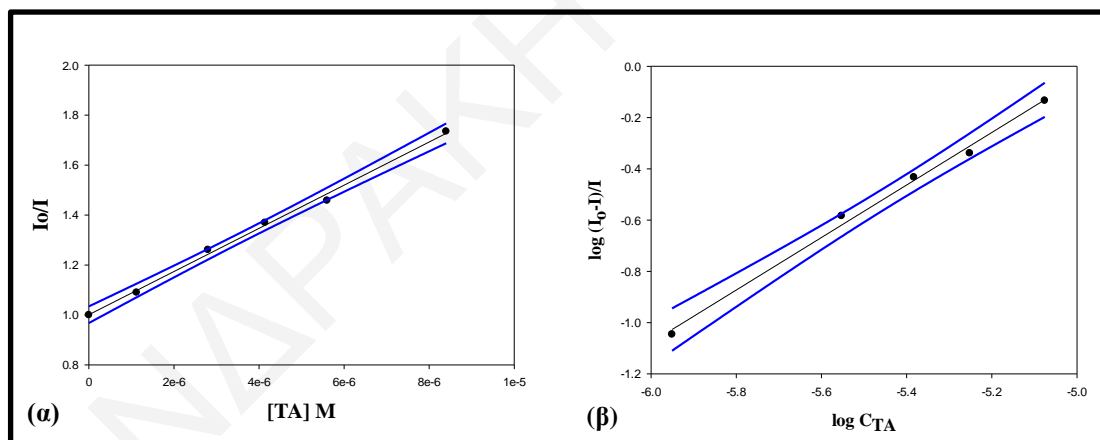
Εξίσωση 6.1

$$\log\left(\frac{I_0 - I}{I}\right) = \log K_s + n \log[Q] \quad \text{Εξίσωση 6.5}$$

$$I_{cor} = I_{obsd} 10^{\frac{(A_1 + A_2)}{2}} \quad \text{Εξίσωση 6.7}$$



Σχήμα 8.4: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA (0-7.1x10⁻⁶ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



Σχήμα 8.5: (α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια TA pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer, K_{sv}, και της σταθεράς K_Q και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_s και του αριθμού προσδεδωμένων μορίων TA ανά μόριο BSA, n. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

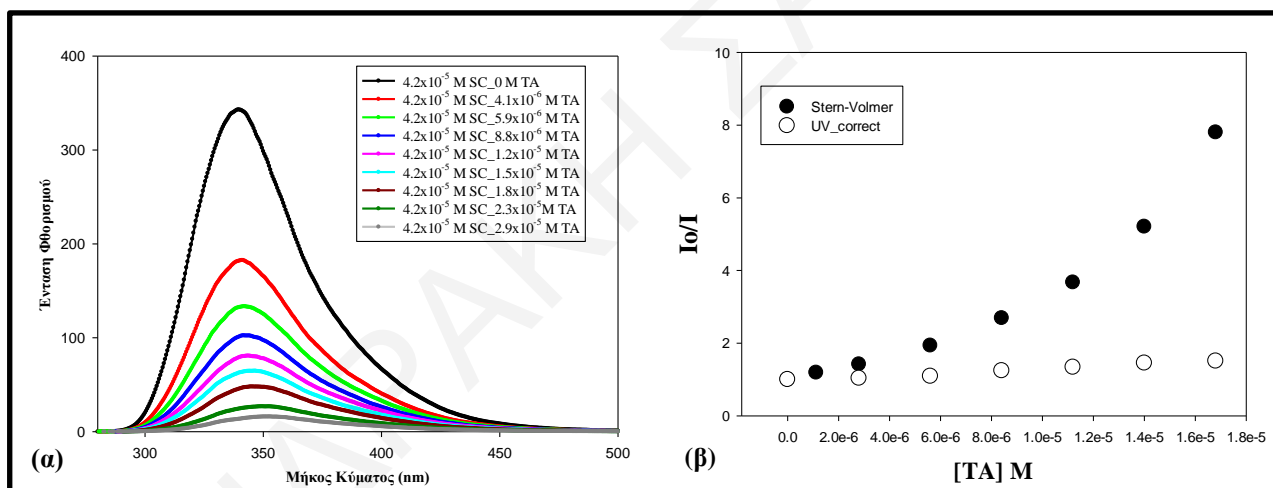
Πίνακας 8.1: Σταθερές απόσβεσης φθορισμού και ο αριθμός μορίων n αντιοξειδωτικών που προσδένονται σε ένα μόριο πρωτεΐνης.

Σύστημα	K _{sv} ή K (M ⁻¹)	K _Q (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _s (M ⁻¹)	n
BSA / TA, pH 4	(8.6 ± 0.6) × 10 ⁴	(1.24 ± 0.09) × 10 ¹³	(1.2 ± 0.6) × 10 ⁵	1.0 ± 0.1
BSA / TA, pH 7	(5 ± 1) × 10 ⁴	(7 ± 1) × 10 ¹²	(8 ± 5) × 10 ⁴	1.0 ± 0.2

WPI / TA, pH 4	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^4$	$(5.1 \pm 0.2) \times 10^{12}$	$(3 \pm 1) \times 10^4$	1.0 ± 0.1
WPI / TA, pH 7	$(3.5 \pm 0.7) \times 10^4$	$(7 \pm 1) \times 10^{12}$	$(4 \pm 1) \times 10^3$	0.8 ± 0.3
SC / TA, pH 7	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^4$	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^{12}$	$(1.1 \pm 0.5) \times 10^4$	0.9 ± 0.1

Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.6 (α) φαίνονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού του SC σε διαφορετικές συγκεντρώσεις TA σε pH = 7. Με διέγερση της πρωτεΐνης στα 280 nm προκύπτει κορυφή εκπομπής περίπου στα 340 nm, της οποίας η ένταση μειώνεται με τη διαδοχική προσθήκη TA και το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής μετατοπίζεται περισσότερο των 10 nm προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η αλλαγή στο μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής δηλώνει πως τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τυροσίνης βρίσκονται σε ένα λιγότερο υδρόφοβο περιβάλλον και πραγματοποιούνται αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης λόγω πρόσδεσης.

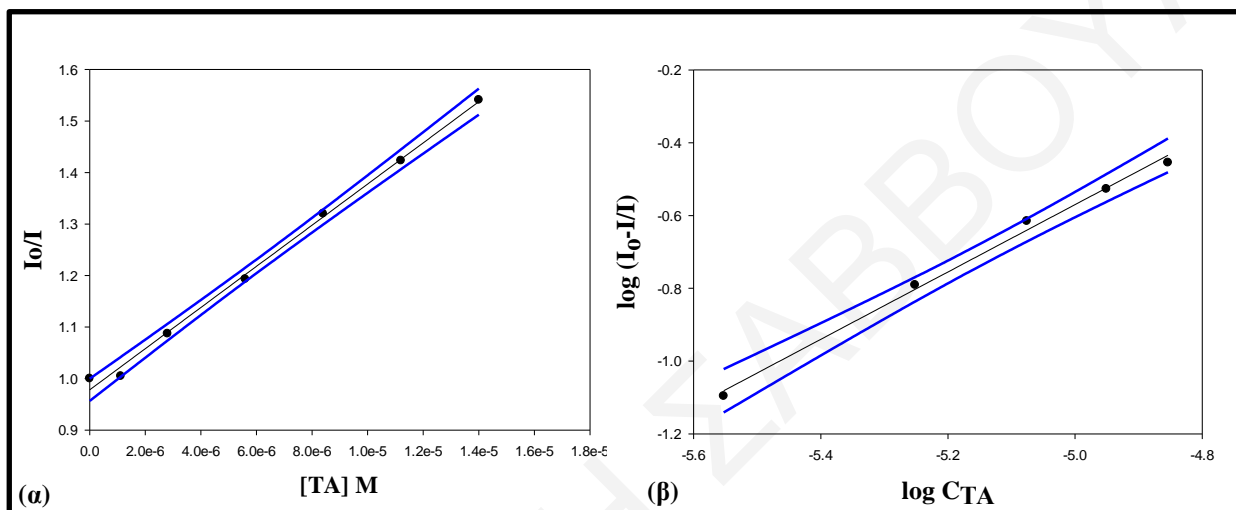
Στα διάγραμμα του Σχήματος 8.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης των Εξισώσεων 6.1 και 6.5 αντίστοιχα, και τα αποτελέσματα συνοφίζονται στον Πίνακα 8.1.



Σχήμα 8.6: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης SC σε pH 7, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-2.95 \times 10^{-5}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης SC από μόρια TA. Διορθωμένα (o) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.

Η διαδικασία της απόσβεσης, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, προκαλείται συνήθως από τη διαδικασία σύγκρουσης ή / και τον σχηματισμό ενός συμπλέγματος μεταξύ φθοροφόρου και αποσβέστη που αναφέρεται ως δυναμικός και στατικός μηχανισμός απόσβεσης, αντίστοιχα. Ωστόσο στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν παρατηρείται πως σε όλες τις περιπτώσεις αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών – TA η σταθερά K_D είναι υψηλότερη από τη μέγιστη αναμενόμενη δυναμική σταθερά απόσβεσης ($2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Wang et al. 2016), γεγονός που υποδεικνύει ότι η διαδικασία απόσβεσης μεταξύ των πρωτεϊνών και του TA οφείλεται κυρίως σε μη-ομοιοπολική σύζευξη. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης BSA

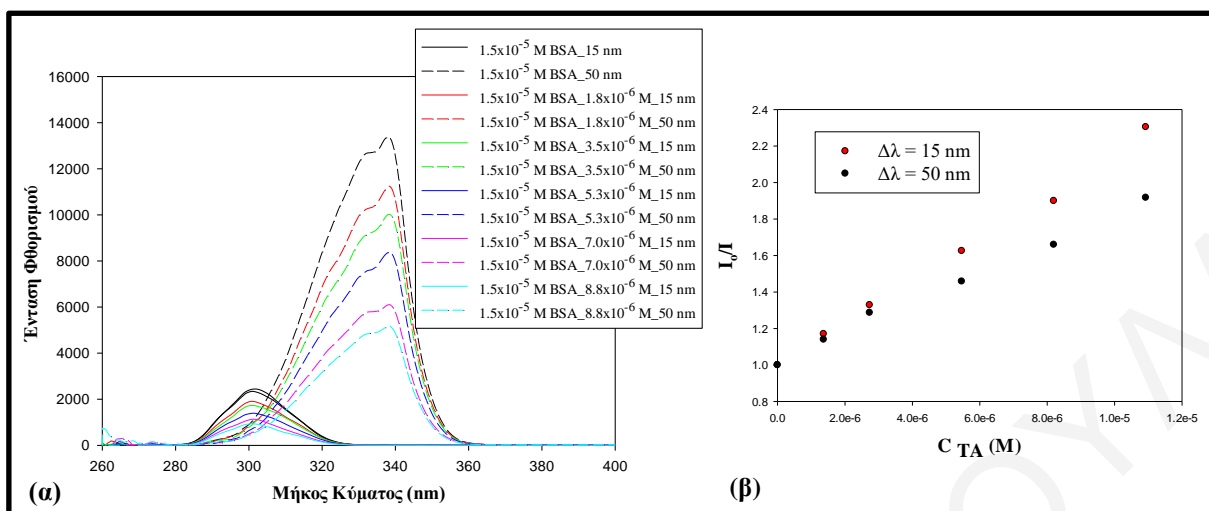
παρατηρείται πως οι σταθερές πρόσδεσης K_s που προσδιορίστηκαν μέσω της Εξίσωσης 6.5 είναι λίγο μεγαλύτερες από αυτές που προσδιορίστηκαν για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να αποδοθεί είτε στη γεωμετρία των μορίων, με το TA να αλληλεπιδρά καλύτερα με συμπαγείς πρωτεΐνες, είτε στις επιφανειακές ιδιότητες (φορτίο, υδροφοβικότητα, ομάδες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου) της BSA. Η τιμή n είναι για όλα τα συστήματα κοντά στη μονάδα γεγονός που φανερώνει πως ένα μόριο TA κατά βάση αρκεί για να αποσβέσει το φθορισμό των φθοροφόρων ομάδων της πρωτεΐνης.



Σχήμα 8.7: α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης SC από μόρια TA σε pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer K_{sv} ή της σταθεράς K_Q και β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_s και του αριθμού n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

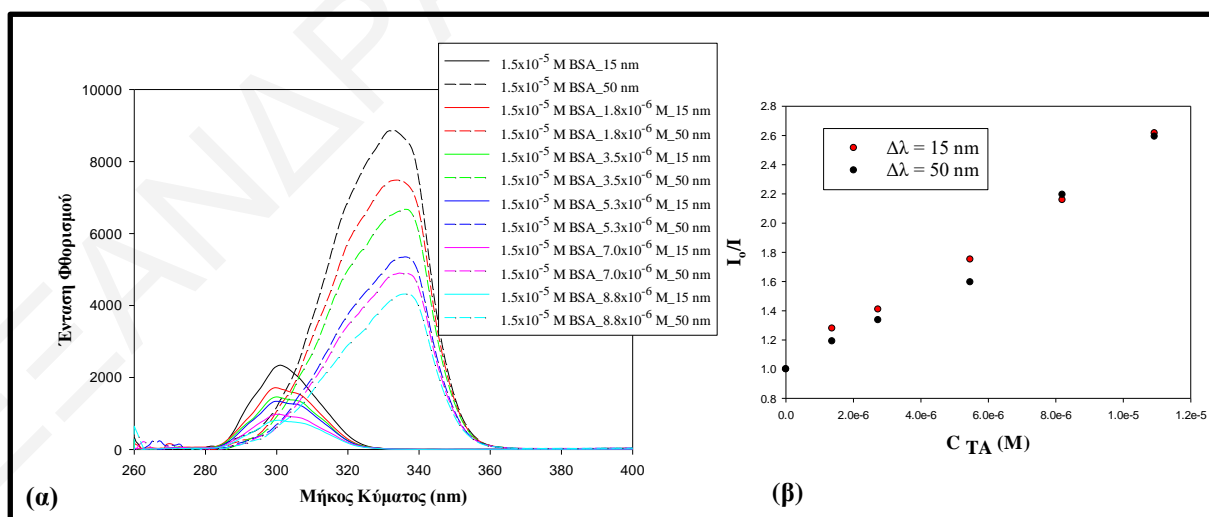
8.1.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων σύγχρονου φθορισμού

Τα σύγχρονα φάσματα φθορισμού μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό περιβάλλον που περιβάλλει τα μόρια της πρωτεΐνης. Η επίδραση του TA στα σύγχρονα φάσματα φθορισμού των πρωτεϊνών μελετήθηκε για $\Delta\lambda = 15$ nm (φθορισμός Tyr) και 50 nm (φθορισμός Trp). Στο Σχήμα 8.8 (α) φαίνεται η επίδραση του TA στα σύγχρονα φάσματα φθορισμού της BSA σε pH = 4. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται πως το μέγιστο εκπομπής των καταλοίπων Tyr είχε μια ελαφρά μετατόπιση προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, το οποίο έδειξε ότι η πολικότητα γύρω από τα κατάλοιπα Tyr αυξήθηκε και η υδροφοβικότητα μειώθηκε ελαφρά. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για τα κατάλοιπα Trp, τα οποία μετατοπίζονται σε ένα λιγότερο υδρόφοβο περιβάλλον και είναι πιο εκτεθειμένα στο διάλυμα. Παρατηρείται λοιπόν, ότι σε pH = 4 η αλληλεπίδραση μεταξύ TA και BSA αλλάζει το μικροπεριβάλλον γύρω από τα κατάλοιπα Tyr και Trp. Επιπλέον συγκρίνοντας της απόσβεση φθορισμού των δύο αυτών τύπων καταλοίπων (Σχήμα 8.8 β), διαπιστώνεται ότι η σχετική απόσβεση του φθορισμού της Tyr είναι μεγαλύτερη από αυτή της Trp.



Σχήμα 8.8: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.

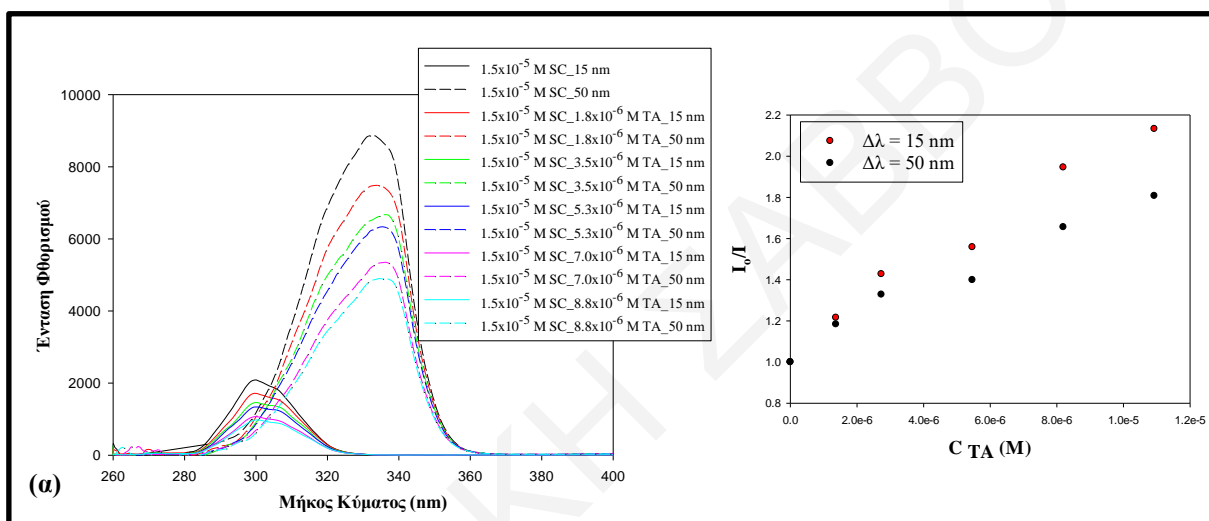
Αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της BSA παρατηρήθηκαν και σε pH = 7, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό από αυτές σε pH = 4 (Σχήμα 8.9 α), αφού δεν παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής και οι σταθερές απόσβεσης Stern-Volmer των δύο τύπων καταλοίπων φαίνεται να είναι παραπλήσιες (Σχήμα 8.9 β). Αυτή η συμπεριφορά, όπως και στα πειράματα θολερότητας, πιθανό να οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται σε pH = 4 ενώ σε pH = 7 δυσχεραίνονται. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για την WPI της οποίας τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα Π.5 και Π.6.



Σχήμα 8.9: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.

Στο Σχήμα 8.10 (α) φαίνεται η επίδραση του TA στα σύγχρονα φάσματα φθορισμού του SC σε pH = 7. Σε αντίθεση με τις ασθενείς αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν για το σύστημα

BSA / TA σε pH = 7, το SC φαίνεται να παρουσιάζει ισχυρότερες, αν και τα δύο μόρια σε αυτές τις συνθήκες είναι αρνητικά φορτισμένα. Υπάρχουν ουσιαστικά τέσσερις τύποι μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο κατά την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών – προσδέτων. Πρόκειται κυρίως για δυνάμεις Van der Waals, δεσμούς υδρογόνου, ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Στην περίπτωση του SC σε pH = 7 φαίνεται πως οι δυνάμεις που καθορίζουν την αλληλεπίδραση είναι οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται και αλλάζουν το μικροπεριβάλλον της πρωτεΐνης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.10 κάνοντάς το λιγότερο υδρόφοβο καθώς παρατηρείται ισχυρή μετατόπιση της μέγιστης κορυφής.

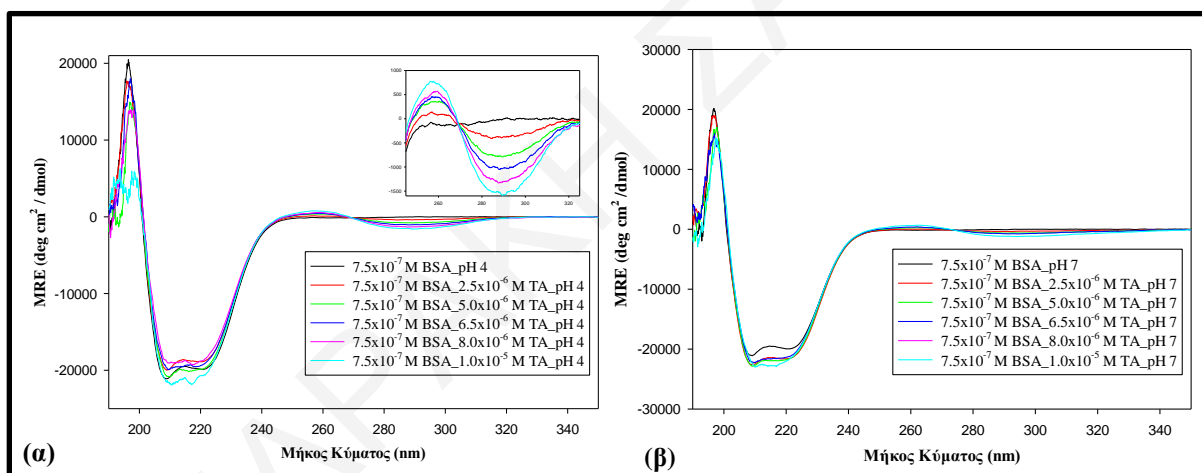


Σχήμα 8.10: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης SC σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA (0-8.8 x10⁻⁶ M) για Δl = 15 nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.

8.1.3 Αποτελέσματα πειραμάτων κυκλικού διχρωισμού (CD)

Οι διαμορφωτικές μεταβολές στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία CD. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η ελλειπτικότητα μέσου κατάλοιπου – MRE (mean residue ellipticity). Τα ποσοστά κάθε τύπου δευτεροταγούς δομής υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου SELCON3 (από το σύνολο προγραμμάτων Dicroprot) και έγινε προσαρμογή μόνο στο εύρος 190-250 nm, γιατί ο θόρυβος σε χαμηλά μήκη κύματος ήταν μεγάλος. Οι αριθμοί των καταλοίπων για τον υπολογισμό της MRE είναι 583 για την πρωτεΐνη BSA, 162 για την WPI και 209 για το SC. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 8.2 για την πρωτεΐνη BSA. Στο Σχήμα 8.11 παρουσιάζονται τα φάσματα CD της πρωτεΐνης BSA παρουσία TA σε pH = 4 και 7. Παρατηρείται μια θετική κορυφή κοντά στα 195 nm και δύο αρνητικές κορυφές κοντά στα 208 και 222 nm που οφείλονται στο χαρακτηριστικό φάσμα της α-ελικοειδούς δομής πρωτεΐνης. Επιπλέον, σε pH = 4 παρατηρείται

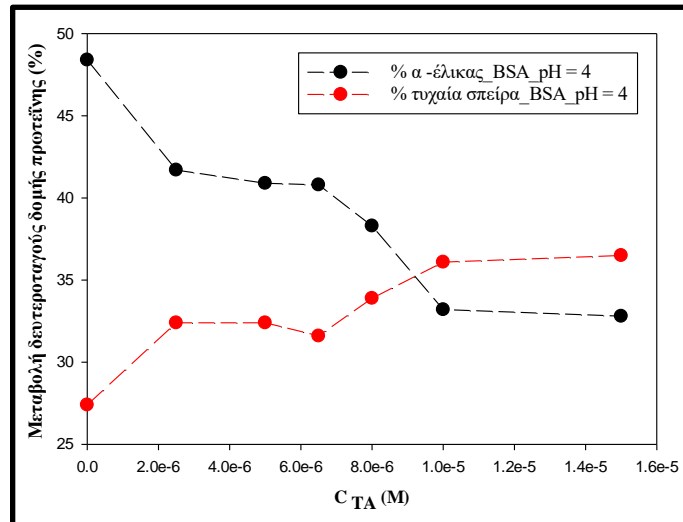
πως με αύξηση της συγκέντρωσης του ΤΑ ελαττώνεται το ποσοστό της α-έλικας στη BSA και αυξάνει το ποσοστό τυχαίας σπείρας. Από τις αντίστοιχες μελέτες σε pH = 7 παρατηρείται πως με αύξηση του ΤΑ δεν αλλάζει συστηματικά το ποσοστό της α-έλικας στη BSA, αλλά ούτε και αυξάνει ξεκάθαρα το ποσοστό τυχαίας σπείρας. Αυτές οι συμπεριφορές μπορούν να φανούν ξεκάθαρα από τα διαγράμματα του Σχήματος 8.12. Γενικά η αλληλεπίδραση ΤΑ με BSA σε αυτό το pH φαίνεται να είναι πολύ ασθενέστερη από ότι για pH = 4, επειδή τόσο η πρωτεΐνη όσο και το ταννικό οξύ φέρουν αρνητικό φορτίο, γεγονός που εμποδίζει την αλληλεπίδραση. Επομένως, τα αποτελέσματα του CD υποδηλώνουν ότι το ΤΑ προκαλεί διαμορφωτική αλλαγή στη δευτερογενή δομή της πρωτεΐνης όταν συνδέεται σε συγκεκριμένη θέση δέσμευσης. Στην περιοχή του εγγύς UV (250 – 330 nm) παρατηρείται σήμα ελλειπτικότητας με μορφή κυματισμού παρουσία του ΤΑ (Σχήμα 8.11 (α) ένθετο). Το σήμα αυτό μπορεί να οφείλεται στην αυτό-συσσωμάτωση των αντιοξειδωτικών. Με αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού το σήματα αυξάνεται λόγω εμφάνισης υπερμοριακής χειρομορφίας (supramolecular chirality) κατά την συσσωμάτωση. (Gavara et al. 2013)



Σχήμα 8.11: Φάσματα CD για τα συστήματα 7.5×10^{-7} M BSA και $(0-1.0 \times 10^{-5})$ M TA (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.

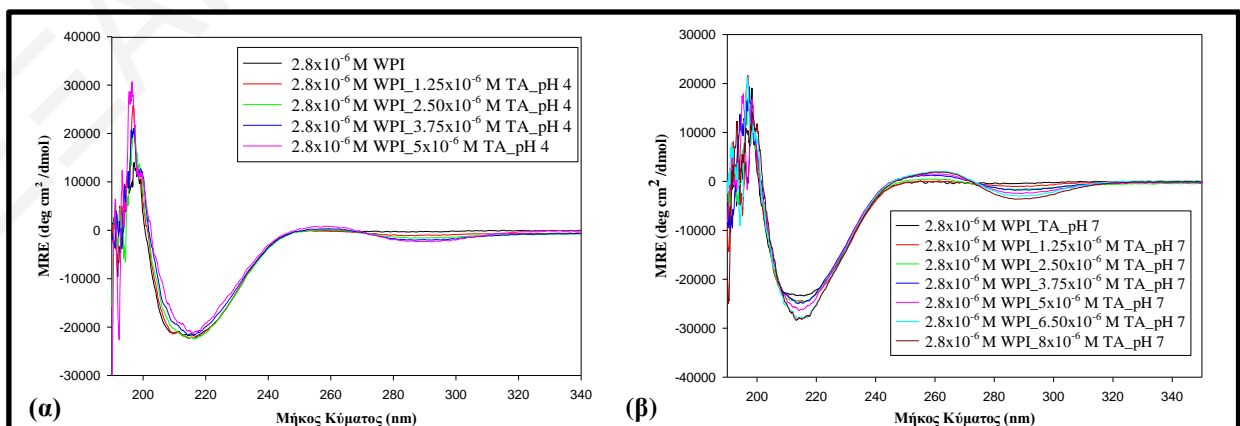
Πίνακας 8.2: Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ΤΑ σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 7.5×10^{-7} M.

Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού	% α-έλικας		% β-πτυχωτής επιφάνειας		% στροφής		% έλικα – πολυπρολόνης		% τυχαία σπείρα		RMS σφάλμα	
	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7
BSA 7.5×10^{-7} M 0 M TA	48.4	45.5	8.1	13.5	15.8	8.3	2.4	6.2	27.4	29.9	1.2	2.0
2.5×10^{-6} M TA	41.7	48.5	14.2	10.8	11.7	12.1	4.6	2.7	32.4	26.2	1.3	1.9
5.0×10^{-6} M TA	40.9	42.9	14.3	12.3	11.0	14.1	5.4	2.7	32.4	28.9	1.5	1.7
6.5×10^{-6} M TA	40.8	46.9	15.9	9.0	10.5	17.2	5.1	2.2	31.6	28.7	1.3	1.2
8.0×10^{-6} M TA	38.3	---	15.0	---	12.0	---	4.8	---	33.9	---	1.5	---
10.0×10^{-6} M TA	33.2	41.4	17.8	13.8	12.1	11.3	4.9	5.3	36.1	39.0	2.9	1.8
15.0×10^{-6} M TA	32.8	42.4	17.5	11.8	13.3	15.3	6.1	3.9	36.5	30.6	2.0	2.0



Σχήμα 8.12: Μεταβολή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε pH 4.

Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης WPI εμφανίζει ένα τυπικό σχήμα αρνητικού ελάχιστου περίπου στα 215 nm υποδεικνύοντας την παρουσία δομής β-πτυχωτής επιφάνειας. Τα φάσματα CD της πρωτεΐνης WPI σε pH = 4 και 7 φαίνονται στο Σχήμα 8.13. Η ελλειπτικότητα της αρνητικής κορυφής της WPI μειώνεται ελαφρώς με την σταδιακή προσθήκη TA χωρίς να φαίνεται να υπάρχει συστηματική επίδραση με αύξηση της συγκέντρωσης του TA. Η συμπεριφορά αυτή επιβεβαιώνεται και από τα ποσοστά κάθε τύπου δευτεροταγούς δομής για την πρωτεΐνη WPI που συνοψίζονται στον Πίνακα 8.3 και παρουσιάζονται και στο Σχήμα 8.14 (β). Ωστόσο, στα αποτελέσματα του Πίνακα 8.3 φαίνεται ότι το ποσοστό της β-πτυχωτής επιφάνειας είναι μικρό. Πιθανώς ο θόρυβος που υπάρχει σε χαμηλές τιμές μήκους κύματος δυσκόλεψε την σωστή προσαρμογή. Από τα αποτελέσματα CD παρατηρείται ασθενέστερη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης WPI με το TA σε σχέση με την πρωτεΐνη BSA, συμπεριφορά που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα του σύγχρονου φθορισμού.



Σχήμα 8.13: Φάσματα CD για τα συστήματα (α) 2.8×10^{-6} M WPI και $(0-5.0 \times 10^{-6}$ M) TA σε pH 4 και (β) 2.8×10^{-6} M WPI και $(0-8.0 \times 10^{-6}$ M) TA σε pH 7.

Πίνακας 8.3: Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης WPI (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 2.8×10^{-6} M.

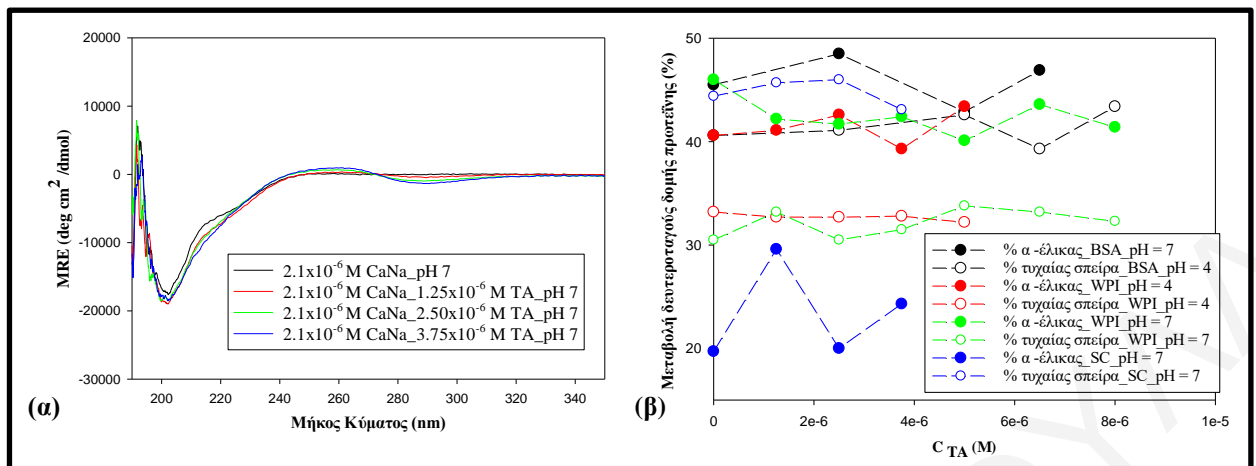
Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού	% α -έλικας		% β-πτυχωτής επιφάνειας		% στροφής		% έλικα – πολυπρολίνης		% τυχαία σπείρα		RMS σφάλμα	
	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7
WPI 2.8×10^{-6} M												
0 M TA	40.6	46.0	15.1	12.0	13.3	10.1	2.5	3.5	33.2	30.5	1.5	1.8
1.25×10^{-6} M TA	41.1	42.2	13.8	6.5	10.7	18.9	6.1	2.6	32.7	33.2	1.7	2.5
2.5×10^{-6} M TA	42.6	41.7	12.9	13.2	8.3	15.1	7.2	3.4	32.7	30.5	2.1	1.9
3.75×10^{-6} M TA	39.3	42.4	15.5	4.7	7.8	18.9	7.1	2.4	32.8	31.5	1.4	2.7
5.0×10^{-6} M TA	43.4	40.1	8.3	14.7	9.0	9.0	7.6	6.8	32.2	33.8	2.4	2.0
6.5×10^{-6} M TA	---	43.6	---	4.7	---	21.1	---	2.3	---	33.2	---	1.8
8.0×10^{-6} M TA	---	41.4	---	11.5	---	15.3	---	3.1	---	32.3	---	2.8

Η δευτεροταγής δομή του SC δίνει ένα φάσμα με μέγιστη αρνητική ελλειπτικότητα μέσου υπολείμματος στα 200 nm και έναν ώμο μεταξύ 210 και 230 nm, το οποίο είναι ενδεικτικό δομής τυχαίας σπείρας (Σχήμα 8.14 α). Παρουσία TA η μέγιστη αρνητική μέση ελλειπτικότητα καταλοίπων στα 200 nm αυξάνεται και μετατοπίζεται ελαφρά προς μεγαλύτερα μήκη κύματος χωρίς να φαίνεται να υπάρχει συστηματική επίδραση της συγκέντρωσης του TA στη δευτεροταγή δομή του SC. Η συμπεριφορά αυτή επιβεβαιώνεται και από τα ποσοστά κάθε τύπου δευτεροταγούς δομής για την πρωτεΐνη SC που συνοψίζονται στον Πίνακα 8.4 και παρουσιάζονται και στο Σχήμα 8.14 (β).

Πίνακας 8.4: Μεταβολή δευτεροταγούς δομής του SC (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε σταθερή συγκέντρωση SC 2.8×10^{-7} M σε pH 7.

Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού	% α -έλικας	% β-πτυχωτής επιφάνειας	% στροφής	% έλικα – πολυπρολίνης	% τυχαία σπείρα	RMS σφάλμα
0 M TA	19.7	14.2	15.1	10.7	44.4	1.2
1.25×10^{-6} M TA	29.6	5.3	13.7	8.6	45.7	1.6
2.5×10^{-6} M TA	20.0	12.5	15.0	10.1	46.0	1.4
3.75×10^{-6} M TA	24.3	12.6	14.3	9.4	43.1	1.0

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μελέτες CD παρατηρείται πως σαφής επίδραση στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών παρατηρείται μόνο στη περίπτωση της BSA σε pH = 4, παρόλο που μέχρι τώρα από τα αποτελέσματα θολερότητας και φθορισμού φαίνεται κάποιος βαθμός αλληλεπίδρασης και με την πρωτεΐνη WPI.



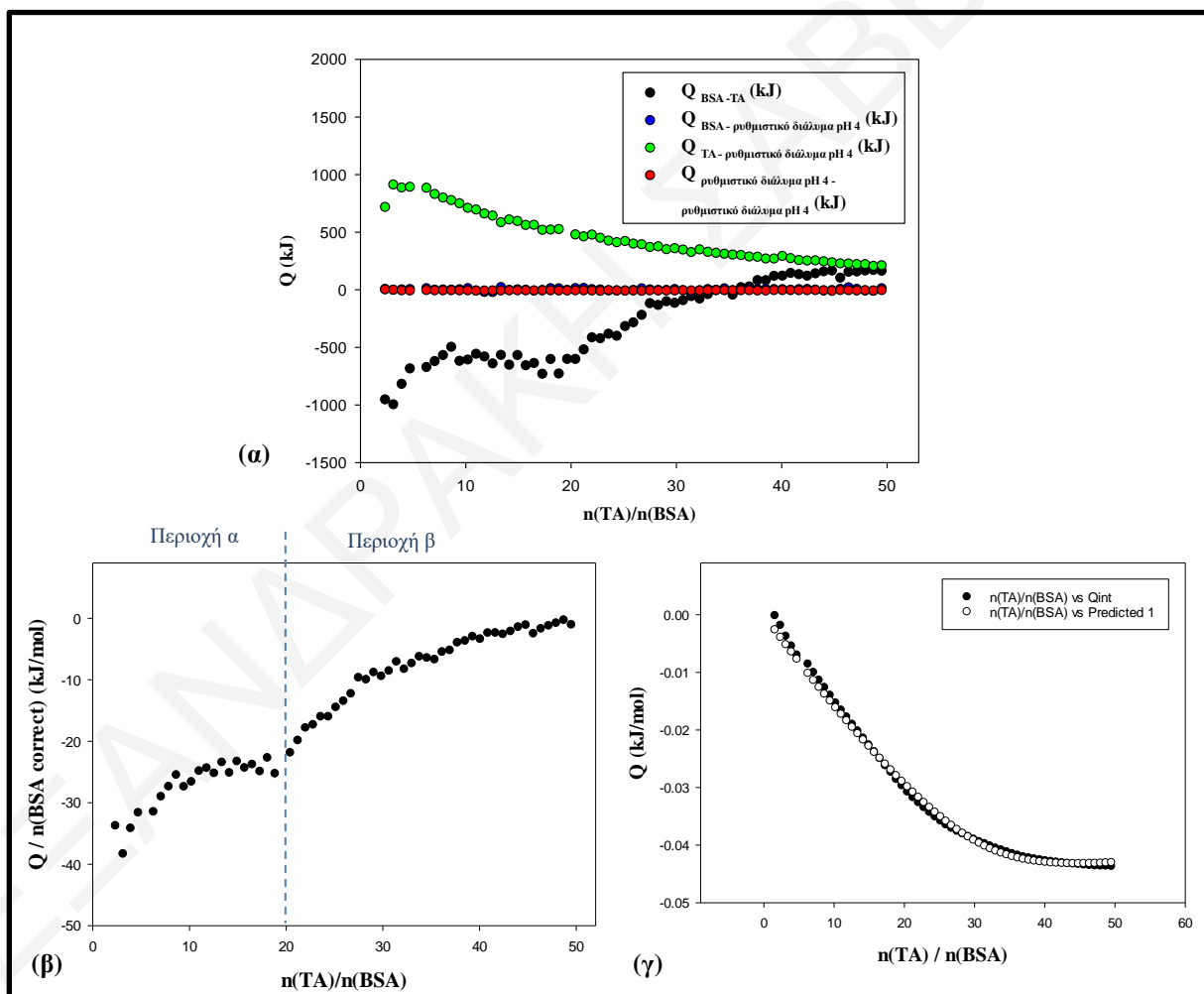
Σχήμα 8.14: (α) Φάσματα CD για το σύστημα 2.1×10^{-6} M SC και $0-3.75 \times 10^{-6}$ M TA σε pH 7 και (β) Μεταβολή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA, WPI και SC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TA σε pH 4 και 7.

8.1.4 Αποτελέσματα πειραμάτων θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Μελετήθηκε η θερμοδυναμική συμπεριφορά των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης – TA μέσω της θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Στο Σχήμα 8.15 (β) φαίνεται το θερμόγραμμα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol BSA για την τιτλοδότηση 9,7610 mM TA σε 0,0497 mM BSA σε pH = 4 στους 25 ° C. Οι θερμότητες που εμφανίζονται στα σχήματα προκύπτουν από διόρθωση με τις θερμότητες αραίωσης, όπως περιγράφεται από την Εξίσωση 6.14. Η εφαρμογή της Εξίσωσης 6.14 στα θερμογράμματα που προκύπτουν κατά τη μελέτη της αντίδρασης BSA-TA φαίνεται στο Σχήμα 8.15 (α) κατά τα οποία γίνεται διόρθωση με τις θερμότητες αραίωσης.

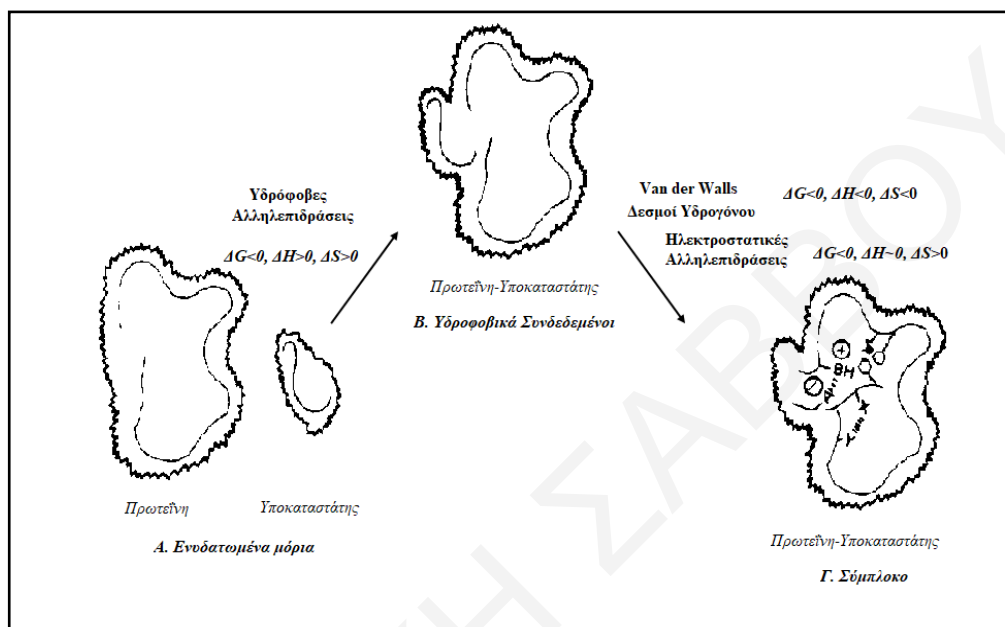
Η δέσμευση του TA στην πρωτεΐνη BSA δείχνει μια εξώθερμη αντίδραση, χαρακτηριστικό των δεσμών υδρογόνου και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 8.16). Κάθε έγχυση του TA στο διάλυμα BSA οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές της θερμότητας, υποδηλώνοντας αλληλεπίδραση μεταξύ του TA και της BSA. Η αλληλεπίδραση χωρίζεται σε δύο περιοχές (Σχήμα 8.15 β). Στην αρχή της τιτλοδότησης και μέχρις ότου η γραμμομοριακή αναλογία TA / BSA φθάσει γύρω στο 18 (Σχήμα 8.15, περιοχή α), η θερμότητα αυξάνεται. Στην δεύτερη περιοχή παρατηρείται ένα ελάχιστο και μετά η θερμότητα συνεχίζει να αυξάνει. Η παρουσία του ελαχίστου υποδεικνύει ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC, η μια από τις οποίες πρέπει να συνδέεται με δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης και παρατηρείται σε προσθήκες μεγαλύτερης ποσότητας TA. Όπως είναι εμφανές από τα θερμογράμματα, οι θερμικές αλληλεπιδράσεις εκτείνονται σε μεγάλους γραμμομοριακούς λόγους mol TA / mol BSA. Συγκεκριμένα στο θερμόγραμμα του Σχήματος 8.15 (β) παρατηρούνται να πραγματοποιούνται δύο φαινόμενα το πρώτο με γραμμομοριακό λόγο mol TA / mol BSA γύρω στα 10 και το δεύτερο φαινόμενο μεγαλύτερο του 40. Αξίζει να σημειωθεί

πως είναι από τις ελάχιστες μελέτες στις οποίες οι αλληλεπιδράσεις μελετώνται σε μεγάλους γραμμομοριακούς λόγους, καθώς οι πλείστες περιορίζονται σε πολύ χαμηλούς γραμμομοριακούς λόγους. Με σκοπό να μελετηθεί εκτενέστερα η ενεργειακή συμπεριφορά των αλληλεπιδράσεων έγινε προσαρμογή των σιγμοειδών καμπύλων των ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης πάνω στην ολοκληρωτική θερμότητα για να προσδιοριστεί η ενθαλπία και ο αριθμός n (Εξίσωση 6.18) (Σχήμα 8.15 γ). Μέσω της προσαρμογής του μοντέλου προσδιορίστηκε ο γραμμομοριακός λόγος $\text{mol TA} / \text{mol BSA} = 33$, $\Delta H = -34.5 \text{ kJ/mol}$ και $K_b = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Εφαρμόζοντας τα αποτελέσματα στις Εξισώσεις 6.20 και 6.21 προκύπτει $\Delta G = -25.0 \text{ kJ/mol}$ και $\Delta S = -32 \text{ J/molK}$. Με βάση τα πρόσημα των θερμοδυναμικών παραμέτρων προκύπτει πως οι αλληλεπιδράσεις που κυριαρχούν είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης και του TA (Σχήμα 8.16).

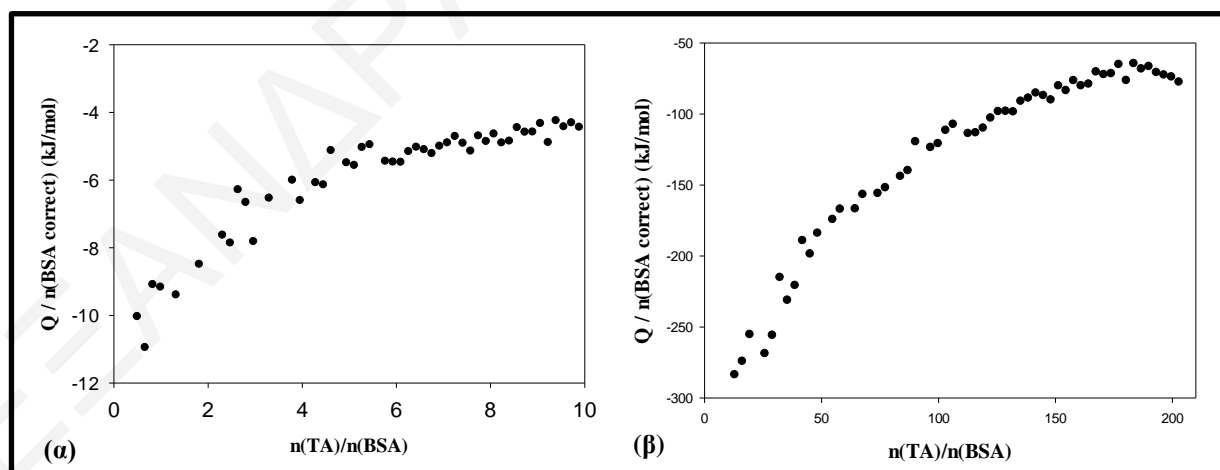


Σχήμα 8.15: (α) Θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία $\text{mol TA} / \text{mol BSA}$ για την τιτλοδότηση $9,7610 \text{ mM TA}$ σε $0,0497 \text{ mM BSA}$ και τα πειράματα αραίωσης, (β) Θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία $\text{mol TA} / \text{mol BSA}$ για την τιτλοδότηση $9,7610 \text{ mM TA}$ σε $0,0497 \text{ mM BSA}$ σε $\text{pH} = 4$ στους 25°C και (γ) ολοκληρωτική θερμότητα από το ίδιο πείραμα και η προσαρμογή του μοντέλου ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης σε αυτή.

Στο Σχήμα 8.17 (α) και (β) φαίνονται τα διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol BSA για την προσθήκη 9,2002 mM TA σε 0,2234 mM BSA και 8,9115 mM TA σε 0,011 mM BSA σε pH = 7 στους 25 ° C, αντίστοιχα. Από τα θερμογράμματα αυτά παρατηρείται να επεκτείνονται οι αλληλεπιδράσεις σε μεγάλες γραμμομοριακές αναλογίες, καθώς οι ενθαλπίες δεν καταλήγουν στο μηδέν.



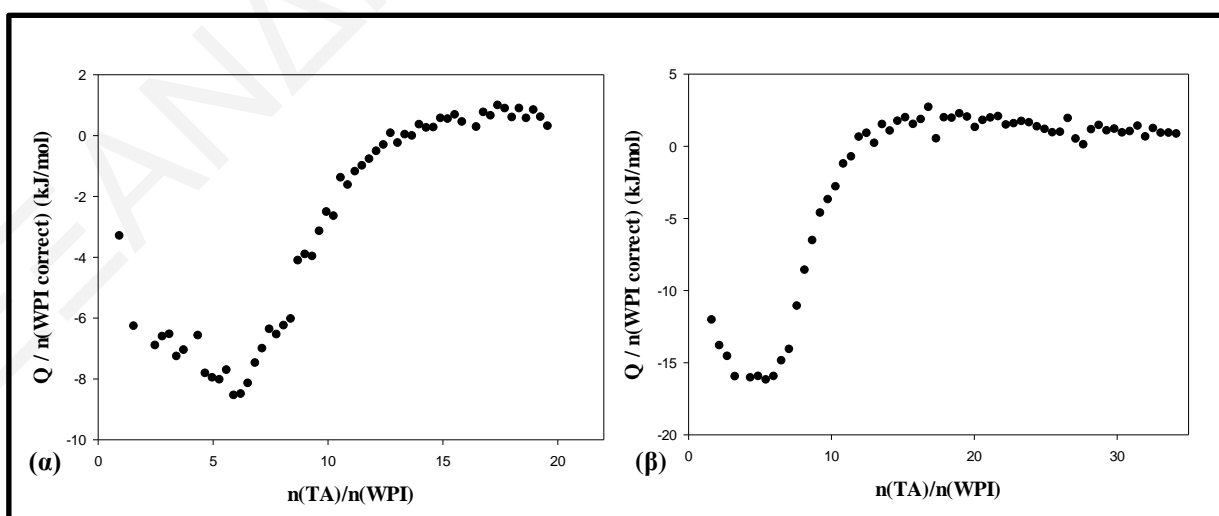
Σχήμα 8.16: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας πρόσδεσης πρωτεϊνών με υποκαταστάτη. (Ross P. D., Subramanian S., 1981)



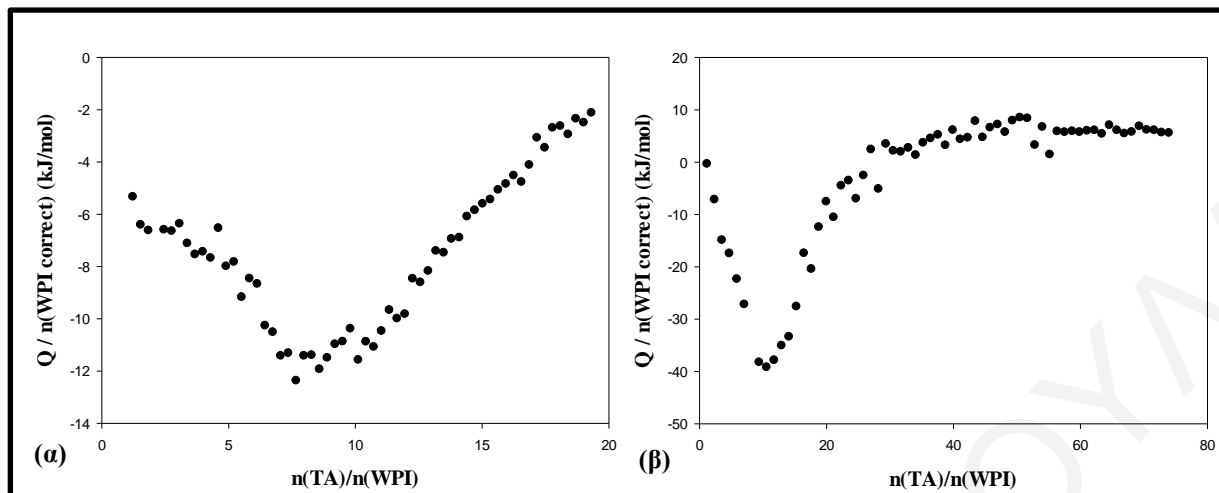
Σχήμα 8.17: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 9,2002 mM TA σε 0,2234 mM BSA και (β) 8,9115 mM TA σε 0,011 mM BSA σε pH = 7 στους 25 ° C.

Οι θερμοδυναμικές ιδιότητες της αλληλεπίδρασης δέσμευσης μεταξύ του TA και της πρωτεΐνης WPI διερευνήθηκαν επίσης με τη μέθοδο ITC και τα αποτελέσματα φαίνονται στα

θερμογράμματα του Σχήματος 8.18 σε $\text{pH} = 4$. Στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν η αλληλεπίδραση δείχνει εξώθερμο χαρακτήρα, ωστόσο μικρότερης έντασης συγκριτικά με αυτή της πρωτεΐνης BSA. Στο θερμογράμμα του Σχήματος Π.10 (α) του Παραρτήματος παρατηρείται πως μεταξύ ίδιας συγκέντρωσης πρωτεΐνης αλλά πολύ μεγαλύτερης συγκέντρωσης TA η αντίδραση είναι ενδόθερμη. Σε αυτά τα συστήματα όπου συμβαίνουν διάφορα παράλληλα φαινόμενα έχουν σημασία και οι απόλυτες συγκεντρώσεις εκτός από τον λόγο $\text{mol TA} / \text{mol}$ πρωτεΐνης. Επίσης σε αυτές τις απόλυτες συγκεντρώσεις στο διάλυμα αναπτύσσονται συσσωματώματα με αποτέλεσμα τα διαλύματα να παρουσιάζουν θολερότητα. Τα δύο θερμογράμματα του Σχήματος 8.18 χωρίζονται σε δύο περιοχές, οι οποίες μεταξύ τους διαχωρίζονται από την ύπαρξη ενός ελαχίστου. Η παρουσία του ελαχίστου υποδεικνύει ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC, η μια από τις οποίες ίσως συνδέεται με δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης ή με συσσωμάτωση και παρατηρείται σε προσθήκες μεγαλύτερης ποσότητας TA. Οι γραμμομοριακοί λόγοι στους οποίους παρατηρούνται τα δύο αυτά φαινόμενα ($\text{mol TA} / \text{mol WPI}$) είναι 2,5 και 10 αντίστοιχα. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ του TA και της πρωτεΐνης WPI σε $\text{pH} = 7$ (Σχήμα 8.19). Οι συμπεριφορές δεν παρατηρούνται στα φάσματα CD, όμως εκεί είναι αδύνατον να χρησιμοποιηθούν οι υψηλές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο ITC. Από τα πειράματα θολερότητας σε $\text{pH} = 4$ παρατηρείται αύξηση της θολερότητας από πολύ χαμηλές γραμμομοριακές αναλογίες $\text{mol TA} / \text{mol WPI}$, ενώ σε $\text{pH} = 7$ η αύξηση παρατηρείται σε μεγαλύτερες γραμμομοριακές αναλογίες $\text{mol TA} / \text{mol WPI}$ περίπου ίση με 25. Ωστόσο τα φαινόμενα αυτά παρατηρήθηκαν σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές που μελετήθηκαν στα πειράματα ITC (Σχήμα 8.3 α).

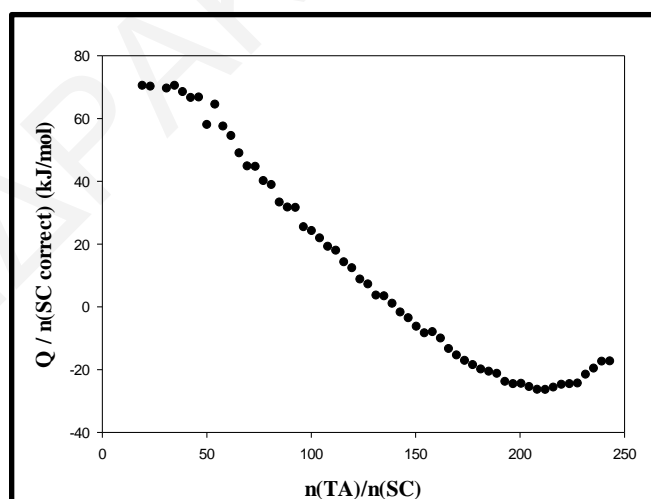


Σχήμα 8.18: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία $\text{mol TA} / \text{mol WPI}$ για την τιτλοδότηση (α) 2.4848mM TA σε 0.032 mM WPI και (β) 9.7610 mM TA σε 0,1020 mM WPI σε $\text{pH} = 4$, στους 25 °C.



Σχήμα 8.19: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol WPI για την τιτλοδότηση (α) 2.4788 mM TA σε 0.0323 mM WPI σε pH = 7 και (β) 9.4808 mM TA σε 0.0323 mM WPI σε pH 7 στους 25 ° C

Τέλος στο Σχήμα 8.20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το θερμοδυναμικό χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης του TA με το SC. Από το θερμογράμμα παρατηρείται πως σε χαμηλούς γραμμομοριακούς λόγους (< 50) η θερμότητα είναι σταθερή και μειώνεται σε μεγαλύτερους γραμμομοριακούς λόγους. Η αντίδραση αρχικά είναι ενδόθερμη και μετά από ένα αριθμό εγχύσεων η θερμότητα μειώνεται και η αλληλεπίδραση εξελίσσεται σε εξώθερμη.



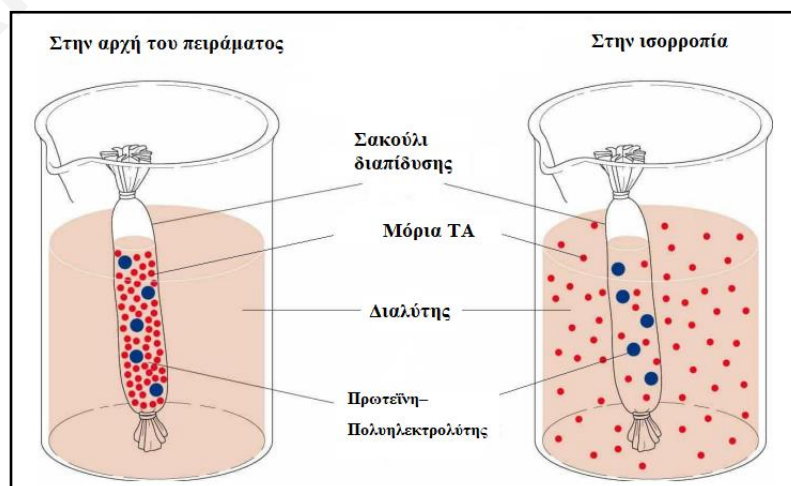
Σχήμα 8.20: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol SC για την τιτλοδότηση 8,2664 mM TA σε 0.0098 mM SC σε pH 7 στους 25 ° C

Η ενδόθερμη αλληλεπίδραση πραγματοποιείται όταν αναπτύσσονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων. (Ross & Subramanian 1981) Η συμπεριφορά αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί στο μόριο του SC λόγω της μη αναδιπλούμενης δομής του και των υδρόφοβων περιοχών του κατά μήκος της αλυσίδας του. Επιπλέον σε αυτές τις συνθήκες pH

το SC είναι αρνητικά φορτισμένο και το ταννικό οξύ έχει επίσης αρνητικό φορτίο, γεγονός που εμποδίζει την προσέγγιση και εξασθενίζει την αλληλεπίδραση. Με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας TA πιθανό να πραγματοποιούνται δομικές αλλαγές στο SC και να αναπτύσσονται ευκολότερα δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των μορίων, χαρακτηριστικό των εξώθερμων αλληλεπιδράσεων. (Ross & Subramanian 1981) Και πάλι αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις δεν ελέγχονται δυστυχώς με CD, όπου οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις είναι δυστυχώς πολύ χαμηλές, αλλά από τα πειράματα θολερότητας παρατηρείται αυξημένη θολερότητα γεγονός που δηλώνει την συσσωμάτωση μεταξύ του SC και του TA. Ωστόσο από τα πειράματα θολερότητας για τα συστήματα του SC δεν παρατηρείται κρίσιμη συγκέντρωση TA, στην οποία να αρχίζει να εμφανίζεται η θολερότητα.

8.1.5 Αποτελέσματα πειραμάτων διαπίδυσης

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση του TA με την BSA και τη χιτοζάνη πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαπίδυσης (dialysis). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διαπίδυσης από κυτταρίνη, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 12-14 kDa. Ωστόσο, αυτή η αποκοπή μοριακού βάρους ίσως είναι οριακή για κάποια από τα βιομόρια (όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος για την WPI) τα οποία έχουν μοριακό βάρος κοντά σε αυτή την τιμή. Είναι σημαντικό στα πειράματα αυτά να μην εξέρχεται ποσότητα των βιομορίων προς το ρυθμιστικό διάλυμα, αφού η ανάλυση των δεδομένων βασίζεται στην απορρόφηση UV-Vis του TA. Γι' αυτό πριν από κάθε πείραμα διεξαγόταν δοκιμή με βιομόρια απουσία αντιοξειδωτικού, για να διαπιστωθεί η μη διαπερατότητα της μεμβράνης από πρωτεΐνες ή πολυσακχαρίτες. Τα μόρια TA θα διαχέονται ελεύθερα δια μέσου της μεμβράνης και θα επιτυγχάνουν ισορροπία σε ολόκληρο τον όγκο του διαλύματος. Στην ισορροπία, η τελική συγκέντρωση του TA εξαρτάται από τους όγκους των διαλυμάτων εντός και εκτός της σακούλας. Μια τυπική διαδικασία πειραμάτων διαπίδυσης φαίνεται στο Σχήμα 8.21.



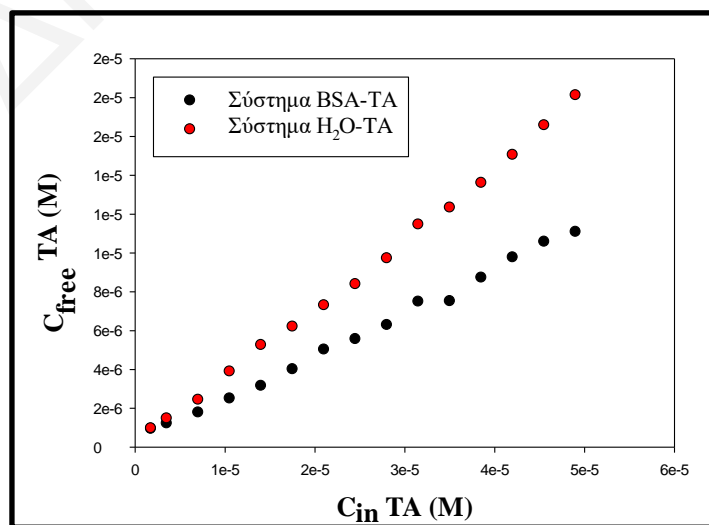
Σχήμα 8.21: Σακούλι διαπίδυσης στην αρχή του πειράματος και στην ισορροπία.

Η ανάλυση των πειραμάτων διαπίδυσης βασίζεται στην Εξίσωση 6.31 η οποία εξηγήθηκε στο θεωρητικό μέρος. Η παράμετρος D , η οποία έχει διαστάσεις όγκου, λαμβάνεται από τη γραμμική σχέση μεταξύ των $[L]_{free} = [L]_{eq}$ και $[L]_{in}$ σε πείραμα που γίνεται στην απουσία βιομορίων, όπως φαίνεται στο διάγραμμα του Σχήματος 8.22. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν έλεγχος της απορρόφησης UV-Vis του TA στα 275 nm, μέχρις ότου παρατηρηθεί σταθερή απορρόφηση. Όπου χρειαζόταν γινόταν 5 φορές αραιώση για να μετρηθεί η απορρόφηση. Η συγκέντρωση του «ελεύθερου» TA υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας μια καμπύλη βαθμονόμησης απορρόφησης σε συνάρτηση της συγκέντρωσης TA που φαίνεται στο Σχήμα Π.11 του Παραρτήματος.

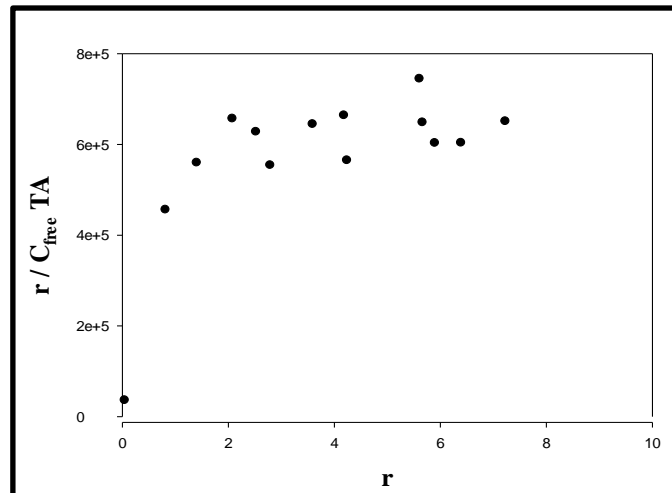
$$[L]_{in} V_{in} = [L]_{eq} V_{tot} + n_{ads} + n_b = [L]_{eq} V_{tot} + D[L]_{eq} + n_b \Rightarrow n_b = [L]_{in} V_{in} - (V_{tot} + D)[L]_{eq}$$

Εξίσωση 6.31

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του TA με την πρωτεΐνη BSA πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαπίδυσης και η συγκέντρωση του TA κυμαινόταν από 1.7×10^{-6} M μέχρι 4.9×10^{-6} M ενώ η συγκέντρωση της BSA ήταν σταθερή στα 2.5×10^{-8} M. Αφού προκύψει η παράμετρος D από το διάγραμμα του Σχήματος 8.22 (α) πραγματοποιείται πείραμα διαπίδυσης παρουσία του βιομορίου ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Σχήμα 8.22 (β)). Από την $[L]_{free}$ υπολογίζεται ο αριθμός προσδεμένων mol TA σε πρωτεΐνες, n_b , με βάση την Εξίσωση 6.31. Από το n_b υπολογίζεται στη συνέχεια ο λόγος $r = \frac{n_b}{n_M}$ (mol προσδεμένης ουσίας ανά mol μακρομορίου). Από τα αποτελέσματα κατασκευάζεται διάγραμμα Scatchard $r/[L]_{free}$ ως προς r που παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.23.

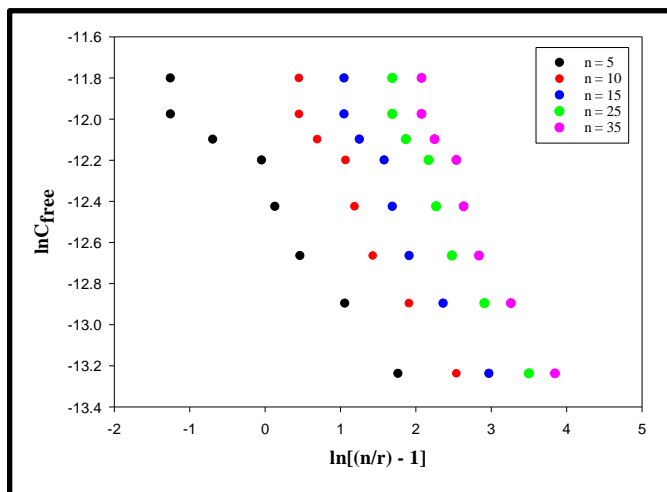


Σχήμα 8.22: Διαγράμματα συγκέντρωσης «ελεύθερου» TA ως προς τη συγκέντρωση του αρχικού TA για πειράματα διαπίδυσης σε μεμβράνη που περιέχει μόνο TA σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4 (●) και σε μεμβράνη που περιέχει TA-BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4 (●).



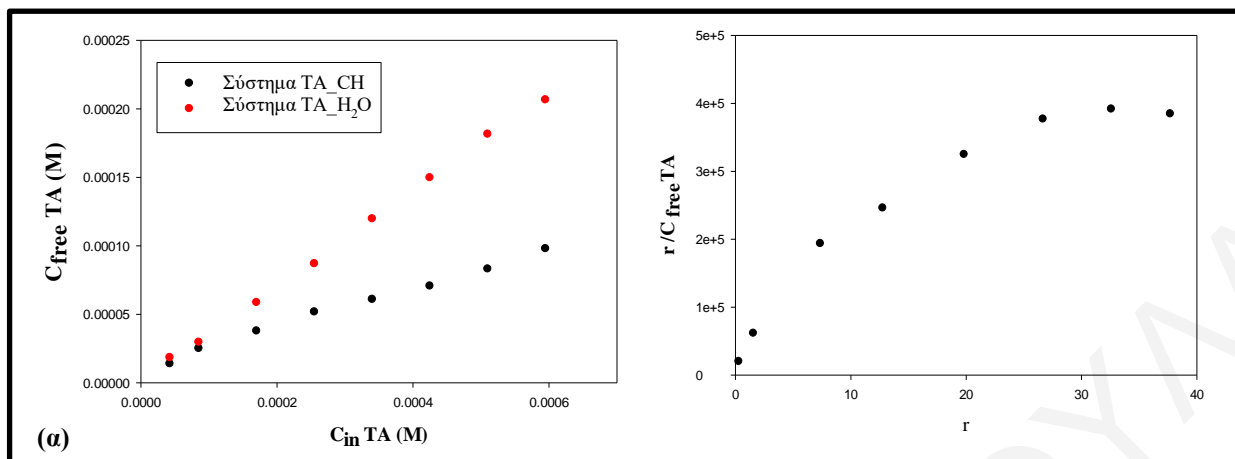
Σχήμα 8.23: Γραφική παράσταση Scatchard πειράματος διαπίδυσης TA-BSA pH 4.

Με βάση τη μορφή του διαγράμματος Scatchard $r/[L]_{free}$ ως προς r προκύπτουν πληροφορίες όσον αφορά τις θέσεις δέσμευσης στο μακρομόριο και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών που προσδένονται στο μακρομόριο. Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στο Υποκεφάλαιο 6.4, η αλληλεπίδραση του TA με BSA σε pH = 4 αναμένεται να έχει τη μορφή του διαγράμματος Scatchard που φαίνεται στο Σχήμα 6.6 (β), με αναμενόμενη τετμημένη του διαγράμματος στο Σχήμα 8.23 να τείνει στο γραμμομοριακό λόγο mol TA / mol BSA της αλληλεπίδρασης. Η μορφή του διαγράμματος Scatchard καμπύλη προς τα κάτω, φανερώνει το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των υποκαταστατών που προσδένονται διαδοχικά σε ένα μακρομόριο. Για να μελετηθεί η συνέργεια χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 6.37, μια τροποποιημένη μορφή της Εξίσωσης Hill, από την οποία μπορεί να υπολογιστεί ο εκθέτης Hill α_H μέσω της κλίσης $-1/\alpha_H$ του διαγράμματος $\ln(L)$ συνάρτηση του $\ln[(n/v) - 1]$, ενώ από την τεταγμένη $-\ln K$ υπολογίζεται η σταθερά πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα του Σχήματος 8.24. Από τις προσαρμογές ως καλύτερη προσέγγιση για το n (αριθμός μορίων ταννικού ανά μόριο BSA) προκύπτει η περιοχή τιμών 10-15, και ο συντελεστής Hill είναι στην περιοχή 1.4-1.5. Ωστόσο όλες οι ευθείες έχουν συγκρίσιμο R^2 και το συμπέρασμα είναι πολύ προσεγγιστικό. Προκύπτει επίσης ότι $-\ln K \approx -11.4 \pm 0.2$ και $K \approx 9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \pm 8 \times 10^3$ σε αδρή συμφωνία με τιμές για τη σταθερά πρόσδεσης που δίνουν οι μέθοδοι φθορισμού.

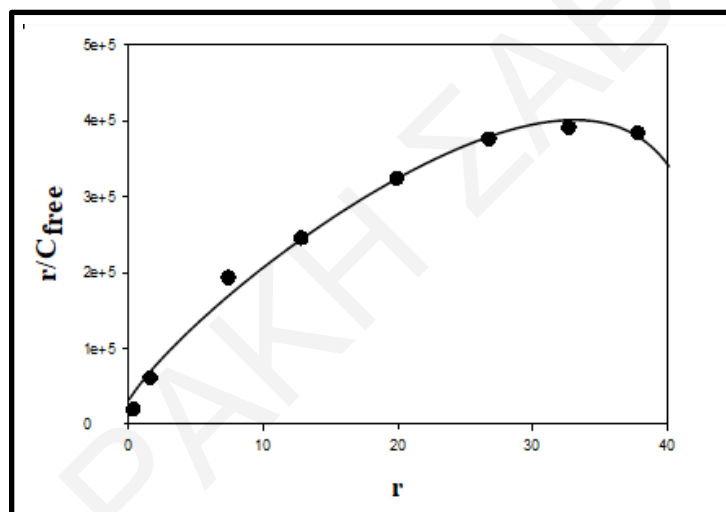


Σχήμα 8.24: Διαγράμματα τροποποιημένης μορφής της Εξίσωσης Hill, από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά a_H μέσω της κλίσης $-1/a_H$ του διαγράμματος για το σύστημα BSA-TA.

Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά τη μελέτη των πειραμάτων διαπίδυσης στα συστήματα TA με χιτοζάνη (Σχήμα 8.25 και Σχήμα Π.12). Η συγκέντρωση του TA κυμαινόταν από 4.2×10^{-5} M μέχρι 5.9×10^{-4} M ενώ η συγκέντρωση της χιτοζάνης ήταν σταθερή στα 8.3×10^{-6} M. Και σε αυτή την περίπτωση το διάγραμμα Scatchard είχε μορφή κοίλη προς τα κάτω και φανερώνει τη συνεργιστική συμπεριφορά των μορίων TA που προσδένονται στη χιτοζάνη. Η μορφή του διαγράμματος Scatchard οφείλεται στο φαινόμενο όπου κατά τη δέσμευση του υποκαταστάτη L με l διαδοχικές μονάδες σε μακρομόριο με N επαναλαμβανόμενες μονάδες αναπτύσσεται το φαινόμενο της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των υποκαταστατών που προσδένονται. (Cantor & Schimmel 1980) Αυτή η συμπεριφορά ερμηνεύεται χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 6.34, η οποία εφαρμόζεται στα αποτελέσματα του διαγράμματος Scatchard. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.26. Από τα αποτελέσματα της προσαρμογής προκύπτει τιμή $l = 14.1 \pm 0.7$, δηλαδή 14 μονομερή της χιτοζάνης για κάθε μόριο ταννικού, $\omega = 280 \pm 80$ τιμή η οποία δηλώνει τη συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων ταννικού. Κάθε μόριο που προσδέεται βοηθάει να προσδεθούν και άλλα και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ελκτικά κατά την πρόσδεσή τους πάνω στην αλυσίδα χιτοζάνης. Η σταθερά k είναι σταθερά διάστασης και υπολογίστηκε ίση με 0.020 ± 0.005 M, τιμή που δηλώνει την ασθενή αλληλεπίδραση του ταννικού με τη χιτοζάνη. Η αντίστοιχη σταθερά πρόσδεσης θα ήταν μόλις ίση με 50 M^{-1} . Ωστόσο αυτή η τιμή του k είναι εξαιρετικά αμφίβολη, επειδή δεν υπάρχουν περισσότερα πειραματικά σημεία σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ταννικού οξέος.



Σχήμα 8.25: (α) Διαγράμματα συγκέντρωσης «ελεύθερου» TA ως προς τη συγκέντρωση του αρχικού TA για πειράματα διαπίδυσης σε μεμβράνη που περιέχει μόνο TA σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4 (●) και σε μεμβράνη που περιέχει TA-CH σε pH 4 (●) και (β) Γραφική παράσταση Scatchard πειράματος διαπίδυσης TA-CH pH 4.



Σχήμα 8.26: Προσαρμογή του συνεργιστικού μοντέλου της Εξίσωσης 6.34 πάνω στο διάγραμμα Scatchard του Σχήματος 8.25 (β).

8.1.6 Σύνοψη αποτελεσμάτων πρώτου σταδίου

Η αλληλεπίδραση των μορίων του TA με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες παρατηρήθηκε από τις πρώτες κιόλας μετρήσεις των πειραμάτων θολερότητας. Στα συστήματα του TA παρατηρήθηκε ισχυρή σύζευξη με τις πρωτεΐνες BSA και WPI σε pH 4, λόγω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται, αφού σε αυτό το εύρος pH οι πρωτεΐνες είναι θετικά φορτισμένες και το TA βρίσκεται σε ουδέτερη μορφή. Εντούτοις το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε σε τιμή pH = 7, όπου οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες και το ταννικό οξύ έχει επίσης αρνητικό φορτίο, γεγονός που εμποδίζει την προσέγγιση και εξασθενίζει την αλληλεπίδραση. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε στην περίπτωση του SC που σε pH = 7 παρουσιάζει αρνητικό φορτίο. Οι κρίσιμοι μοριακοί λόγοι σε pH = 4 για το σύστημα BSA / TA

προσδιορίστηκαν κοντά στο 10, ενώ για τη BSA σε pH = 7 οι λόγοι ήταν στην περιοχή του 100. Επίσης στην περίπτωση του SC σε pH = 7 δεν παρατηρήθηκαν να υπάρχουν κρίσιμοι λόγοι. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για τα αποτελέσματα της πρωτεΐνης WPI σε pH = 7, ενώ σε pH = 4 οι κρίσιμοι λόγοι ήταν κοντά στο 5. Όσο αφορά τις αλληλεπιδράσεις του TA με πολυσακχαρίτες, παρατηρήθηκε ισχυρή αλληλεπίδραση με τη χιτοζάνη και λιγότερο με την πηκτίνη. Στα συστήματα που μελετάμε η αύξηση της θολερότητας αποδίδεται κυρίως στην συσσωμάτωση μεταξύ πρωτεϊνών όταν αυξηθεί η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που δρα γεφυρωτικά. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως η θολερότητα φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τους λόγους συγκέντρωσης του TA και της πρωτεΐνης όσο και από τις απόλυτες τιμές των συγκεντρώσεων, αφού για κάθε συγκέντρωση BSA υπάρχει μια διαφορετική κρίσιμη συγκέντρωση TA στην οποία αρχίζει να εμφανίζεται θολερότητα λόγω μεγαλύτερης κλίμακας συσσωμάτωσης.

Οι μελέτες φθορισμού των αλληλεπιδράσεων του TA με τα βιομόρια επικεντρώθηκαν σε πειράματα απόσβεσης φθορισμού των πρωτεϊνών από τα μόρια του TA και σε πειράματα σύγχρονου φθορισμού. Με την διέγερση των τριών πρωτεϊνών στα 280 nm προκύπτει κορυφή εκπομπής περίπου στα 340 nm, της οποίας η ένταση μειώνεται με τη διαδοχική προσθήκη TA λόγω της απόσβεσης που προκαλεί στις πρωτεΐνες. Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση της κορυφής μέγιστης έντασης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, γεγονός που δηλώνει τη μείωση της υδροφοβικότητας γύρω από τα μόρια της πρωτεΐνης, πιθανώς λόγω της δημιουργίας επιφανειακών συζεύξεων που μεταβάλλουν το μικροπεριβάλλον γύρω από τα κατάλοιπα. Υπολογίστηκαν οι σταθερές K_{sv} και K_s για να διερευνηθεί αν η διαδικασία της απόσβεσης χαρακτηρίζεται από δυναμικό και στατικό χαρακτήρα. Στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε πως σε όλες τις περιπτώσεις η σταθερά K_Q είναι υψηλότερη από τη μέγιστη αναμενόμενη δυναμική σταθερά απόσβεσης ($2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), γεγονός που υποδεικνύει ότι η διαδικασία απόσβεσης μεταξύ των πρωτεϊνών και του TA οφείλεται κυρίως σε μη-ομοιοπολική σύζευξη. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης BSA παρατηρήθηκε πως οι σταθερές πρόσδεσης K_s που προσδιορίστηκαν ήταν λίγο μεγαλύτερες από αυτές που προσδιορίστηκαν για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες, ίσως λόγω της γεωμετρία των μορίων της BSA και του TA, που ευνοούν επιφανειακή ρόφηση του TA και ισχυρότερη αλληλεπίδραση. Από τα πειράματα σύγχρονου φθορισμού επιβεβαιώθηκαν οι ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ του TA και των πρωτεϊνών BSA/ WPI σε pH = 4 αφού παρατηρήθηκε αλλαγή στο μικροπεριβάλλον γύρω από τα κατάλοιπα Tyr και Trp αυξάνοντας την πολικότητά τους. Επιπλέον η απόσβεση του φθορισμού της Tyr ήταν μεγαλύτερη από αυτή της Trp. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για το SC σε pH = 7.

Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών μελετήθηκε με τη μέθοδο CD. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μελέτες παρατηρήθηκε πως το TA προκαλεί επίδραση στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης BSA σε $pH = 4$. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε πως με αύξηση της συγκέντρωσης του TA ελαττώνεται το ποσοστό της α -έλικας στη BSA και αυξάνει το ποσοστό τυχαίας σπείρας. Για τις δύο άλλες πρωτεΐνες WPI και SC δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στη δευτεροταγή δομή τους παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TA. Ωστόσο σε αυτά τα συστήματα υπάρχει μεγάλος θόρυβος σε μήκη κύματος κάτω των 200 nm που εμποδίζει την προσαρμογή των δεδομένων για υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής.

Η θερμοδυναμική μελέτη της αλληλεπίδρασης του TA με την πρωτεΐνη BSA έδειξε ένα εξώθερμο χαρακτήρα. Επίσης στα θερμογράμματα παρατηρήθηκαν τουλάχιστο δύο διαφορετικές περιοχές γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC, μια από τις οποίες πρέπει να συνδέεται με δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης και παρατηρείται σε προσθήκες μεγαλύτερης ποσότητας TA. Στα αποτελέσματα έγινε προσαρμογή του απλού μοντέλου ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης πάνω στην ολοκληρωτική θερμότητα και προσδιορίστηκε ο γραμμομοριακός λόγος $\text{mol TA} / \text{mol BSA} = 33$, η $\Delta H = -34.5 \text{ kJ/mol}$ και η $K_b = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Όμοιες περίπλοκες συμπεριφορές παρατηρήθηκαν και για την πρωτεΐνη WPI, όπου και πάλι οι αλληλεπιδράσεις παρουσιάζουν εξώθερμο χαρακτήρα. Ωστόσο στην περίπτωση του SC σε $pH = 7$ η αλληλεπίδραση είχε ενδόθερμο χαρακτήρα. Σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν οι γραμμομοριακοί λόγοι των αλληλεπιδράσεων ήταν αρκετές δεκάδες, γεγονός που δηλώνει πως σε μια μόνο πρωτεΐνη προσδένονται και αλληλεπιδρούν πολλά μόρια TA.

Τα συστήματα του TA με την πρωτεΐνη BSA και με τη χιτοζάνη που έδειξαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν και μέσω πειραμάτων διαπίδυσης και τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά. Μέσω των διαγραμμάτων Hill για το σύστημα BSA / TA προσδιορίστηκε ο αριθμός n μορίων ταννικού ανά μόριο BSA περίπου ίσος με 10-15 και για το σύστημα CH / TA προσδιορίστηκε ότι 14 μονομερή χιτοζάνης αλληλεπιδρούν με κάθε μόριο ταννικού. Επιπλέον παρατηρήθηκε συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων ταννικού. Κάθε μόριο που προσδέεται βοηθάει να προσδεθούν και άλλα, που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ελκτικά κατά την πρόσδεσή τους πάνω στην αλυσίδα χιτοζάνης. Ο συνολικός αριθμός αυτών των μορίων ταννικού εκτιμήθηκε στα 40 – 50 για κάθε αλυσίδα χιτοζάνης μοριακού βάρους 10^5 Da . Η σταθερά διάστασης δηλώνει μια ασθενή αλληλεπίδραση του ταννικού με τη χιτοζάνη.

Η ισχυρότερη αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε μεταξύ της πρωτεΐνης BSA και του TA επιβεβαιώθηκε και από τις πέντε τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες σε διάλυμα. Μέσω των πειραμάτων θολερότητας, ITC και διαπίδυσης είναι δυνατός ο υπολογισμός ο αριθμός των μορίων του TA ανά μόριο BSA. Μέσω των πειραμάτων θολερότητας

υπολογίστηκε ίσος με 6 – 15 ανάλογα με την συγκέντρωση BSA που χρησιμοποιείται. Από τα πειράματα ITC για το σύστημα BSA και του TA, ο αριθμός των μορίων του TA ανά μόριο BSA προσδιορίστηκε ίσος με 33. Ωστόσο αυτός ο αριθμός φαίνεται να αποτελεί ενδιάμεση τιμή των δύο φαινομένων που πραγματοποιούνται και απεικονίζονται στο θερμόγραμμα του Σχήματος 8.15 α. Το πρώτο φαινόμενο φαίνεται να πραγματοποιείται για γραμμομοριακή αναλογία TA/ BSA ίση με 10 και το δεύτερο για 35 – 40. Τέλος από τα πειράματα διαπίδυσης και μέσω της Εξίσωσης Hill προέκυψε πως ο αριθμός των μορίων TA ανά μόριο πρωτεΐνης είναι σε εύρος 10 – 15. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των τριών αυτών τεχνικών παρατηρείται πως είναι αρκετά κοντά και επιβεβαιώνονται μεταξύ τους. Πέραν της γραμμομοριακής αναλογίας προσδιορίστηκαν και οι σταθερές πρόσδεσης μέσω των πειραμάτων φθορισμού, ITC και διαπίδυσης. Σε γενικές γραμμές και οι σταθερές πρόσδεσης βρίσκονται σε συμφωνία μεταξύ τους. Από τη μέθοδο του φθορισμού προσδιορίστηκε $K_S = 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, από τη μέθοδο ITC η $K_b = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ και τέλος από τα πειράματα διαπίδυσης η $K = 9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

8.2. ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

Τα υμένα από γαλακτωματοποιητές και πολυσακχαριτές σε στερεές επιφάνειες δεν είναι ισοδύναμα με εκείνα τις διεπιφάνειες σταγονιδίων των ΠΓ, αλλά η διερεύνηση αυτών των συστημάτων LbL μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την παρασκευή των ΠΓ. Στόχοι των πειραμάτων σε επιφάνειες είναι να εξεταστεί η σταθερότητα ενός στρώματος όταν εναποτίθεται ένα επόμενο στρώμα διαφορετικού υλικού, να προσδιοριστούν οι καλύτεροι δυνατοί συνδυασμοί συστατικών και τα εύρη συγκεντρώσεων που διασφαλίζουν τη μέγιστη απόθεση υλικών (ειδικά του αντιοξειδωτικού) στην επιφάνεια.

Το πρωτόκολλο πίσω από τα πειράματα εναπόθεσης σε επιφάνειες διατηρήθηκε όσο το δυνατόν πιο απλό, δεδομένου του τεράστιου αριθμού πιθανών συνδυασμών των στρωμάτων. Το pH στα πλείστα διαλύματα εναπόθεσης ήταν ίσο με 4, καθώς οι αλληλεπιδράσεις TA - βιοπολυμερούς είναι ισχυρότερες σε αυτό το pH, όπως προέκυψε από τις μελέτες σε διάλυμα. Εξετάστηκε εάν η εναπόθεση είναι γραμμική ή όχι και εάν τα επόμενα στρώματα έχουν αρνητικό αποτέλεσμα στην εναπόθεση των προηγούμενων στρωμάτων.

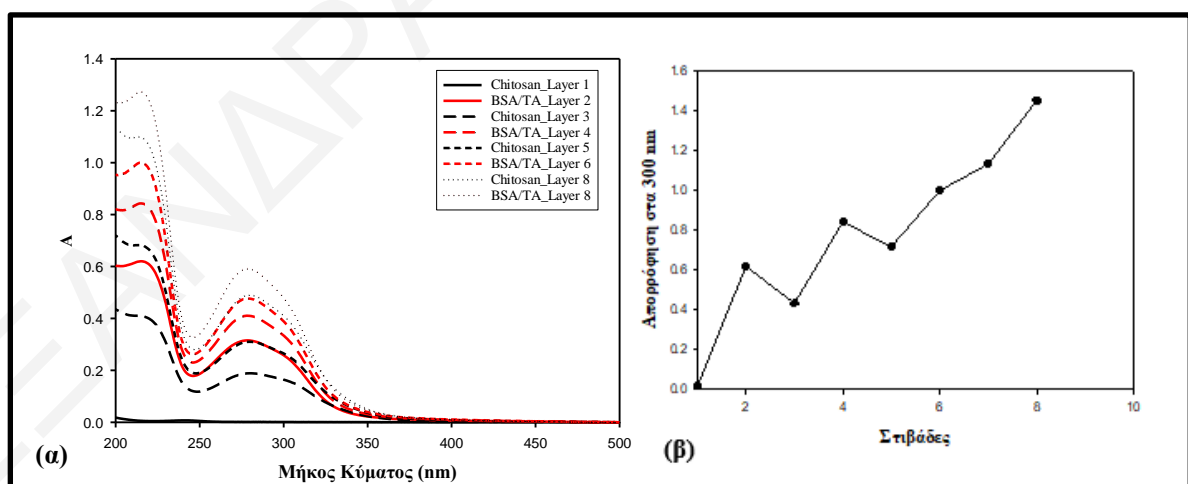
8.2.1 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία UV-Vis

Για τον προσδιορισμό της αποτιθέμενης ποσότητας TA στην επιφάνεια χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση UV-Vis στα 280-310 nm, καθώς το TA απορροφά σε αυτό το εύρος μήκους κύματος. Πέραν του TA, σε αυτό το εύρος μήκους κύματος απορροφούν και οι πρωτεΐνες.

Ωστόσο είναι δυνατό να διακριθεί η κορυφή που αντιστοιχεί στο TA σε κοινό φάσμα BSA και TA με κατάλληλη αποσυνέλιξη των φασμάτων σε αυτό το εύρος μήκους κύματος (Σχήμα Π.13).

Για τα πειράματα UV-Vis οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε τρεις κατευθύνσεις. Αρχικά έγιναν διερευνητικά πειράματα με σκοπό να προσδιοριστεί πως η γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{πρωτεΐνης})$ επηρεάζει την μέγιστη εναπόθεση υλικών (ειδικά TA) στην επιφάνεια. Ακολούθως μελετήθηκε πως το είδος του πολυηλεκτρολύτη που χρησιμοποιείται ως πρώτο στρώμα επηρεάζει την εναπόθεση του επόμενου στρώματος διαφορετικού υλικού και τέλος εξετάστηκε η επίδραση του pH.

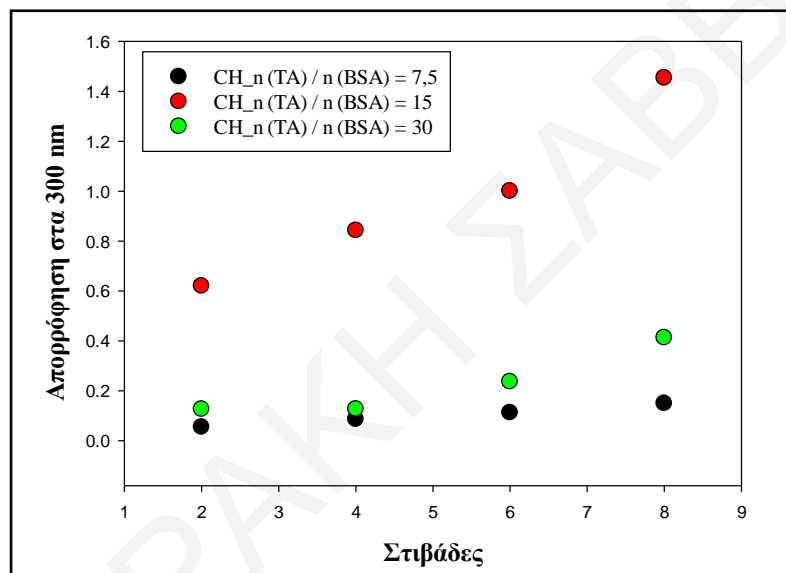
Το Σχήμα 8.27 δείχνει την απορρόφηση εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης και μιγμάτων BSA και TA (από διαλύματα 1 g / L BSA, με το TA να είναι σε 15 φορές γραμμομοριακή περίσσεια έναντι του BSA ($n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$). Από τα διαγράμματα παρατηρείται ότι η εναπόθεση πολλών στρωμάτων προχωρά με επιτυχία. Ωστόσο, κάποια ποσότητα BSA / TA που είχε εναποτεθεί στην επιφάνεια χάνεται όταν εναποτίθεται το επόμενο στρώμα χιτοζάνης με αποτέλεσμα η απορρόφηση να παρουσιάζει συμπεριφορά ζιγκ-ζαγκ (Σχήμα 8.27 β), παρόμοια με αυτή που παρατηρείται σε άλλα συστήματα LbL. (Shutava T., et al., 2005) Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αλλαγή της πυκνότητας φορτίου στην επιφάνεια καθώς εναποτίθενται τα επόμενα στρώματα. Ένας επιπλέον λόγος για αυτήν τη συμπεριφορά μπορεί να είναι η μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα σε νερό στο υμένιο καθώς χτίζονται τα πολυστρώματα. (Benbow et al. 2019)



Σχήμα 8.27: (α) Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης και μιγμάτων BSA και TA ($n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4 και (β) Διάγραμμα απορρόφησης στα 300 nm συναρτήσεως του αριθμού των στιβάδων κατά την εναπόθεση CH και BSA / TA σε pH 4.

Πολύ παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται για όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν με σκοπό να εξεταστεί πως η γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA})$ επηρεάζει την μέγιστη

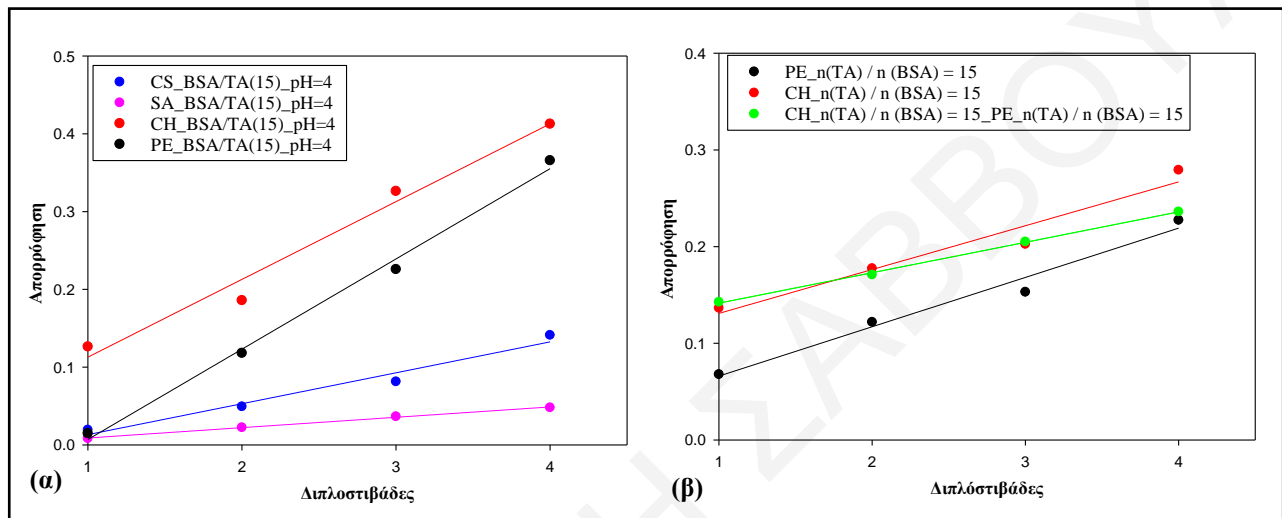
απόθεση υλικών στην επιφάνεια χρησιμοποιώντας ως πρώτο στρώμα χιτοζάνη. Η γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n (BSA) που μελετήθηκε είναι 7.5, 15 και 30. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 8.28 και τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας αυτών των πολυστρωματικών υμενίων με γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n (BSA) ίσο με 7.5 και 30 φαίνονται στο Παράρτημα (Σχήμα Π.14). Το διάγραμμα δείχνει ότι μέγιστη εναπόθεση TA στην επιφάνεια παρατηρείται όταν η γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n (BSA) στο διάλυμα είναι ίση με 15. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν χωρίς ανάδευση. Το TA έχει την ικανότητα να δημιουργεί γέφυρες μεταξύ των βιοπολυμερών και συνεπώς όσο η συγκέντρωση του TA αυξάνεται τόσο περισσότερο δημιουργούνται μεγάλα συσσωματώματα, τα οποία δεν μπορούν να σχηματίσουν σταθερές διασπορές και καταβυθίζονται.



Σχήμα 8.28: Εναποτιθέμενη ποσότητα BSA / TA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL με πολυσακχαρίτη περιττού στρώματος τη χιτοζάνη. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL σε pH 4.

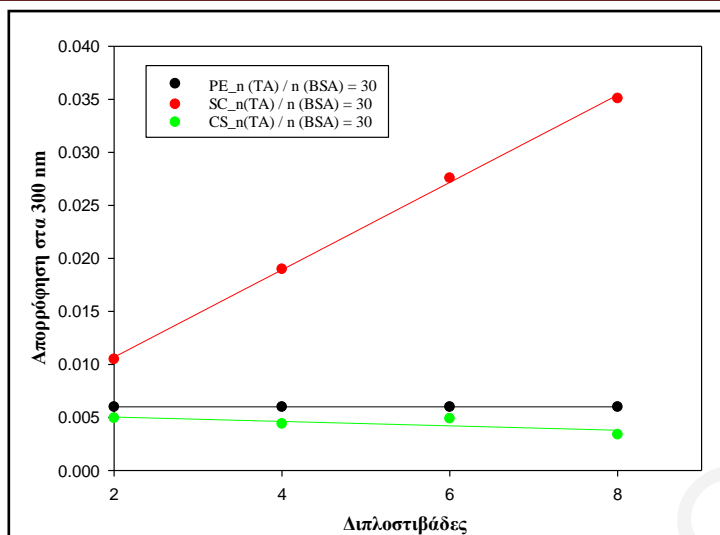
Στο Σχήμα 8.29 (α) συνοψίζονται τα αποτελέσματα εναπόθεσης για στρώματα TA / BSA με τέσσερις διαφορετικούς πολυσακχαρίτες (1 mg / mL) που χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα στρώματα για τα στρώματα BSA / TA. Σε όλες τις περιπτώσεις το TA ήταν παρόν μαζί με την BSA και ήταν πάντα σε 15πλάσια μοριακή περίσσεια έναντι BSA (n (TA) / n (BSA) = 15). Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων ήταν 1 mg / mL. Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.29 (β) η γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n (BSA) είναι ίση με 15. Από το γράφημα είναι εμφανές ότι περισσότερη ποσότητα εναποτίθεται όταν η χιτοζάνη ή η πηκτίνη χρησιμοποιούνται ως υλικά ενδιάμεσης στιβάδας και ιδιαίτερα όταν ως πρώτο στρώμα χρησιμοποιείται η χιτοζάνη, λόγω της καλής προσρόφησης στις αρνητικά φορτισμένες γυάλινες επιφάνειες. (Shutava et al. 2005) Επιπλέον φαίνεται ότι η εναπόθεση δεν είναι εντελώς γραμμική, αν και για έναν τόσο

μικρό αριθμό στρωμάτων είναι αδύνατο να διαπιστώσουμε αν γίνεται τελικά εκθετικά. Τα αποτελέσματα του Σχήματος 8.29 δείχνουν ότι η χιτοζάνη και η πηκτίνη θα πρέπει να είναι οι ενδιάμεσοι πολυσακχαρίτες για την παρασκευή πολυστρωματικού γαλακτώματος έναντι της θειικής χονδροϊτίνης και του αλγινικού νατρίου, γεγονός που επιβεβαιώνουν τα πειράματα θολερότητας. Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας αυτών των πολυστρωματικών υμενίων με γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA)$ ίση με 15 και 30 φαίνονται στο Παράρτημα (Σχήμα Π.15 – Π.17).



Σχήμα 8.29: Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL (α) σε συστήματα $n(TA) / n(BSA) = 15$ και (β) σε συστήματα $n(TA) / n(BSA) = 15$, ως συνάρτηση διαφορετικών πολυσακχαριτών ως περιττό στρώμα σε pH 4. Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg / mL.

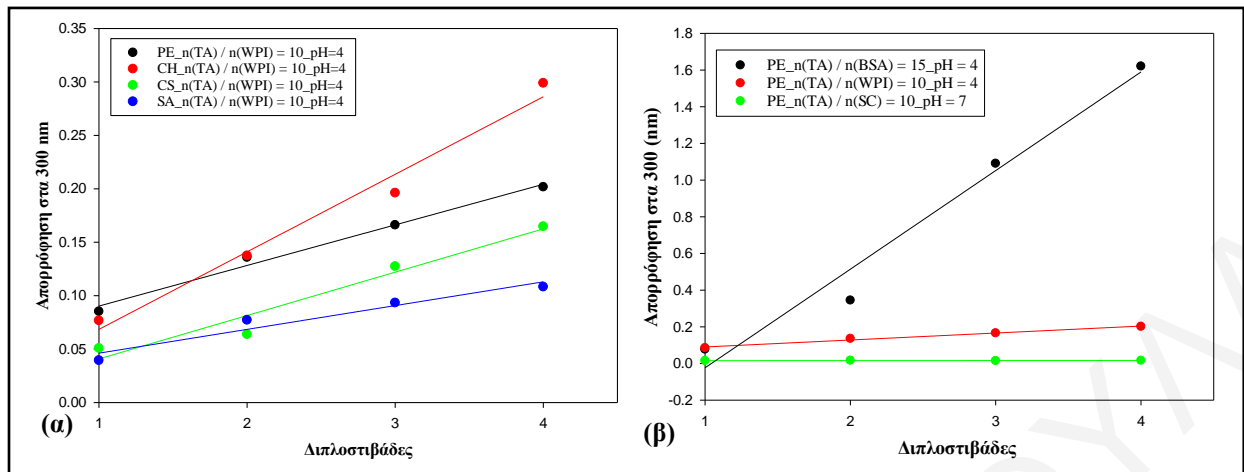
Στις μελέτες δημιουργίας πολυστρωματικών υμενίων σε pH = 7 χρησιμοποιήθηκαν ως πολυηλεκτρολύτες πηκτίνη, καζεϊνικό νάτριο και θειική χονδροϊτίνη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στο διάγραμμα του Σχήματος 8.30 και τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας αυτών των πολυστρωματικών υμενίων με γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA)$ ίση με 30 φαίνονται στο Παράρτημα (Σχήμα Π.18 – Π.19). Παρατηρείται ότι η ποσότητα TA που εναποτίθεται σε αυτές τις συνθήκες είναι χαμηλότερη συγκριτικά με τα πειράματα σε pH = 4. Αυτό συμβαίνει ίσως λόγω των ασθενώς ηλεκτροστατικών απώσεων λόγω όμοιων φορτίων σε αυτές τις συνθήκες, που εμποδίζουν τη δημιουργία υμενίων.



Σχήμα 8.30: Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL σε συστήματα $n(TA) / n(BSA) = 30$ ως συνάρτηση διαφορετικών πολυσακχαριτών ως περιττό στρώμα σε pH 7. Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg / mL.

Στο Σχήμα 8.31 (α) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εναπόθεσης TA με την πρωτεΐνη WPI και πως η γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(WPI)$ και το είδος του πολυηλεκτρολύτη που χρησιμοποιείται ως πρώτο στρώμα επηρεάζει την μέγιστη απόθεση του αντιοξειδωτικού στην επιφάνεια. Η γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(WPI)$ που μελετήθηκε είναι ίση με 10 και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης WPI είναι 1 mg/ mL. Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας των πολυστρωματικών υμενίων του Σχήματος 8.31 φαίνονται στο Παράρτημα (Σχήμα Π.20 – Π.21). Το διάγραμμα δείχνει ότι μέγιστη εναπόθεση TA στην επιφάνεια παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται ως πρώτο στρώμα η χιτοζάνη και ακολούθως η πηκτίνη. Όλες οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg/mL. Επιπλέον όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Σχήματος 8.31 (β) η πηκτίνη λειτουργεί καλύτερα ως πρώτο στρώμα σε pH = 4 παρά σε pH = 7. Τέλος από το διάγραμμα του Σχήματος 8.31 (β) προκύπτει πως η μέγιστη ποσότητα TA που εναποτίθεται στην επιφάνεια επιτυγχάνεται όταν το TA είναι συζευγμένο με την πρωτεΐνη BSA σε pH = 4.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο LbL μέσω της διερεύνησης με φασματοσκοπία UV-Vis προκύπτει ότι η μέγιστη ποσότητα TA που εναποτίθεται στην επιφάνεια επιτυγχάνεται όταν το TA είναι συζευγμένο με την πρωτεΐνη BSA σε pH = 4 συγκριτικά με την πρωτεΐνη WPI και όταν ως υλικά ενδιάμεσης στιβάδας είναι η χιτοζάνη και η πηκτίνη.

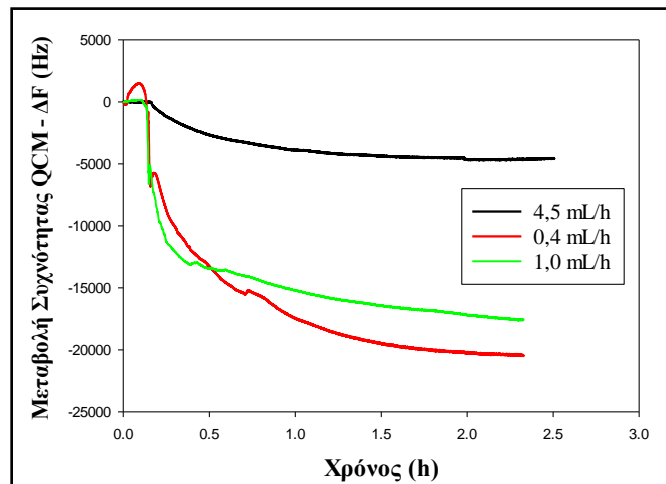


Σχήμα 8.31: (α) Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / WPI για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL σε συστήματα όπου $n(TA) / n(WPI) = 10$ ως συνάρτηση διαφορετικών πολυσακχαριτών ως άρτιο στρώματα σε pH 4 και (β) Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / πρωτεΐνης για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL σε συστήματα $n(TA) / n(\text{πρωτεΐνης}) = 30, 20$ και 10 με πηκτίνης ως ενδιάμεσο στρώμα σε pH 4 και 7. Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg/mL .

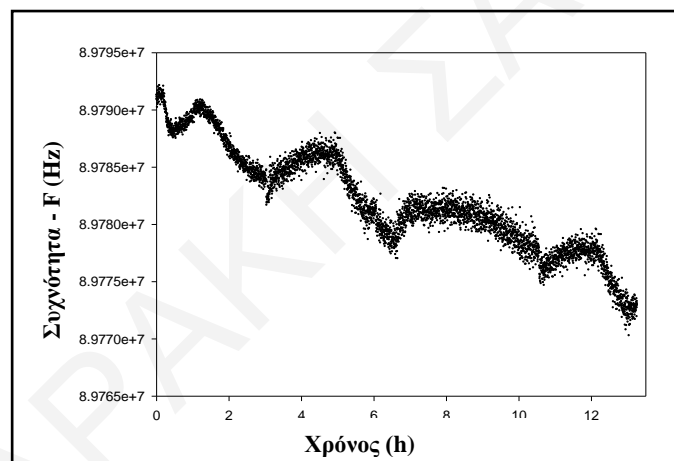
8.2.2 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με μικροζυγό κρυστάλλων χαλαζία-QCM

Στη μέθοδο QCM γίνεται εναπόθεση από διαλύματα πρωτεΐνης BSA συγκέντρωσης $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ και TA σε $n(TA) / n(BSA) = 15$, σε κρύσταλλο χαλαζία επικαλυμμένο με χρυσό σε συνθήκες ροής που επιβάλλεται από κινούμενη σύριγγα. Η κυριότερη παράμετρος είναι ο ρυθμός ροής, ο οποίος καθορίζει τον χρόνο επαφής του διαλύματος με την επιφάνεια του κρυστάλλου χαλαζία. Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικοί ρυθμοί ροής, 0.4 mL/h , 1.0 mL/h και 4.5 mL/h . Ο ρυθμός ροής που χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία (Wu et al. 2018) είναι μεγαλύτερος του 4.5 mL/h , ωστόσο ο ρυθμός αυτός στη συγκεκριμένη διάταξη δεν επιτρέπει να εναποτεθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα ουσίας στην επιφάνεια του κρυστάλλου ήδη από το πρώτο στρώμα, δυσχεραίνοντας την εναπόθεση των υπόλοιπων στιβάδων. Ρυθμός ροής ίσος με 1.0 mL/h δίνει εξίσου καλά αποτελέσματα με 0.4 mL/h για χρόνους μέχρι μισή ώρα όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.32.

Η δημιουργία πολυστρωματικών υμενίων σε επιφάνεια χρυσού ελέγχεται σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας QCM παρακολουθώντας τις μεταβολές συχνότητας του κρυστάλλου χαλαζία κατά τη διάρκεια της διαδοχικής εναπόθεσης των υπό μελέτη συστατικών. Στο Σχήμα 8.33 φαίνεται η μεταβολή της συχνότητας ως συνάρτηση του χρόνου για την κατασκευή τεσσάρων διπλοστιβάδων χιτοζάνης / BSA-TA. Η συγκέντρωση της χιτοζάνης (και της πηκτίνης σε ανάλογα πειράματα) ήταν 1 mg/mL . Είναι προφανές ότι σε κάθε στάδιο εναπόθεσης μειώνεται η συχνότητα, πράγμα που υποδηλώνει προσρόφιση μάζας επάνω στην επιφάνεια του κρυστάλλου χαλαζία.



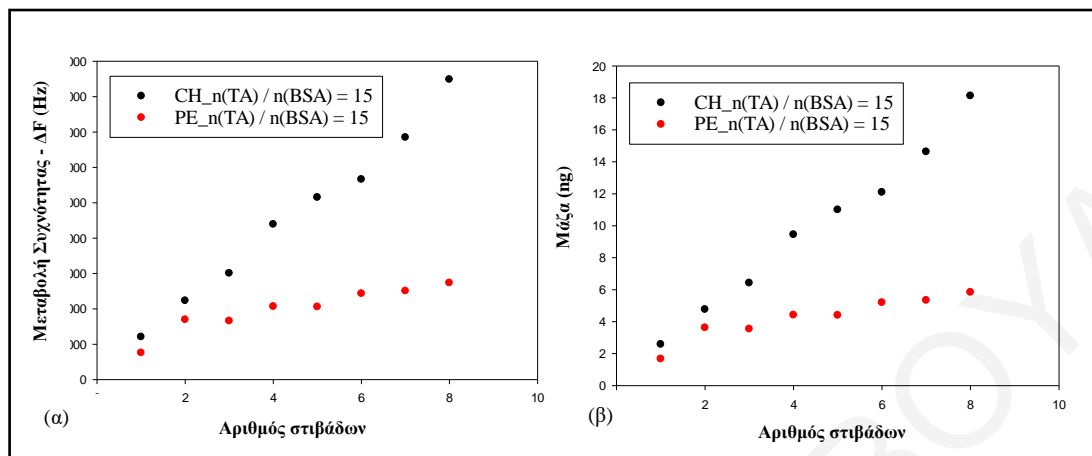
Σχήμα 8.32: Διάγραμμα μεταβολής συχνότητας QCM ως προς το χρόνο για τις μετρήσεις QCM με τον ρυθμό ροής ως παράμετρο.



Σχήμα 8.33: Διάγραμμα συχνότητας συναρτήσει του χρόνου κατά τη διάρκεια εναπόθεσης των στιβάδων για το σύστημα χιτοζάνης και $n(\text{TA}) / n(\text{BSA})$ ίση με 15. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL.

Στο Σχήμα 8.34 (α) συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μεταβολής της συχνότητας συντονισμού σε σχέση με τον αριθμό των στρωμάτων που έχουν εναποτεθεί για τα δύο συστήματα TA που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι η εναπόθεση των στιβάδων είναι γραμμική, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των πειραμάτων LbL σε στερεά υποστρώματα χαλαζία. Η χιτοζάνη ως πολυηλεκτρολύτης φαίνεται να δρα καλύτερα από την πηκτίνη ως εναλλακτικό στρώμα για το σύμπλοκοποιημένο TA, αφού συνολικά εναποτίθεται τριπλάσια συνολική μάζα στο σύστημα CH / BSA-TA σε σχέση με το σύστημα PE / BSA-TA (Σχήμα 8.34 (β)). Η μάζα του υμενίου υπολογίστηκε με βάση την Εξίσωση 6.49. Τα

πειράματα QCM δεν συνεχίστηκαν επειδή ήταν υπερβολικά χρονοβόρα, αλλά τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώνουν εκείνα των τεχνικών UV-Vis και PM-IRRAS.

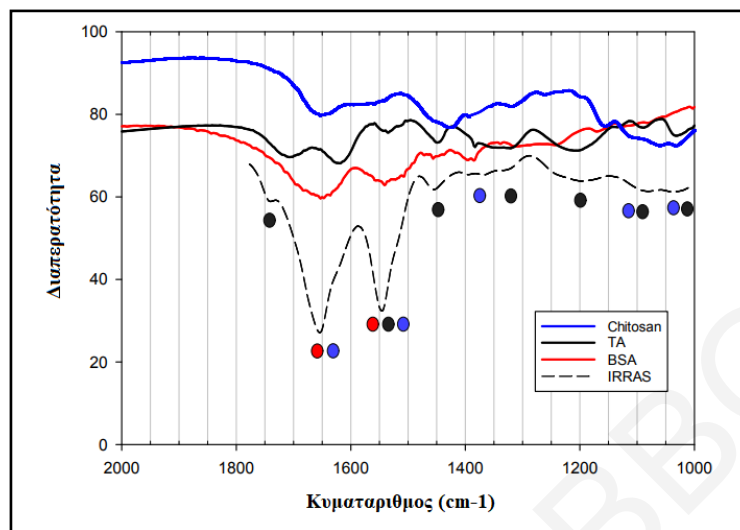


Σχήμα 8.34: (α) Διάγραμμα ΔF συναρτήσει του αριθμού των στιβάδων και (β) Διάγραμμα μάζας που εναποτίθεται συναρτήσει του αριθμού των στιβάδων για μίγματα BSA / TA με συγκέντρωση BSA 1 mg/mL και $n(TA) / n(BSA)$ ίση με 15 με ενδιάμεσα στρώματα χιτοζάνη ή πηκτινή συγκέντρωσης 1 mg/mL.

8.2.3 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία ανάκλαση απορρόφησης υπερόθρου (PM-IRRAS)

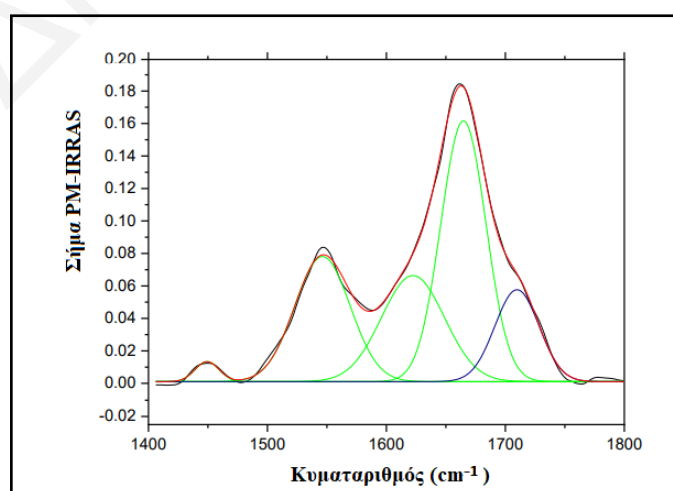
Η φασματοσκοπία ανάκλασης απορρόφησης υπερόθρου (PM-IRRAS) σπάνια χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό υμενίων LbL σε στερεές επιφάνειες, καθώς για τέτοιου είδους μελέτες χρησιμοποιείται συχνότερα η φασματοσκοπία ATR-IR. (Torger & Müller 2013) Δεδομένου ότι η εστίαση εδώ είναι το αντιοξειδωτικό, η πρόκληση της χρήσης PM-IRRAS ή οποιασδήποτε φασματοσκοπίας IR σε αυτά τα συστήματα είναι να προσδιοριστούν οι κορυφές που ανήκουν στο ταννικό οξύ και να διακριθούν από τις κορυφές των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς όλες αυτές οι οργανικές ενώσεις έχουν παρόμοιες δραστικές ομάδες στο IR. Στο Σχήμα 8.35 βλέπουμε τα φάσματα FTIR στερεής BSA, χιτοζάνης και TA, και φάσμα PM-IRRAS από ένα υμένιο BSA / TA (σε μοριακή αναλογία TA προς BSA ίσο με 15) πάνω σε ένα στρώμα χιτοζάνης συγκέντρωσης 1 mg/mL. Παρατηρείται σημαντική φασματική επικάλυψη πολλών από τις κορυφές, αν και το ταννικό οξύ έχει αρκετά διαφορετικό φάσμα. Τόσο η BSA όσο και η χιτοζάνη έχουν χαρακτηριστικές κορυφές αμιδίου στα 1650 και 1500-1550 cm^{-1} , ενώ οι κορυφές του καρβοξυλικού εστέρα του ταννικού οξέος βρίσκονται στους 1720 cm^{-1} και 1625 cm^{-1} . Οι μαύροι γεμάτοι κύκλοι κάτω από το φάσμα PM-IRRAS αντιστοιχούν στις κορυφές της BSA, οι μπλε γεμάτοι κύκλοι στη χιτοζάνη, ενώ οι κόκκινοι κύκλοι είναι οι κορυφές του TA. Η μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί με τον ίδιο τρόπο σε υμένιο που περιέχει πολυσακχαρίτες με σημαντική απορρόφηση στην καρβονυλική περιοχή, όπως η πηκτινή ή το αλγινικό νάτριο. Όπως θα φανεί

ωστόσο στη συνέχεια, η αξιολόγηση των υμενίων με τέτοια συστατικά είναι εφικτή, αφαιρώντας την απορρόφηση της πηκτίνης από το σύνολο για τον υπολογισμό της απορρόφησης του καθαρού ΤΑ στα στρώματα.



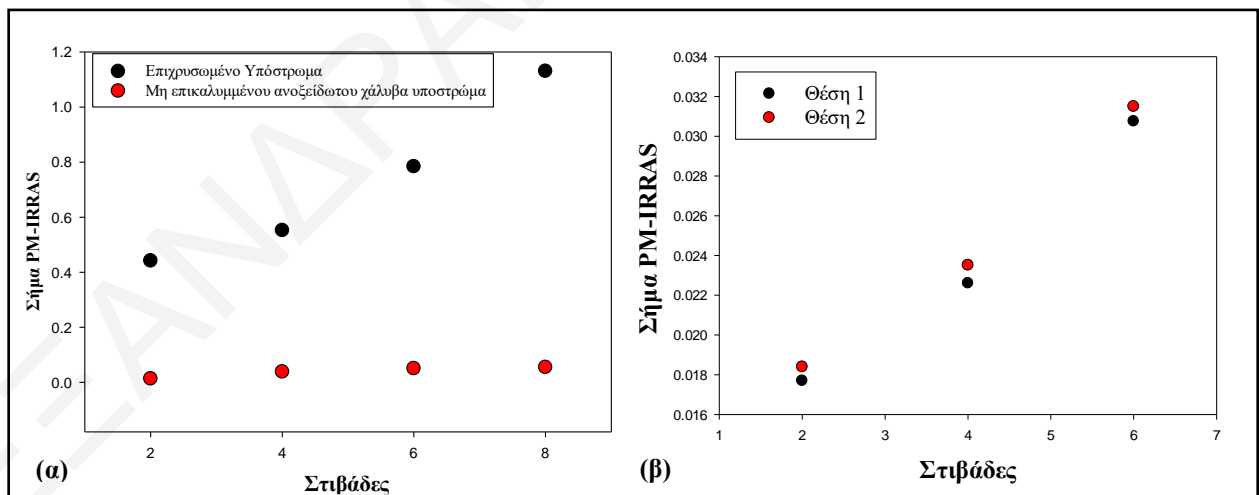
Σχήμα 8.35: Φάσματα FTIR στερεής BSA, χιτοζάνης και ταννικού οξέος σε σύγκριση με ένα φάσμα PM-IRRAS διπλής στιβάδας χιτοζάνης και BSA / TA (μοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$) που εναποτέθηκε σε ανακλαστική επιφάνεια. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL.

Για την ανάλυση πολυστρωματικών υμενίων BSA-TA / πολυσακχαρίτη αξιολογήθηκαν οι κορυφές στους 1550 cm^{-1} και 1200 cm^{-1} για πιθανή ποσοτικοποίηση ΤΑ, αλλά αποδείχθηκαν πολύ χαμηλής έντασης για ακριβή μελέτη. Επιλέχθηκε η περιοχή από 1400 έως 1800 cm^{-1} και χρησιμοποιήθηκε η κορυφή του καρβονυλίου πάνω από τους 1700 cm^{-1} , η οποία λήφθηκε με φασματική αποσυνέλιξη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin.Pro, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.36.



Σχήμα 8.36: Αποσυνέλιξη του φάσματος PM-IRRAS ενός υμενίου στην περιοχή $1400\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$. Πρόκειται για μια μεμβράνη που περιέχει έξι στρώσεις: η χιτοζάνη χρησιμοποιείται στα περιττά στρώματα και BSA / TA σε γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$ στα άρτια στρώματα. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης, BSA και TA ήταν 1 mg/mL.

Πριν από τη χρήση της μεθόδου PM-IRRAS για τη μελέτη των υμενίων που σχηματίζονται σε επίπεδες επιφάνειες εξετάστηκε κατά πόσο η επιχρυσώση της επιφάνειας του υποστρώματος επηρεάζει την ένταση του σήματος PM-IRRAS. Το αρχικό υπόστρωμα ήταν από ανοξείδωτο χάλυβα. Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.37 (α) φαίνεται η ένταση σήματος PM-IRRAS ενός επιχρυσωμένου υποστρώματος και ενός μη επικαλυμμένου υποστρώματος, που λήφθηκαν για ένα σύστημα με εναλλασσόμενα στρώματα πηκτίνης (1mg/mL) και TA / BSA σε γραμμομοριακή αναλογία ίση με 15, συναρτήσει του αριθμού των στιβάδων του υμενίου. Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι το σήμα PM-IRRAS είναι πολύ υψηλότερο για το επιχρυσωμένο υπόστρωμα. Επιπλέον μελετήθηκε και η ένταση του σήματος PM-IRRAS στους 1735 cm^{-1} (κορυφή του καρβονυλίου) συναρτήσει σε διαφορετικές περιοχές του υποστρώματος όπου καταλήγει η δέσμη του λέιζερ για να ελεγχθεί αν η εναπόθεση είναι ομοιογενής. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο Σχήμα 8.37 (β) από ένα υμένιο με εναλλασσόμενα στρώματα χιτοζάνης και TA / BSA σε γραμμομοριακή αναλογία ίση με 15. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι ίση με 1 mg/mL . Παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές του σήματος στους 1735 cm^{-1} στα δύο σημεία αλλά η συνολική επαναληψιμότητα είναι ικανοποιητική. Τέλος έγιναν πειράματα για να μελετηθεί πως η σειρά εναπόθεσης των στρωμάτων επηρεάζει τη μέγιστη εναπόθεση των επόμενων στρωμάτων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η BSA εναποτίθεται σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν ως πρώτη στιβάδα χρησιμοποιείται ένας ευέλικτος πολυσακχαρίτης παρά μια πρωτεΐνη (Σχήμα Π.22).

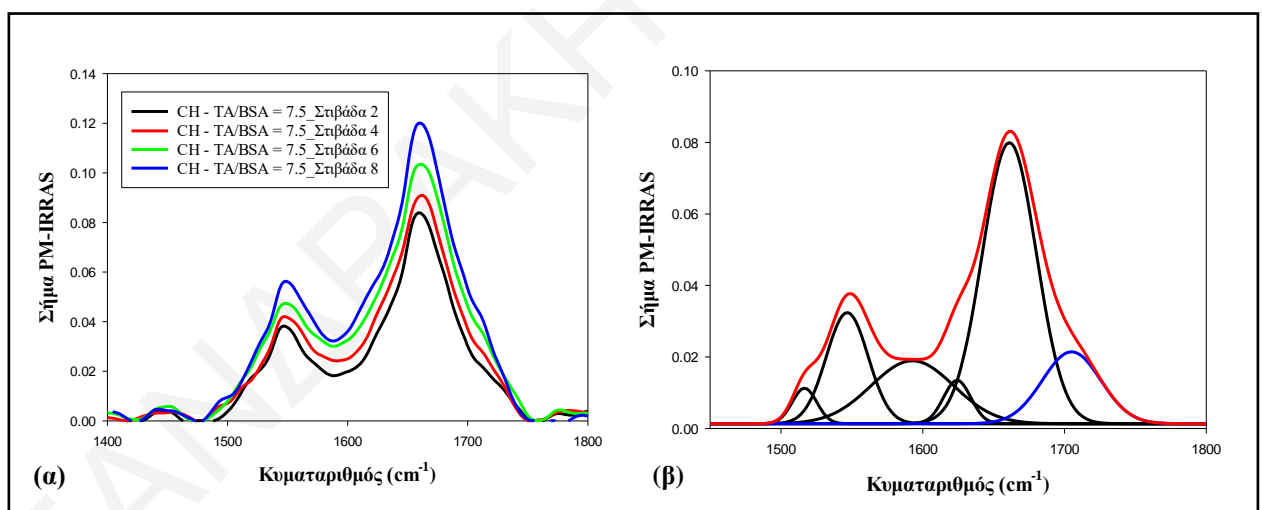


Σχήμα 8.37: (α) Επίδειξη της επίδρασης του υλικού του υποστρώματος, σε υμένα LbL πηκτίνης – $n(\text{TA})/n(\text{BSA}) = 15$ συναρτήσει του σήματος PM-IRRAS και (β) Εξέταση της ομοιογένειας των υμενίων LbL χιτοζάνης - $n(\text{TA})/n(\text{BSA}) = 15$ με μέτρηση σε δύο διαφορετικές θέσεις του υποστρώματος.

Με τη μέθοδο PM-IRRAS μελετήθηκαν τα συστήματα που παρουσίασαν ενδιαφέρον με βάση τις προηγούμενες μεθοδολογίες. Για να μελετηθούν με όσο το δυνατόν καλύτερο τρόπο, οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε τρεις κατευθύνσεις. Αρχικά έγιναν διερευνητικά πειράματα με

σκοπό να προσδιοριστεί πως η γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{πρωτεΐνης})$ επηρεάζει την μέγιστη εναπόθεση υλικών (ειδικά TA) στην επιφάνεια του επιχρυσωμένου υποστρώματος. Ακολούθως μελετήθηκε πως το είδος του πολυηλεκτρολύτη που χρησιμοποιείται ως πρώτο στρώμα επηρεάζει την εναπόθεση του επόμενου στρώματος διαφορετικού υλικού και τέλος εξετάστηκε πως η πρωτεΐνη επηρεάζει την μέγιστη εναπόθεση στην επιφάνεια.

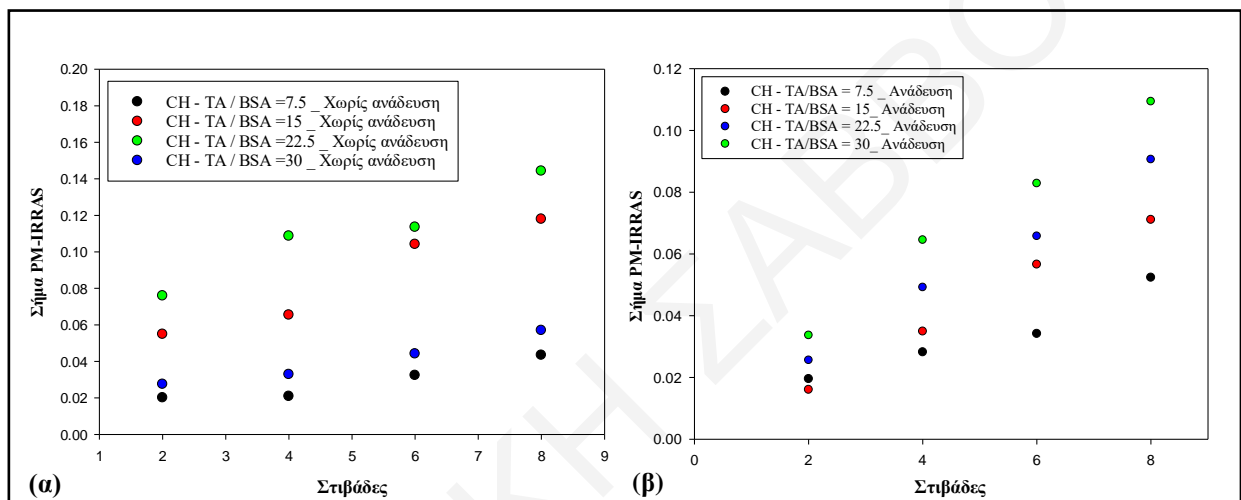
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν με σκοπό να εξεταστεί πως η γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA})$ επηρεάζει την μέγιστη απόθεση υλικών στην επιφάνεια χρησιμοποιώντας ως πρώτο στρώμα χιτοζάνη (1 mg/mL). Η γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA})$ που μελετήθηκε είναι 7.5, 15, 22.5 και 30. Στο Σχήμα 8.38 (α) παρουσιάζονται τα υπέρυθρα φάσματα για τη μελέτη του συστήματος CH στην περιττή στιβάδα (1 mg/mL) και TA / BSA ($n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 7.5$) στην άρτια στιβάδα στην περιοχή από 1400 έως 1800 cm^{-1} . Χρησιμοποιήθηκε η κορυφή του καρβονυλίου πάνω από 1700 cm^{-1} , η οποία λήφθηκε με φασματική αποσυνέλιξη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin.Pro, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.38 (β). Τα υπέρυθρα φάσματα των υπόλοιπων πολυστρωματικών υμενίων με γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA})$ ίση με 15, 22.5 και 30 με ανάδευση και χωρίς, φαίνονται στο Παράρτημα (Σχήμα Π.23 – Π.26).



Σχήμα 8.38: (α) Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA ($n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 7.5$) στην άρτια στιβάδα και (β) Διαδικασία για την απομόνωση της κορυφής ταννικού οξέος (μπλε) από το φάσμα PM-IRRAS ενός υμενίου στο εύρος 1400-1800 cm^{-1} . Πρόκειται για τη δεύτερη στιβάδα του συστήματος CH - TA/BSA = 7.5. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι ίσες με 1 mg/mL pH 4.

Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.39 (α & β) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την κορυφή του TA για τα συστήματα CH - TA/BSA, με το μίγμα TA/BSA στην μια περίπτωση να βρίσκεται υπό ανάδευση κατά την εναπόθεση της στιβάδας στην επιφάνεια (Σχήμα 8.39 (β)). Το διάγραμμα του Σχήματος 8.39 (α) δείχνει ότι μέγιστη εναπόθεση TA στην επιφάνεια

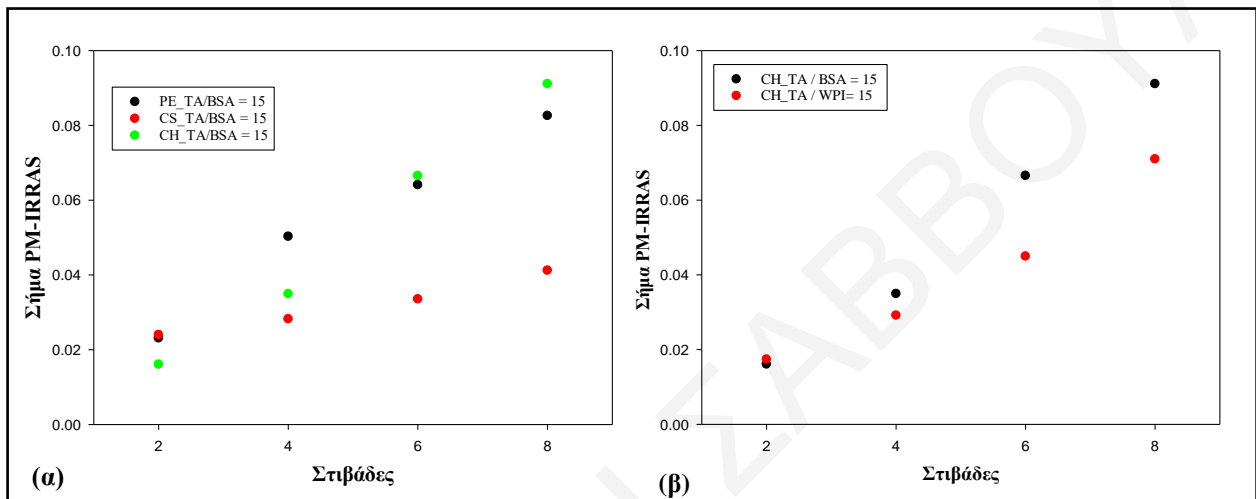
παρατηρείται όταν η γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n (BSA) είναι ίση με 22.5, ενώ στο Σχήμα 8.39 (β) για πειράματα που η εναπόθεση γίνεται κάτω από συνθήκες ανάδευσης μέγιστη εναπόθεση παρατηρείται σε γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n (BSA) ίση με 30. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το TA έχει την ικανότητα να δημιουργεί γέφυρες μεταξύ των βιοπολυμερών και συνεπώς όσο η συγκέντρωση του TA αυξάνεται τόσο περισσότερο δημιουργούνται μεγάλα συσσωματώματα τα οποία δεν μπορούν να σχηματίσουν σταθερές διασπορές και καταβυθίζονται. Γι' αυτό όταν η εναπόθεση δεν πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες ανάδευσης η γραμμομοριακή αναλογία στην οποία παρατηρείται μέγιστη εναπόθεση είναι ίση με 22.5 ενώ κάτω από συνθήκες ανάδευσης είναι ίση με 30.



Σχήμα 8.39: Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας στην περιττή στιβάδα χιτοζάνη για γραμμομοριακές αναλογίες n (TA) / n (BSA) = 7.5, 15, 22.5 και 30 σε pH 4 (α) χωρίς ανάδευση και (β) με ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι ίση με 1 mg/mL.

Στο Σχήμα 8.40 (α) συνοψίζονται τα αποτελέσματα εναπόθεσης για τα εναλλασσόμενα στρώματα TA / BSA συνάρτηση τριών διαφορετικών πολυσακχαριτών (1 mg / mL) με μίγματα TA / BSA. Σε όλες τις περιπτώσεις το TA ήταν παρόν μαζί με την BSA και ήταν πάντα σε 15πλάσια μοριακή περίσσεια έναντι της BSA (n (TA) / n (BSA) = 15). Από το γράφημα είναι εμφανές ότι μεγαλύτερη ποσότητα TA εναποτίθεται όταν χρησιμοποιηθεί ως περιττό στρώμα η χιτοζάνη, ακολούθως η πηκτίνη και τελευταία η θειική χονδροϊτίνη. Στο Σχήμα 8.40 (β) φαίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν χρησιμοποιώντας ως περιττό στρώμα τη χιτοζάνη και ως άρτιο στρώμα είτε TA / BSA είτε TA / WPI σε γραμμομοριακή αναλογία n (TA) / n (πρωτεΐνης) = 15. Τα αποτελέσματα του Σχήματος 8.40 (β) δείχνουν ότι το TA εναποτίθεται σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν βρίσκεται μαζί με τη BSA συγκριτικά με την WPI. Τα υπέρυθρα φάσματα των πολυστρωματικών υμενίων, των οποίων τα αποτελέσματα φαίνονται στα πιο κάτω διαγράμματα, παρατίθενται στο Παράρτημα (Σχήμα Π.27 και Π.28). Στην περίπτωση που

χρησιμοποιείται η πηκτίνη ως ενδιάμεσο στρώμα και λόγω της σημαντικής απορρόφησης στην καρβονυλική περιοχή που παρουσιάζει, η αξιολόγηση των υμενίων έγινε εφικτή, αφαιρώντας την απορρόφηση της πηκτίνης από το σύνολο για τον υπολογισμό της απορρόφησης του καθαρού TA στα στρώματα. Τα διαγράμματα της εναποτιθέμενης ποσότητας TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας ως περιττό στρώμα πηκτίνη με γραμμομοριακές αναλογίες $n(TA) / n(BSA) = 15$ σε pH 4 παρατίθενται στο Σχήμα Π.28 του Παραρτήματος.



Σχήμα 8.40: (α) Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας ως περιττό στρώμα πολυηλεκτρολύτη με γραμμομοριακές αναλογίες $n(TA) / n(BSA) = 15$ σε pH 4 και (β) Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / πρωτεΐνης για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας ως περιττό στρώμα χιτοζάνη με γραμμομοριακές αναλογίες $n(TA) / n(πρωτεΐνη) = 15$ σε pH 4. Οι συγκέντρωση των διαλυμάτων είναι ίση με 1 mg/mL.

8.2.4 Σύνοψη αποτελεσμάτων δεύτερου σταδίου

Συνοψίζοντας, από τη διερεύνηση των υμενίων που προκύπτουν από τη μέθοδο LbL με φασματοσκοπία UV-Vis, προσδιορίστηκε ότι η μέγιστη ποσότητα TA που εναποτίθεται στην επιφάνεια επιτυγχάνεται όταν το TA είναι συζευγμένο με την πρωτεΐνη BSA σε pH = 4 συγκριτικά με την πρωτεΐνη WPI. Επίσης φάνηκε πως η δημιουργία του πρώτου στρώματος βοηθά την εναπόθεση του επόμενου στρώματος διαφορετικού υλικού οδηγώντας στη δημιουργία ενός σταθερού πολυστρωματικού υμενίου. Καλύτεροι πολυηλεκτρολύτες ως υλικά ενδιάμεσων στιβάδων αποδείχθηκαν η χιτοζάνη και η πηκτίνη, ενώ ως υλικό πρώτης στιβάδας η χιτοζάνη. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε και από τις μελέτες QCM και PM-IRRAS. Από τις μελέτες σε επίπεδες επιφάνειες προκύπτει πως η χιτοζάνη είναι καλύτερο υλικό ενδιάμεσου στρώματος από τη θειική χονδροϊτίνη και είναι συγκρίσιμο με την πηκτίνη. Με χιτοζάνη και πηκτίνη ως ενδιάμεσα στρώματα είναι δυνατή η μεταφορά και διατήρηση μεγαλύτερων ποσοτήτων TA στην επιφάνεια. Η ποσότητα του TA που εναποτίθεται αυξάνεται με τη συγκέντρωσή του (γραμμομοριακή αναλογία προς BSA) σε διάλυμα σε pH 4. Ωστόσο,

αναλογίες TA / BSA μεγαλύτερες από 20 δίνουν θολά διαλύματα και η εναπόθεση αποτυγχάνει απουσία ανάδευσης λόγω καταβύθισης των συσσωματωμάτων BSA-TA. Για αυτούς τους λόγους η γραμμομοριακή αναλογία TA / BSA που χρησιμοποιείται στις μελέτες των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων είναι κοντά στο 10.

8.3. ΤΡΙΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

Σε αντίθεση με τα πειράματα σε υμένα σε στερεές επιφάνειες, τα πολυστρωματικά γαλακτώματα σταθεροποιούνται αρχικά με ένα στρώμα πρωτεΐνης BSA, η οποία, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα σημεία της εργασίας αυτής, έχει εξαιρετική γαλακτωματοποιητική ικανότητα. Η χιτοζάνη και η πηκτίνη δεν είναι ιδανικοί γαλακτωματοποιητές από μόνες τους και γι' αυτό χρησιμοποιούνται ως εναλλακτικά στρώματα για την παρασκευή του πολυστρωματικού τοιχώματος. (Gumus 2016) Στον Πίνακα 8.5 παρουσιάζονται οι διάφορες δοκιμές που έγιναν ώστε να καταλήξουμε σε συνδυασμούς που παράγουν σταθερά γαλακτώματα. Αρχικά έγιναν διάφοροι συνδυασμοί ως προς το είδος του πολυηλεκτρολύτη, την συγκέντρωση των συστατικών και τη σειρά εναπόθεσης των συστατικών. Μερικά από τα γαλακτώματα ήταν σταθερά, αλλά παρόλα αυτά λόγω του μεγάλου αριθμού συνδυασμών που υπάρχουν επιλέχθηκε να μελετηθούν γαλακτώματα που έχουν ως γαλακτωματοποιητή τη BSA και ως πολυηλεκτρολύτες τη χιτοζάνη και την πηκτίνη. Μετά το πρώτο στρώμα γαλακτωματοποιητή BSA, ως δεύτερο και τρίτο στρώμα χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη ή πηκτίνη και αντίστροφα. Όπως συζητήθηκε και στο Πειραματικό Μέρος το TA προστέθηκε σε κάποιο από τα τρία στρώματα, ώστε κάθε τριτοταγές γαλακτώμα να περιέχει TA σε κάποιο στρώμα. Μετά από αυτές τις προσπάθειες επιλέχθηκαν τα τρία τελευταία συστήματα του πίνακα ώστε να χαρακτηρισθούν πλήρως και να μελετηθεί η οξειδωτική τους σταθερότητα.

Πίνακα 8.5: Δοκιμές συστημάτων που μελετήθηκαν για την παρασκευή σταθερών γαλακτωμάτων.

Πρωτοταγές γαλακτώμα	Δευτεροταγές γαλακτώμα	Τριτοταγές γαλακτώμα	Σταθερότητα Γαλακτώματος
BSA 4,0 mg / mL	CH _{low} MW 1,0 mg/mL	TA 3,0 mg / mL	Ασταθές
BSA 4,0 mg / mL	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	TA 3,0 mg / mL	Σταθερό
BSA 4,0 mg / mL	PE 0.4 mg/mL	TA 3,0 mg / mL	Σταθερό
BSA 1,0 mg / mL	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	BSA 1,0 mg / mL	Σταθερό
BSA 1,0 mg / mL	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	n(TA)/n(BSA) = 15	Σταθερό
n(TA)/n(BSA) = 15	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	n(TA)/n(BSA) = 15	Ασταθές
n(TA)/n(BSA) = 15	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	BSA 1,0 mg / mL	Ασταθές
n(TA)/n(BSA) = 3.7	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	BSA 4,0 mg / mL	Σταθερό

$n(TA)/n(BSA) = 7.5$	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	BSA 4,0 mg / mL	Σταθερό
$n(TA)/n(BSA) = 7.5$	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	PE 0,4 mg/mL	Σταθερό
$n(TA)/n(BSA) = 7.5$	PE 0,4 mg/mL	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	Σταθερό
$n(TA)/n(BSA) = 30$	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	BSA 4,0 mg / mL	Ασταθές
BSA 4,0 mg / mL	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	BSA 4,0 mg / mL	Σταθερό
BSA 4,0 mg / mL	CH 2,0 mg/mL	BSA 4,0 mg / mL	Σταθερό
BSA 4,0 mg / mL	$n(TA)/n(PE) = 3.7$	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	Ασταθές
BSA 4,0 mg / mL	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	BSA 4,0 mg / mL	Σταθερό
BSA 4,0 mg / mL	CH _{medium} MW 1,0 mg/mL	TA 3,0 mg/mL	Σταθερό
$n(TA)/n(BSA) = 9$	CH 0,5 mg/mL	PE 0,25 mg/mL	Σταθερό
BSA 4,0 mg / mL	$n(TA)/n(CH) = 130$	PE 0,25 mg/mL	Σταθερό
BSA 4,0 mg/mL	CH 0,5 mg/mL	$n(TA)/n(CH) = 90$	Σταθερό

8.3.1 Μετρήσεις ζήτα - δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων

Στον Πίνακα 8.6 συνοψίζονται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού ως προς το φορτίο και το μέγεθος των ΠΓ που παρασκευάστηκαν στην παρουσία και μη του TA ως αντιοξειδωτικό. Οι πρότυπες μετρήσεις ζ-δυναμικού και το μέγεθος των γαλακτωμάτων φαίνονται στο Παράρτημα στα Σχήματα Π.29 - Π.34.

Πίνακα 8.6: Μεγέθη σταγονιδίων και ζήτα – δυναμικό για τα τριτοταγή ΠΓ που μελετήθηκαν.

Σύσταση Στιβάδας	Αριθμός Στιβάδων	D (sD) (nm)	ζ (sζ) (mV)
BSA – CH – PE	1	267 ± 127	33.8 ± 4.6
	2	217 ± 97	40.2 ± 5.5
	3	294 ± 121	24.9 ± 4.1
BSA/TA – CH – PE	1	664 ± 98	29.1 ± 3.5
	2	353 ± 240	42.3 ± 4.3
	3	354 ± 153	30.9 ± 3.8
BSA – CH/TA – PE	1	267 ± 127	33.8 ± 4.6
	2	250 ± 125	42.9 ± 6.5
	3	279 ± 120	29.9 ± 4.8
BSA – CH – PE/TA	1	267 ± 127	33.8 ± 4.6
	2	217 ± 97	40.2 ± 5.5
	3	337 ± 151	21.1 ± 3.7
BSA – PE – CH	1	267 ± 127	33.8 ± 4.6
	2	914 ± 189	10.4 ± 3.1
	3	982 ± 204	31.1 ± 3.3

Τόσο οι μετρήσεις ζήτα – δυναμικού όσο και DLS δείχνουν ότι τα γαλακτώματα με BSA ως πρώτο στρώμα, χιτοζάνη ως δεύτερο στρώμα και η πηκτίνη ως τρίτο στρώμα είναι σταθερά και παράγουν σταγονίδια με παρόμοια μεγέθη και ηλεκτρικές ιδιότητες. Η αναμενόμενη μεταβολή του ζήτα – δυναμικού παρατηρείται σε όλα τα συστήματα και αποδεικνύει ουσιαστικά την πολυστρωματική φύση των διεπιφανειακών σταγονιδίων, δηλαδή το στρώμα BSA έχει θετικό δυναμικό σε pH = 4, η χιτοζάνη κάνει το δυναμικό ακόμη πιο θετικό και η πηκτίνη λιγότερο θετικό. Η προσθήκη ταννικού οξέος με τον πολυσακχαρίτη του δευτέρου ή του τρίτου στρώματος δεν οδηγεί σε σημαντικές μεταβολές, αλλά οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερο μέγεθος όταν υπάρχει στο πρώτο στρώμα, αποδεικνύοντας μια επιβλαβή επίδραση στη γαλακτωματοποιητική ιδιότητα της BSA. Όταν η πηκτίνη χρησιμοποιείται ως το δεύτερο στρώμα και η χιτοζάνη ως τρίτο, διαπιστώνεται ότι τα γαλακτώματα είναι λιγότερο σταθερά, όπως φαίνεται από τα μεγαλύτερα μέσα μεγέθη σταγονιδίων. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ασθενέστερη ηλεκτροστατική σταθεροποίηση, δεδομένου ότι το φορτίο στο δεύτερο στρώμα του συστήματος BSA-PE-CH είναι πολύ χαμηλότερο από αυτό στο σύστημα BSA-CH-PE. Η παρουσία ταννικού οξέος στις διεπιφανείες των σταγονιδίων επαληθεύεται έμμεσα από αυτά τα αποτελέσματα, ειδικά από την αποσταθεροποίηση του πρώτου στρώματος στην παρουσία TA.

8.3.2 Μετρήσεις αντιοξειδωτικής σταθερότητας λιπιδικής φάσης γαλακτωμάτων

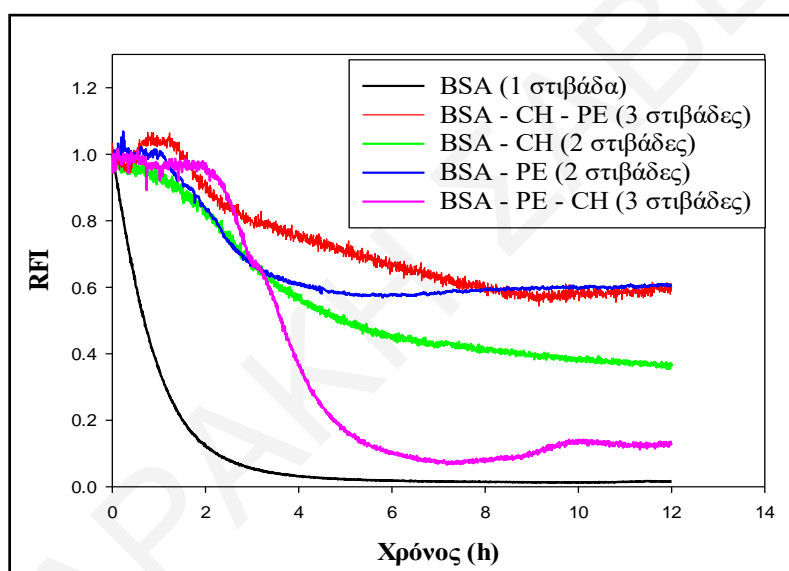
Στο Σχήμα Π.35 φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο αξιολογήθηκε η συμπεριφορά οξειδωσης της λιπιδικής φάσης στην παρούσα εργασία. Η ένταση φθορισμού (RFI) που παρουσιάζεται στα επόμενα φάσματα είναι το αποτέλεσμα δύο παράλληλων πειραμάτων, στα οποία παρακολουθείται η κανονικοποιημένη ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red παρουσία και απουσία του εκκινητή ριζών AAPH. Υπενθυμίζεται ότι η ένταση φθορισμού (RFI) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$RFI = \frac{I_{t,AAPH} / I_{0,AAPH}}{I_{t,control} / I_{0,control}} \quad \text{Εξίσωση 7.3}$$

όπου $I_{t,AAPH}$ είναι η ένταση φθορισμού του γαλακτώματος μετά από «t» min έκθεσης σε AAPH, I_0 η ένταση φθορισμού του γαλακτώματος αμέσως μετά την προσθήκη του AAPH, και $I_{t,control}$ και $I_{0,control}$ είναι οι αντίστοιχες ποσότητες για το διάλυμα ελέγχου.

Στο Σχήμα 8.41 φαίνεται η επίδραση της παρουσίας της χιτοζάνης ως δευτέρου στρώματος και της πηκτίνης ως τρίτου, καθώς και το αντίστροφο, στη σταθεροποίηση των σταγονιδίων έναντι της οξειδωσης. Από τα αποτελέσματα είναι σαφές ότι η BSA από μόνη της δεν παρέχει

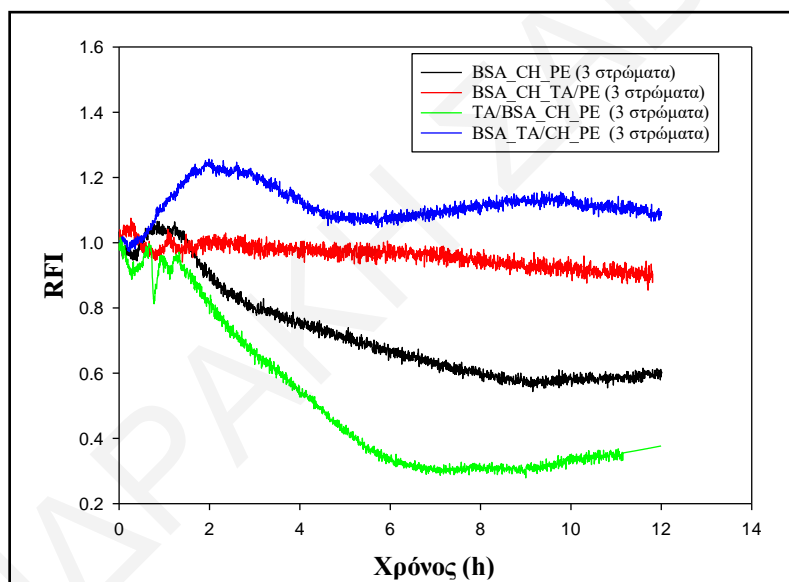
προστασία στην λιπιδική φάση, ενώ οποιοδήποτε δεύτερο στρώμα βελτιώνει σημαντικά την οξειδωτική σταθερότητα, γεγονός που είναι γνωστό από άλλα συστήματα γαλακτωμάτων. Παραδόξως, ενώ η πηκτίνη είναι ικανοποιητική από μόνη της ως δεύτερη στιβάδα, επιδεινώνεται όταν προστίθεται χιτοζάνη ως τρίτη στιβάδα. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται κατά κύριο λόγο στον σχηματισμό συσσωματωμάτων χιτοζάνης-πηκτίνης, λόγω ασθενέστερης ηλεκτροστατικής σταθεροποίησης λόγω χαμηλού φορτίου (Πίνακας 8.6). Αυτή η διαπίστωση επιβεβαιώνεται και από το μεγάλο μέγεθος των σταγονιδίων που μετρήθηκε από τα πειράματα DLS για αυτό το σύστημα. Η αλληλουχία BSA - CHI - PE φαίνεται να παρέχει τη μέγιστη προστασία στα σταγονίδια, ακόμη και απουσία συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού στο σύστημα. Αυτή είναι η ακολουθία που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως βάση για την ανίχνευση της επίδρασης της θέσης του αντιοξειδωτικού ταννικού οξέος στα γαλακτώματα.



Σχήμα 8.41: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red σε διάφορα γαλακτώματα πολλαπλών στρωμάτων που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το BSA ως τον κύριο γαλακτωματοποιητή και χιτοζάνη και πηκτίνη ως υλικά του τοιχώματος απουσία συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού.

Στο Σχήμα 8.42 αποδεικνύεται ότι πράγματι έχει σημασία σε ποιο στρώμα το αντιοξειδωτικό τοποθετείται στο σύστημα. Παραδόξως, η τοποθέτηση του αντιοξειδωτικού στο πρώτο στρώμα μειώνει πραγματικά την οξειδωτική σταθερότητα του συστήματος. Αυτό πιθανό να οφείλεται σε αλλαγές που συμβαίνουν στη γαλακτωματοποιητική ικανότητα της BSA, δεδομένου ότι η παρουσία του TA σε διάλυμα BSA είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη διαμόρφωση της BSA, και συνεπώς πιθανό να έχει επίδραση στο συμπαγές στρώμα της BSA στις διεπιφάνειες των σταγονιδίων επηρεάζοντας και την ικανότητά της να σταθεροποιεί τα σταγονίδια του ελαίου. Από τις προαναφερθείσες μελέτες θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης, φθορισμού και

κυκλικού διχρωρισμού έχει επαληθευτεί ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ ταννικού οξέος και BSA είναι ισχυρή και εκτείνεται σε γραμμομοριακές αναλογίες ταννικού οξέος προς BSA μέχρι και 30 – 40. Μια οριστική ένδειξη για μια τέτοια δομική επίδραση του ταννικού οξέος φαίνεται στα αποτελέσματα DLS του Πίνακα 8.6, όπου παρατηρούνται πολύ μεγαλύτερα σταγονίδια όταν εισάγεται ταννικό οξύ μαζί με BSA στο πρώτο στρώμα. Η εισαγωγή του TA στο δεύτερο στρώμα (χιτοζάνη) παρέχει σίγουρα την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ η ενσωμάτωση στο τρίτο στρώμα (με πηκτίνη) είναι επίσης πλεονεκτική. Τιμές RFI μεγαλύτερες από την μονάδα, που παρατηρούνται στην περίπτωση BSA - CHI / TA - PE, πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή, αλλά αναδεικνύουν σίγουρα την εξαιρετική οξειδωτική σταθεροποίηση που παρατηρείται για αυτό το σύστημα. Στα Σχήματα Π.36 – Π.38 παρατίθενται τα διαγράμματα σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής Nile Red των τριτοταγή γαλακτωμάτων που παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.42.



Σχήμα 8.42: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red σε διάφορα γαλακτώματα πολλαπλών στρωμάτων που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το BSA ως τον κύριο γαλακτωματοποιητή και χιτοζάνη και πηκτίνη ως υλικά του τοιχώματος παρουσία του TA σε διαφορετικά στρώματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Σχεδιασμός πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με βηταλαΐνες: Η κολλοειδής προσέγγιση

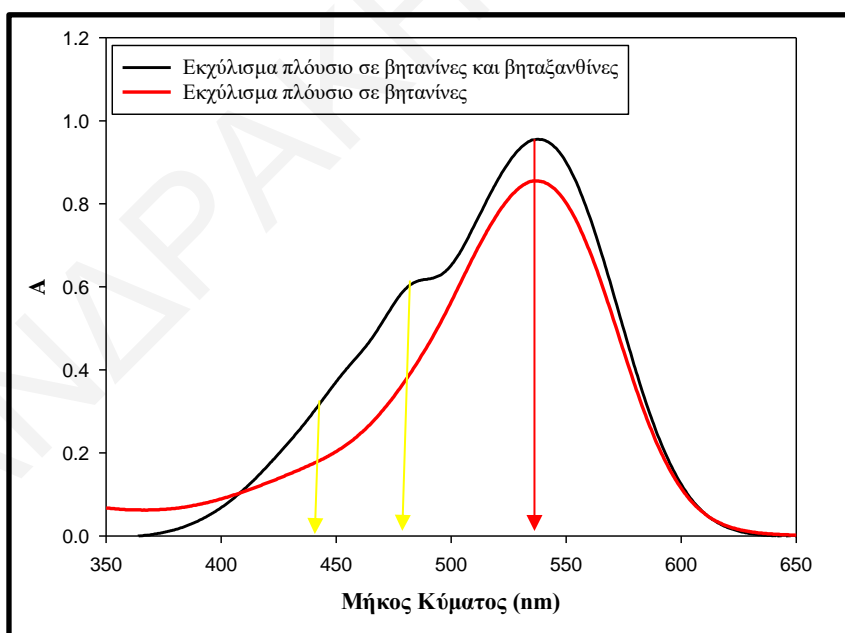
Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται προσπάθεια εφαρμογής της κολλοειδούς προσέγγισης των τριών βημάτων για τον συστηματικό σχεδιασμό πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με βηταλαΐνες ως αντιοξειδωτικό συστατικό. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μελέτες αλληλεπίδρασης σε διάλυμα. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στην τελική μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των βηταλαΐνων σε πολυστρωματικά γαλακτώματα, όπου ελέγχεται η σταθερότητά τους και η επίδραση της ακριβούς γεωμετρικής τοποθέτησης του αντιοξειδωτικού στις διεπιφάνειες.

9.1 Απομόνωση βηταλαΐνων από κόκκινα τεύτλα

Οι συγκεντρώσεις της βητανίνης και της βουλγαξανθίνης στην τελική πλούσια φάση βηταλαΐνων που απομονώθηκαν από τα κόκκινα τεύτλα μέσω της μεθόδου ATPS, υπολογίστηκαν μέσω μετρήσεων απορρόφησης UV-Vis, μιας διαδικασίας που καθιερώθηκε από τον Nilsson (1970). (Cardoso-Ugarte et al. 2014, Chethana et al. 2007) Η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε βηταλαΐνες, βητανίνη και βουλγαξανθίνη – I προσδιορίστηκε στα 0.14 ± 0.04 mM, 0.11 ± 0.03 mM και 0.04 ± 0.02 mM αντίστοιχα μέσω των Εξισώσεων 6.1 και 6.2 όπως περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο 6.2.1.1. Το προφίλ των βηταλαΐνων στο εκχύλισμα αξιολογήθηκε με χρήση HPLC. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC χρωματογραφίας Waters, με Waters e2695 Alliance Separation Module, εξοπλισμένο Waters 2998 με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector – PDA) και με στήλη αντίστροφης φάσης Waters Spherisorb 4.6 mm x 250 mm με μέγεθος σωματιδίων 5 μm. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε υπό σύστημα διαβάθμισης με διαλύτη 4% μεθανικό οξύ (Διαλύτης Α) και

ακετονιτρίλιο (Διαλύτη Β). Για το διαχωρισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο σύστημα διαβάθμισης: 97% Α με 3% Β στα 0 λεπτά, βαθμίδα έως 85% Α με 20% Β στα 35 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL και ο ρυθμός ροής ήταν 0,5 mL / min . Η ανίχνευση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε στα 538 και 480 nm. (Jerz et al. 2008) Το μείγμα εκχυλίσματος βηταλαϊνών περιέχει βουλγαξανθίνη – I και βητανίνη, τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. (Chandrasekhar et al. 2015) Τα χρωματογραφήματα HPLC του εκχυλίσματος βηταλαϊνών φαίνονται στο Σχήμα Π.39 του Παραρτήματος.

Το φάσμα UV-Vis του εκχυλίσματος βηταλαϊνών σε $\text{pH} = 4$ φαίνεται στο Σχήμα 9.1. Το κόκκινο φάσμα αντιστοιχεί σε εκχύλισμα το οποίο περιέχει κυρίως βητανίνη ενώ το μαύρο φάσμα αντιστοιχεί σε εκχύλισμα το οποίο περιέχει βουλγαξανθίνη – I και βητανίνη. Η αποσυνέλιξη του φάσματος φανερώνει την ύπαρξη τριών κορυφών, στα 440 nm και 480 nm, που οφείλονται στις βηταξανθίνες, και στα 540 nm που αντιστοιχεί στη βητανίνη. Τα δύο διαφορετικού τύπου σύστασης εκχυλίσματα προκύπτουν όταν κατά τη διαδικασία της απομόνωσης το πρώτο βήμα εκχύλισης πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Όταν η θερμοκρασία είναι 25 $^{\circ}\text{C}$ τότε το εκχύλισμα περιέχει σε μεγάλο ποσοστό βητανίνες, ενώ όταν η εκχύλιση γίνει σε θερμοκρασίες 4 – 5 $^{\circ}\text{C}$ το εκχύλισμα περιέχει βουλγαξανθίνη – I και βητανίνη.

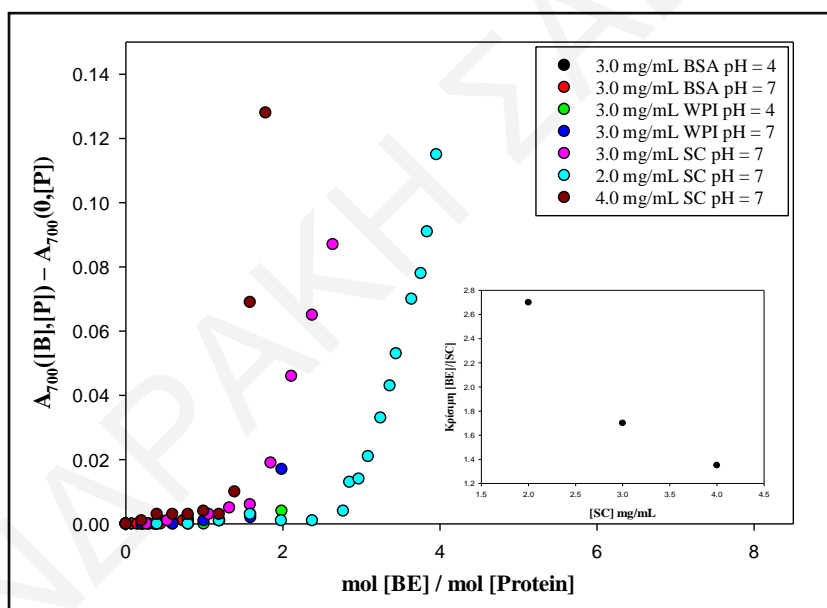


Σχήμα 9.1: Φάσμα UV-Vis εκχυλίσματος βηταλαϊνών σε $\text{pH} = 4$. Το κόκκινο φάσμα αντιστοιχεί σε εκχύλισμα το οποίο περιέχει κυρίως βητανίνη ενώ το μαύρο φάσμα αντιστοιχεί σε εκχύλισμα το οποίο περιέχει βουλγαξανθίνη – I και βητανίνη. Οι κορυφές στα 440 nm και 480 nm οφείλονται στις βηταξανθίνες ενώ αυτή στα 540 nm αντιστοιχεί στη βητανίνη.

9.2 ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

9.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων θολερότητας

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις θολερότητας διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των βηταλαϊνών (BE). Αυτές οι μετρήσεις καθορίζουν το εύρος συγκέντρωσης πάνω από το οποίο πραγματοποιείται συσσωμάτωση μεταξύ BE και βιοπολυμερών. Στο Σχήμα 9.2 απεικονίζεται η θολερότητα στα 700 nm ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας BE ως προς τη πρωτεΐνη για διαφορετικές τιμές της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο διάλυμα. Ο άξονας y είναι η ποσότητα $\Delta A_{700} = A_{700}([B], [P]) - A_{700}(0, [P])$ για οποιαδήποτε συγκέντρωση πρωτεΐνης [P]. Η βητανίνη απορροφά ισχυρά στην ορατή περιοχή με $\lambda_{\max} = 536$ nm. Ως εκ τούτου η θολερότητα στα συστήματα βηταλαϊνών μετρήθηκε στα 700 nm για αποφυγή παρεμβολών από την απορρόφηση του χρωμοφόρου μορίου, σε αντίθεση με τις μετρήσεις θολερότητας του ΤΑ που έγιναν στα 600 nm.



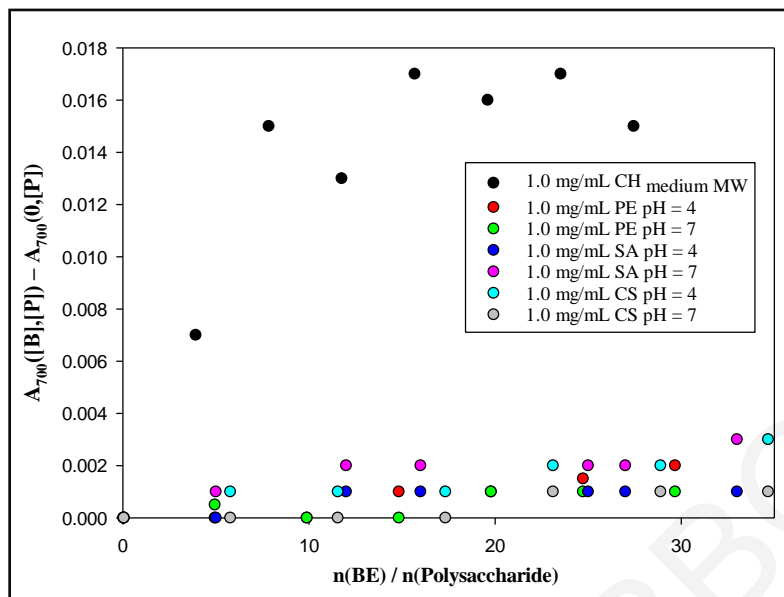
Σχήμα 9.2: Διάγραμμα θολερότητας διαλυμάτων BE / Πρωτεΐνης σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Ένθετο: Κρίσιμες τιμές γραμμομοριακής αναλογίας στην οποία παρατηρείται έναρξη της αύξησης θολερότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης SC.

Από το Σχήμα 9.2 φαίνεται ότι οι βηταλαΐνες δεν προκαλούν συσσωμάτωση σε διαυγή διαλύματα BSA ή WPI, σε τιμές pH 4 είτε 7, ενώ προκαλούν συσσωμάτωση σε διαλύματα SC σε pH = 7. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε είναι 3 mg / mL για BSA και WPI, καθώς αυτές είναι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτών των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται στις άλλες μεθόδους. Στο Σχήμα Π.40 παρουσιάζονται τα διαγράμματα θολερότητας των βηταλαϊνών παρουσία μεταβαλλόμενων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών BSA και WPI σε pH = 4 και 7. Στο διάγραμμα του Σχήματος 9.2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα για

περισσότερες συγκεντρώσεις SC, το οποίο συσσωματώνεται στην παρουσία βηταλαϊνών. Σε $pH = 7$ τόσο το SC όσο και οι βηταλαΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βηταλαϊνών και BSA ή WPI είναι ασθενείς, ενώ αυτές με το SC είναι ισχυρότερες και οδηγούν σε συσσωμάτωση του SC. Αυτή η διαφορετική συμπεριφορά των βηταλαϊνών ως προς αυτή του TA (Υποκεφάλαιο 8.1.1), μπορεί πιθανώς να αποδοθεί στην «ανοιχτή» διαμόρφωση του SC στο διάλυμα. Τα μόρια των βηταλαϊνών είναι μικρότερα σε μέγεθος από αυτό του TA, άρα είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με αναδιπλωμένες δομές ευκολότερα συγκριτικά με τις συμπαγείς πρωτεΐνες, στοχεύοντας κατάλοιπα τα οποία σε συμπαγείς πρωτεΐνες ίσως δεν είναι προσβάσιμα. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η θολερότητα εξαρτάται τόσο από τους λόγους συγκέντρωσης των δύο συστατικών όσο και από τις απόλυτες τιμές των συγκεντρώσεων. Για κάθε συγκέντρωση SC υπάρχει μια διαφορετική κρίσιμη συγκέντρωση βηταλαϊνών στην οποία αρχίζει να εμφανίζεται θολερότητα λόγω μεγαλύτερης κλίμακας συσσωμάτωσης. Όπως φαίνεται στο ένθετο του Σχήματος 9.2 οι κρίσιμοι μοριακοί λόγοι σε $pH = 7$ είναι κοντά στο 2.

Στο Σχήμα 9.3 παρουσιάζεται το διάγραμμα θολερότητας για τους τέσσερις πολυσακχαρίτες που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα. Παρατηρείται μια διαφορετική συμπεριφορά ως προς αυτή του SC. Τα δεδομένα που εμφανίζονται είναι για διαλύματα πολυσακχαριτών 1 mg/mL σε $pH = 4$ και 7. Μετρήσεις έχουν γίνει και για διαφορετικές συγκεντρώσεις, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν παρουσίαζαν αξιοσημείωτες διαφορές και φαίνονται στο Σχήμα Π.41. Η τετμημένη είναι η αναλογία γραμμομορίων βηταλαϊνών ανά γραμμομόριο μονομερούς του πολυσακχαρίτη. Σε αυτά τα αποτελέσματα δεν παρατηρείται η θολερότητα να αυξάνεται ούτε για μεγάλες συγκεντρώσεις βηταλαϊνών εκτός από την περίπτωση της χιτοζάνης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η βητανίνη σε $pH 4$ είναι δίπολο ιόν, ενώ σε $pH 7$ είναι αρνητικά φορτισμένη. (Wylle 1969) Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως οι βηταλαΐνες αλληλεπιδρούν με τη θετικά φορτισμένη χιτοζάνη ($pK = 6.3$) πιθανώς μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

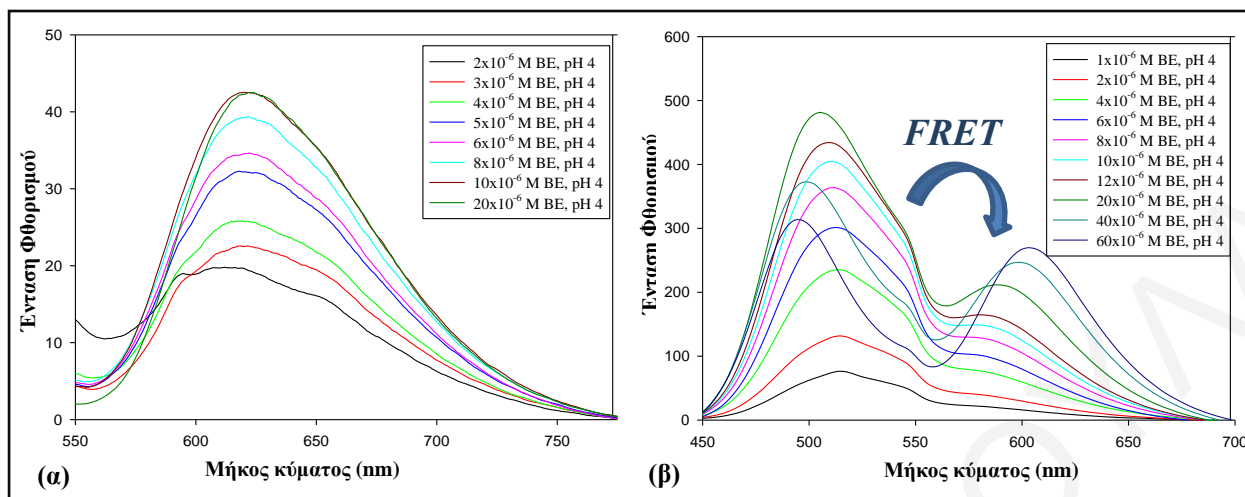
Τα πειράματα θολερότητας έχουν καθοδηγητικό ρόλο αφού υποδεικνύουν τις αλληλεπιδράσεις των αντιοξειδωτικών με τους πολυηλεκτρολύτες και τις πρωτεΐνες στα υδατικά διαλύματα. Για τα συστήματα των βηταλαϊνών προκύπτει πως για τον σχηματισμό ισχυρών συζεύξεων πρέπει να χρησιμοποιηθεί το SC και η χιτοζάνη.



Σχήμα 9.3: Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων BE / πολυσακχαρίτη ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαλύματα πολυσακχαρίτη 1 mg / mL σε pH = 4 και 7.

9.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων φθορισμού

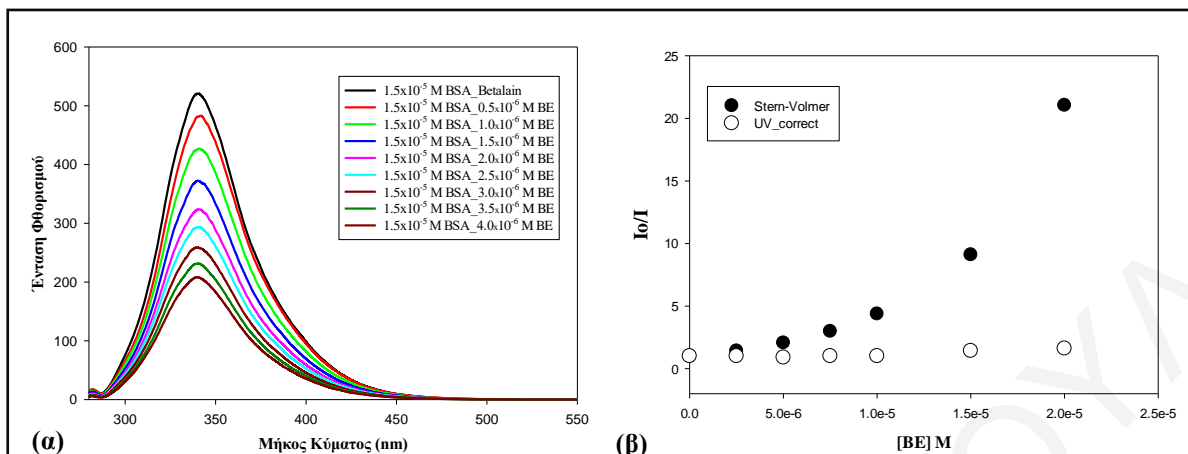
Ο φθορισμός των βηταλαϊνών παρατηρείται με διέγερση στα 260-280 nm που δίνει μια ασθενή ζώνη στα 330 nm, ωστόσο αυτή η περιοχή δεν είναι χρήσιμη στην παρούσα έρευνα, καθώς επικαλύπτονται με το φθορισμό των πρωτεϊνών. Η διέγερση στις κορυφές απορρόφησης στα 480 nm και 540 nm οδηγεί σε σημαντική εκπομπή πάνω από 600 nm και μπορεί να αποδοθεί στις βητανίνες. Από την άλλη πλευρά, οι βηταξανθίνες διεγείρονται στα 440 nm και δίνουν μια ισχυρή ζώνη εκπομπής στα 540 nm. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των βηταλαϊνών, παρατηρείται σημαντική μεταφορά τύπου FRET, με την εκπομπή στα 540 nm να μειώνεται και τον φθορισμό της βητανίνης στα 600 nm να αυξάνεται, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.4. Η μεταφορά FRET γίνεται σημαντικό σε συγκεντρώσεις βηταλαϊνών μεγαλύτερες από 8-10 μM. Επομένως αυτή είναι η μέγιστη συγκέντρωση βηταλαϊνών που πρέπει να χρησιμοποιείται κατά τη μελέτη της ζώνης εκπομπής 540 nm, καθώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οδηγούν σε αποκλίσεις από τη γραμμική συμπεριφορά (Σχήμα Π.42).



Σχήμα 9.4: Φάσμα φθορισμού BE (α) με διέγερση στα 540 nm και εκπομπή πάνω από 600 nm και (β) με διέγερση στα 440 nm και εκπομπή πάνω από 540 nm (Μεταφορά FRET).

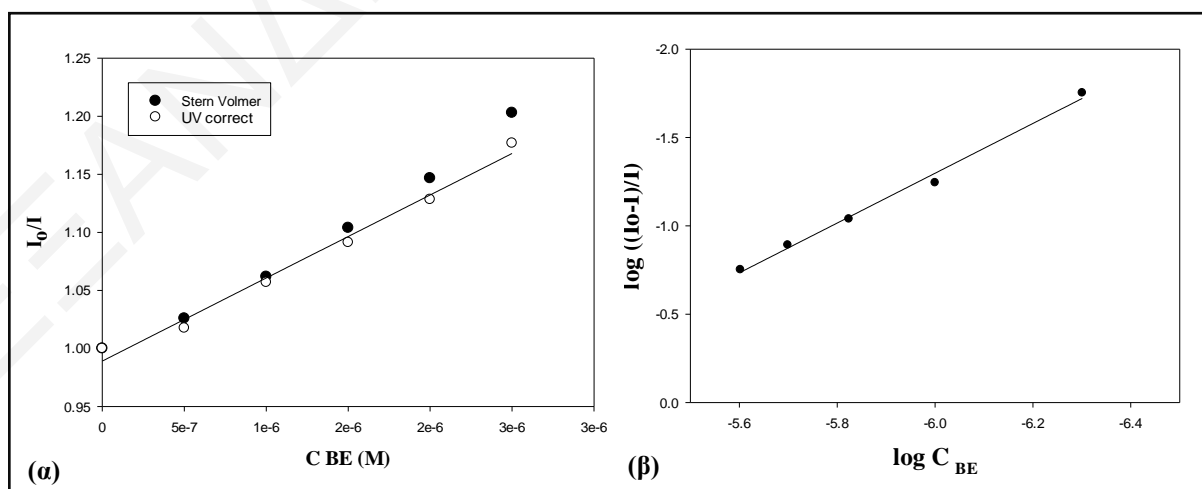
9.2.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων απόσβεσης φθορισμού πρωτεϊνών

Μετρήθηκε ο φθορισμός των πρωτεϊνών BSA, WPI και SC παρουσία BE σε pH 4 και 7. Στο διάγραμμα του Σχήματος 9.5 (α) φαίνονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού της BSA συγκέντρωσης 1.5×10^{-5} M σε εύρος συγκεντρώσεων BE $0-4.0 \times 10^{-6}$ M σε pH = 4. Με την διέγερση της πρωτεΐνης στα 280 nm προκύπτει κορυφή εκπομπής περίπου στα 340 nm, της οποίας η ένταση μειώνεται σημαντικά με τη διαδοχική προσθήκη BE. Ωστόσο, λόγω της ισχυρής απορρόφησης που παρουσιάζουν οι βηταλαΐνες στην περιοχή διέγερσης είναι απαραίτητη η διόρθωση των αποτελεσμάτων μέσω της Εξίσωσης 6.7 για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου. Στο διάγραμμα του Σχήματος 9.5 (β) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πριν και μετά τη διόρθωση για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου. Από τα αποτελέσματα είναι προφανής η τεράστια μείωση της παρατηρούμενης έντασης κατά την εκπομπή λόγω αυτής της απορρόφησης. Ακολούθως έγινε προσπάθεια να γίνει εφαρμογή των δεδομένων που λήφθηκαν από τις μετρήσεις φθορισμού στην Εξίσωση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) καθώς και στην Εξίσωση 6.5, ωστόσο σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων η προσαρμογή ήταν αδύνατη λόγω της πολύ ασθενούς αλληλεπίδρασης που παρατηρείται και του πολύ έντονου φαινομένου εσωτερικού φίλτρου. Στο Σχήμα Π.43 - Π.45 του Παραρτήματος παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τη πρωτεΐνη BSA σε pH = 7, WPI σε pH = 4 και 7 και SC σε pH = 7. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται πως τα διαγράμματα που προκύπτουν από τα διορθωμένα αποτελέσματα έχουν πολύ ισχυρή απορρόφηση στο μήκος κύματος διέγερσης, γεγονός που καθιστά αδύνατη την περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών.

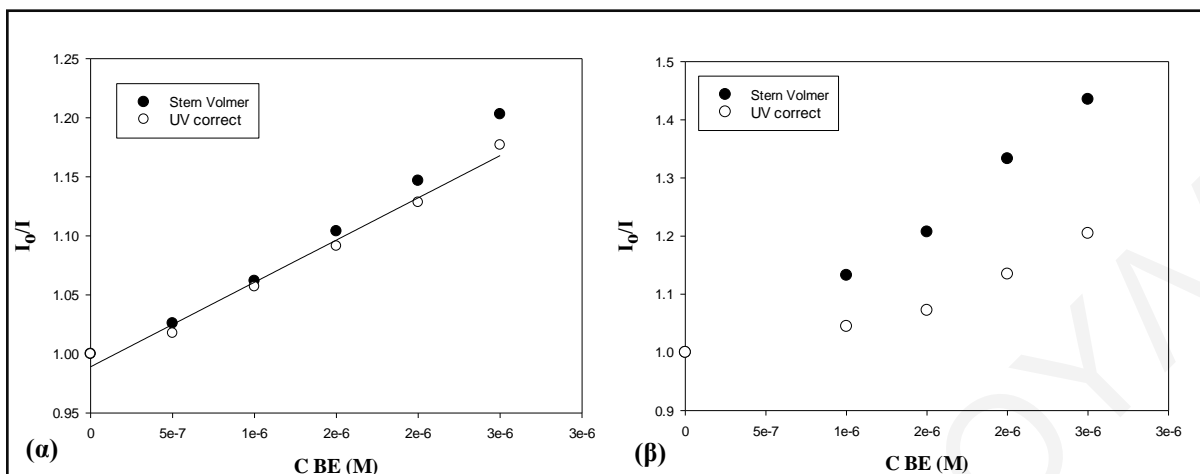


Σχήμα 9.5: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE (0- 4.0×10^{-6} M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.

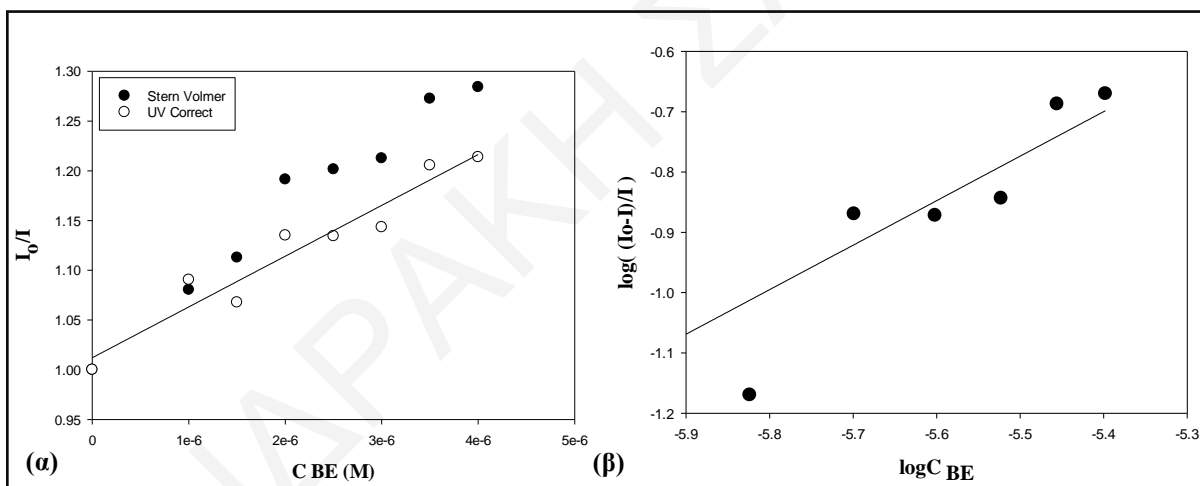
Στη συνέχεια έγιναν πειράματα απόσβεσης φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH = 4 και του SC σε pH = 7 σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή των Εξισώσεων 6.1 και 6.5 στα δεδομένα για τον υπολογισμό των σταθερών πρόσδεσης και του αριθμού n. Μετρήσεις έγιναν μόνο για BSA και SC, επειδή σε αυτές τις πρωτεΐνες υπήρχαν ενδείξεις αλληλεπίδρασης από άλλες μετρήσεις. Οι σταθερές φθορισμού K_{sv} ή K_a , K_s και ο αριθμός n των συστημάτων που μελετήθηκαν συγκεντρώνονται στον Πίνακα 9.1. Στο Σχήμα 9.6 - 9.8 παρουσιάζονται τα διαγράμματα για τα συστήματα BSA – BE σε pH = 4 και για το σύστημα SC – BE σε pH = 7, αντίστοιχα.



Σχήμα 9.6: (α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA (1.37×10^{-6} M) από μόρια BE (0 – 2.5×10^{-6} M) pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer, K_{sv} , και της σταθεράς K_a και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_s και του αριθμού προσδεμένων μορίων BE ανά μόριο BSA, n.



Σχήμα 9.7: Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA (1.37×10^{-6} M) από μόρια BE ($0 - 2.5 \times 10^{-6}$ M) από εκχύλιση βηταλαΐνων πλούσιο σε (α) βηταξανθίνες και (β) βηταίνες.



Σχήμα 9.8: (α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης SC (8.4×10^{-6} M) από μόρια BE ($0 - 2.5 \times 10^{-6}$ M) pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς Stern-Volmer, K_{sv} , και της σταθεράς K_Q και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.5 για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_S και του αριθμού προσδεμένων μορίων BE ανά μόριο SC, n .

Πίνακας 9.1: Σταθερές απόσβεσης φθορισμού και ο αριθμός μορίων n αντιοξειδωτικών που προσδένονται σε ένα μόριο πρωτεΐνης.

Σύστημα	K_{sv} ή K (M^{-1})	K_Q ($M^{-1}s^{-1}$)	K_S (M^{-1})	n
BSA / BE, pH 4	$(7 \pm 1) \times 10^4$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{13}$	$(1 \pm 1) \times 10^7$	1.4 ± 0.2
SC / BE, pH 7	$(5 \pm 1) \times 10^4$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{13}$	$(2 \pm 4) \times 10^3$	0.7 ± 0.4

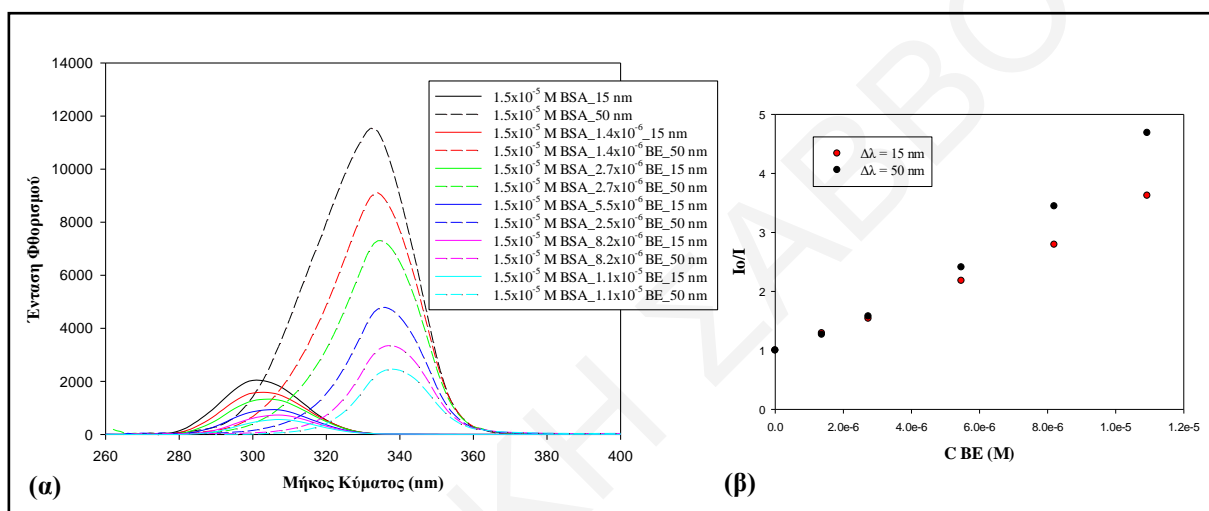
Στα δεδομένα που παρουσιάζονται στα Σχήματα 9.6 – 9.8 ήταν δυνατή η εφαρμογή των Εξισώσεων για τον υπολογισμό των σταθερών πρόσδεσης και του αριθμού n , παρόλο που τα σφάλματα είναι αρκετά μεγάλα λόγω των σφαλμάτων που προκύπτουν κατά την αφαίρεση της απορρόφησης εσωτερικού φίλτρου. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις τα πειράματα ήταν χαμηλής ακρίβειας, επειδή μειώθηκε η συγκέντρωση των βηταλαϊνών (αλλά και πρωτεΐνης) ώστε να περιοριστεί σε μεγάλο βαθμό το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου, αλλά τότε περιορίζεται και το ποσοστό μείωσης του φθορισμού. Ωστόσο τα πειράματα αυτά δίνουν μια ένδειξη της τάξης μεγέθους των αλληλεπιδράσεων που υπάρχουν σε αυτά τα συστήματα. Στην περίπτωση της BSA σε $\text{pH} = 4$ η σταθερά πρόσδεσης K_s και ο γραμμομοριακός αριθμός n είναι μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα για το σύστημα SC σε $\text{pH} = 7$. Αυτή η συμπεριφορά πιθανό να οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν σε αυτές τις συνθήκες αφού οι βηταλαϊνες σε $\text{pH} = 4$ είναι δίπολα ιόντα και μπορούν να αλληλεπιδρούν με τη θετικά φορτισμένη BSA, ενώ σε $\text{pH} = 7$ είναι αρνητικά φορτισμένα και τα δύο μόρια (βηταλαϊνες και SC).

Στο Σχήμα 9.7 παρουσιάζονται τα διορθωμένα και μη διαγράμματα της Εξίσωσης Stern-Volmer για το σύστημα BSA – BE σε $\text{pH} = 4$, ωστόσο χρησιμοποιώντας διαφορετικά εκχυλίσματα βηταλαϊνών. Στο διάγραμμα (α) το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε βηταξανθίνες και στο διάγραμμα (β) το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε βητανίνες. Τα δύο μίγματα βηταλαϊνών δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα. Το εκχύλισμα που είναι πλούσιο σε βητανίνες έχει συστηματικά αυξανόμενη απορρόφηση. Πριν τη διόρθωση εσωτερικού φίλτρου, δίνει σταθερά $K_{SV} = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, ενώ μετά τη διόρθωση πέφτει στο $8.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Το εκχύλισμα πλούσιο σε βηταξανθίνες έχει εξ αρχής σημαντικά μειωμένη απορρόφηση στα 280 nm και οι σταθερές K_{SV} πριν και μετά η διόρθωση εσωτερικού φίλτρου έχουν μεταξύ τους ελάχιστες διαφορές, $K_{SV} = 7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ και $7.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ αντίστοιχα.

9.2.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων σύγχρονου φθορισμού

Η επίδραση των βηταλαϊνών στα σύγχρονα φάσματα φθορισμού των πρωτεϊνών μελετήθηκε για $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (φθορισμός Tyr) και 50 nm (φθορισμός Trp). Στο Σχήμα 9.9 (α) φαίνεται η επίδραση των βηταλαϊνών στα σύγχρονα φάσματα φθορισμού της BSA σε $\text{pH} = 4$. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι το μέγιστο εκπομπής των καταλοίπων Tyr είχε μια μετατόπιση προς μεγαλύτερα μήκη κύματος ($\Delta\lambda = 7 \text{ nm}$), το οποίο έδειξε ότι η πολικότητα γύρω από τα κατάλοιπα Tyr αυξήθηκε και η υδροφοβικότητα μειώθηκε. Η ίδια συμπεριφορά ($\Delta\lambda = 6 \text{ nm}$) παρατηρήθηκε και για τα κατάλοιπα Trp, τα οποία εντοπίστηκαν σε ένα λιγότερο υδρόφοβο περιβάλλον και πιο εκτεθειμένα στο διάλυμα. Παρατηρείται λοιπόν, ότι σε $\text{pH} = 4$ η αλληλεπίδραση μεταξύ BE και BSA αλλάζει το μικροπεριβάλλον γύρω από τα κατάλοιπα Tyr

και Tyr. Επιπλέον συγκρίνοντας της απόσβεση φθορισμού των δύο αυτών τύπων καταλοίπων (Σχήμα 9.9 β), διαπιστώνεται ότι η απόσβεση του φθορισμού της Tyr είναι μεγαλύτερη από αυτή της Tyr. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε για όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν και τα αποτελέσματά τους φαίνονται στα Σχήματα Π.46- Π.48. Ωστόσο στα πειράματα σύγχρονου φθορισμού δεν έγινε διόρθωση του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου λόγω της ιδιαιτερότητας της μεθόδου. Συνεπώς η μεγάλη απόσβεση του φθορισμού που παρατηρείται δεν οφείλεται αποκλειστικά στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ βηταλαϊνών και BSA αλλά και στην μεγάλη απορρόφηση που έχουν τα μόρια των βηταλαϊνών σε αυτό το εύρος μήκους κύματος.



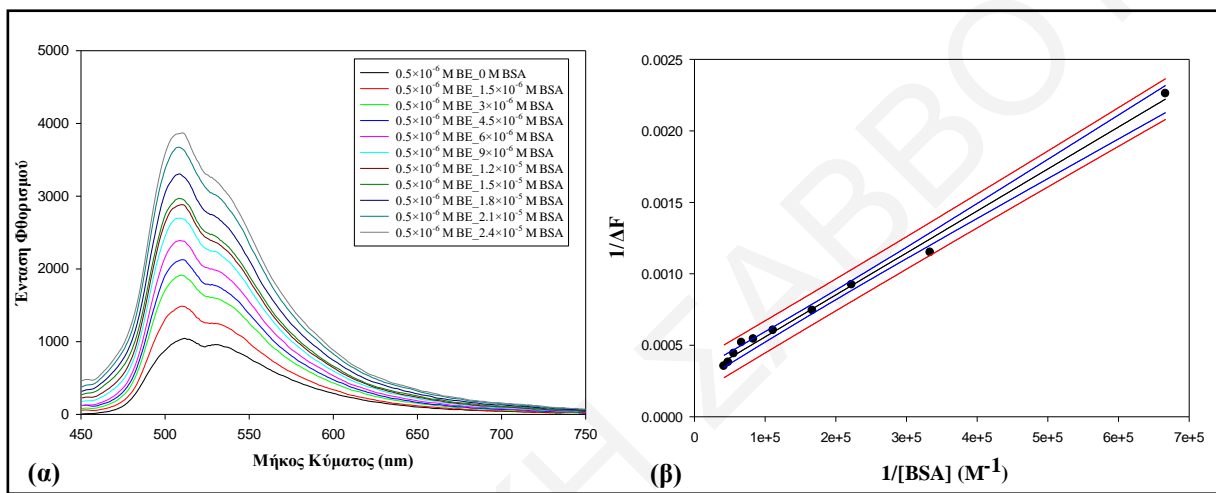
Σχήμα 9.9: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE (0-1.1x10⁻⁵ M) για Δλ = 15 nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.

9.2.2.3 Αποτελέσματα πειραμάτων ενίσχυσης φθορισμού

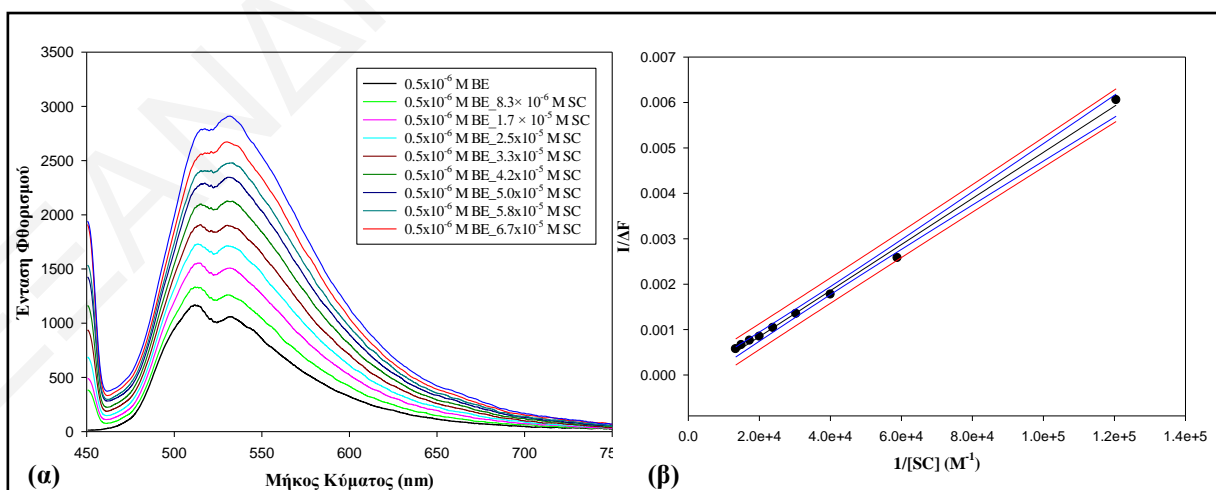
Οι βηταλαΐνες έχουν ένα επιπλέον πλεονέκτημα, αφού ο φθορισμός τους μπορεί να μελετηθεί ανεξάρτητα στην παρουσία πρωτεϊνών. Στο Σχήμα 9.10 (α) φαίνεται πως μεταβάλλεται η ένταση εκπομπής της βηταξανθίνης στα 540 nm παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης BSA. Το σήμα αυξάνεται παρουσία της πρωτεΐνης. Δεδομένου ότι η απορρόφηση των διαλυμάτων αυτών δεν αλλάζει πολύ όταν υπάρχει πρωτεΐνη (Σχήμα Π.49 στο Παράρτημα), συμπεραίνουμε ότι η κβαντική απόδοση φθορισμού της χρωστικής αυξάνεται παρουσία BSA. Ένας έμμεσος τρόπος μοντελοποίησης τέτοιων δεδομένων βασίζεται στην εξίσωση Benesi-Hildebrand (Εξίσωση 6.9).

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{K \Delta F_{\max}} \times \frac{1}{[P]} \quad \text{Εξίσωση 6.9}$$

Στο Σχήμα 9.10 (β) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσαρμογής της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα. Η μεταβολή του φθορισμού των βηταλαϊνών μελετήθηκε παρουσία όλων των πρωτεϊνών και όλων των πολυσακχαριτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα, ωστόσο όμοια συμπεριφορά με αυτή της BSA σε pH = 4, παρατηρήθηκε μόνο για τα συστήματα SC σε pH = 7 και CH σε pH = 4, των οποίων τα διαγράμματα παρουσιάζονται στα Σχήματα 9.11 και 9.12, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της εξίσωσης συνοψίζονται στον Πίνακα 9.2. Στον πίνακα δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το σύστημα CH σε pH = 4 καθώς προκύπτει αρνητική αποτέμνουσα.



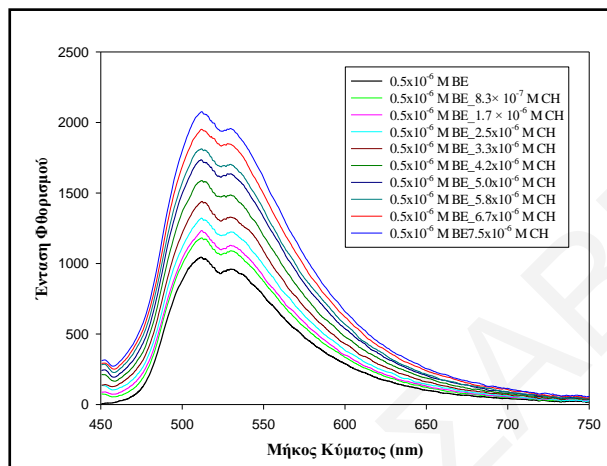
Σχήμα 9.10: (α) Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA ($0-2.4 \times 10^{-5}$ M) σε pH 4 και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Benesi-Hildebrand για την ενίσχυση του φθορισμού της BE από μόρια πρωτεΐνης BSA. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.



Σχήμα 9.11: (α) Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης SC ($0-6.7 \times 10^{-5}$ M) σε pH 7 και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Benesi-Hildebrand για την ενίσχυση του φθορισμού της BE από μόρια πρωτεΐνης SC. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.

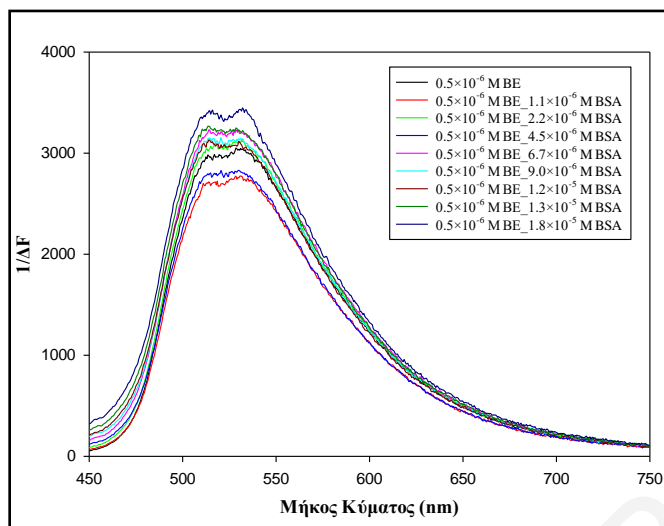
Πίνακας 9.2: Σταθερές Benesi-Hildebrand που προσδιορίστηκαν από τα πειράματα ενίσχυσης φθορισμού των βηταλαϊνών.

Σύστημα	K (M ⁻¹)
BSA / BE, pH 4	102000 ± 7000
SC / BE, pH 7	80000 ± 50000



Σχήμα 9.12: Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων χιτοζάνης ($0-7.5 \times 10^{-6}$ M) σε pH 4.

Στο Σχήμα 9.13 φαίνονται τα φάσματα φθορισμού BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA ($0-2.4 \times 10^{-5}$ M) σε pH = 7. Από το διάγραμμα είναι εμφανές ότι δεν παρατηρείται ενίσχυση του φθορισμού των βηταλαϊνών, όπως και συμβαίνει για τα υπόλοιπα συστήματα που παρουσιάζονται στα Σχήματα Π.50 – Π.54 του Παραρτήματος. Η συμπεριφορά αυτή υποδεικνύει την πολύ μικρή αλληλεπίδραση μεταξύ των συστημάτων αυτών και των βηταλαϊνών. Σε pH = 7 οι βηταλαΐνες και τα βιομόρια είναι αρνητικά φορτισμένα με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται απωστικές αλληλεπιδράσεις εμποδίζοντας την έλξη μεταξύ τους. Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9.2 προκύπτουν σταθερές K που είναι διαφορετικές από τις τιμές K_s που προκύπτουν από τα λογαριθμικά διαγράμματα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1. Οι διαφορές πιθανό να οφείλονται σε σφάλματα που προκύπτουν κατά την αφαίρεση της απορρόφησης εσωτερικού φίλτρου και στις διορθώσεις που γίνονται για την χρήση των εξισώσεων, αν και υπάρχει περίπτωση να οφείλονται στη διαφορετική αλληλεπίδραση των ξανθινών και των βητανινών με τα βιομόρια.



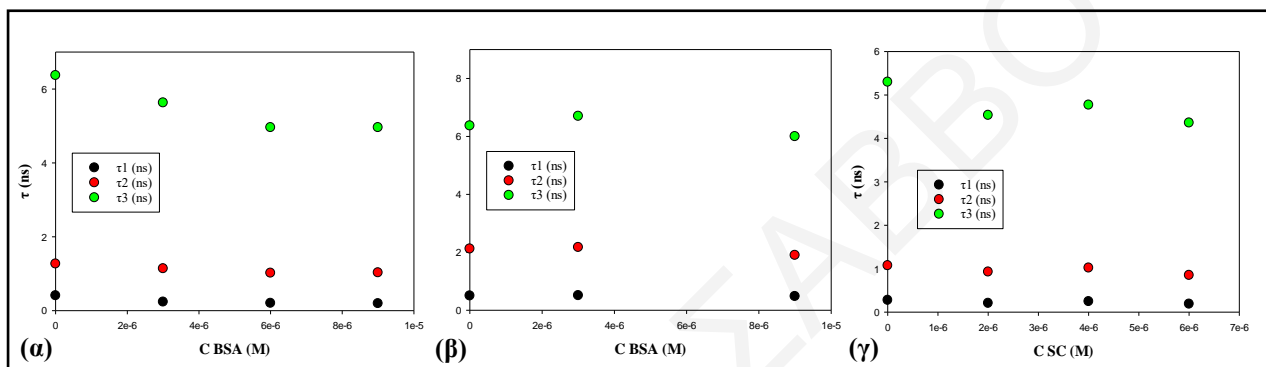
Σχήμα 9.13: Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA ($0-2.4 \times 10^{-5}$ M) σε pH 7.

9.2.2.4 Αποτελέσματα πειραμάτων χρονοεξαρτημένου φθορισμού

Μελετήθηκε ο χρονοεξαρτημένος φθορισμός των βηταλαϊνών στην παρουσία πρωτεϊνών στα συστήματα BE - BSA και BE - SC, επειδή σε αυτά τα συστήματα υπήρχαν ενδείξεις αλληλεπίδρασης από τις προηγούμενες μετρήσεις και για να ελεγχθεί ο μηχανισμός απόσβεσης. Η διέγερση των συστημάτων αυτών έγινε στα 405 nm και η ανίχνευση στα 540 nm για να εξετασθούν οι χαρακτηριστικοί χρόνοι ημιζωής των βηταλαϊνών. Προσδιορίστηκαν τρεις τέτοιοι χρόνοι στην τάξη των ns για το σύστημα BE - BSA σε pH = 4 και 7 και για το σύστημα BE - SC σε pH = 7, οι οποίοι είναι πολύ μεγαλύτεροι από αυτούς που αναφέρονται σε πρόσφατες μελέτες και έχουν εύρος τιμών 3 – 40 ps (Πίνακας 9.3). (Wendel et al. 2015) Είναι προφανές ότι στην εργασία των Wendel et al. που αφορούσε τις βηταλαΐνες μόνες τους στο διάλυμα έχουν μετρηθεί χρόνοι που αντιστοιχούν σε διαφορετικά φαινόμενα. Οι μετρούμενοι χρόνοι στην παρούσα εργασία κατά κάποιον τρόπο αντανακλούν φαινόμενα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των βηταλαϊνών με τις πρωτεΐνες. Στα διαγράμματα του Σχήματος 9.14 παρουσιάζεται η μεταβολή του κάθε χρόνου για το κάθε σύστημα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Στο σύστημα BE - BSA σε pH = 4 και 7 και BE - SC σε pH = 7 παρατηρείται μείωση των χρόνων καθώς η συγκέντρωση αυξάνεται, ενώ για το σύστημα BE - BSA σε pH = 7 δεν παρατηρείται κάποια συστηματική συμπεριφορά. Η συγκέντρωση των βηταλαϊνών ήταν $2,0 \times 10^{-6}$ mol/L, της BSA από $3,0 \times 10^{-6}$ mol/L μέχρι $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L σε pH 4 και pH 7 και του SC από $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L μέχρι $2,7 \times 10^{-5}$ σε pH 7. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 405 nm (που αντιστοιχεί σε διέγερση ξανθινών) και το μήκος κύματος μέτρησης στα 540 nm.

Πίνακας 9.3: Χαρακτηριστικοί χρόνοι αποδιέγερσης βηταλαϊνών κατά τη διέγερσή τους στα 405 nm παρουσία BSA και SC συγκέντρωσης 3.0×10^{-6} M.

Σύστημα	α_1	τ_1 (ns)	α_2	τ_2 (ns)	α_3	τ_3 (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)
BE - BSA, pH 4	0.678 ± 0.005	0.238 ± 0.002	0.342 ± 0.004	1.14 ± 0.02	0.025 ± 0.002	5.6 ± 0.4	1.9 ± 0.3
BE - BSA, pH 7	0.517 ± 0.003	0.517 ± 0.003	0.157 ± 0.004	2.18 ± 0.06	0.023 ± 0.002	6.7 ± 0.4	2.25 ± 0.05
BE - SC, pH 7	0.538 ± 0.005	0.205 ± 0.002	0.448 ± 0.004	0.93 ± 0.01	0.050 ± 0.002	4.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1



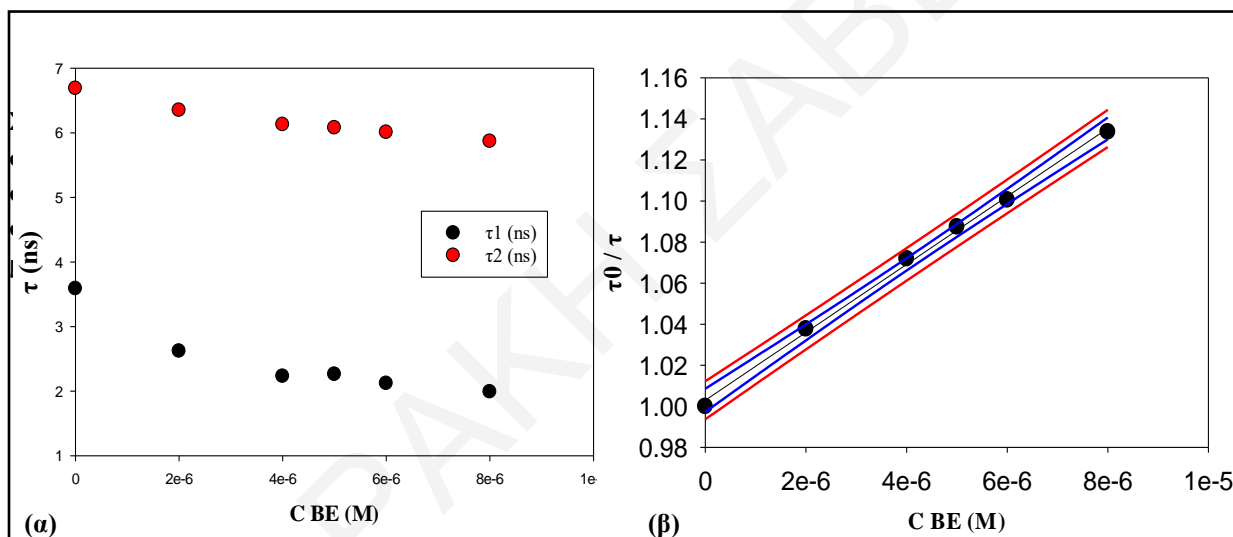
Σχήμα 9.14: Χρόνοι αποδιέγερσης των βηταλαϊνών κατά τη διέγερσή τους στα 405 nm στα συστήματα (α) BE - BSA σε pH = 4, (β) BE - BSA σε pH = 7 και (γ) BE - SC σε pH = 7 συνάρτηση των μεταβαλλόμενων συγκεντρώσεων BSA και SC.

Επιπλέον μελετήθηκε και ο χρονοεξαρτημένος φθορισμός των πρωτεϊνών BSA και SC στην παρουσία μεταβαλλόμενων συγκεντρώσεων βηταλαϊνών. Η διέγερση σε αυτά τα συστήματα έγινε στα 266 nm και η μέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm. Προσδιορίστηκαν δύο χρόνοι ημιζωής για τις δύο αυτές πρωτεΐνες, οι οποίοι φαίνονται στον Πίνακα 9.4. Στα διαγράμματα των Σχημάτων Π.56 – Π.60 παρουσιάζεται η απόσβεση του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου όπως προκύπτει από τα πειράματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού και φαίνεται η ποιότητα της προσαρμογής του μοντέλου δύο χρόνων ημιζωής. Από τις μετρήσεις του χρόνου ημιζωής της πρωτεΐνης BSA παρουσία βηταλαϊνών σε pH 4 παρατηρούνται δύο χρόνοι ημιζωής, οι οποίοι μειώνονται στην παρουσία βηταλαϊνών (Σχήμα 9.15 (α)). Οι χρόνοι ημιζωής που προσδιορίστηκαν για την πρωτεΐνη BSA είναι όμοιοι με αυτούς που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. (Dasmandal et al. 2015) Με τη χρήση της Εξίσωσης 6.13 υπολογίζεται οι μέσοι χρόνοι ημιζωής σε κάθε συγκέντρωση βηταλαϊνών $\langle \tau \rangle$ και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας αυτούς τους χρόνους στην Εξίσωση Stern-Volmer προκύπτει το διάγραμμα Stern-Volmer σε pH = 4 το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 9.15 (β). Από τη κλίση της ευθείας προκύπτει ότι η σταθερά K_D είναι ίση με 16600 M^{-1} και με $\tau_0 = 6.95 \text{ ns}$, προκύπτει ότι η διμοριακή σταθερά

($K_Q = K_D/\tau_0 = 2,4 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} > 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) είναι μεγαλύτερη από τον αναμενόμενο ρυθμό διμοριακών συγκρούσεων, άρα η απόσβεση έχει και στατική συνιστώσα.

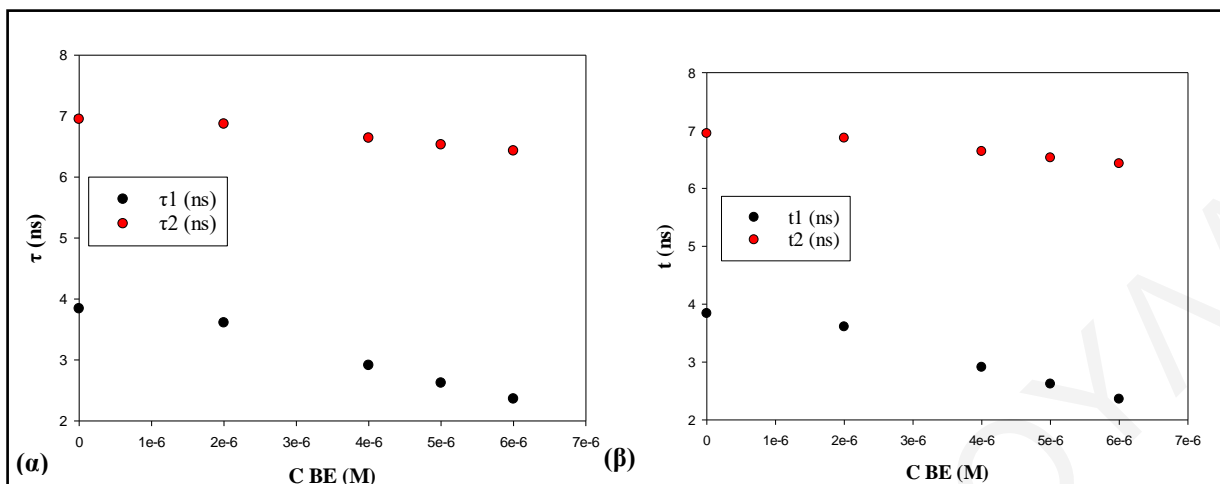
Πίνακας 9.4: Χαρακτηριστικοί χρόνοι αποδιέγερσης των πρωτεϊνών BSA συγκέντρωσης $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ σε pH = 4 και 7 και SC συγκέντρωσης $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ σε pH = 7 κατά τη διέγερσή τους στα 266 nm.

Σύστημα	$\alpha 1$	$\tau 1$ (ns)	$\alpha 2$	$\tau 2$ (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)
BSA pH 4	0.289 ± 0.007	2.468 ± 0.002	0.696 ± 0.005	6.19 ± 0.03	5.7 ± 0.4
BSA pH 7	0.279 ± 0.005	3.068 ± 0.002	0.701 ± 0.005	6.68 ± 0.03	6.1 ± 0.2
SC pH 7	0.279 ± 0.006	3.068 ± 0.002	0.701 ± 0.005	6.68 ± 0.02	6.1 ± 0.1



Σχήμα 9.15: (α) Χρόνοι αποδιέγερσης της BSA κατά τη διέγερσή της στα 266 nm στα συστήματα BSA - BE σε pH = 4 και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια BE ($0 - 9 \times 10^{-6} \text{ M}$) pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_D . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.

Όμοια αποτελέσματα με αυτά του συστήματος BSA σε pH = 4 παρατηρήθηκαν και σε pH = 7 στα συστήματα BSA - BE και SC - BE, όπου φαίνεται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης των βηταλαϊνών οι χρόνοι ημιζωής μειώνονται. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.16



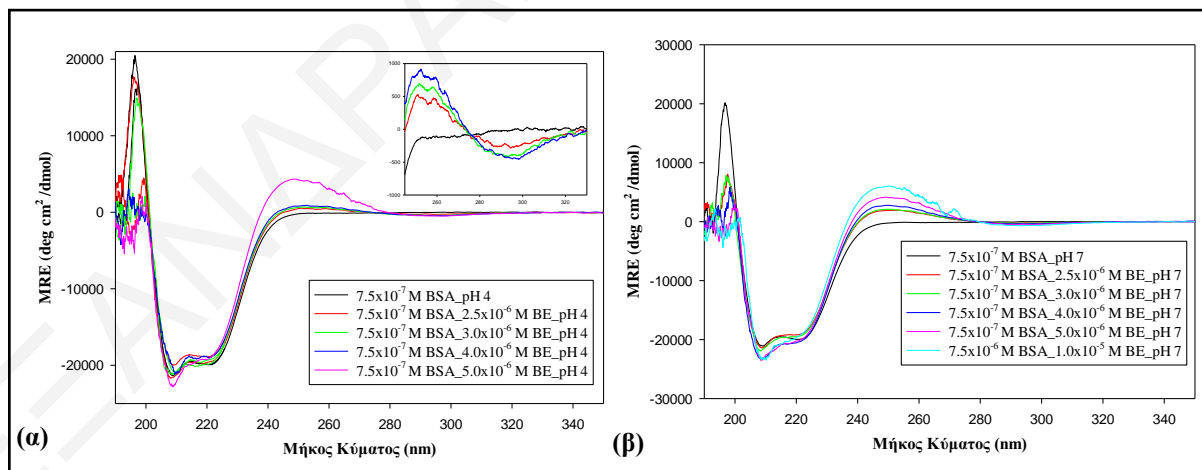
Σχήμα 9.16: Χρόνοι αποδιέγερσης των πρωτεϊνών κατά τη διέγερσή τους στα 266 nm (α) στο σύστημα BSA - BE και (β) στο σύστημα SC - BE σε pH = 7.

Συνοψίζοντας, κατά τις μελέτες φθορισμού των βηταλαϊνών προέκυψε ότι οι βηταλαΐνες παρουσιάζουν ικανοποιητικό φθορισμό, ο οποίος είναι γραμμικός μέχρι συγκέντρωση 8-10 μM (Σχήμα Π.42). Ο φθορισμός των βηταλαϊνών έχει μελετηθεί ξανά στο παρελθόν ωστόσο είναι η πρώτη φορά κατά την οποία γίνεται εκτενής μελέτη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσουν οι βηταλαΐνες με διάφορα βιομόρια μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού. Από τα πειράματα απόσβεσης φθορισμού προέκυψε ότι οι βηταλαΐνες δεν αποσβένουν ισχυρά τον φθορισμό των πρωτεϊνών και παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μόνο για την πρωτεΐνη BSA και το SC σε pH = 4 και 7, αντίστοιχα. Οι σταθερές K_{SV} που προσδιορίστηκαν για αυτά τα δύο συστήματα είναι της τάξης του 10^4 M^{-1} . Επιπλέον από τα πειράματα σύγχρονου φθορισμού παρατηρήθηκε μια μετατόπιση του μέγιστου σε υψηλότερα μήκη κύματος παρουσία βηταλαϊνών, μια ένδειξη ότι οι φθορίζουσες ομάδες μετατοπίζονται σε ένα πιο πολικό περιβάλλον όταν προστεθούν βηταλαΐνες. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης του φθορισμού των βηταλαϊνών στην παρουσία βιομορίων, και τα πειράματα απέδειξαν την ενίσχυση του φθορισμού των βηταλαϊνών για τα συστήματα BSA, CH και SC. Οι σταθερές K που προσδιορίστηκαν μέσω της Εξίσωσης Benesi-Hildebrand είναι της τάξης του 10^4 M^{-1} . Τέλος από τα πειράματα του χρονοεξαρτημένου φθορισμού προσδιορίστηκαν τρεις χρόνοι χαλάρωσης για τις βηταλαΐνες και δύο χρόνοι για τις πρωτεΐνες. Επίσης από τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύεται ότι η απόσβεση των πρωτεϊνών από τις βηταλαΐνες οφείλεται τουλάχιστον μερικώς σε στατική απόσβεση. Οι αλληλεπιδράσεις βηταλαϊνών και βιομορίων είναι μικρές και ασθενέστερες από αυτές του TA. Με τους πολυσακχαρίτες οι αλληλεπιδράσεις των βηταλαϊνών είναι γενικά ασθενείς. Η προηγούμενη διερεύνηση

υποδεικνύει ως καλύτερη τη σύζευξη των βηταλαϊνών με BSA, CH και SC για την ενσωμάτωσή τους στις διεπιφάνειες γαλακτωμάτων.

9.2.3 Αποτελέσματα πειραμάτων κυκλικού διχρωισμού (CD)

Οι διαμορφωτικές μεταβολές στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών παρουσία βηταλαϊνών μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία CD. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 9.5 για την πρωτεΐνη BSA. Στο Σχήμα 9.17 παρουσιάζονται τα φάσματα CD της πρωτεΐνης BSA παρουσία BE σε pH = 4 και 7. Παρατηρείται μια θετική κορυφή κοντά στα 195 nm και δύο αρνητικές κορυφές κοντά στα 208 και 222 nm που οφείλονται στο χαρακτηριστικό φάσμα της α-ελικοειδούς δομής πρωτεΐνης. Επιπλέον, σε pH = 4 παρατηρείται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης των BE ελαττώνεται το ποσοστό της α-έλικας στη BSA και αυξάνει το ποσοστό τυχαίας σπείρας. Από τις αντίστοιχες μελέτες σε pH = 7, από τα λίγα αποτελέσματα που υπάρχουν (λόγω του μεγάλου θορύβου σε μικρά μήκη κύματος που δυσκόλεψε την προσαρμογή), παρατηρείται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης των βηταλαϊνών ελαττώνεται το ποσοστό της α-έλικας στη BSA. Αυτή η τάση φαίνεται ξεκάθαρα στα διαγράμματα του Σχήματος 9.18. Στην περιοχή του εγγύς UV (250 – 330 nm) παρατηρείται σήμα ελλειπτικότητας με μορφή κυματισμού παρουσία των BE (Σχήμα 9.17 (α) ένθετο). Το σήμα αυτό, όπως και στην περίπτωση του TA, μπορεί να οφείλεται στην εμφάνιση υπερμοριακής χειρομορφίας (supramolecular chirality) κατά την συσσωμάτωση.

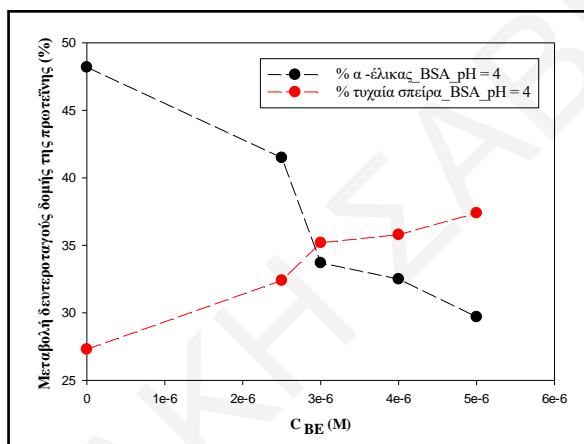


Σχήμα 9.17: Φάσματα CD για τα συστήματα 7.5×10^{-7} M BSA και $(0-1.0 \times 10^{-5})$ M BE (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.

Πίνακας 9.5: Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BE σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 7.5×10^{-7} M.

Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού	% α -έλικας		% β-πτυχωτής επιφάνειας		% στροφής		% έλικα – πολυπρολύνης		% τυχαία σπείρα		RMS σφάλμα	
	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7
BSA 7.5×10^{-7} M												
0 M BE	48.2	45.5	13.3	13.5	10.2	8.3	4.4	6.2	27.3	29.9	2.1	2.0
2.5×10^{-6} M BE	41.5	40.0	16.4	14.8	12.7	12.0	6.4	5.7	32.4	30.2	2.3	1.6
3.0×10^{-6} M BE	33.7	---	14.9	---	13.9	---	6.3	---	35.2	---	2.5	---
4.0×10^{-6} M BE	32.5	---	14.0	---	13.1	---	7.5	---	35.8	---	1.9	---
5.0×10^{-6} M BE	29.7	---	18.5	---	13.2	---	5.9	---	37.4	---	2.2	---

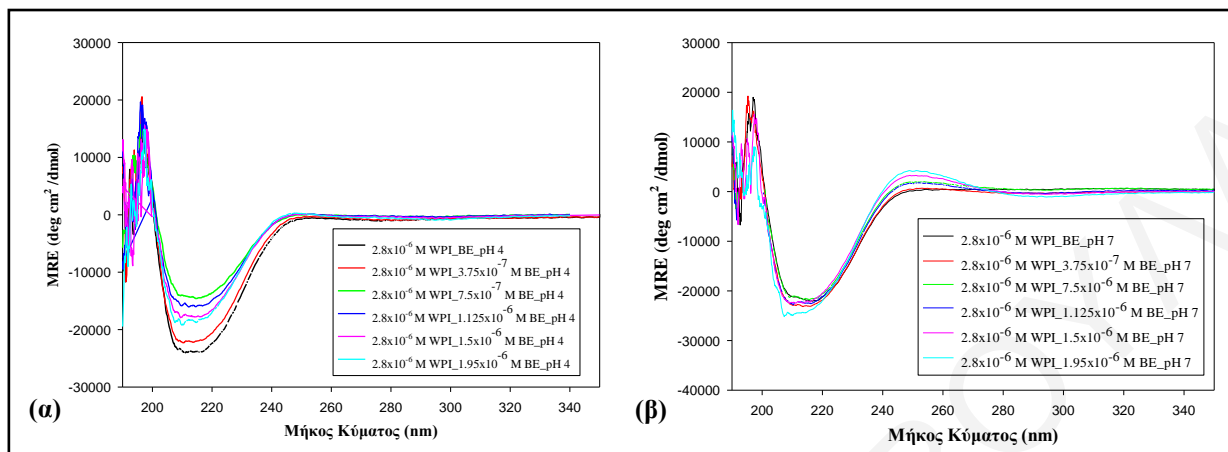
Επομένως, τα αποτελέσματα του CD υποδηλώνουν ότι οι βηταλαΐνες προκαλούν διαμορφωτική αλλαγή στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης BSA επιβεβαιώνοντας τις παρατηρήσεις από τα πειράματα σύγχρονου φθορισμού.



Σχήμα 9.18: Μεταβολή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης BSA παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BE σε pH 4.

Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης WPI εμφανίζει ένα τυπικό σχήμα αρνητικού ελάχιστου περίπου στα 215 nm υποδεικνύοντας την δομή β-πτυχωτής επιφάνειας. Τα φάσματα CD της πρωτεΐνης WPI σε pH = 4 και 7 φαίνονται στο Σχήμα 9.19. Η ελλειπτικότητα της αρνητικής κορυφής της WPI μειώνεται ελαφρώς με την σταδιακή προσθήκη BE χωρίς να φαίνεται να υπάρχει συστηματική επίδραση με αύξηση της συγκέντρωσης του BE. Η συμπεριφορά αυτή επιβεβαιώνεται και από τα ποσοστά κάθε τύπου δευτεροταγούς δομής για την πρωτεΐνη WPI που συνοψίζονται στον Πίνακα 9.6. Από τα αποτελέσματα CD παρατηρείται ασθενέστερη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης WPI με το BE σε σχέση με την πρωτεΐνη BSA, όπως παρατηρήθηκε και στη περίπτωση του TA, συμπεριφορά που προέκυψε και από τα αποτελέσματα του φθορισμού. Η δευτεροταγής δομή του SC δίνει ένα φάσμα με μέγιστη αρνητική ελλειπτικότητα μέσου υπολείμματος στα 200 nm και έναν ώμο μεταξύ 210 και 230 nm, το οποίο είναι ενδεικτικό δομής τυχαίας σπείρας (Σχήμα 9.20). Επειδή τα φάσματα CD δεν

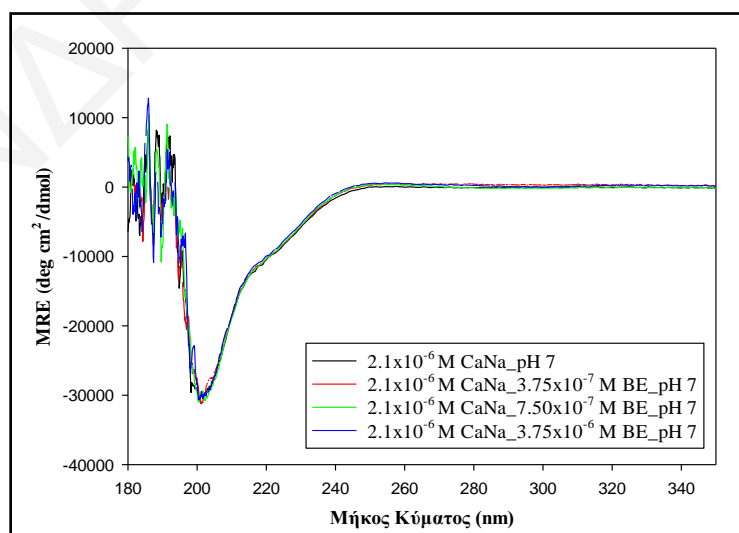
αλλάζουν ουσιαστικά με αύξηση της συγκέντρωσης των βηταλαϊνών, δεν κρίθηκε αναγκαία η ανάλυση αυτών των φασμάτων, που θα έδινε αποτελέσματα ανάλογα αυτών του ΤΑ.



Σχήμα 9.19: Φάσματα CD για τα συστήματα 2.8×10^{-6} M WPI και $(0-1.95 \times 10^{-6}$ M) BE (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.

Πίνακας 9.6: Μεταβολή δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης WPI (%) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BE σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 2.8×10^{-6} M.

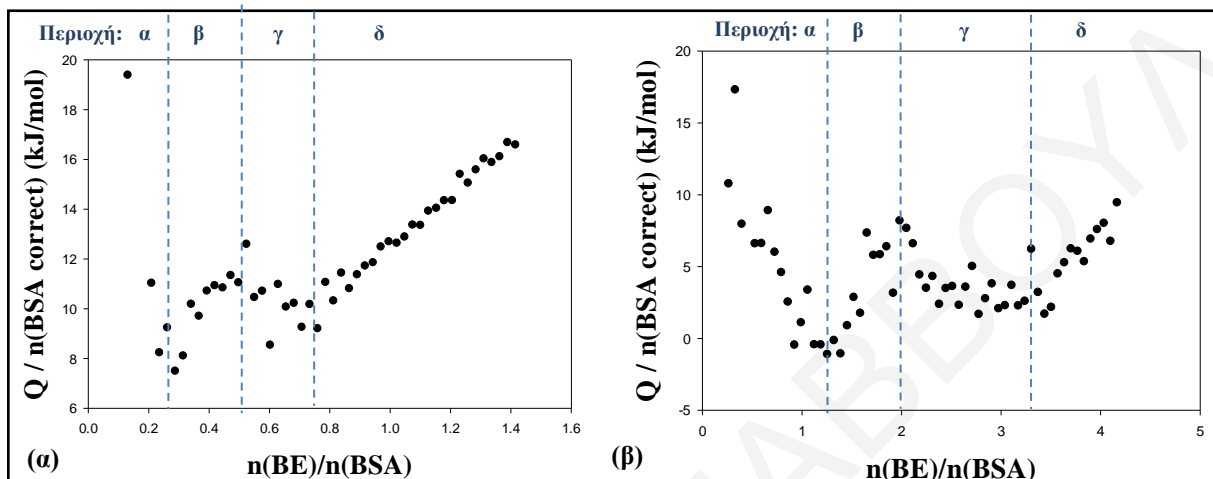
Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού	% α -έλικας		% β-πτυχωτής επιφάνειας		% στροφής		% έλικα – πολυπρολόνης		% τυχαία σπείρα		RMS σφάλμα	
	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7
WPI 2.8×10^{-6} M												
0 M BE	41.8	42.3	8.0	15.4	17.5	10.8	2.5	4.4	32.4	29.8	2.4	2.1
3.75×10^{-7} M BE	42.3	39.7	4.5	16.9	18.8	12.9	2.6	3.5	31.8	28.9	2.1	2.2
7.5×10^{-7} M BE	40.8	45.4	17.9	13.3	8.4	9.6	5.9	5.7	29.3	29.7	2.1	2.1
1.13×10^{-6} M BE	42.8	43.1	3.4	14.0	20.1	10.1	2.2	5.6	32.4	29.7	1.0	2.3
1.5×10^{-6} M BE	39.7	42.9	16.5	8.5	13.4	14.5	3.1	4.1	31.9	29.6	0.9	2.3
1.95×10^{-6} M BE	44.8	---	7.8	---	15.8	---	4.1	---	30.6	---	0.7	---



Σχήμα 9.20: Φάσματα CD για το σύστημα 2.1×10^{-6} M SC και $0-3.75 \times 10^{-6}$ M BE σε pH 7.

9.2.4 Αποτελέσματα πειραμάτων θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Μελετήθηκε η θερμοδυναμική συμπεριφορά των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης – ΒΕ μέσω της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Στο Σχήμα 9.21 φαίνεται το διορθωμένο θερμόγραμμα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA για την τιτλοδότηση 0,1647 mM BE σε 0,0251 mM BSA (α) και 0,0100 mM BSA (β) σε pH = 4 στους 25 ° C.

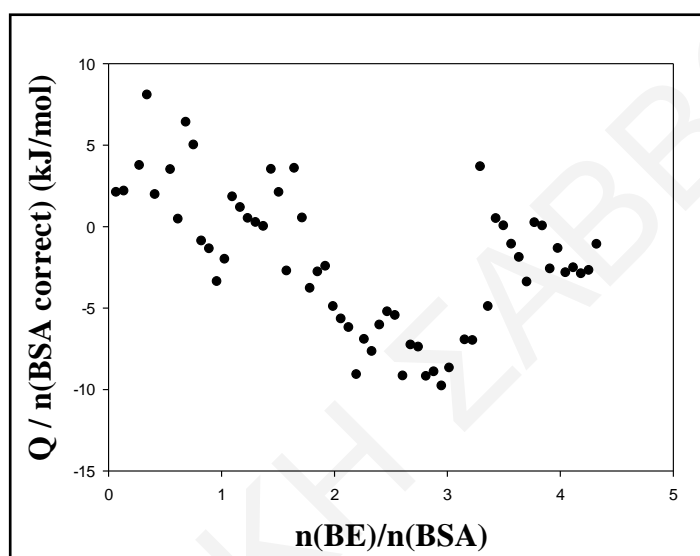


Σχήμα 9.21: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 0,1647 mM BE σε 0,0251 mM BSA και (β) 0,1647 mM BE σε 0,0100 mM BSA σε pH = 4 στους 25 ° C.

Η δέσμευση των βηταλαϊνών στην πρωτεΐνη BSA φαίνεται ότι είναι ενδόθερμη αντίδραση, με μικρές θερμότητες, χαρακτηριστικό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 8.16). Στο θερμόγραμμα του Σχήματος 9.21 (α) μελετήθηκε η θερμότητα της αλληλεπίδρασης BSA – BE μέχρι γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA = 1,5 ενώ στο διάγραμμα του Σχήματος 9.21 (β) μέχρι γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA = 4. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρούνται πολλαπλά φαινόμενα κατά την αλληλεπίδραση. Στην αρχή της τιτλοδότησης του θερμογράμματος (α) και μέχρις ότου η γραμμομοριακή αναλογία BE / BSA φθάσει γύρω στο 0,3 (Σχήμα 9.21, περιοχή α), η θερμότητα μειώνεται. Ακολούθως στη δεύτερη περιοχή παρατηρείται ένα ελάχιστο και μετά η θερμότητα αυξάνεται. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και στην περιοχή γ και δ με το ελάχιστο να παρατηρείται σε γραμμομοριακή αναλογία BE / BSA = 0.8. Η παρουσία δύο ελαχίστων υποδεικνύει ότι υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC, η μια από τις οποίες πρέπει να συνδέεται με δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης και παρατηρείται σε προσθήκες μεγαλύτερης ποσότητας BE. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στο πείραμα του Σχήματος 9.21 (β) που φτάνει γραμμομοριακές αναλογίες BE / BSA = 4. Σε αυτή την περίπτωση τα δύο ελάχιστα εμφανίζονται σε γραμμομοριακή αναλογία BE / BSA ίση με 1,5 και 3,5. Οι θερμικές

αλληλεπιδράσεις δεν φαίνεται να εκτείνονται σε μεγάλους γραμμομοριακούς λόγους $n(\text{BE}) / n(\text{BSA})$, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της θολερότητας.

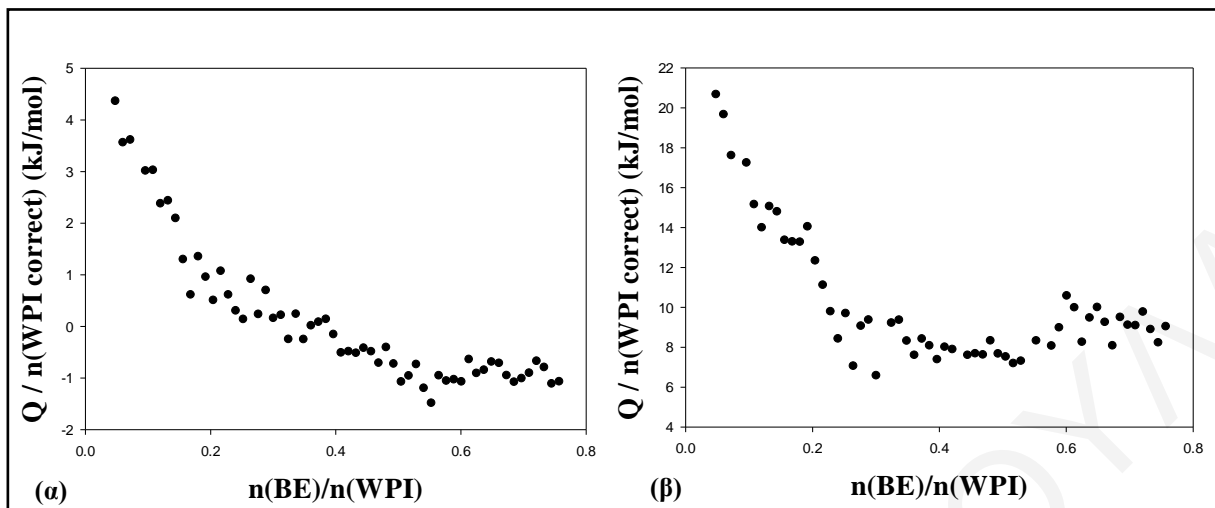
Στο διάγραμμα του Σχήματος 9.22 παρουσιάζεται το διορθωμένο θερμογράμμα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA για την τιτλοδότηση 0,1647 mM BE σε 0,0100 mM BSA σε $\text{pH} = 7$ στους 25°C . Και σε αυτό το pH , όπως και στο $\text{pH} = 4$, παρατηρούνται τουλάχιστο φαινόμενα σε διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες, τώρα όμως οι ενθαλπίες αλληλεπίδρασης είναι πολύ μικρότερες (κοντά στο μηδέν). Όπως έχει ειπωθεί τα μόρια BE και BSA έχουν ομόσημα φορτία σε αυτό το pH , γεγονός που περιορίζει την αλληλεπίδραση.



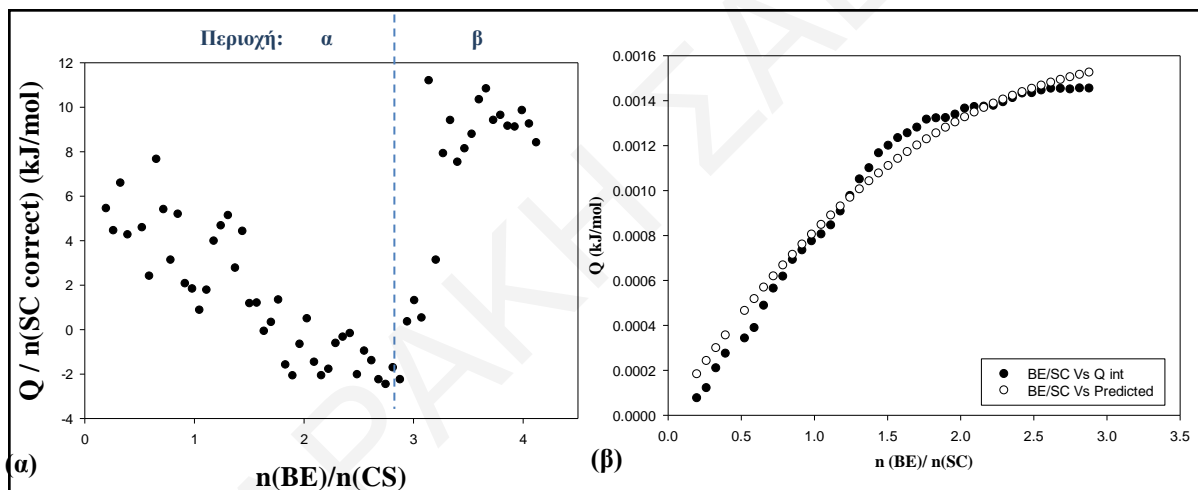
Σχήμα 9.22: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol BSA για την τιτλοδότηση 0,1647 mM BE σε 0,0100 mM BSA σε $\text{pH} = 7$ στους 25°C .

Οι θερμοδυναμικές ιδιότητες της αλληλεπίδρασης δέσμευσης μεταξύ των βηταλαϊνών και της πρωτεΐνης WPI διερευνήθηκαν μέσω της ITC, και παρουσιάζονται στα θερμογράμματα του Σχήματος 9.23 σε $\text{pH} = 4$ και 7 για την τιτλοδότηση 0,1647 mM BE σε 0,0274 mM WPI. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις, η αλληλεπίδραση δείχνει ενδόθερμο χαρακτήρα όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης BSA. Τα δύο θερμογράμματα δείχνουν όμοια συμπεριφορά και στα δύο pH , θετικές τιμές θερμότητας που μειώνονται καθώς αυξάνεται η ποσότητα των βηταλαϊνών στην κυψελίδα.

Η μορφή αυτών των καμπύλων δεν επέτρεψε την περαιτέρω θεωρητική τους ανάλυση. Τέλος στο Σχήμα 9.24 (α) παρουσιάζεται ο θερμοδυναμικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των βηταλαϊνών με το SC. Από το θερμογράμμα παρατηρούνται δύο περιοχές, όπου κατά την περιοχή α η θερμότητα μειώνεται και στην περιοχή β η θερμότητα αυξάνεται αφού περάσει από ένα ελάχιστο σε γραμμομοριακό λόγο περίπου 3. Η αντίδραση είναι ενδόθερμη με χαμηλές θερμότητες.



Σχήμα 9.23: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol WPI για την τιτλοδότηση 0,1647 mM BE σε 0,0274 mM WPI (α) σε pH = 4 και (β) σε pH = 7, στους 25 °C.



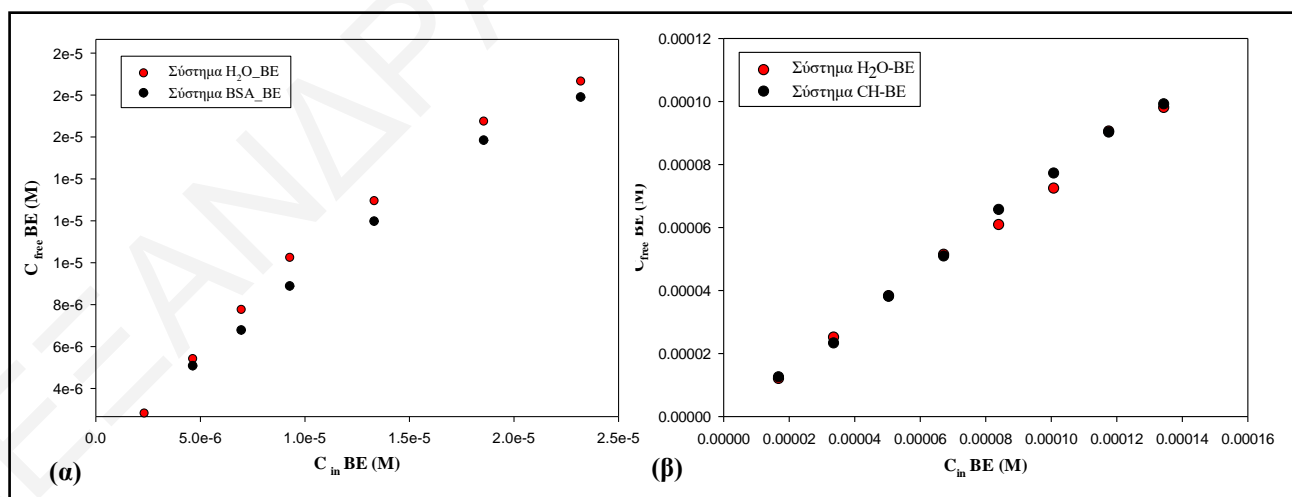
Σχήμα 9.24: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol BE / mol SC για την τιτλοδότηση (α) 0.1647 mM BE σε 0,0101 mM SC σε pH = 7 στους 25 ° C και (β) Διάγραμμα προσαρμογής των σιμοειδή καμπύλων των ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης πάνω στην ολοκληρωτική θερμότητα.

Με σκοπό να μελετηθεί εκτενέστερα η ενεργειακή συμπεριφορά των αλληλεπιδράσεων έγινε προσαρμογή του απλού μοντέλου των ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης πάνω στην ολοκληρωτική θερμότητα για να προσδιοριστεί η ενθαλπία αλληλεπίδρασης και ο αριθμός n (Εξίσωση 6.18). Μέσω της προσαρμογής του μοντέλου προσδιορίστηκε ο γραμμομοριακός λόγος mol BE / mol SC = 2, $\Delta H = 115$ kJ/mol και $K_a = 2.2 \times 10^5$ M⁻¹. Η σταθερά K που προσδιορίστηκε μέσω της Εξίσωσης Benesi-Hildebrand για το σύστημα SC / BE είναι κοντά αφού υπολογίστηκε ίση με 8×10^4 M⁻¹.

Γενικά όσο αφορά το θερμοδυναμικό χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεων των βηταλαϊνών με τις πρωτεΐνες παρατηρούνται ασθενείς ενδόθερμες αλληλεπιδράσεις σε αρκετά χαμηλές γραμμομοριακές αναλογίες.

9.2.5 Αποτελέσματα πειραμάτων διαπίδυσης

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση των βηταλαϊνών με την BSA και τη χιτοζάνη, συστήματα για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις από τα πειράματα που αναφέρθηκαν πιο πάνω, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαπίδυσης. Στα πειράματα αυτά η συγκέντρωση των βηταλαϊνών κυμαινόταν από 3.3×10^{-6} M μέχρι 1.6×10^{-5} M ενώ η συγκέντρωση της BSA ήταν σταθερή στα 2.7×10^{-7} M και της χιτοζάνης στα 1.4×10^{-6} M. Αφού προκύψει η παράμετρος D από το διάγραμμα του Σχήματος 9.25 (α) για το σύστημα H_2O -BE-(BSA=0) και από το διάγραμμα του Σχήματος 9.25 (β) για το σύστημα H_2O -BE-(CH=0) πραγματοποιήθηκαν πείραμα διαπίδυσης παρουσία του βιομορίου ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των βηταλαϊνών με BSA και CH. Στο διάγραμμα του Σχήματος 9.25 (α) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το σύστημα BSA-BE και στο διάγραμμα του Σχήματος 9.25 (β) για το σύστημα CH-BE. Μετά την απομόνωση των βηταλαϊνών μέσω της διαδικασίας της εκχύλισης διαπιστώθηκε ότι παραμένουν δισθενή θειικά ιόντα τα οποία καθιστούν άγνωστη και απρόβλεπτη την ιοντική ισχύ των διαλυμάτων και παρεμποδίζουν τα πειράματα διαπίδυσης μέσω ισχυρών ωσμωτικών φαινομένων. Ωστόσο τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν μετά την απομάκρυνση των θεικών με καταβύθιση με $BaCl_2$.



Σχήμα 9.25: Διαγράμματα συγκέντρωσης «ελεύθερων» BE ως προς τη συγκέντρωση των συνολικών BE για πειράματα διαπίδυσης (α) για το σύστημα BSA-BE και (β) για το σύστημα CH-BE pH 4.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαπίδυσης επιβεβαιώνουν την ασθενή αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε και από τις προηγούμενες μεθόδους, αφού τα σημεία στα διαγράμματα

παρουσία και απουσία του βιομορίου βρίσκονται πολύ κοντά. Λόγω αυτής της συμπεριφοράς δεν κατέστη δυνατή η δημιουργία των διαγραμμάτων Scatchard $r/[L]_{free}$ ως προς r με αποτέλεσμα και δεν προέκυψαν πληροφορίες για τις θέσεις δέσμευσης στα μακρομόρια και τις σταθερές πρόσδεσης.

9.2.6 Σύνοψη αποτελεσμάτων πρώτου σταδίου

Οι βηταλαΐνες απομονώθηκαν από τα κόκκινα τεύτλα. Από τις μελέτες θολερότητας παρατηρήθηκε ότι οι βηταλαΐνες δεν προκαλούν συσσωμάτωση σε διαυγή διαλύματα BSA ή WPI, σε τιμές pH 4 είτε 7, ενώ προκαλούν συσσωμάτωση σε διαλύματα SC σε pH = 7. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βηταλαΐνων και BSA ή WPI είναι ασθενείς, ενώ αυτές με SC είναι ισχυρότερες και οδηγούν σε συσσωμάτωση του SC. Οι κρίσιμοι μοριακοί λόγοι για το σύστημα SC-BE σε pH = 7 είναι κοντά στο 2. Επιπλέον παρατηρήθηκε θολερότητα στην περίπτωση της χιτοζάνης, ίσως λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους σε αυτές τις συνθήκες.

Οι αλληλεπιδράσεις των βηταλαΐνων με βιομόρια μελετήθηκαν εκτεταμένα με τη φασματοσκοπία φθορισμού, λόγω του φθορισμού που παρουσιάζουν οι ίδιες, πέραν του φθορισμού των πρωτεϊνών. Οι βηταλαΐνες παρουσιάζουν φθορισμό στα 330 nm και στα 540 nm που οφείλεται στις βηταξανθίνες, αλλά και στα 600 nm που αποδίδεται στις βητανίνες. Προσδιορίστηκε η μέγιστη συγκέντρωση βηταλαΐνων που μπορεί να χρησιμοποιείται κατά τη μελέτη της ζώνης εκπομπής στα 540 nm, που είναι ίση με 8-10 μM , καθώς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μεταφορά FRET από τις ξανθίνες στις βητανίνες. Από τα πειράματα απόσβεσης φθορισμού προέκυψε ότι οι βηταλαΐνες δεν αποσβένουν ισχυρά τον φθορισμό των πρωτεϊνών και παρατηρήθηκε μετρήσιμη αλληλεπίδραση μόνο για την πρωτεΐνη BSA σε pH = 4 και το SC σε pH = 7. Οι σταθερές K_{sv} που προσδιορίστηκαν για αυτά τα δύο συστήματα είναι της τάξης του 10^4 M^{-1} . Επιπλέον από τα πειράματα σύγχρονου φθορισμού παρατηρήθηκε μια μετατόπιση του μέγιστου σε υψηλότερα μήκη κύματος παρουσία βηταλαΐνων, μια ένδειξη ότι οι φθορίζουσες ομάδες βρίσκονται σε ένα πολικότερο περιβάλλον. Κατά τη μελέτη της επίδρασης των βιομορίων στον φθορισμό των βηταλαΐνων παρατηρήθηκε ενίσχυση του φθορισμού των βηταλαΐνων από BSA, CH και SC. Οι σταθερές K που προσδιορίστηκαν μέσω της Εξίσωσης Benesi-Hildebrand για BSA και SC είναι επίσης της τάξης του 10^4 M^{-1} . Τέλος από πειράματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού προσδιορίστηκαν τρεις χρόνοι ημιζωής για τις βηταλαΐνες και δύο χρόνοι για τις πρωτεΐνες. Από τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύεται πως η απόσβεση των πρωτεϊνών από τις βηταλαΐνες είναι στατικής φύσης. Η αλληλεπίδραση υπάρχει, αλλά είναι μικρή και ασθενέστερη από αυτή του TA με τα ίδια

βιομάρια. Τα πειράματα φθορισμού υποδεικνύουν ότι η ενσωμάτωση των βηταλαϊνών στα γαλακτώματα πρέπει να γίνει μέσω σύζευξής τους με τις πρωτεΐνες BSA και SC.

Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών κατά την αλληλεπίδρασή τους με βηταλαΐνες μελετήθηκε με τη μέθοδο CD. Οι βηταλαΐνες επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της BSA σε $pH = 4$ ελαττώνοντας το ποσοστό της α -έλικας στη BSA και αυξάνοντας το ποσοστό της τυχαίας σπείρας.

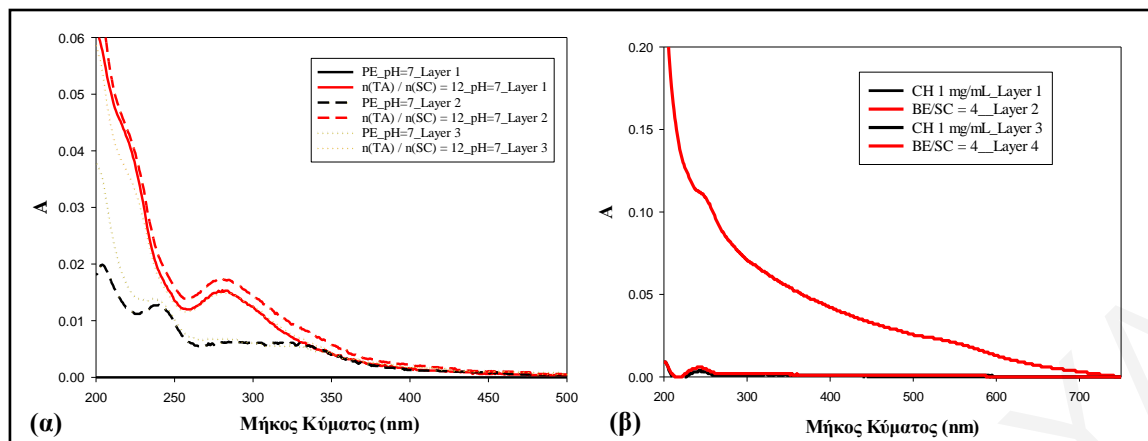
Η αλληλεπίδραση των βηταλαϊνών με τις τρεις πρωτεΐνες έχει ενδόθερμο χαρακτήρα. Στα θερμογράμματα παρατηρήθηκαν ωστόσο διαφορετικές περιοχές, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχουν αρκετές διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC. Σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν, οι μέσοι γραμμομοριακοί λόγοι των αλληλεπιδράσεων ήταν χαμηλοί, μέχρι το 5, γεγονός που δηλώνει πως σε μια μόνο πρωτεΐνη προσδένονται και αλληλεπιδρούν λίγα (1 ή 2) μόρια βηταλαϊνών. Στο σύστημα SC-βηταλαΐνες έγινε προσαρμογή του μοντέλου των ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης πάνω στην ολοκληρωτική θερμότητα και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι αλληλεπίδρασης $\text{mol BE} / \text{mol SC} = 2$, $\Delta H = 115 \text{ kJ/mol}$ και $K_a = 2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Οι αριθμοί αυτοί ωστόσο συνοδεύονται από αβεβαιότητες της τάξης του 100%, λόγω της μεγάλης σκέδασης των πειραματικών σημείων και δεν δίνουν τη σωστή εικόνα των αλληλεπιδράσεων (π.χ. οι τιμές ΔH και K_a είναι υπερβολικά μεγάλες). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαπίδυσης επιβεβαίωσαν την ασθενή αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε από τις προηγούμενες μεθόδους.

9.3. ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

9.3.1 Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία UV-Vis

Για τον προσδιορισμό της εναποτιθέμενης ποσότητας βηταλαϊνών σε στερεές επιφάνειες χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση UV-Vis στα 538 nm, καθώς οι βηταλαΐνες απορροφούν σε αυτό το μήκος κύματος. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες με χρήση διαφόρων παραμέτρων δεν κατέστη δυνατή η ενσωμάτωση βηταλαϊνών στα συναρμολογημένα πολυστρωματικά υμενια, καθώς οι ποσότητες που ενσωματώνονται στο δεύτερο στρώμα βρέθηκε ότι απομακρύνονται με την εναπόθεση των επόμενων στρωμάτων. Αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό, αν γίνει σύγκριση μεταξύ αντίστοιχων πειραμάτων με βηταλαΐνες και ΤΑ που παρουσιάζονται στα διαγράμματα των Σχημάτων 9.26 (α) και 9.26 (β).

Από τα αποτελέσματα είναι εμφανές πως οι βηταλαΐνες δεν έχουν επιφανειοενεργό χαρακτήρα, με αποτέλεσμα η προσρόφησή τους σε επιφάνειες να είναι μηδαμινή. Στον Πίνακα 9.7 συνοψίζονται τα διάφορα συστήματα με τα οποία επιχειρήθηκε να εναποτεθούν οι βηταλαΐνες σε στερεά υποστρώματα.



Σχήμα 9.26: (α) Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων πηκτίνης και μιγμάτων SC και TA ($n(TA) / n(SC) = 12$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 7 και (β) Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης και μιγμάτων SC και BE ($n(BE) / n(SC) = 4$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου.

Πίνακας 9.7: Συστήματα και συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν με μέθοδο LbL-UV-Vis σε pH 4 και 7.

Πρωτεΐνη - πολυηλεκτρολύτης περιττής στιβάδας	Γραμμομοριακή αναλογία αντιοξειδωτικού/πρωτεΐνης άρτιας στιβάδας	pH
CH 1 mg/mL	BE/ SC = 2, 4	4, 7
CH 1 mg/mL	BE/ CH = 10, 40	4
PE 1 mg/mL	BE/ CH = 10, 40	4
PE 1 mg/mL	BE/ BSA = 10	4, 7
PE 1 mg/mL	BE/ SC = 2, 4	7
SC 1 mg/mL	BE/ SC = 2, 4	7
SC 1 mg/mL	BE/ CH = 10, 40	4, 7

9.4. ΤΡΙΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

Για την παρασκευή των ΠΓ που περιέχουν ως αντιοξειδωτικό μόρια βηταλαϊνών ακολουθήθηκε η ίδια στρατηγική με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στα ΠΓ του TA. Μετά το πρώτο στρώμα γαλακτωματοποιητή BSA, ως δεύτερο χρησιμοποιήθηκε η χιτοζάνη και ως τρίτο στρώμα η πηκτίνη. Αυτός ο συνδυασμός όπως έδειξαν τα πειράματα μελέτης των ΠΓ του TA παρουσιάζει τη βέλτιστη συμπεριφορά. Λόγω των ασθενών αλληλεπιδράσεων που παρατηρήθηκαν μεταξύ των συστατικών σε pH 7 και της αδυναμίας βασικών συστατικών, όπως για παράδειγμα η χιτοζάνη, να διαλύονται στο ίδιο pH, επιλέχθηκε ως pH μελέτης των

γαλακτωμάτων το pH = 4. Συνεπώς οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις και η αποτυχία του δεύτερου σταδίου σε στερεές επιφάνειες, οδήγησε στην επιλογή της BSA και της χιτοζάνης ως υλικά για τα ΠΓ, που αποδείχθηκε στο πρώτο στάδιο ότι αλληλεπιδρούν αισθητά με ΒΕ.

9.4.1 Μετρήσεις ζήτα - δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων

Στον Πίνακα 9.8 συνοψίζονται το φορτίο και το μέγεθος των σταγονιδίων των ΠΓ που παρασκευάστηκαν στην παρουσία και μη βηταλαϊνών ως αντιοξειδωτικά. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των ΠΓ χρησιμοποιώντας ως αντιοξειδωτικά μόρια βηταλαϊνών ήταν ίδια με αυτή του ΤΑ. Οι πρότυπες μετρήσεις ζ-δυναμικού και το μέγεθος των γαλακτωμάτων φαίνονται στο Παράρτημα στα Σχήματα Π.61 - Π.66. Αρχικά, κατά την παρασκευή των ΠΓ με βηταλαΐνες τα γαλακτώματα ήταν αρκετά ασταθή. Μετά από αρκετή έρευνα έγινε κατανοητό ότι αυτή η αποσταθεροποίηση οφειλόταν στην παρουσία σημαντικών συγκεντρώσεων θεικών ιόντων στο εκχύλισμα των βηταλαϊνών, τα οποία παραμένουν κατά τη διαδικασία εκχύλισης των δύο υδατικών φάσεων. Αφού απομακρύνθηκαν τα θειικά με καταβύθιση με BaCl₂, έγινε εφικτή η παρασκευή σταθερών ΠΓ χρησιμοποιώντας ως αντιοξειδωτικά βηταλαΐνες.

Πίνακα 9.8: Μεγέθη σταγονιδίων και ζήτα – δυναμικό για τα τριτοταγή ΠΓ που μελετήθηκαν.

Σύσταση Στιβάδας	Αριθμός Στιβάδων	D (sD) (nm)	ζ (sζ) (mV)
BSA – CH – PE	1	267 ± 127	33.8 ± 4.6
	2	217 ± 97	40.2 ± 5.5
	3	294 ± 121	24.9 ± 4.1
BSA/BE – CH – PE	1	293 ± 111	10.1 ± 4.3
	2	390 ± 240	32.4 ± 3.7
	3	437 ± 253	30.9 ± 3.8
BSA – CH/BE – PE	1	267 ± 127	33.8 ± 4.6
	2	394 ± 195	30.1 ± 3.8
	3	306 ± 154	30.2 ± 3.5
BSA – CH – PE/BE	1	267 ± 127	33.8 ± 4.6
	2	217 ± 97	40.2 ± 5.5
	3	292 ± 68	25.0 ± 4.0

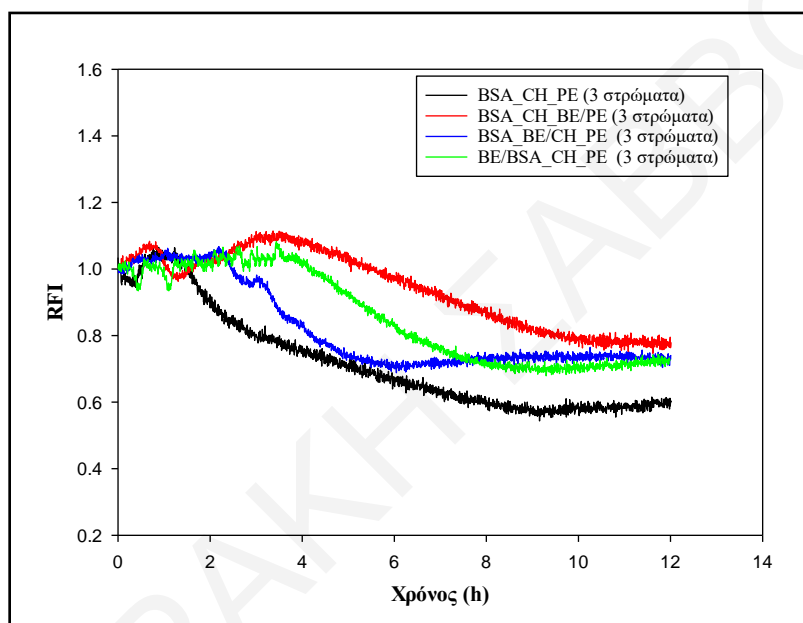
Οι μετρήσεις ζήτα – δυναμικού και μεγέθους των σταγονιδίων δείχνουν ότι τα γαλακτώματα με BSA ως πρώτο στρώμα, χιτοζάνη ως δεύτερο στρώμα και πηκτίνη ως τρίτο στρώμα είναι σταθερά και παράγουν σταγονίδια με παρόμοια μεγέθη και ηλεκτρικές ιδιότητες. Η

αναμενόμενη μεταβολή του ζήτα – δυναμικού παρατηρείται σε όλα τα συστήματα και αποδεικνύει ουσιαστικά την πολυστρωματική φύση των διεπιφανειακών σταγονιδίων, δηλαδή το στρώμα BSA έχει θετικό δυναμικό σε $pH = 4$, η χιτοζάνη κάνει το δυναμικό ακόμη πιο θετικό και η πηκτίνη λιγότερο θετικό. Η προσθήκη βηταλαϊνών στο πρώτο στρώμα μαζί με την πρωτεΐνη BSA μειώνει το φορτίο της επιφάνειας σημαντικά. Αυτή η μείωση οφείλεται κυρίως στην αραίωση της BSA στην επιφάνεια από τις βηταλαΐνες, που είναι κυρίως δίπολα ιόντα σε $pH = 4$, αλλά ίσως και στην αλλαγή διαμόρφωσης της πρωτεΐνης που διαπιστώθηκε με CD. Το μέγεθος σταγονιδίων του δευτεροταγούς και τριτοταγούς γαλακτώματος αυξάνεται συστηματικά με την προσθήκη του πολυσακχαρίτη χιτοζάνη και πηκτίνη αντίστοιχα. Αυτό πιθανό να οφείλεται σε ασθενέστερη ηλεκτροστατική σταθεροποίηση, δεδομένου ότι το φορτίο στο πρώτο στρώμα του συστήματος είναι χαμηλό. Η προσθήκη βηταλαϊνών στο δεύτερο στρώμα της χιτοζάνης οδηγεί σε μεγαλύτερο μέγεθος σταγονιδίων. Ωστόσο το φορτίο αυτού του στρώματος (30.1 mV) είναι μειωμένο συγκριτικά με το δευτεροταγές στρώμα καθαρής χιτοζάνης (40.2 mV), γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη βηταλαϊνών στην επιφάνεια του σταγονιδίου. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την εναπόθεση των βηταλαϊνών στο τρίτο στρώμα της πηκτίνης. Η παρουσία των βηταλαϊνών στα ΠΓ φαίνεται ότι μειώνει την γαλακτωματοποιητική ικανότητα της BSA και τον επιφανειοδραστικό χαρακτήρα των πολυσακχαριτών χιτοζάνη και πηκτίνη. Ο λόγος, όπως προέκυψε από τις μελέτες που έχουν γίνει στα προηγούμενα δύο στάδια, είναι ίσως οι ασθενείς αλλά υπαρκτές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσουν οι βηταλαΐνες με τα βιομόρια. Ωστόσο στις ασθενείς αλληλεπιδράσεις και στην αδυναμία εναπόθεσης των βηταλαϊνών σε επιφάνειες πιθανό να συμβάλει και η παρουσία αλάτων στο εκχύλισμα των βηταλαϊνών, τα οποία μπορεί να αποσταθεροποιούν τα γαλακτώματα (ακόμα και μετά την απομάκρυνση των θεικών παραμένει σημαντική ποσότητα NaCl).

9.4.2 Μετρήσεις αντιοξειδωτικής σταθερότητας λιπιδικής φάσης γαλακτωμάτων

Από τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής σταθερότητας της λιπιδικής φάσης δεν φαίνεται να έχει σημασία σε ποιο στρώμα το αντιοξειδωτικό τοποθετείται στο σύστημα, αφού σε χρονική περίοδο 12 ωρών που πραγματοποιείται η μέτρηση, και τα τρία τριτοταγή γαλακτώματα καταλήγουν να έχουν οξειδωθεί στον ίδιο βαθμό. Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ τους είναι ο χρόνος στον οποίο φτάνουν σε πλήρη οξείδωση. Το γαλάκτωμα BSA – CHI/ BE – PE φαίνεται να οξειδώνεται ταχύτερα από τα υπόλοιπα πιθανό λόγω της αστάθειάς του που υποδεικνύεται στα αποτελέσματα DLS του Πίνακα 9.8. Το γαλάκτωμα BSA – CHI – PE/ BE φαίνεται να είναι το σταθερότερο και αυτό που οξειδώνεται με πιο αργό ρυθμό. Αυτή η συμπεριφορά είναι μια ένδειξη ότι ίσως οι βηταλαΐνες δεν εναποτίθενται επιτυχώς στις

διεπιφάνειες των σταγονιδίων, με αποτέλεσμα στο τέλος τα μόρια των βηταλαϊνών να καταλήγουν στη συνεχή φάση του γαλακτώματος. Ωστόσο οι τιμές RFI για τα γαλακτώματα παρουσία των βηταλαϊνών είναι μεγαλύτερες από αυτές για το σύστημα BSA – CHI – PE, δηλώνοντας πως οι βηταλαΐνες φαίνεται να βελτιώνουν την οξειδωτική σταθερότητα της λιπιδικής φάσης των γαλακτωμάτων, χωρίς αυτό να σημαίνει και την ταυτόχρονη επιτυχή τους ενσωμάτωση στο τοίχωμα. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μελέτες σε επιφάνειες, παρόλη την ασθενή αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε στις μελέτες σε διάλυμα, η εναπόθεση των βηταλαϊνών σε στρώμα μέσω ασθενών υδρόφοβων, Van der Waals είτε ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είναι δυνατή.



Σχήμα 9.27: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red σε διάφορα γαλακτώματα πολλαπλών στρωμάτων που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τη BSA ως κύριο γαλακτωματοποιητή και χιτοζάνη και πηκτίνη ως υλικά του τοιχώματος παρουσία των BE σε διαφορετικά στρώματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

Ανακεφαλαίωση – Συμπεράσματα

10.1 Γενικά συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα Διδακτορική εργασία φαίνεται ότι η κολλοειδής προσέγγιση τριών βημάτων που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 1 της Εισαγωγής παρέχει σημαντικές υποσχέσεις για τον συστηματικό σχεδιασμό πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με στόχο τη βελτίωση της σταθερότητας των ενθυλακωμένων ελαίων ως προς την οξειδωση. Λόγω του τεράστιου αριθμού δυνατοτήτων και συνδυασμών, η παρούσα έρευνα περιορίστηκε σε ένα μικρό σύνολο πιθανών συστημάτων για να αποδείξει τη χρησιμότητα της κολλοειδούς προσέγγισης. Το ταννικό οξύ χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή ως πρότυπο αντιοξειδωτικό. Πρώτον, χρησιμοποιώντας θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης, κυκλικό διχρωισμό και φασματοσκοπία φθορισμού και UV-Vis επιβεβαιώθηκε ότι το ταννικό οξύ αλληλεπιδρά αρκετά ισχυρά με τη BSA η οποία είναι ο κύριος γαλακτωματοποιητής στην παρούσα εργασία. Από τις μετρήσεις που έγιναν προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες γραμμομοριακές αναλογίες TA / BSA για χρήση σε επακόλουθη μελέτη γαλακτώματος (στην περιοχή των 10, καθώς για μεγαλύτερες αναλογίες παρατηρήθηκε σημαντική συσσωμάτωση στο διάλυμα). Διαπιστώθηκε επίσης ότι η χιτοζάνη και η πηκτίνη είναι οι πολυσακχαρίτες που αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με το TA, σε σύγκριση με το αλγινικό νάτριο και τη θειική χονδροϊτίνη, επομένως είναι προτιμότερη η χρήση τους σε γαλακτώματα πολλαπλών στρώσεων όπου επιχειρείται να ενσωματωθεί ταννικό οξύ στις διεπιφάνειες των σταγονιδίων. Στο δεύτερο στάδιο, σε πειράματα εναπόθεσης LbL σε στερεές επιφάνειες ήταν δυνατό να εξακριβωθεί ότι η χιτοζάνη και η πηκτίνη είναι τα βέλτιστα συστατικά για τη δημιουργία των πολυστρωματικών υμενίων ώστε να μεγιστοποιηθεί η διεπιφανειακή συγκέντρωση του ταννικού οξέος σε τέτοια συστήματα. Τέλος, παρασκευάστηκαν γαλακτώματα τριών

στρωμάτων με τη BSA ως τον κύριο γαλακτωματοποιητή, και τη χιτοζάνη και την πηκτίνη ως υλικά του τοιχώματος. Τα γαλακτώματα αυτά εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να σταθεροποιούν το ευαίσθητο λινέλαιο ως προς την οξείδωση. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η ακριβής θέση του TA στις πολυστρωματικές διεπιφάνειες είναι σημαντική για βελτιστοποίηση της σταθερότητας των ελαίων έναντι στην οξείδωση.

Στη συνέχεια η ίδια λογική της κολλοειδούς προσέγγισης εφαρμόστηκε σε συστήματα όπου ως αντιοξειδωτικά χρησιμοποιήθηκαν μόρια βηταλαϊνών που απομονώθηκαν από τεύτλα. Στα πλαίσια αυτού του δεύτερου σκέλους της μελέτης, πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός καινοτόμων πειραμάτων, αφού είναι η πρώτη φορά που γίνεται εκτενής μελέτη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσουν οι βηταλαΐνες με πολλά βιομόρια μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού, της θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης και του κυκλικού διχρωισμού.

Η μελέτη των βηταλαϊνών αντιμετώπισε αρκετές δυσκολίες. Αρχικά, οι βηταλαΐνες απομονώνονται από τα κόκκινα τεύτλα ως μίγμα μορίων. Ανάλογα με τις συνθήκες της εκχύλισης μπορεί να μεταβληθεί σημαντικά η αναλογία βουλγαξανθίνης – I και βητανίνης στο τελικό εκχύλισμα, δημιουργώντας προβλήματα επαναληψιμότητας. Επίσης η ίδια η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε, οδηγεί μεν σε απλοποίηση του τελικού μίγματος (λόγω της απομάκρυνσης ελεύθερων σακχάρων), αλλά εισάγει σε αυτό σημαντικές ποσότητες αλάτων και μάλιστα των δυσθερών θεικών, που επηρεάζουν σημαντικά τα πειράματα θερμοδομετρίας και διαπίδυσης. Η απομάκρυνση θεικών με καταβύθιση με $BaCl_2$ βελτιώνει σημαντικά την κατάσταση αλλά δεν επιλύει πλήρως το πρόβλημα. Τέλος, οι βηταλαΐνες παρουσιάζουν σημαντική ευαισθησία στην οξείδωση από το φως. Τα διαλύματά τους πρέπει να φυλάσσονται στο ψυγείο και να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την παρασκευή τους, καθιστώντας δύσκολη την εκτέλεση μακροχρόνιων πειραμάτων. Παρά τις δυσκολίες αυτές έγιναν αρκετά χρήσιμα πειράματα και εξάχθηκαν χρήσιμα συμπεράσματα, όπως τονίζεται παρακάτω. Το κυριότερο γενικό δίδαγμα ωστόσο είναι ότι, λόγω της μεγάλης διαλυτότητάς τους και της μικρής τους επιφανειοενεργότητας, οι βηταλαΐνες δεν μεταφέρονται εύκολα σε επιφάνειες και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιφανειακά αντιοξειδωτικά σε ΠΓ, τουλάχιστο στη μορφή των μιγμάτων που απομονώνονται στη παρούσα εργασία και στην παρουσία αλάτων.

10.2 Ανακεφαλαίωση των κυριότερων αποτελεσμάτων από τις μελέτες αλληλεπιδράσεων των συστατικών των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με το ταννικό οξύ

10.2.1 Μελέτες σε διαλύματα

Η αλληλεπίδραση των μορίων του TA με πρωτεΐνες και βιολογικούς πολυσακχαρίτες σε διαλύματα είναι αρκετά γνωστή και έχει μελετηθεί αποσπασματικά σε πολλές εργασίες που

αναφέρονται στο εισαγωγικό μέρος της διατριβής (Κεφ 8.1). Η εργασία που έγινε στην παρούσα διατριβή ήταν στα πλαίσια της προσέγγισης τριών βημάτων και είχε σκοπό να επιβεβαιώσει, συμπληρώσει και προεκτείνει τα βιβλιογραφικά αποτελέσματα.

Πειράματα θολερότητας έγιναν επειδή ήταν γνωστό ότι το TA δρα γεφυρωτικά για πολλές πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, οδηγώντας στη συσσωμάτωση και καταβύθισή τους, κάτι που έπρεπε να αποφευχθεί στην παρούσα εργασία. Πράγματι, στα συστήματα του TA παρατηρήθηκε ισχυρή σύζευξη με τις πρωτεΐνες BSA και WPI σε pH 4 που οδήγησε σε συσσωμάτωση, λόγω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται, αφού σε αυτό το εύρος pH οι πρωτεΐνες είναι θετικά φορτισμένες και το TA βρίσκεται σε ουδέτερη μορφή. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε σε τιμή pH = 7, όπου οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες και το ταννικό οξύ έχει επίσης αρνητικό φορτίο. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε ωστόσο στην περίπτωση του SC που σε pH = 7 παρουσιάζει αρνητικό φορτίο. Από τις μετρήσεις θολερότητας υπολογίστηκαν οι κρίσιμοι μοριακοί λόγοι αλληλεπίδρασης TA με πρωτεΐνες (εκτός του SC) που αποτελούν σημαντικό κριτήριο σχεδιασμού για τα επόμενα πειράματα. Όσο αφορά τις αλληλεπιδράσεις του TA με πολυσακχαρίτες, παρατηρήθηκε ισχυρή αλληλεπίδραση με τη χιτοζάνη και λιγότερο με την πηκτίνη. Δεν εντοπίστηκαν κρίσιμες τιμές μοριακών λόγων, όπως και στην περίπτωση του SC, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση με τις συμπαγείς πρωτεΐνες είναι διαφορετικής φύσης από ότι αυτή με ευέλικτα μόρια.

Οι μελέτες φθορισμού των αλληλεπιδράσεων του TA με τα βιομόρια επικεντρώθηκαν σε πειράματα απόσβεσης φθορισμού των πρωτεϊνών από τα μόρια του TA και σε πειράματα σύγχρονου φθορισμού. Υπολογίστηκαν οι σταθερές K_{sv} και K_s για να διερευνηθεί αν η διαδικασία της απόσβεσης χαρακτηρίζεται από δυναμικό ή στατικό χαρακτήρα. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε ότι η σταθερά K_Q ήταν της τάξης $10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ που είναι αισθητά μεγαλύτερη από τη μέγιστη αναμενόμενη δυναμική σταθερά απόσβεσης ($2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), γεγονός που υποδεικνύει ότι η διαδικασία απόσβεσης μεταξύ των πρωτεϊνών και του TA οφείλεται κυρίως σε μη-ομοιοπολική σύζευξη. Οι σταθερές πρόσδεσης K_s που προσδιορίστηκαν ήταν λίγο μεγαλύτερες από αυτές που προσδιορίστηκαν για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Τα πειράματα σύγχρονου φθορισμού επιβεβαιώνουν τις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ του TA και των πρωτεϊνών BSA/ WPI σε pH = 4, αφού παρατηρήθηκε γύρω από τα κατάλοιπα Tyr και Trp αύξηση της πολικότητας του περιβάλλοντός τους.

Η επίπτωση του TA στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών μελετήθηκε με τη μέθοδο CD. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μελέτες αυτές, παρατηρήθηκε ότι με

αύξηση της συγκέντρωσης του TA ελαττώνεται το ποσοστό της α -έλικας στη BSA σε $\text{pH}=4$ και αυξάνει το ποσοστό τυχαίας σπείρας.

Η θερμοδομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης του TA με την πρωτεΐνη BSA έδειξε ένα εξώθερμο χαρακτήρα. Επίσης στα θερμογράμματα παρατηρήθηκαν τουλάχιστο δύο διαφορετικές περιοχές γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC, η μια από τις οποίες πρέπει να συνδέεται με δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης και παρατηρείται σε προσθήκες μεγαλύτερης ποσότητας TA. Όμοιες περίπλοκες συμπεριφορές παρατηρήθηκαν και για την πρωτεΐνη WPI, όπου οι αλληλεπιδράσεις ήταν και πάλι εξώθερμες. Ωστόσο στην περίπτωση του SC σε $\text{pH} = 7$ η αλληλεπίδραση είχε ενδόθερμο χαρακτήρα, γεγονός που ενισχύει την εικόνα για διαφορετική λογική αλληλεπίδρασης του TA με αυτή την ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη. Σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν, οι γραμμομοριακοί λόγοι, όπου εξακολουθούσαν να είναι μετρήσιμες οι θερμότητες των αλληλεπιδράσεων, ήταν αρκετές δεκάδες, γεγονός που δηλώνει πως σε ένα μόνο μόριο πρωτεΐνης προσδένεται και αλληλεπιδρά μεγάλος αριθμός μορίων TA.

Τα συστήματα TA/BSA και TA/χιτοζάνη που έδειξαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία μέσω πειραμάτων διαπίδυσης και τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακά. Εφαρμόστηκαν θεωρητικά μοντέλα στατιστικής μηχανικής που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα σε τέτοια συστήματα. Μέσω των διαγραμμάτων Hill για το σύστημα BSA / TA προσδιορίστηκε ότι ο αριθμός n μορίων TA που προσδένονται ανά μόριο BSA είναι περίπου ίσος με 10-15. Για το σύστημα CH / TA από τη θεωρία McGhee-von Hippel (Cantor & Schimmel, 1980) εκτιμήθηκε ότι 14 μονομερή χιτοζάνης αλληλεπιδρούν με κάθε μόριο TA, άρα μέχρι 40-50 μόρια TA φαίνεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κατά την πρόσδεσή τους πάνω σε μια αλυσίδα χιτοζάνης μικρού μοριακού βάρους.

10.2.2 Μελέτες σε στερεές επιφάνειες

Οι μελέτες στις επίπεδες επιφάνειες με τη μέθοδο LbL ήταν πρωτότυπες και διαφωτιστικές. Με φασματοσκοπία UV-Vis βρέθηκε ότι η μέγιστη ποσότητα TA που εναποτίθεται στην επιφάνεια επιτυγχάνεται όταν το TA είναι συζευγμένο με την πρωτεΐνη BSA σε $\text{pH} = 4$. Διαπιστώθηκε ότι η δημιουργία του πρώτου στρώματος βοηθά την εναπόθεση του επόμενου στρώματος διαφορετικού υλικού οδηγώντας στη δημιουργία ενός σταθερού πολυστρωματικού υμενίου, αν και μικρή ποσότητα από την αρχική εναπόθεση χάνεται, οδηγώντας σε εναπόθεση τύπου zig-zag. Οι καλύτεροι πολυηλεκτρολύτες ως υλικά ενδιάμεσης στιβάδας είναι η χιτοζάνη και η πηκτίνη, ενώ καλύτερο υλικό πρώτης στιβάδας είναι η χιτοζάνη. Παρόμοιο συμπέρασμα προέκυψε και από τις μελέτες QCM και PM-IRRAS. Η ποσότητα του TA που εναποτίθεται

αυξάνεται με τη συγκέντρωσή του σε διάλυμα σε pH 4. Αναλογίες TA / BSA μεγαλύτερες του 20 οδηγούν σε θολά διαλύματα και η εναπόθεση αποτυγχάνει απουσία ανάδευσης λόγω καταβύθισης συσσωματωμάτων BSA-TA. Για αυτούς τους λόγους η γραμμομοριακή αναλογία TA / BSA που χρησιμοποιείται στις μελέτες των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων είναι κοντά στο 10.

10.2.3 Μελέτες σε γαλακτώματα

Τέλος παρασκευάστηκαν τα ΠΓ με βάση τα βέλτιστα συστήματα που προέκυψαν από τα δύο προηγούμενα βήματα της ορθολογικής προσέγγισης. Χρησιμοποιήθηκε ως γαλακτωματοποιητής η πρωτεΐνη BSA και ως δεύτερο και τρίτο στρώμα η χιτοζάνη και η πηκτίνη αντίστοιχα. Μετρήσεις ζήτα – δυναμικού και DLS έδειξαν την σταθερότητα του γαλακτώματος και την μεταβολή των ηλεκτρικών φορτίων κατά στρώμα. Από τις μετρήσεις της οξειδωτικής σταθερότητας της λιπιδικής φάσης φάνηκε ότι πράγματι έχει σημασία σε ποιο στρώμα το αντιοξειδωτικό τοποθετείται στο σύστημα. Η τοποθέτηση του αντιοξειδωτικού στο πρώτο στρώμα μαζί με τη BSA μείωσε την οξειδωτική σταθερότητα του συστήματος πιθανότατα λόγω αλλαγών της διαμόρφωσης της BSA, που επηρεάζουν τις γαλακτωματοποιητικές της ικανότητες. Η εισαγωγή του TA στο δεύτερο στρώμα (χιτοζάνη) παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ η ενσωμάτωση στο τρίτο στρώμα (με πηκτίνη) παρουσίασε επίσης πλεονεκτήματα.

10.3 Ανακεφαλαίωση των κυριότερων αποτελεσμάτων από τις μελέτες των αλληλεπιδράσεων συστατικών των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με τις βηταλαΐνες

Οι βηταλαΐνες απομονώθηκαν από τα κόκκινα τεύτλα με γνωστές μεθόδους της βιβλιογραφίας (Raja et al. 2012). Όπως αναφέρθηκε στα γενικά συμπεράσματα, αυτό οδηγεί σε αρκετά προβλήματα, που καθιστούν δύσκολη την εφαρμογή της μεθόδου τριών σταδίων σε συστήματα με βηταλαΐνες. Ωστόσο, επειδή ακόμα και σε υδατικά διαλύματα δεν έχουν μελετηθεί σχεδόν καθόλου οι αλληλεπιδράσεις των βηταλαϊνών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, η παρούσα διατριβή άνοιξε αυτό το νέο κεφάλαιο.

10.3.1 Μελέτες σε διαλύματα

Από τις μελέτες θολερότητας παρατηρήθηκε ότι οι βηταλαΐνες δεν προκαλούν συσσωμάτωση σε διαυγή διαλύματα BSA ή WPI, ενώ προκαλούν συσσωμάτωση σε διαλύματα SC σε pH = 7. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βηταλαϊνών και BSA ή WPI είναι μάλλον ασθενείς, ενώ αυτές με SC είναι ισχυρότερες. Επιπλέον παρατηρήθηκε

θολερότητα στην περίπτωση της χιτοζάνης, ίσως λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται σε αυτές τις συνθήκες.

Οι βηταλαΐνες μελετήθηκαν εκτεταμένα με τη φασματοσκοπία φθορισμού λόγω του φθορισμού που παρουσιάζουν τα ίδια τα μόρια πέραν αυτών παρουσία πρωτεϊνών. Παρόμοιες μελέτες δεν έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα. Οι βηταλαΐνες παρουσιάζουν φθορισμό στα 330 nm, στα 540 nm (που οφείλεται στις βηταξανθίνες) και στα 600 nm που αποδίδεται στις βητανίνες. Κατά τις μελέτες φθορισμού των βηταλαϊνών προέκυψε πως οι βηταλαΐνες παρουσιάζουν ικανοποιητικό φθορισμό, ο οποίος είναι γραμμικός μέχρι συγκέντρωσης 8-10 μM . Από τα πειράματα απόσβεσης φθορισμού παρατηρήθηκε ασθενής αλληλεπίδραση μόνο για τις πρωτεΐνες BSA σε $\text{pH} = 4$ και SC σε $\text{pH} = 7$. Με χρήση διαφορετικών διαλυμάτων βηταλαϊνών, ένα πλουσιότερο και ένα φτωχότερο σε βηταξανθίνες, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι ξανθίνες αλληλεπιδρούν με τη BSA ισχυρότερα από ότι οι βητανίνες, κάτι που καθιστά πολύ ενδιαφέρουσα την περαιτέρω μελέτη με καθαρά μόρια! Τα πειράματα ενίσχυσης του φθορισμού των βηταλαϊνών ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα και καινοτόμα, και υπόδειξαν την ενίσχυση του φθορισμού των βηταλαϊνών για τα συστήματα BSA, CH και SC. Τέλος από τα πειράματα του χρονοεξαρτημένου φθορισμού προσδιορίστηκαν τρεις χρόνοι ημιζωής για τις βηταλαΐνες και δύο χρόνοι για τις πρωτεΐνες. Επίσης από τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύεται πως η απόσβεση των πρωτεϊνών από τις βηταλαΐνες οφείλεται και σε στατική απόσβεση. Η αλληλεπίδραση είναι ωστόσο μικρή και ασθενέστερη από αυτή του TA με τα ίδια βιομόρια.

Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών στην παρουσία βηταλαϊνών μελετήθηκε με τη μέθοδο CD. Βρέθηκε ότι οι βηταλαΐνες επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της BSA σε $\text{pH} = 4$ κατά τρόπο παρόμοιο με το TA (σταδιακή μείωση α -έλικας).

Η θερμοδομετρική μελέτη έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των βηταλαϊνών με τις τρεις πρωτεΐνες (BSA, WPI, SC) είναι ενδόθερμη. Στα θερμογράμματα παρατηρήθηκαν διαφορετικές συμπεριφορές σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και βηταλαϊνών, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχουν διάφορες διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC. Ωστόσο τα πειράματα ITC είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στα άλατα που συνοδεύουν τις βηταλαΐνες και είναι πρακτικά αδύνατη η ανάλυση αυτών των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαπίδυσης επιβεβαίωσαν την πολύ ασθενή αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε από τις προηγούμενες μεθόδους, ωστόσο και αυτά τα πειράματα είναι αρκετά ευαίσθητα στην παρουσία αλάτων.

10.3.2 Μελέτες σε στερεές επιφάνειες και γαλακτώματα

Από τα πειράματα σε επίπεδες επιφάνειες έγινε εμφανές ότι οι βηταλαΐνες δεν παρουσιάζουν επιφανειοενεργό χαρακτήρα με αποτέλεσμα η προσρόφηση τους σε επιφανείς να μην επιτυγχάνεται. Πρόβλημα και εδώ είναι η αλατότητα των εκχυλισμάτων των βηταλαΐνων.

Οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσουν οι βηταλαΐνες με την πρωτεΐνη BSA και τους πολυσακχαρίτες των ΠΓ και η αδυναμία τους να εναποτίθενται σε επιφάνειες επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής σταθερότητας της λιπιδικής φάσης. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι ανεξάρτητα σε ποιο στρώμα του ΠΓ (που συντίθεται από BSA, χιτοζάνη και πηκτίνη) επιχειρηθεί να τοποθετηθούν οι βηταλαΐνες, η αντιοξειδωτική τους δράση φαίνεται να είναι παρόμοια και πιθανότατα δεν σχετίζεται με τοποθέτηση στη διεπιφάνεια. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με αυτό που προέκυψε από τις μελέτες του ΤΑ.

10.3.3 Σύγκριση μεταξύ αποτελεσμάτων ταννικού οξέος και βηταλαΐνων

Το ταννικό οξύ φαίνεται να παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά συγκριτικά με τις βηταλαΐνες στη μελέτη τριών σταδίων που επιχειρήθηκε. Από τις μελέτες σε διάλυμα φάνηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βηταλαΐνων και των βιομορίων είναι ασθενείς, ενώ οι αλληλεπιδράσεις του ταννικού οξέος με τα βιομόρια φάνηκαν να είναι ισχυρότερες. Από τα πειράματα θολερότητας στα συστήματα του ΤΑ παρατηρήθηκε ισχυρή σύζευξη με τις πρωτεΐνες BSA και WPI σε pH = 4, όπως και στην περίπτωση του SC σε pH = 7. Όσο αφορά τις αλληλεπιδράσεις του ΤΑ με πολυσακχαρίτες, παρατηρήθηκε ισχυρή αλληλεπίδραση με τη χιτοζάνη και λιγότερο με την πηκτίνη. Σε αντίθεση στα συστήματα των βηταλαΐνων παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μόνο με το SC σε pH = 7 και με την χιτοζάνη. Ωστόσο οι κρίσιμοι μοριακοί λόγοι ήταν μικρότεροι του 2,5, ενώ για το ταννικό οξύ κυμαίνονται στην περιοχή 10-100 ανάλογα με το pH. Από τις μελέτες φθορισμού για τα συστήματα ταννικού οξέος η σταθερά K_Q που προσδιορίστηκε ήταν της τάξης $10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ που είναι αισθητά μεγαλύτερη από τη μέγιστη αναμενόμενη δυναμική σταθερά απόσβεσης ($2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), γεγονός που υποδεικνύει ότι η διαδικασία απόσβεσης μεταξύ των πρωτεϊνών και του ΤΑ οφείλεται κυρίως σε μη-ομοιοπολική σύζευξη. Όμοια συμπεριφορά παρουσίασαν και οι βηταλαΐνες, όπου από τα πειράματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού επιβεβαιώθηκε η στατική συνιστώσα στην απόσβεση του φθορισμού των πρωτεϊνών για τα συστήματα BSA σε pH = 4 και SC σε pH = 7. Και για τα δύο συστήματα παρατηρήθηκε αύξηση της πολικότητας του περιβάλλοντος γύρω από τα κατάλοιπα Tyr και Trp. Από τα αποτελέσματα CD βρέθηκε ότι τόσο το ταννικό οξύ όσο και οι βηταλαΐνες επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της BSA σε pH = 4 κατά τρόπο παρόμοιο, αφού σταδιακά μειώνεται το ποσοστό α-έλικας και αυξάνεται αυτό τις τυχαίας σπείρας. Η θερμιδομετρική μελέτη έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των βηταλαΐνων με

τις τρεις πρωτεΐνες (BSA, WPI, SC) είναι ενδόθερμη, ενώ του ταννικού οξέος με τις πρωτεΐνες ήταν εξώθερμη. Στα θερμογράμματα παρατηρήθηκαν διαφορετικές συμπεριφορές σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και βηταλαϊνών/ ταννικού οξέος, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχουν διάφορες διεργασίες που δίνουν σήμα στο ITC. Για το ταννικό οξύ είναι γνωστή η συμπύκνωση πολλών μορίων TA γύρω από ένα μόριο πρωτεΐνης, κάτι που δεν φαίνεται να συμβαίνει με τις βηταλαΐνες. Τέλος, τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαπίδυσης επιβεβαίωσαν την ισχυρότερη αλληλεπίδραση BSA και CH με το ταννικό οξύ και την πολύ ασθενή αλληλεπίδραση για τις βηταλαΐνες που παρατηρήθηκε από τις προηγούμενες μεθόδους, ωστόσο τα πειράματα αυτά είναι αρκετά ευαίσθητα στην παρουσία αλάτων.

Από τα πειράματα σε επίπεδες επιφάνειες έγινε εμφανές ότι οι βηταλαΐνες δεν παρουσιάζουν επιφανειοενεργό χαρακτήρα, σε αντίθεση με το ταννικό οξύ που εναποτίθεται με επιτυχία σε στερεές επιφάνειες και στη συνέχεια στην επιφάνεια των γαλακτωμάτων. Αυτό φάνηκε και από τα πειράματα μελέτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των γαλακτωμάτων, όπου στα συστήματα του ταννικού οξέος η θέση του ταννικού ή και μοριακή του αναλογία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική σταθερότητα της λιπιδικής φάσης, σε αντίθεση με τα συστήματα των βηταλαϊνών, που δεν φαίνεται να καταφέρνουν να ενσωματώνονται στις διεπιφάνειες των σταγονιδίων των ΠΓ.

10.4 Μελλοντική Εργασία

Ο κύριος στόχος της διατριβής αυτής ήταν να αποδειχθεί η γενική αρχή ότι τα φυσικά συμπλέγματα που σχηματίζονται χάρη στις ισχυρές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις αντιοξειδωτικών – βιοπολυμερών στο διάλυμα και δίνουν υψηλής ποιότητας υμένια LbL σε στερεές επιφάνειες, είναι επίσης εξαιρετικά επιτυχημένα στη σταθεροποίηση της λιπιδικής φάσης των ΠΓ κατά την οξείδωση. Ο στόχος αυτός πραγματοποιήθηκε σε σημαντικό βαθμό για το ταννικό οξύ, όχι όμως για τις βηταλαΐνες. Από την εργασία αυτή έμειναν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα, τα οποία θα μπορούσαν να εξετασθούν μέσα από επιπλέον πειραματικές και θεωρητικές μελέτες.

Ταννικό οξύ: Η εναπόθεση του ταννικού οξέος στις διεπιφάνειες των σταγονιδίων εκτιμήθηκε μόνο έμμεσα από τις μετρήσεις ζήτα δυναμικού. Θα πρέπει κανονικά να πραγματοποιηθεί ο άμεσος προσδιορισμός του TA που βρίσκεται στις διεπιφάνειες των γαλακτωμάτων, ώστε να υπάρξει συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης του με τη πραγματική παρουσία του (ροφημένη ποσότητα και θέση) στα πολυστρωματικά γαλακτώματα.

Βηταλαΐνες: Η απομόνωση των βηταλαϊνών από τεύτλα οδήγησε στα προβλήματα που συζητήθηκαν στα γενικά συμπεράσματα. Ιδανικά πρέπει είτε να χρησιμοποιηθούν καθαρά μόρια με κατάλληλη σύνθεση ή απομόνωση (π.χ. με παρασκευαστική χρωματογραφία), είτε

τουλάχιστον να βρεθεί μέθοδος απομόνωσης/εκχύλισης που δεν θα επιμολύνει τα αντιοξειδωτικά με μεγάλες ποσότητες αλάτων. Ακόμα και έτσι όμως, οι βηταλαΐνες δεν αναμένεται να επιδείξουν ισχυρό επιφανειοενεργό χαρακτήρα. Για να επιτευχθεί η εναπόθεσή τους στις διεπιφάνειες θα πρέπει μεταξύ των βηταλαϊνών και των πρωτεϊνών ή των πολυσακχαριτών να πραγματοποιηθούν ισχυρές ομοιοπολικές συζεύξεις, ώστε οι βηταλαΐνες να εναποτίθενται με επιτυχία στις διεπιφάνειες και να συνεισφέρουν αποτελεσματικά στην οξειδωτική σταθερότητα της λιπιδικής φάσης. Τέτοιες προσεγγίσεις έχουν γίνει με επιτυχία για τις κατεχίνες (Staszewski et al. 2014), αλλά όχι για τις ανθοκυανίνες ή τις βηταλαΐνες μέχρι σήμερα.

Η ισχυρότερη απόδειξη της εγκυρότητας της τριμερούς κolloειδούς προσέγγισης για το σχεδιασμό των ΠΓ που παρουσιάζεται σε αυτή την εργασία μπορεί να γίνει μόνο με μελέτες που θα χρησιμοποιούν διαφορετικούς γαλακτωματοποιητές, πολυσακχαρίτες και αντιοξειδωτικά. Η δύναμη της μεθόδου μπορεί να αποδειχθεί με ένα νέο επιφανειοενεργό αντιοξειδωτικό, του οποίου οι αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια δεν θα έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία. Η μέθοδος αυτή θα αποτελέσει τότε ένα βασικό εργαλείο για το συστηματικό σχεδιασμό ΠΓ με νέα συστατικά.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ach D., Briancon S., Dugas V., Pelletier J., Broze G., Chevalier Y., “*Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with Acacia gum*”, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2015**, 481, 367–374

Al-Hanish A., Stanic-Vucinic D., Mihailovic J., Prodic I., Minic S., Stojadinovic M., Radibratovic M., Milcic M., Cirkovic Velickovic T., “*Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate*”, Food Hydrocolloids, **2016**, 61, 241–250

Al-Malah K. I., Azzam M. O. J., Omari R. M., “*Emulsifying properties of BSA in different vegetable oil emulsions using conductivity technique*”, Food Hydrocolloids, **2000**, 14, 485–490

Anestopoulos I., Kiouisi D. E., Klavaris A., Galanis A., Salek K., Euston S. R., Pappa A., Panayiotidis M. I., “*Surface Active Agents and Their Health-Promoting Properties: Molecules of Multifunctional Significance*”, Pharmaceutics, **2020**, 12, 688

Antunes J. C., Leite Pereira C., Molinos M., Ferreira-da-Silva F., Dessì M., Gloria A., Ambrosio L., Gonçalves R. M., Barbosa M. A., “*Layer-by-layer self-assembly of chitosan and poly(γ -glutamic acid) into polyelectrolyte complexes*”, Biomacromolecule, **2011**, 12, 4183–4195

Atkins P. W., Paula J., **2010** “*Physical Chemistry*”, Ninth Edition, W. H. Freeman and Company, New York

Ball V., “*High loading capacity of Fe^{3+} cations in LBL films made from poly(ethyleneimine) and tannic acid: An alternative to coordination driven multistep assembly using polyphenols and Fe^{3+}* ”, Colloid and Interface Science Communications, **2014**, 3, 1–4

Benbow N. L., Webber J. L., Pawliszak P., Sebben D. A., Karpiniec S., Stringer D., Tobin M. J., Vongsvivut J., Krasowska M., Beattie D. A., “*Odd-even effects on hydration of natural*

polyelectrolyte multilayers: An in situ synchrotron FTIR microspectroscopy study”, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2019**, 553, 720–733

Benjamin O., Silcock P., Beauchamp J., Buettner A., Everett D. W., “*Volatile release and structural stability of b-lactoglobulin primary and multilayer emulsions under simulated oral conditions*”, *Food Chemistry*, **2013**, 140, 124–134

Berton C., Ropers M.-H., Viau M., Genot C., “*Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 5052–5061

Berton-Carabin C. C., Schroën K., “*Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer*”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2014**, 13, 945–977

Bin X., Zawisza I., Goddard J. D., Lipkowski J., “*Electrochemical and PM-IRRAS Studies of the Effect of the Static Electric Field on the Structure of the DMPC Bilayer Supported at Au(III) Electrode Surface*”, *Langmuir*, **2005**, 21, 330–347

Bobone S., Weert M., Stella L., “*A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contributions in protein emission and in the determination of conformational changes*”, *Journal of Molecular Structure*, **2014**, 1077, 68–76

Bordbar A. K., Saboury A. A., Moosavi- Movahedi A. A., “*The Shapes of Scatchard Plots for Systems with Two Sets of Binding Sites*”, *Biochemical Education*, **1996**, 24, 172–175

Brown A., “*Analysis of Cooperativity by Isothermal Titration Calorimetry*”, *International Journal of Molecular Sciences*, **2009**, 10, 3457–3477

Buffeteau T., Desbat B., Turllet J. M., “*Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films: Experimental Procedure and Quantitative Analysis*”, *Applied Spectroscopy*, **1991**, 45, 380–389

Cantor C. R., Schimmel P. R., **1980**, “*Biophysical Chemistry, Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*” San Francisco

Cardoso-Ugarte G. A., Sosa-Morales M. E., Ballard T., Liceaga A., San Martín-Gonzalez M. F., “*Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*)*”, *LWT- Food Science and Technology International*, **2014**, 59, 276–282

Caruso F., Rinia H. A., Furlong D. N., “*Gravimetric Monitoring of Nonionic Surfactant Adsorption from Nonaqueous Media onto Quartz Crystal Microbalance Electrodes and Colloidal Silica*”, *Langmuir*, **1996**, 12, 2145–2152

Casanova F., Chapeau A. L., Hamon P., Carvalho A. F., Croguennec T., Bouhallab S., “*pH- and ionic strength-dependent interaction between cyanidin-3-O-glucoside and sodium caseinate*”, *Food Chemistry*, **2018**, 267, 52–59

Chaiyasit W., Elias R. J., McClements D. J., Decker E. A., “*Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation*”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2007**, 47, 299–317

Chandrasekhar J., Madhusudhan M. C., Raghavarao K. S., “*Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption*”, *Food Bioprod Process Journal*, **2012**, 90, 615–623

Charoen R., Jangchud A., Jangchud K., Harnsilawat T., Decker E. A., McClements D. J., “*Influence of interfacial composition on oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized by biopolymer emulsifiers*”, *Food Chemistry*, **2012**, 131, 1340–1346

Chen C., Chen G., Wan P., Chen D., Zhu T., Hu B., Sun Y., Zeng X., “*Characterization of Bovine Serum Albumin and (-)-Epigallocatechin Gallate/3,4-O-Dicaffeoylquinic Acid/Tannic Acid Layer by Layer Assembled Microcapsule for Protecting Immunoglobulin G in Stomach Digestion and Release in Small Intestinal Tract*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2018**, 66, 11141–11150.

Cheng H., Fan Q., Liu T., Wusigale, Liang L., “*Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol in oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate: Impact of polysaccharide on the stability and bioaccessibility*”, Journal of Food Engineering, **2020**, 264, 109685

Cheng H., Wusigale F. Z., Bakry A. M., Chen Y., Liang L., “*Complexation of trans- and cis-resveratrol with bovine serum albumin, b-lactoglobulin or α -lactalbumin*”, Food Hydrocolloids, **2018**, 81, 242–252

Chethana S., Nayak C. A., Raghavarao K. S. M. S., “*Aqueous two-phase extraction for purification and concentration of betalains*”, Journal of Food Engineering, **2007**, 81, 679–687

Chibowski E., Espinosa-Jiménez M., Ontiveros-Ortega A., Giménez-Martin E., “*Surface free energy, adsorption and zeta potential in Leacril/Tannic acid system*”, Langmuir, **1998**, 14, 5237–5244.

Choo W. S., “*Betalains: Application in Functional Foods*”, Bioactive Molecules in Food, Springer International Publishing, **2018**, 1–28

Cuomo F., Ceglie A., Piludu M., Miguel M. G., Lindman B., Lopez F., “*Loading and protection of hydrophilic molecules into liposome-templated polyelectrolyte nanocapsules*”, Langmuir, **2014**, 30, 7993–7999

Dai T., Chen J., McClements D. J., Hu P., Ye X., Liua C., Li T., “*Protein–polyphenol interactions enhance the antioxidant capacity of phenolics: analysis of rice glutelin–procyanidin dimer interactions*”, Food Function Journal, **2019**, 10, 765–774

Dasmandal S., Kundu A., Rudra S., Mahapatra A., “*Binding interaction of an anionic amino acid surfactant with bovine serum albumin: physicochemical and spectroscopic investigations combined with molecular docking study*”, RSC Advances, **2015**, 5, 79107–79118

Decher G., “*Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites*”, Science, **1997**, 277, 1232–1237

Decher G., Hong J. D., Schmitt J., “*Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. III: Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces*”, Thin Solid Films, **1991**, 210/211, 831–835

Dickinson E., “*Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems*”, Food Hydrocolloid, **2003**, 17, 25–39

Dyerberg J., Bang H. O., “*Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos*”, Lancet, **1979**, 314, 433–435

Encina C., Vergara C., Gimenez B., Oyarzún-Ampuero F., Robert P., “*Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil*”, Trends in Food Science and Technology, **2016**, 56, 46–60

Erel-Unal I., Sukhishvili S. A., “*Hydrogen-Bonded Multilayers of a Neutral Polymer and a Polyphenol*”, Macromolecules **2008**, 41, 3962–3970

Evdokimova I. A., Alieva L. R., Varlamov V. P., Kharitonov T. V., Butkevich V. D., Kurchenko V. P., Foods and Raw Materials, **2015**, 3, 29–39

Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E., “*Nomenclature of the Proteins of Cows’ Milk—Sixth Revision*”, Journal of Dairy Science, **2004**, 87, 1641–1674

Fioramonti S. A., Arzeni C., Pilosof A. M. R., Rubiolo A. C., Santiago L. G., “*Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions*”, Journal of Food Engineering, **2015**, 156, 31–38

Fioramonti S. A., Martinez M. J., Pilosof A. M. R., Rubiolo A. C., Santiago L. G., “*Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil microencapsulation: Effect of pH and alginate concentration*”, Food Hydrocolloid, **2015**, 43, 8–17

Flach C. R., Gericke A., Mendelsohn R., “*Quantitative Determination of Molecular Chain Tilt Angles in Monolayer Films at the Air/Water Interfaces: Infrared Reflection/Absorption Spectroscopy of Behenic Acid Methyl Ester*”, *Journal of Physical Chemistry*, **1997**, 101, 58–65

Frazier R. A., Deaville E. R., Greenc R. J., Stringano E., Willoughby I., Plant J., Mueller-Harvey I., “*Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins*”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2010**, 51, 490–495

Frazier R. A., Papadopoulou A., Mueller-Harvey I., Kisson D., Green R. J., “*Probing Protein-Tannin Interactions by Isothermal Titration Microcalorimetry*”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2003**, 51, 5189–5195

Freyer M.W., Lewis E.A. “*Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions*”, *Methods in Cell Biology*, **2008**, Chapter 4, 84, 79–113

Fu S., Shen Z., Ajlouni S., Ng K., Sanguansri L., Augustin M. A., “*Interactions of buttermilk with curcuminoids*”, *Food Chemistry*, **2014**, 149, 47–53

Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F., “*Structural implications on colour, fluorescence, and antiradical activity in betalains*”, *Planta*, **2010**, 232, 449–460

Gavara R., Petrov V., Quintas A., Pina F., “*Circular dichroism of anthocyanidin 3-glucoside self-aggregates*”, *Phytochem.*, **2013**, 88, 92–98

Gomez-Guillen M.C., Gimenez B., Lopez-Caballero M.E., Montero M.P., “*Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review*”, *Food Hydrocolloid*, **2011**, 25, 1813–1827

Gonzalez M. J., Medina I., Maldonado O. S., Lucas R., Morales J. C., “*Antioxidant activity of alkyl gallates and glycosyl alkyl gallates in fish oil in water emulsions: Relevance of their surface active properties and of the type of emulsifier*”, *Food Chemistry*, **2015**, 183, 190–196.

Grigoriev D. O., Miller R., “*Mono- and multilayer covered drops as carriers*”, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **2009**, 14, 48–59.

Gulcin I., Huyut Z., Elmastaş M., Aboul-Enein H. Y., “*Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid*”, *Arabian Journal of Chemistry*, **2010**, 3, 43–53.

Guzey D., & McClements D. J., “*Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry*”, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2006**, 128–130, 227–248

Guzey D., D. J. McClements, “*Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by α -Lactoglobulin - Pectin Complexes*”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2007**, 55, 475–485

Guzey D., Kim H. J., McClements D. J., “*Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by b-lactoglobulin–pectin membranes*”, *Food Hydrocolloids*, **2004**, 18, 967–975

Harnsilawat T., Pongsawatmanit R., McClements D. J., “*Characterization of b-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study*”, *Food Hydrocolloids*, **2006**, 20, 577–585

He Z., Xu M., Zeng M., Qin F., Chen J., “*Interactions of milk a- and b-casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts*”, *Food Chemistry*, **2016**, 199, 314–322

Hemar Y., Gerbeaud M., Oliver C. M., Augustin M. A., “*Interaction between resveratrol and whey proteins using fluorescence spectroscopy*”, *International Journal of Food Science and Technology*, **2011**, 46, 2137–2144

Hernández Sánchez M. R., Cuvelier M.E., Turchiuli C., “*Effect of α -tocopherol on oxidative stability of oil during spray drying and storage of dried emulsions*”, *Food Research International*, **2016**, 88, 32–41

Hibbeln J. R., Nieminen L. R. G., Blasbalg T. L., Riggs J. A., Lands W. E. M., “*Healthy intakes of omega-3 and omega-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity*”, *American Journal of Clinical Nutrition*, **2006**, 83, 1483S–1493S

Hogan S. A., O’Riordan E. D., O’Sullivan M., “*Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions*”, *Journal of Microencapsulation*, **2003**, 20, 675–688

Hu M., McClements D. J., Decker E. A., “*Impact of Whey Protein Emulsifiers on the Oxidative Stability of Salmon Oil-in-Water Emulsions*”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2003**, 51, 1435–1439

Innis S. M., “*Dietary ω -3 fatty acids and brain development*”, *The Journal of Nutrition*, **2007**, 137, 855–859

Ishtikhar M., Ahmada E., Siddiqui Z., Ahmads S., Khana M. V., Zamana M., Khursheed Siddiqui M., Nusrat S., Chandel T. I., Ajmal M. R., Khana R. H., “*Biophysical insight into the interaction mechanism of plant derived polyphenolic compound tannic acid with homologous mammalian serum albumins*”, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2018**, 107, 2450–2464

Jiménez-Colmenero F., “*Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods*”, *Food Research International*, **2013**, 52, 64–74

Jiménez-Martín E., Rojas T. A., Gharsallaoui A., Carrascal J. R., Pérez-Palacios T., “*Fatty acid composition in double and multilayered microcapsules of α -3 as affected by storage conditions and type of emulsions*”, *Food Chemistry*, **2016**, 194, 476–486

Kanner J., Harel S., Granit R., “*Betalains-A New Class of Dietary Cationized Antioxidants*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 5178–5185

Kastuda M. S., McClements D. J., Miglioranza L. H. S., Decker E. A., “*Physical and Oxidative Stability of Fish Oil-in-Water Emulsions Stabilized with β -Lactoglobulin and Pectin*”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2008**, 56, 5926–5931

Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., McClements D. J., Decker E. A., “*Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 8365–8371

Kosters P., “*FT-IR Spectroscopy of thin Biological Layers*”, **1972**, 2, 11–43

Kowalonek J., “*Studies of chitosan/pectin complexes exposed to UV radiation*”, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2017**, 103, 515–524

Kulkarni V. S., **2010**, “*Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*”, 1st ed. William Andrew

Ladbury J. E., “*Biocalorimetry II: Applications of calorimetry in the biological sciences*”, **2004**, West Sussex: John Wiley & Son Ltd

Laguerre M., Bayrasy C., Panya A., Weiss J., McClements D. J., Lecomte J., Decker E. A., Villeneuve P., “*What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox*”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2015**, 55, 183–201

Lakowicz J. R., **2006**, “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”, 3rd edition Springer

Lau H. H., Murney R., Yakovlev N. L., Novoselova M. V., Lim S. H., Roy N., Singh H., Sukhorukov G. B., Haigh B., Kiryukhin M. V., “*Protein-tannic acid multilayer films: A multifunctional material for microencapsulation of food-derived bioactive*”, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2017**, 505, 332–340

Lau H. H., Yakovlev N. L., Ooi C. P., Kiryukhin M. V. “*Adsorption kinetics of tannic acid onto an albumin-terminated multilayer thin films*”, *Colloid and Polymer Science*, **2019**, 297, 471–422

Lesmes U., Sandra S., Decker E. A., McClements D. J., “*Impact of surface deposition of lactoferrin on physical and chemical stability of omega-3 rich lipid droplets stabilised by caseinate*”, *Food Chemistry*, **2010**, 123, 99–106

- Li G., Huang J., Chen T., Wang X., Zhang H., Chen Q., “*Insight into the interaction between chitosan and bovine serum albumin*”, Carbohydrate Polymers, **2017**, 176, 75–82
- Li K., Li Y., Liu C. L., Fu L., Zhao Y. Y., Zhang Y. Y., Wang Y. T., Bai Y. H., “*Improving interfacial properties, structure and oxidative stability by ultrasound application to sodium caseinate prepared pre-emulsified soybean oil*”, LWT, **2020**, 131, 109755
- Li M., McClements D. J., Liu X., Liu F., “*Design principles of oil-in-water emulsions with functionalized interfaces: Mixed, multilayer, and covalent complex structures*”, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, **2020**, 1–32
- Li P., Guo C., Li X., Yuan K., Yang X., Guo Y., Yang X., “*Preparation and structural characteristics of composite alginate/casein emulsion gels: A microscopy and rheology study*”, Food Hydrocolloids, **2021**, 118, 106792
- Li X., Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G. O., Jiang F., “*Complexation of bovine serum albumin and sugar beet pectin: Stabilising oil-in-water emulsions*”, Journal of Colloid and Interface Science, **2012**, 388, 103–111
- Li X., Wang G., Chen D., Lu Y., “*Binding of ascorbic acid and α -tocopherol to bovine serum albumin: a comparative study*”, Molecular BioSystems, **2014**, 10, 326–337
- Li Y. Q., Huang X. Z., Xu J. G., “*Synchronous Fluorescence Spectrometric Methodology in the Wavelength Domain*”, Journal of Fluorescence, **1999**, 9, 173–179
- Li Y., Hu M., Xiao H., Du Y., Decker E. A., McClements D. J., “*Controlling the functional performance of emulsion-based delivery systems using multi-component biopolymer coatings*”, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **2010**, 76, 38–47
- Liang L., Tajmir-Riahi A. H., Subirade M., “*Interaction of β -lactoglobulin with resveratrol and its biological implications*”, Biomacromolecules, **2008**, 9, 50–56
- Lin D., Xing B. “*Tannic acid adsorption and its role for stabilizing carbon nanotube suspensions*”, Environmental Science and Technology, **2008**, 42, 5917–5923

Liu F., Wang D., Sun C., McClements D. J., Gao Y., “*Utilization of interfacial engineering to improve physicochemical stability of β -carotene emulsions: Multilayer coatings formed using protein and protein-polyphenol conjugates*”, *Food Chemistry*, **2016**, 205, 129–139

Lomova M. V., Sukhorukov G. B., Antipina M. N., “*Antioxidant Coating of Micronsize Droplets for Prevention of Lipid Peroxidation in Oil-in-Water Emulsion*”, *ACS Applied Material and Interfaces*, **2010**, 2, 3669–3676

Luo Y., Wang Q., “*Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: a review*”, *Journal of Applied Polymer Science*, **2014**, 131, 40696

Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T., “*Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption*”, *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 6117–6123

Ma J., Liu Y., Chen L., Xie Y., Wang L. Y., Xie M. X., “*Spectroscopic investigation on the interaction of 3,7-dihydroxyflavone with different isomers of human serum albumin*”, *Food Chemistry*, **2012**, 132, 663–670

Maglio O., Costanzo S., Cercola R., Zambrano G., Mauro M., Battaglia R., Ferrini G., Nistri F., Pavone V., Lombardi A., “*A Quartz Crystal Microbalance Immunosensor for Stem Cell Selection and Extraction*”, *Sensors*, **2017**, 17, 2747

Marchuk M., Seliga M. J., Cellia G. B., Lawrence P., Smilgies D. M., A. Abbaspourrada A., “*Mechanistic investigation via QCM-D into the color stability imparted to betacyanins by the presence of food grade anionic polysaccharides*”, *Food Hydrocolloids*, **2019**, 93, 226–234

Martins N., Roriz C. L., Morales P., Barros L., Ferreira I., “*Coloring attributes of betalains: a key emphasis on stability and future applications*”, *Food Function*, **2017**, 8, 1357–1372

Matsuo K., Namatame H., Taniguchi M., Gekko K., “*Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Analysis of Glycosaminoglycans by Synchrotron-Radiation Spectroscopy*”, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **2009**, 73, 557–561

McClements D. J., “*Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles*”, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **2012**, 17, 235–245

McClements D. J., “*Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review*”, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2018**, 253, 1–22

McClements D. J., “*Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems*”, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2015**, 219, 27–53

McClements D. J., **2016**, “*Food Emulsions principles practices and techniques, Third Edition*”, CRC Press, Taylor & Francis Group

McClements D. J., Decker E., “*Interfacial Antioxidants: A review of Natural and Synthetic Emulsifiers and Coemulsifiers that Can Inhibit Lipid Oxidation*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2018**, 66, 20–35

McClements D. J., Gumus C. E., “*Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance*”, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2016**, 234, 3–26

McClements D. J., Yan L., “*Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components*”, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2010**, 159, 213–228

McClements D.J., “*Protein-stabilized emulsions*”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2004**, 9, 305–313

Mei L., Decker E. A., McClements D. J., “*Evidence of Iron Association with Emulsion Droplets and Its Impact on Lipid Oxidation*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46, 5072–5077.

Mendelsohn R., Brauner J. W., Gericke A., “*External Infrared Reflection Adsorption Spectrometry of monolayer films at the air-water interface*”, Annual Review of Physical Chemistry, **1995**, 46, 305–334

Mendelsohn R., Flach C. R., “*Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy of Lipids, Peptides, and Proteins in Aqueous Monolayers*”, Current Topics in Membranes, **2002**, 52, 57–88

Miller R., Fainerman V. B., Makievski A.V., Kragel J., Grigoriev D. O., Kazakov V. N., *et al.* “*Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at the water/fluid interface*”, Advances in Colloid and Interface Science, **2000**, 86, 39–82

Murari G. F., Penido J. A., Machado P. A. L., Lemos L. R., Lemes N. H. T., Virtuoso L. S., G. Rodrigues, Mageste A. B., “*Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol + ammonium sulfate + water: equilibrium data and thermodynamic modelling*”, Fluid Phase Equilibria, **2015**, 406, 61–69

Neemann F., Rosenberger S., Jefferson B., McAdam E. J., “*Non-covalent protein–polysaccharide interactions and their influence on membranefouling*”, Journal of Membrane Science, **2013**, 446, 310–317

Nemzer B., Pietrkowski Z., Sporna A., Stalica P., Thresher W., Michałowski T., Wybraniec S., “*Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (Beta vulgaris L.) dried extracts*”, Food Chemistry, **2011**, 127, 42–53

Neumann M. G., Schmitt C. C., Iamazaki E. T., “*A fluorescence study of the interactions between sodium alginate and surfactants*”, Carbohydrate Research, **2003**, 338, 1109–1113

Ni Y., Lin D., Kokot S., “*Synchronous fluorescence, UV–visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA*”, Analytical Biochemistry, **2006**, 352, 231–242

Nie S.P., Wang C., Cui S. W., Wang Q., Xie M.Y., G.O. Phillips, “*A further amendment to the classical core structure of arabic (Acacia senegal)*”, Food Hydrocoll, **2013**, 31, 42–48

Nielsen N. S., Horn A. F., Jacobsen C., “*Effect of emulsifier type, pH and iron on oxidative stability of 5% fish oil-in-water emulsions*”, European Journal of Lipid Science and Technology, **2013**, 115, 874–889

Opanasopit P., Apirakaramwong A., Ngawhirunpat T., Rojanarata T., Ruktanonchai U., “*Development and Characterization of Pectinate Micro/Nanoparticles for Gene Delivery*”, American Association of Pharmaceutical Scientists, **2008**, 9, 67–74

Ozturk B., Argin S., Ozilgen M., McClements D.J., “*Formation and stabilization of nanoemulsion - based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin*”, Journal of Food Engineering, **2014**, 142, 57–63

Pal S., Saha C., “*A review on structure-affinity relationship of dietary flavonoids with serum albumins*”, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, **2014**, 32, 1132–1147

Pal S., Saha C., Hossain M., Dey K. S., Kumar G. S., “*Influence of Galloyl Moiety in Interaction of Epicatechin with Bovine Serum Albumin: A Spectroscopic and Thermodynamic Characterization*”, PLOS ONE, **2012**, 7, e43321

Pan Y., Nitin N., “*Effect of layer-by-layer coatings and localization of antioxidant on oxidative stability of a model encapsulated bioactive compound in oil-in-water emulsions*”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2015**, 135, 472–480

Pantoja-Castroa M. A., González-Rodríguez H., “*Study by infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis of tannins and tannic acid*”, Revista Latinoamericana de Química, **2011**, 39, 107–112

Patel B. K., Sepay N., Mahapatra A., “*Curious Results in the Prospective Binding Interactions of the Food Additive Tartrazine with β -Lactoglobulin*”, Langmuir, **2019**, 35, 11579–11589

Patel S., Goyal A., “*Applications of natural polymer gum arabic: a review*”, International Journal of Food Properties, **2015**, 18, 986–998

Petty M. C., **1996**, “*Langmuir-Blodgett Films-An Introduction*”, Cambridge University Press, 12–26

Peyratout C. S., Dähne L., “*Tailor-made polyelectrolyte macrocapsules from multilayers to smart containers*”, *Angewandte Chemie International Edition*, **2004**, 43, 3762–3783

Piorkowski D. T., McClements D. J., “*Beverage emulsions: recent developments in formulation, production, and applications*”, *Food Hydrocolloid*, **2014**, 42, 5–41

Precupas A., Sandu R., Leonties A. R., Anghel D. F., Popa V. T., “*Complex interaction of caffeic acid with bovine serum albumin: calorimetric, spectroscopic and molecular docking evidence*”, *New Journal Chemistry*, **2017**, 41, 15003–15015

Puthusserickal A. H., Suman R., Gunjan V., “*Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering*”, *Langmuir*, **2015**, 31, 3–12

Qiu C. Y., Wang B., Wang Y., Teng Y. L., “*Effects of colloidal complexes formation between resveratrol and deamidated gliadin on the bioaccessibility and lipid oxidative stability*”, *Food Hydrocolloid*, **2017**, 69, 466–472

Quina F. H., Bastos E. L., “*Chemistry Inspired by the Colors of Fruits, Flowers and Wine*”, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **2018**, 90, 681–695

Raja S., Murty V. R., Thivaharan, V., Rajasekar V., Ramesh V., “*Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules-A Review*”, *Catalysis Science and Technology*, **2012**, 1, 7–16.

Rangsansarid J., Fukada K., “*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*, **2007**, 316, 779–786

Ringwald C., Ball V., “*Step-by-step deposition of type B gelatin and tannic acid displays a peculiar ionic strength dependence at pH 5*”, *Royal Society of Chemistry Advances*, **2016**, 6, 4730–4738

Ross P. D., Subramanian S., “*Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability*”, *Annual Review of Biochemistry*, **1981**, 20, 3096–3102

Sadovoy A. V., Kiryukhin M. V., Sukhorukov G. B., Antipina M. N., “*Kinetic stability of water-dispersed oil droplets encapsulated in a polyelectrolyte multilayer shell*”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2011**, 13, 4005–4012

Sadovoy A. V., Lomova M. V., Antipina M. N., Braun N. A., Sukhorukov G. B., Kiryukhin M. V., “*Layer-by-layer assembled multilayer shells for encapsulation and release of fragrance*”, *ACS Applied Materials and Interfaces*, **2013**, 5, 8948–8954

Sagalowicz L., Leser M. E., “*Delivery systems for liquid food products*”, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **2010**, 15, 61–72

Salis, A., Boström, M., Medda, L., Cugia, F., Barse, B., Parsons, D. F., Ninham, B. W., Monduzzi, M. “*Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge / Potential of BSA Protein*”, *Langmuir*, **2011**, 27, 11597–11604

Salvia-Trujillo L., Decker E. A., McClements D. J., “*Influence of an anionic polysaccharide on the physical and oxidative stability of omega-3 nanoemulsions: Antioxidant effects of alginate*”, *Food Hydrocolloids*, **2016**, 52, 690–698

Sanchez-Gonzalez N., Jaime-Fonseca M. R., San Martin-Martinez E., Zepeda L. G., “*Extraction, Stability, and Separation of Betalains from Opuntia joconostle cv. Using Response Surface Methodology*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 11995–12004

Sandra S., Decker E. A., McClements D. J., “*Effect of Interfacial Protein Cross-Linking on the in Vitro Digestibility of Emulsified Corn Oil by Pancreatic Lipase*”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2008**, 56, 7488–7494

Schmelz T., Lesmes U., Weiss J., McClements D. J., “*Modulation of physicochemical properties of lipid droplets using b-lactoglobulin and/or lactoferrin interfacial coatings*”, *Food Hydrocolloids*, **2011**, 25, 1181–1189

Sellimi S., Younes I., Ayed H. B., Maalej H., Montero V., Rinaudo M., Dahia M., Mechichi T., Hajji M., M. Nasri M., “*Structural, physicochemical and antioxidant properties of*

sodiumalginate isolated from a Tunisian brown seaweed”, International Journal of Biological Macromolecules, **2015**, 72, 1358–1367

Shahidi F., **2015**, “*Antioxidants*”, Handbook of Antioxidants for Food Preservation. Elsevier, 1–14

Shahidi F., Zhong Y., “*Lipid oxidation and improving the oxidative stability*”, Chemical Society Reviews, **2010**, 39, 4067–4079

Shang J., Zhong F., Zhu S., Wang J., Huang D., Li Y., “*Structure and physiochemical characteristics of whey protein isolate conjugated with xylose through Maillard reaction at different degrees*”, Arabian Journal of Chemistry, **2020**, 13, 8051–8059

Shaw L. A., McClements D. J., Decker E. A., “*Spray-Dried Multilayered Emulsions as a Delivery Method for ω -3 Fatty acids into Food Systems*”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, 3112–3119

Shekhar T. C., Anju G., “*Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of Ageratum conyzoides Linn. Leaves*”, American Journal of Ethnomedicine., **2014**, 1, 244–249.

Shchukina E. M., Shchukin D. G., “*Layer-by-layer coated emulsion microparticles as storage and delivery tool*”, Current Opinion in Colloid and Interface Science, **2012**, 17, 281–289

Shutava T. G., Prouty M. D., Agabekov V. E., Lvov Y. M., “*Antioxidant properties of layer-by-layer films on the basis of Tannic acid*”, Chemistry Letter, **2006**, 35, 1144 –1145

Shutava T., Prouty M., Kommireddy D., Lvov Y., “*pH responsive decomposable layer-by-layer nanofilms and capsules on the basis of Tannic acid*”, Macromolecules, **2005**, 38, 2850–2858

Skoog D. A., Hooler F. J., Nieman T. A., Καραγιάννης Μ. Ι., Ευσταθίου Κ. Η., **2005**, “*Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*”, Εκδόσεις Κωσταράκης

- Slimen I. B., Najar T., Abderrabba M., “*Chemical and Antioxidant Properties of Betalains*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2017**, 65, 675–689
- Soares S., Mateus N., Freitas V., “*Interaction of different polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by fluorescence quenching*”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2007**, 55, 6726–6735
- Staszewski M., Ruiz-Henestrosa V. M. P., Pilosof A. M. R., “*Green tea polyphenols-b-lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil*”, *Food Hydrocoll.*, **2014**, 35, 505–511
- Sukhorukov G. B., Lichtenfeld H., Knippel E., Budde A., Möhwald H., “*Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles*”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1998**, 137, 253–266
- Surh J., Decker E. A., McClements D. J., “*Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions*”, *Food Hydrocolloids*, **2006**, 20, 607–618
- Tan C., McClements D. J., “*Application of Advanced Emulsion Technology in the Food Industry: A Review and Critical Evaluation*”, *Foods*, **2021**, 10, 812
- Telesford D. M., **2012**, “*Langmuir Trough and Brewster Angle Microscopy Study of Model Lung Surfactant Monolayers at the Air/Aqueous Interface*”, Master Thesis, Ohio State University, 45–52
- Thongkaew C., Gibis M., Hinrichs J., Weiss J., “*Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates*”, *Food Hydrocolloids*, **2014**, 41, 103–112
- Torger B., Müller M., “*In situ-ATR-FTIR analysis on the uptake and release of streptomycin from polyelectrolyte complex layers*”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, **2013**, 104, 546–553.

Trentin A., Güell C., López F., Ferrando M., “*Microfiltration membranes to produce BSA-stabilized O/W emulsions by premix membrane emulsification*”, *Journal of Membrane Science*, **2010**, 356, 22–32

Tsao R., “*Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation*”, *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Elsevier, **2015**, 335–347

Tsionsky V., “*The Quartz-Crystal Microbalance W in an Undergraduate Laboratory Experiment*”, *Journal of Chemical Education*, **2007**, 84, 1334

Van Buren J. P., Robinson W. B., “*Formation of complexes between protein and Tannic acid*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1969**, 17, 773–777

Van Holde K. E., Johnson W. C., Shing P.H., “*Principles of Physical Biochemistry*”, **2005**, Upper Saddle River, New Jersey

Vereshchagin A. G., Novitskaya G. V., “*The triglyceride composition of linseed oil*”, *Journal of the American Oil*, Chemists Society, **1965**, 42, 970–974.

Viljanen K., Kylli P., Hubbermann E. M., Schwarz K., Heinonen M. “*Anthocyanin Antioxidant Activity and Partition Behavior in Whey Protein Emulsion*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 2022–2027.

Von Staszewski M., Pizones Ruiz-Henestrosa V. M., Pilosof A. M. R., “*Green tea polyphenols- β -lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil*”, *Food Hydrocolloids*, **2014**, 35, 505–511

Wan Z. L., Wang J. M., Wang L. Y., Yang X. Q., Yuan Y., “*Enhanced Physical and Oxidative Stabilities of Soy Protein-Based Emulsions by Incorporation of a Water-Soluble Stevioside-Resveratrol complex*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 4433–4440

Wan Z. L., Wang J. M., Wang L. Y., Yuan Y., Yang X. Q., “*Complexation of resveratrol with soy protein and its improvement on oxidative stability of corn oil/water emulsions*”, *Food Chemistry*, **2014**, 161, 324–331

Wang X. Y., Heuzey M. C., “*Chitosan-Based Conventional and Pickering Emulsions with Long-Term Stability*”, *Langmuir*, **2016**, 32, 929–936

Wang Y. H., Wan Z. L., Yang X. Q., Wang J. M., Guo J., Lin Y., “*Colloidal complexation of zein hydrolysate with tannic acid: Constructing peptides-based nanoemulsions for alga oil delivery*”, *Food Hydrocolloid.*, **2016**, 54, 40–48

Wang Y., Yang F., Yang J., Bai Y., Li B., “*Synergistic stabilization of oil in water emulsion with chitin particles and tannic acid*”, *Carbohydrate Polymers*, **2021**, 254, 117292

Wei J., Xu D., Zhang X., Yang J., Wang Q., “*Evaluation of anthocyanins in Aronia melanocarpa/BSA binding by spectroscopic studies*”, *AMB Express*, **2018**, 8, 72–81

Wei Z., Yang W., Fan R., Yuan F., Gao Y., “*Evaluation of structural and functional properties of protein EGCG complexes and their ability of stabilizing a model b-carotene emulsion*”, *Food Hydrocolloids*, **2015**, 45, 337–350

Wendel M., Nizinski S., Tuwalska D., Starzak K., Szot D., Prukala D., Sikorski M., Wybraniec S., Burdzinski G., “*Time-resolved spectroscopy of the singlet excited state of betanin in aqueous and alcoholic solutions*”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2015**, 17, 18152–18158

Wierenga P. A., Egmond M. R., Voragen A. G. J., Jongh H. H., “*The adsorption and unfolding kinetics determines the folding state of proteins at the air–water interface and thereby the equation of state*”, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2006**, 299, 850–857

Wu J. G., Wei S. C., Chen Y., Chen J. H., Luo S. C., “*Critical Study of the Recognition between C-Reactive Protein and Surface-Immobilized Phosphorylcholine by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation*”, *Langmuir*, **2018**, 34, 943–951

Wu Y., Eskin N. A. M., Cui W., Pokharel B., “*Emulsifying properties of water soluble yellow mustard mucilage: a comparative study with gum arabic and citrus pectin*”, *Food Hydrocoll.*, **2015**, 47, 191–196

Wyler H., “*Die Betalaine*”, *Chemie Unserer Zeit*, **1969**, 3, 146–151

Xie L., Wehling R. L., Ciftci O., Zhang Y., “*Formation of complexes between tannic acid with bovine serum albumin, egg ovalbumin and bovine beta-lactoglobulin*”, *Food Research International*, **2017**, 102, 195–202

Yan Y., Hu J., Yao P., “*Effects of Casein, Ovalbumin, and Dextran on the Astringency of Tea Polyphenols Determined by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation*”, *Langmuir*, **2009**, 25, 397–402

Yang F., Yang J., Qiu S., Xu W., Wang Y., “*Tannic acid enhanced the physical and oxidative stability of chitin particles stabilized oil in water emulsion*”, *Food Chemistry*, **2021**, 346, 128762

Yang S., Wang Y., Wu X., Sheng S., Wang T., Zan X., “*Multifunctional Tannic acid (TA) and Lysozyme (Lys) films built layer by layer for potential application on implant coating*”, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, **2019**, 5, 3582–3594

Yang, F., Yang, J., Qiu, S., Xu, W., & Wang Y., “*Tannic acid enhanced the physical and oxidative stability of chitin particles stabilized oil in water emulsion*”, *Food Chemistry*, **2021**, 346, 128762

Yi H., L.-Q. Wu L.-Q., Bentley W. E., Ghodssi R., Rubloff G. W., Culver J. N., Payne G. F., *Biomacromol.*, **2005**, 6, 2881–2894

Yuan F., Gao Y., Decker E. A., McClements D. J., “*Modulation of physicochemical properties of emulsified lipids by chitosan addition*”, *Journal of Food Engineering*, **2013**, 114, 1–7

Yuksel Z., Avcı E., Erdem Y. K., “*Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins*”, *Food Chemistry*, **2010**, 121, 450–456

Zargar V., Asghari M., Dashti A., “*A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications*”, *ChemBioEng Reviews*, **2015**, 2, 204–226

Zhan F., Li J., Wang Y., Shi M., Li B., Sheng F., “*Bulk, foam, and interfacial properties of Tannic acid/Sodium caseinate nanocomplexes*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2018**, 66, 6832–6839

Zhan F., Yang J., Li J., Wang Y., Li B., “*Characteristics of the interaction mechanism between tannic acid and sodium caseinate using multispectroscopic and thermodynamics methods*”, *Food Hydrocolloids*, **2018**, 75, 81–87

Zhang F., Cai X., Ding L., Wang S., “*Effect of pH, ionic strength, chitosan deacetylation on the stability and rheological properties of O/W emulsions formulated with chitosan/ casein complexes*”, *Food Hydrocolloids*, **2021**, 111, 106211

Zhang L., Liu Y., Wang Y., “*Interaction between an (-)-epigallocatechin-3-gallate-copper complex and bovine serum albumin: Fluorescence, circular dichroism, HPLC, and docking studies*”, **2019**, 301, 125294

Zhang T., Fang L., Lin N., Wang J., Wang Y., Wu T., Song P., “*Highly transparent, healable, and durable anti-fogging coating by combining hydrophilic pectin and tannic acid with poly(ethylene terephthalate)*”, *Green Chemistry*, **2019**, 21, 5405–5413

Zhao Q., Zaaboul F., Liu Y., Li J., “*Recent advances on protein-based Pickering high internal phase emulsions (Pickering HIPEs): Fabrication, characterization, and applications*”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2020**, 4, 1934–1968

Zhou B., Gao S., Li X., Liang H., Li S. “*Antioxidant pickering emulsions stabilized by zein/tannic acid colloidal particles with low concentration*”, *International Journal of Food Science and Technology*, **2020**, 55, 1924–1934

Zhou F., Li G., Huang J., “*Effect of Chitosan/BSA Addition on the Physical Stability of Sunflower Oil Emulsions*”, *Journal of Food Quality*, **2019**, 6264270

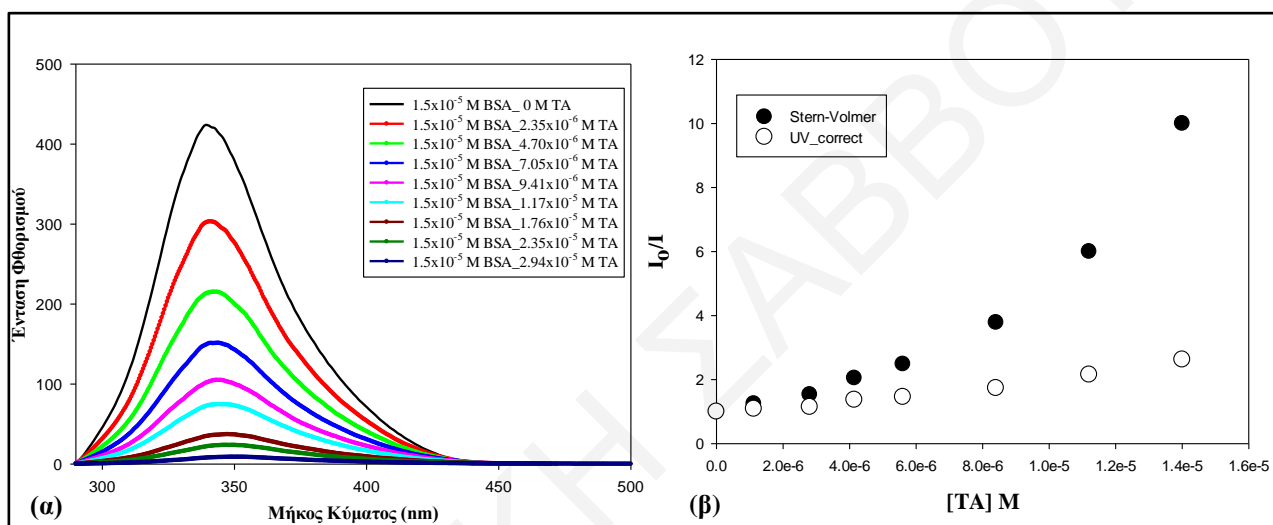
Zinoviadou G. K., Scholten E., Moschakis T., Biliaderis G. C., “*Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes*”, *International Dairy Journal*, **2012**, 26, 94–105

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

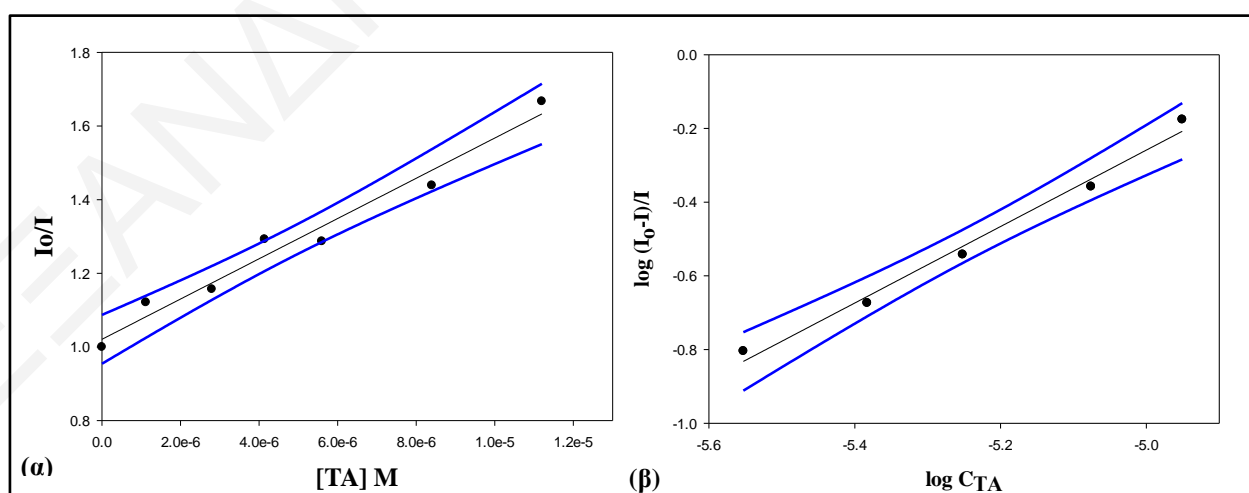
Π.1 Σχεδιασμός πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με ταννικό οξύ: Η κολλοειδής προσέγγιση

Π.1.1 ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

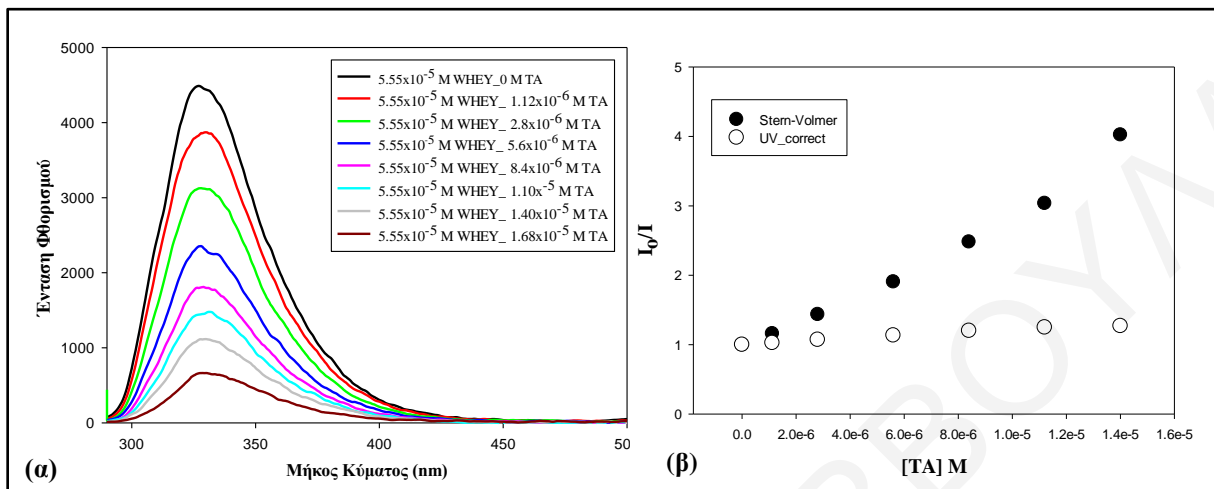
Π.1.1.1: Αποτελέσματα πειραμάτων φθορισμού



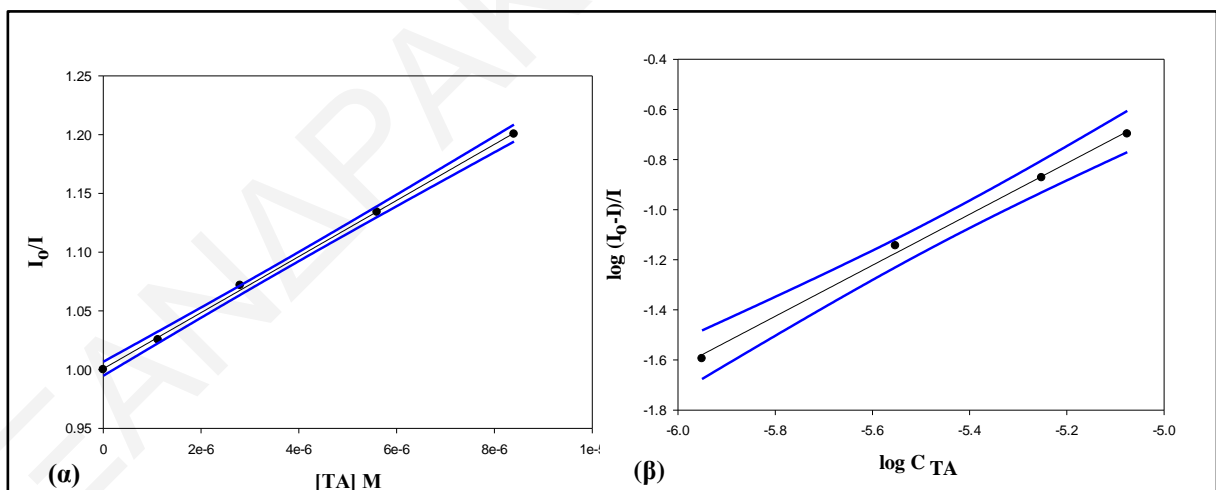
Σχήμα Π.1: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 7, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-2.95 \times 10^{-5}$ M) και (β) εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (•) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



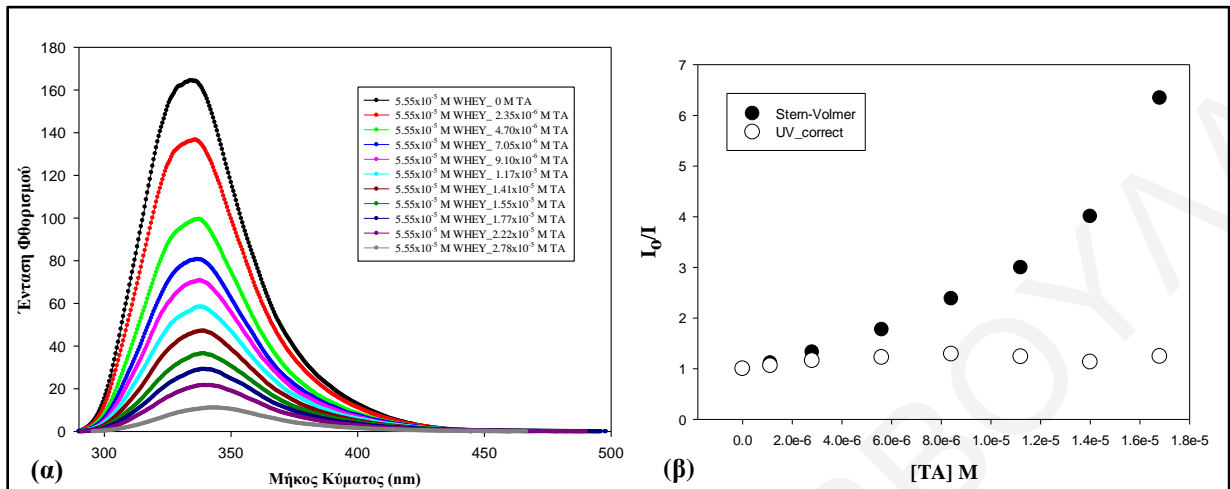
Σχήμα Π.2: α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια TA σε pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς φθορισμού K_{sv} ή K_q και (β) γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.4 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_s και του αριθμού n. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.



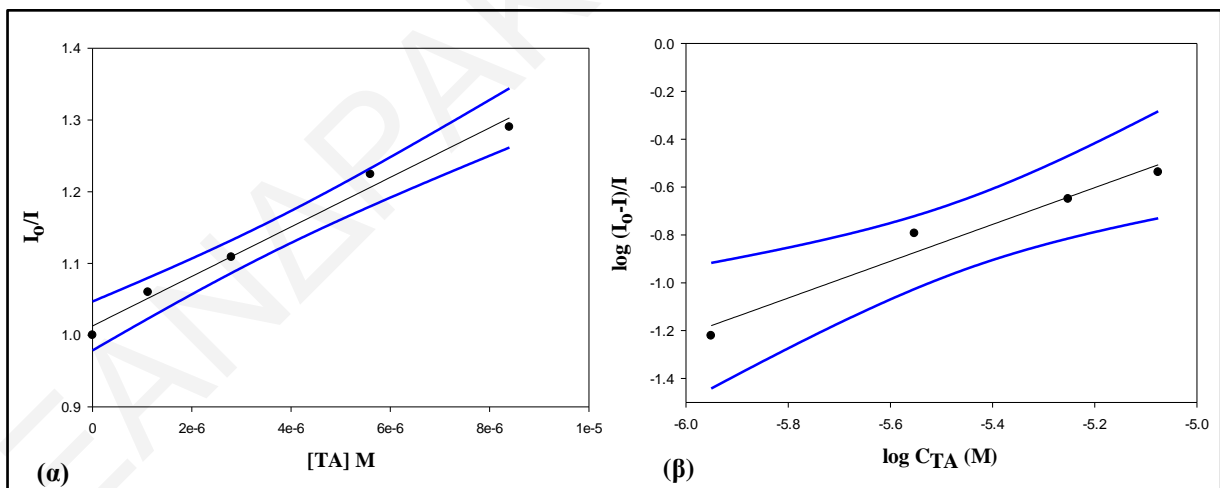
Σχήμα Π.3: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 4, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-1.68 \times 10^{-5}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (●) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



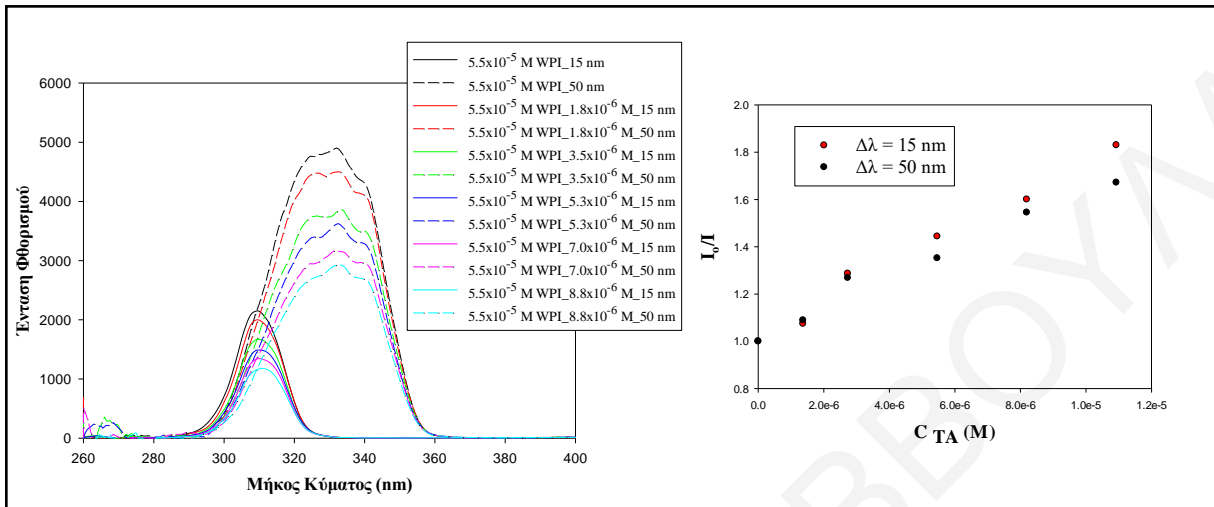
Σχήμα Π.4: α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA σε pH 4 για τον υπολογισμό της σταθεράς φθορισμού K_{sv} ή K_q και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.4 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_s και του αριθμού n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.



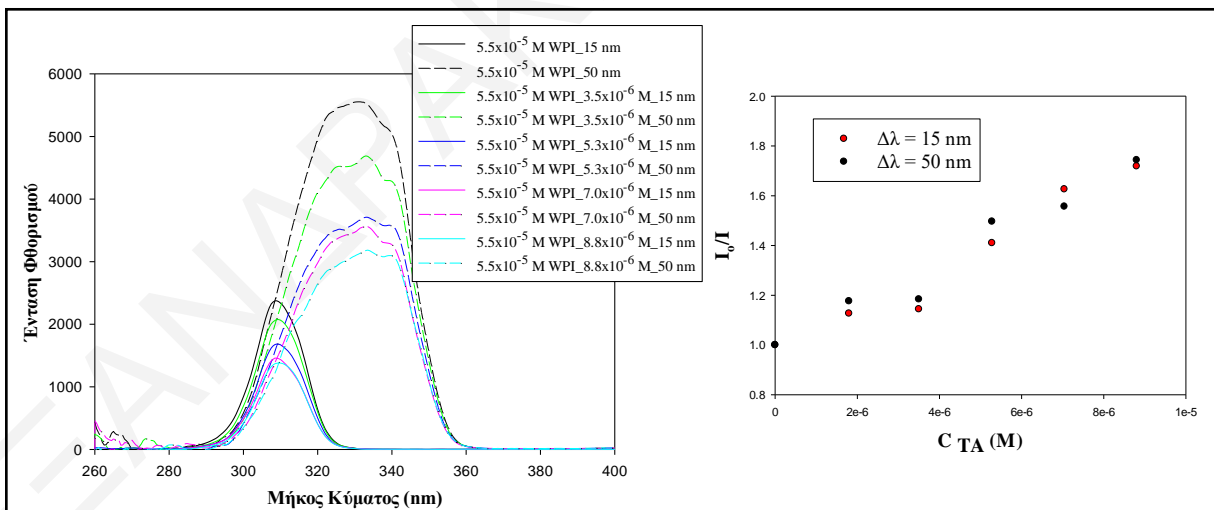
Σχήμα Π.5: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 7, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-2.78 \times 10^{-4}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA. Διορθωμένα (ο) και μη (●) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



Σχήμα Π.6: α) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια TA σε pH 7 για τον υπολογισμό της σταθεράς φθορισμού K_{SV} ή K_q και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Εξίσωσης 6.4 για τον υπολογισμό της σταθεράς K_S και του αριθμού n . Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

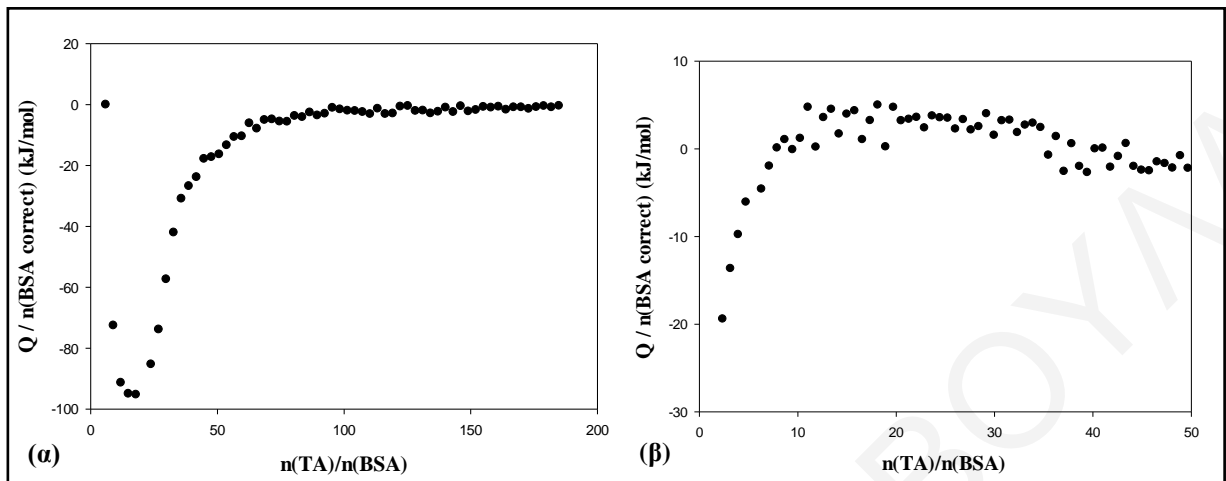


Σχήμα Π.7: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI (5.5×10^{-5} M) σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.

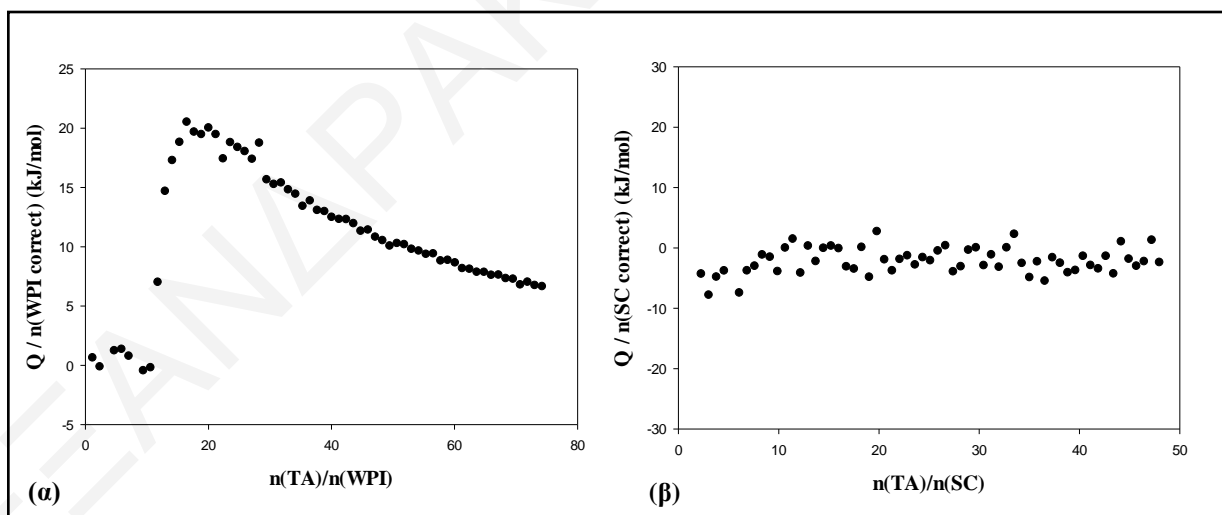


Σχήμα Π.8: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI (5.5×10^{-5} M) σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-8.8 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) Γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.

Π.1.1.2: Αποτελέσματα πειραμάτων θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης

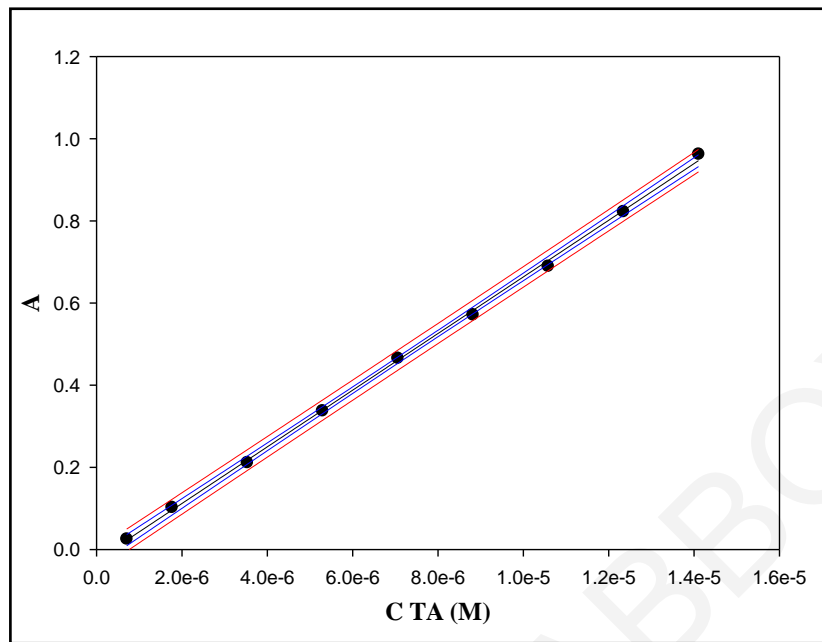


Σχήμα Π.9: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol BSA για την τιτλοδότηση (α) 8,264 mM TA σε 0,011 mM BSA σε pH = 4 και (β) 9,4808 mM TA σε 0,0481 mM BSA σε pH = 7 στους 25 ° C

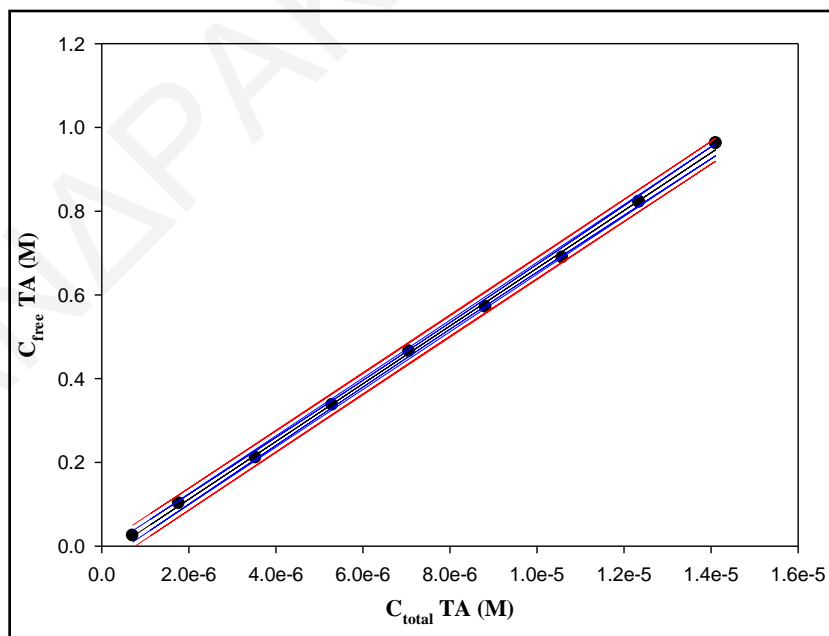


Σχήμα Π.10: Διορθωμένα θερμογράμματα ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία mol TA / mol πρωτεΐνης για την τιτλοδότηση (α) 9.7610 mM TA σε 0.0331 mM WPI σε pH = 4 και (β) 9,4808 mM TA σε 0,0498 mM CS σε pH = 7, στους 25 ° C

Π.1.1.3: Αποτελέσματα πειραμάτων διαπίδυσης



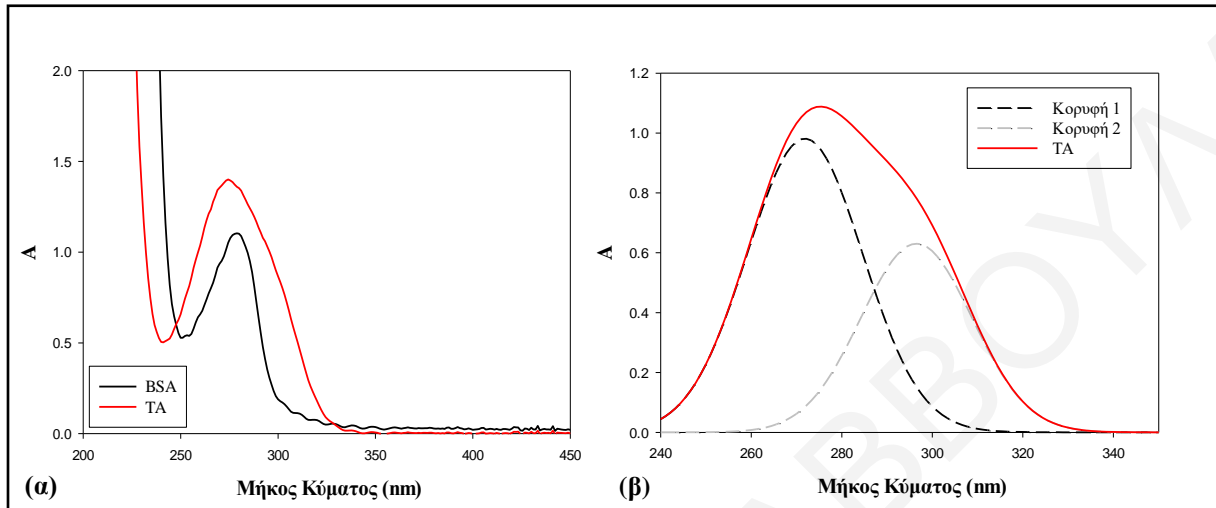
Σχήμα Π.11: Καμπύλη βαθμονόμησης TA σε εύρος συγκεντρώσεων $0-1.5 \times 10^{-5}$ M συνάρτηση της απορρόφησης για το σύστημα TA-BSA. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.



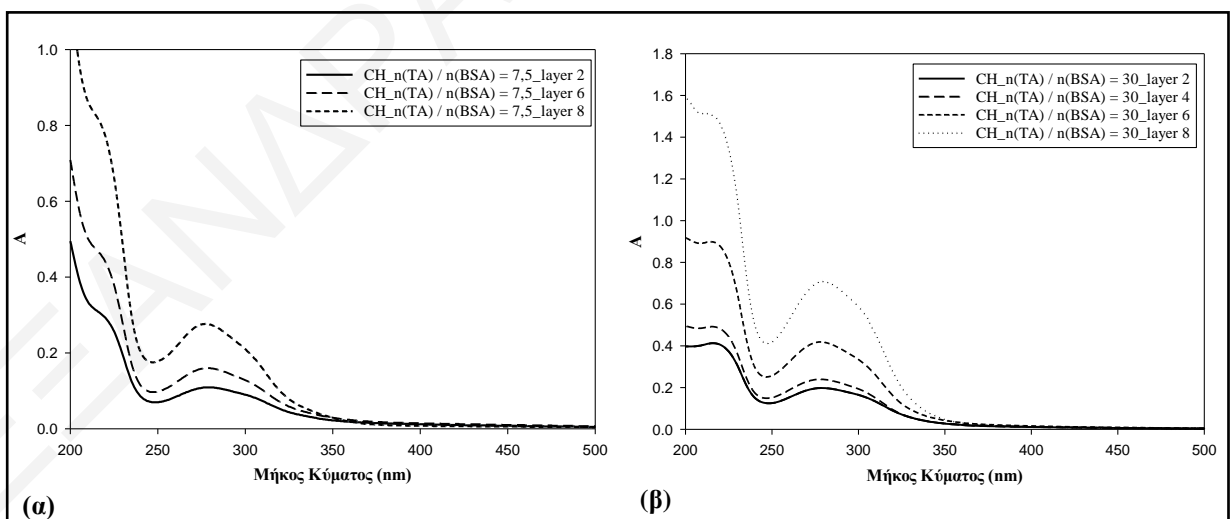
Σχήμα Π.12: Καμπύλη βαθμονόμησης TA σε εύρος συγκεντρώσεων $0-1.5 \times 10^{-5}$ M συνάρτηση της απορρόφησης για το σύστημα TA-CH. Οι μπλε γραμμές αποδίδουν το διάστημα εμπιστοσύνης 99% και οι κόκκινες σε 95%.

Π.1.2 ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

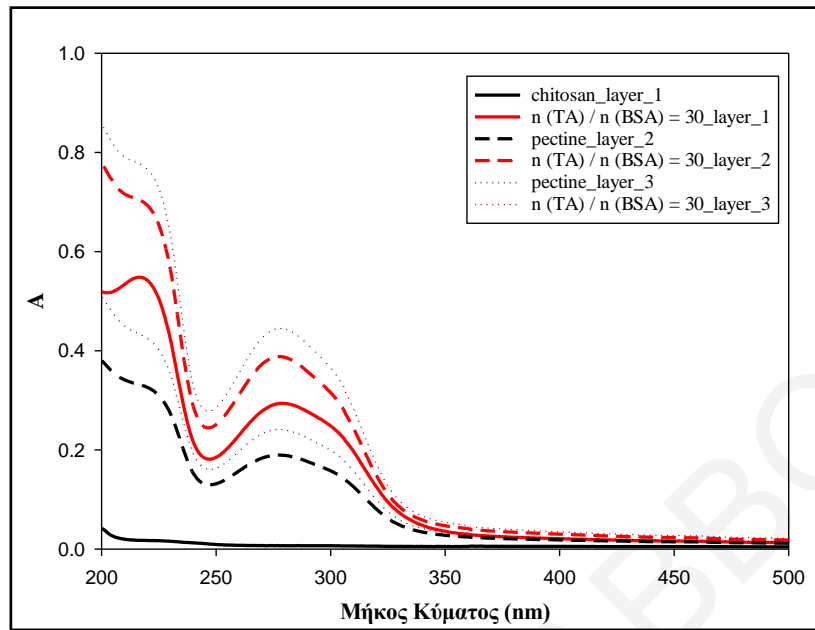
Π.1.2.1: Αποτελέσματα πειραμάτων Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία UV-Vis



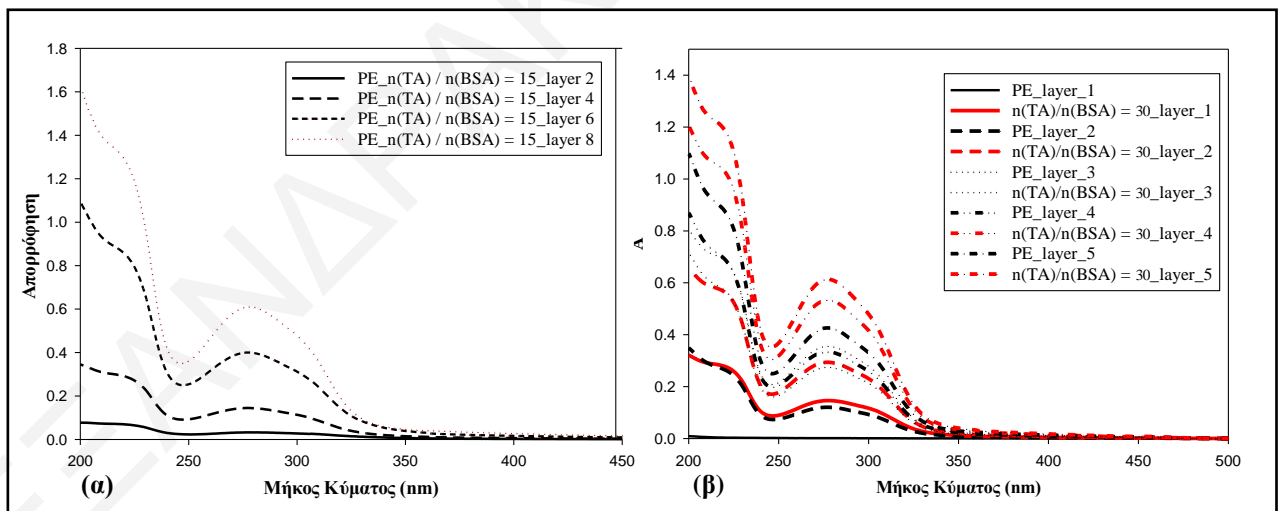
Σχήμα Π.13: (α) Φάσματα UV-Vis για το TA και την BSA και (β) Αποσυνέλιξη φάσματος UV- Vis για το TA με την βοήθεια του προγράμματος Origin.



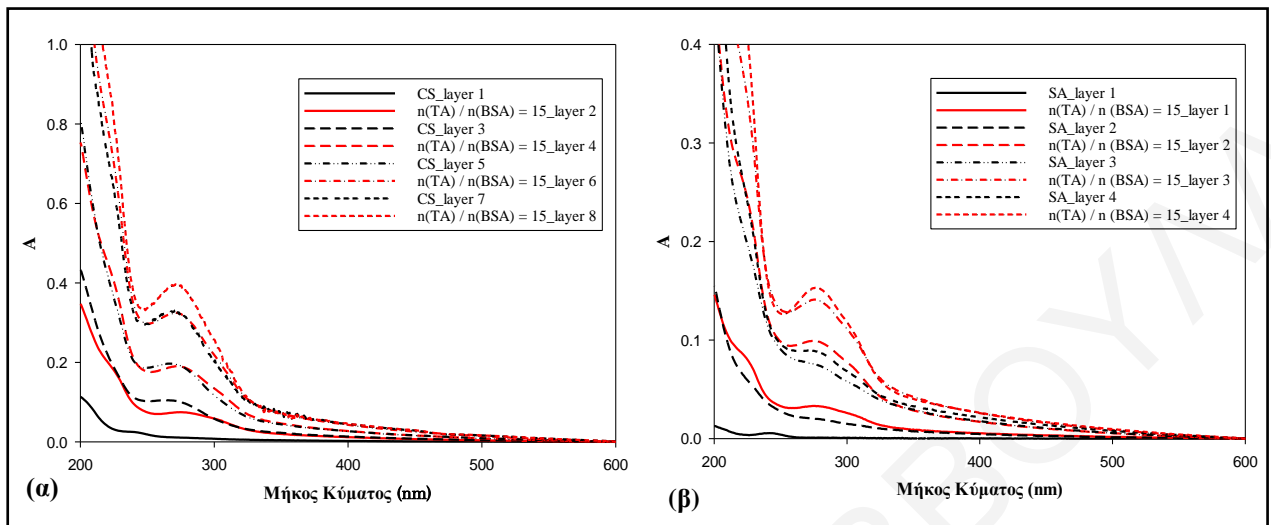
Σχήμα Π.14: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης και μιγμάτων BSA και TA (α) $n(TA) / n(BSA) = 7,5$ και (β) $n(TA) / n(BSA) = 30$ κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.



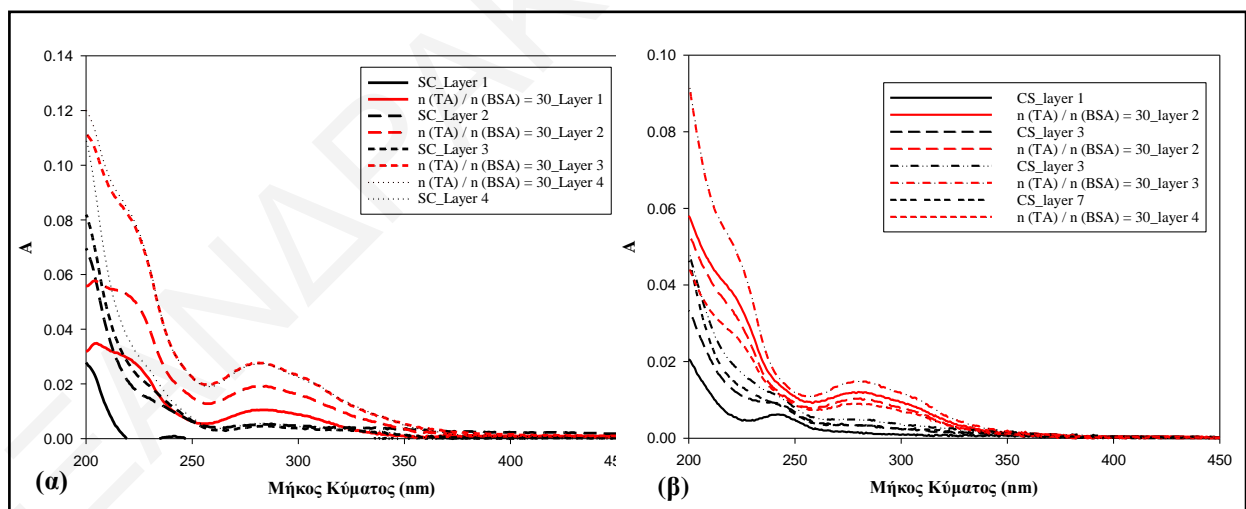
Σχήμα Π.15: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων χιτοζάνης – πηκτίνης και μιγμάτων BSA και TA ($n(TA) / n(BSA) = 30$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.



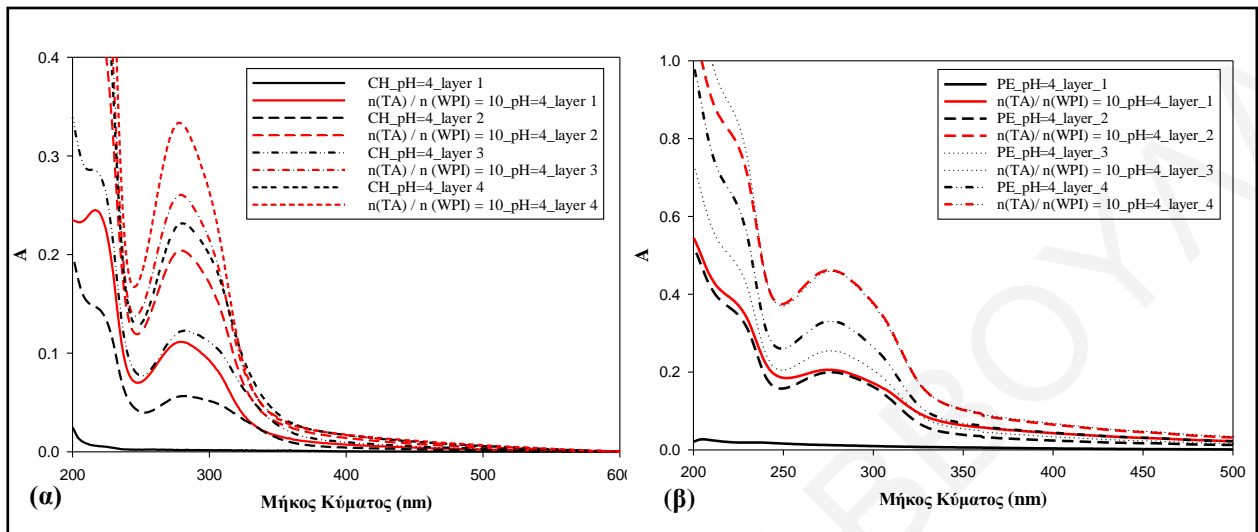
Σχήμα Π.16: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων πηκτίνης και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία (α) ($n(TA) / n(BSA) = 15$) και (β) ($n(TA) / n(BSA) = 30$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.



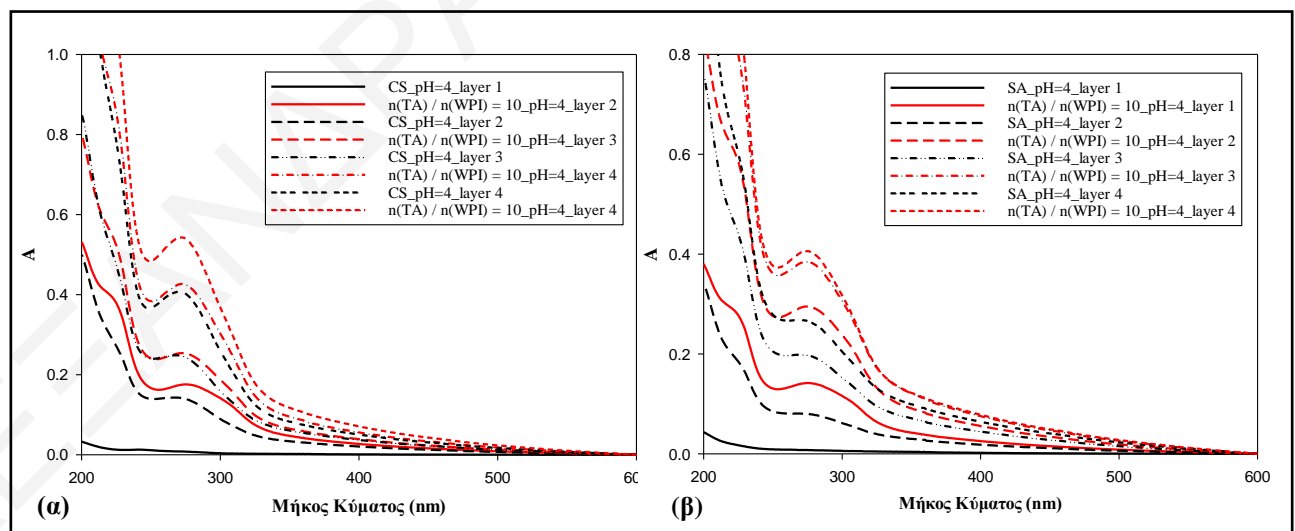
Σχήμα Π.17: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) θεικής χονδροϊτίνης και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ και (β) αλγινικού νατρίου και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.



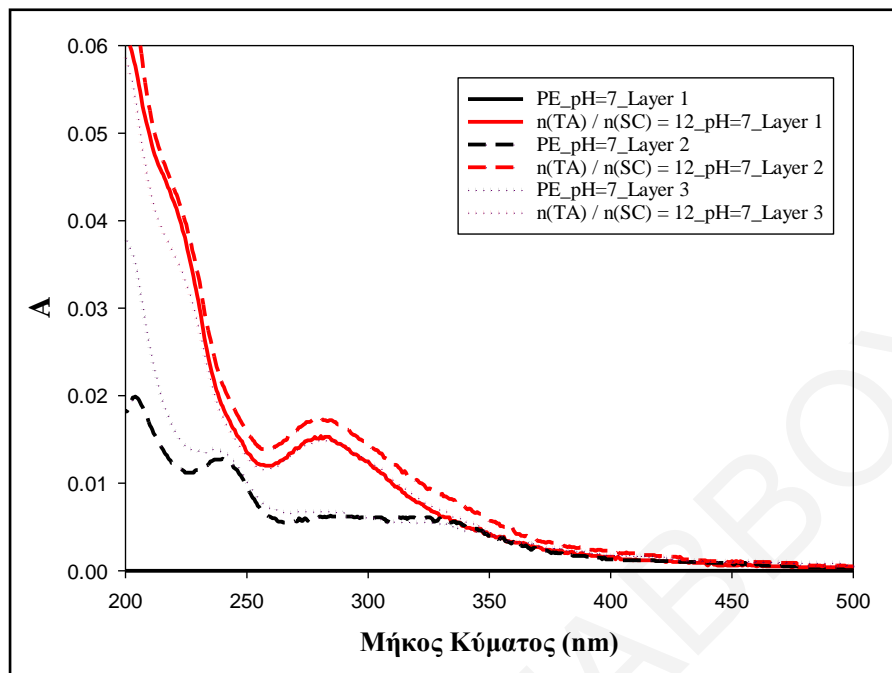
Σχήμα Π.18: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) καζεϊνικού νατρίου και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 30$ και (β) θεικής χονδροϊτίνης και μιγμάτων BSA και TA σε αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 30$ κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 7.



Σχήμα Π.19: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) χιτοζάνης και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία ($n(TA) / n(WPI) = 10$) και (β) πηκτίνης και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία ($n(TA) / n(WPI) = 10$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 7.

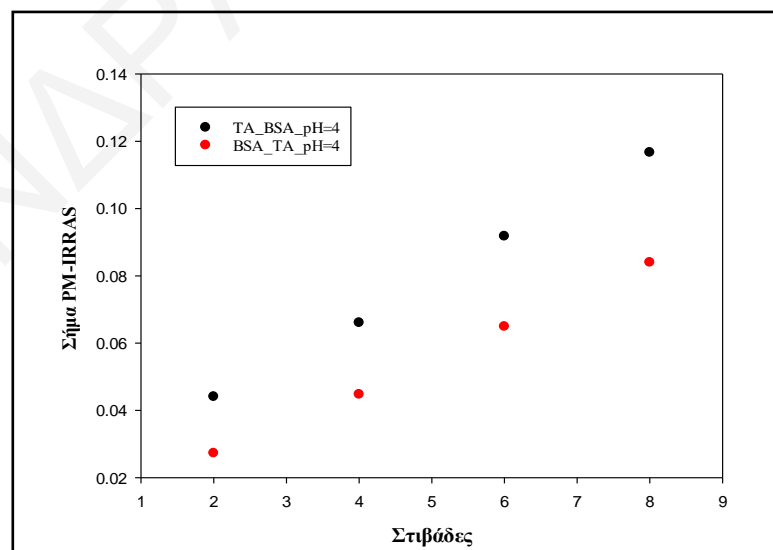


Σχήμα Π.20: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων (α) θεϊκής χονδροϊτίνης και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία ($n(TA) / n(WPI) = 10$) και (β) αλγινικού νατρίου και μιγμάτων WPI και TA σε αναλογία ($n(TA) / n(WPI) = 10$) κατά την δημιουργία πολυστρωματικού υμενίου σε pH 4.

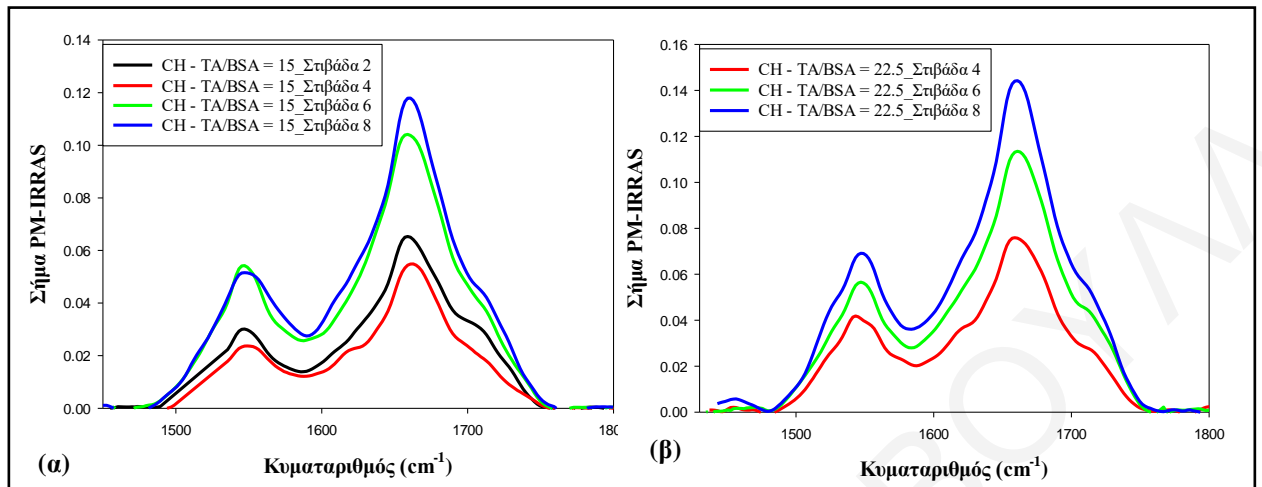


Σχήμα Π.21: Φάσματα UV-Vis εναλλασσόμενων στρωμάτων πηκτίνης και μγγμάτων SC και TA σε αναλογία $(n(TA) / n(SC) = 12)$ σε pH 7.

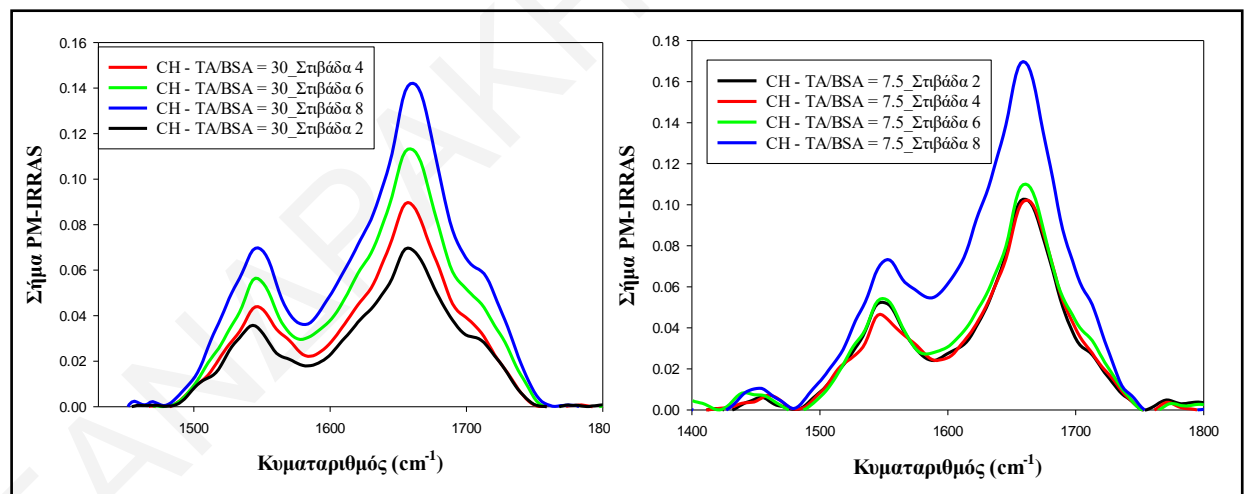
Π.1.2.2: Πειράματα Layer-by-Layer και διερεύνηση με φασματοσκοπία ανάκλαση απορρόφηση υπερύθρου (PM-IRRAS)



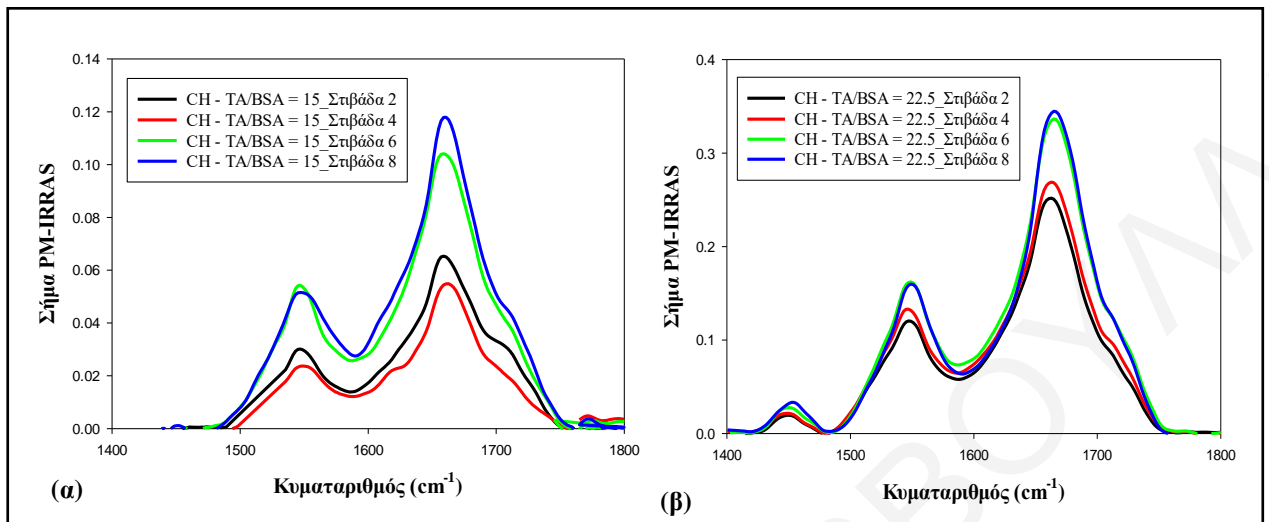
Σχήμα Π.22: Μελέτη της σειράς εναπόθεσης των στρωμάτων και μέτρηση σήματος PM-IRRAS κάθε άρτιου στρώματος χρησιμοποιώντας ως περιττό στρώμα TA και ως άρτιο τη BSA (μαύροι κύκλοι) και αντίστροφα (κόκκινοι κύκλοι).



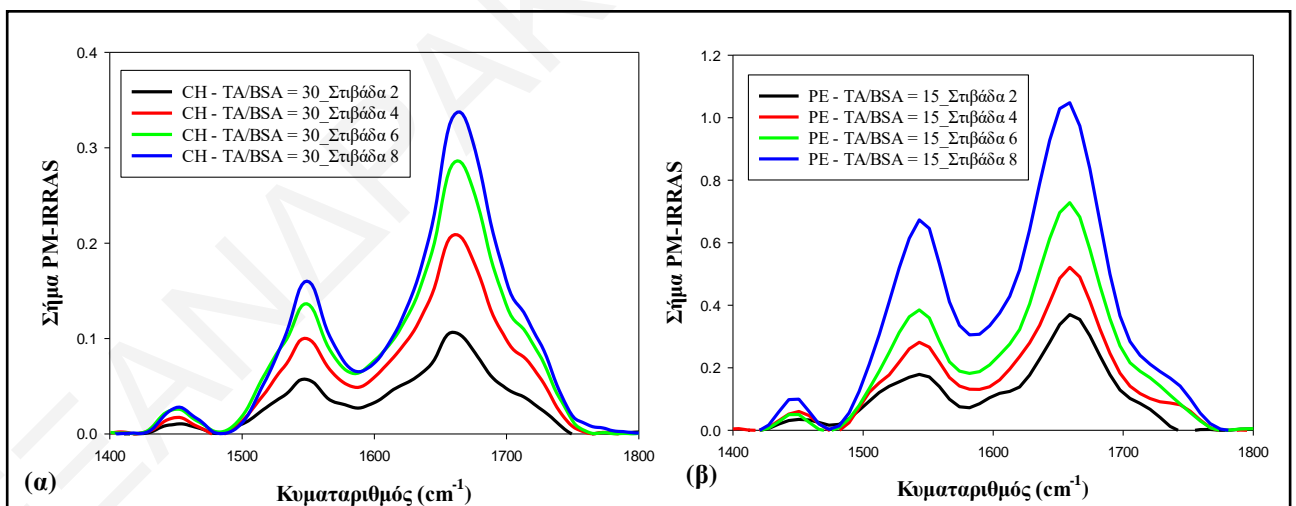
Σχήμα Π.23: Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα (α) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ και (β) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 22.5$, σε pH = 4 χωρίς ανάδευση.



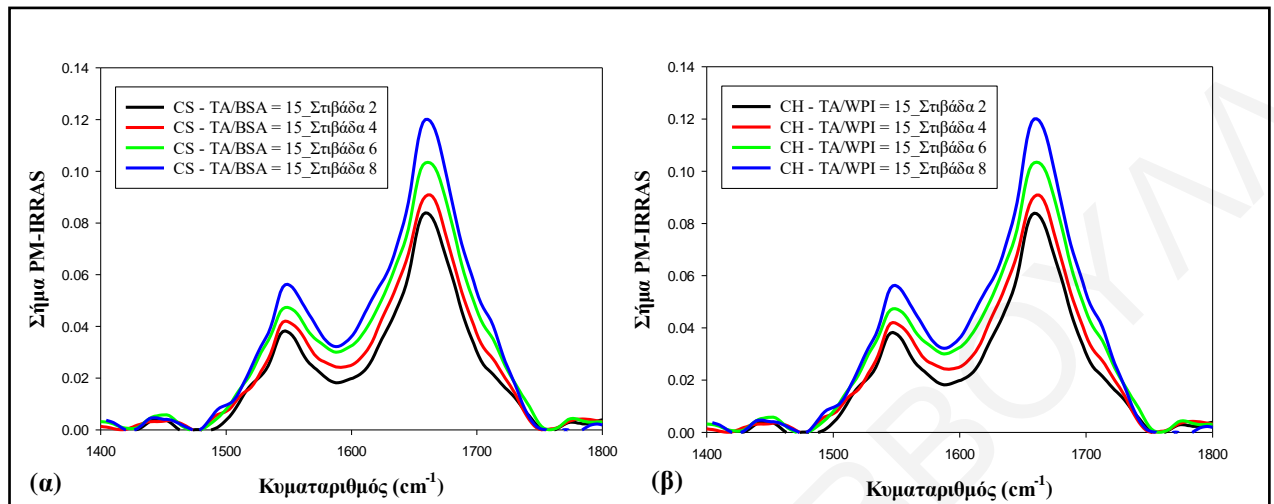
Σχήμα Π.24: Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα (α) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 30$ χωρίς ανάδευση και (β) για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 7.5$ σε pH = 4 με ανάδευση.



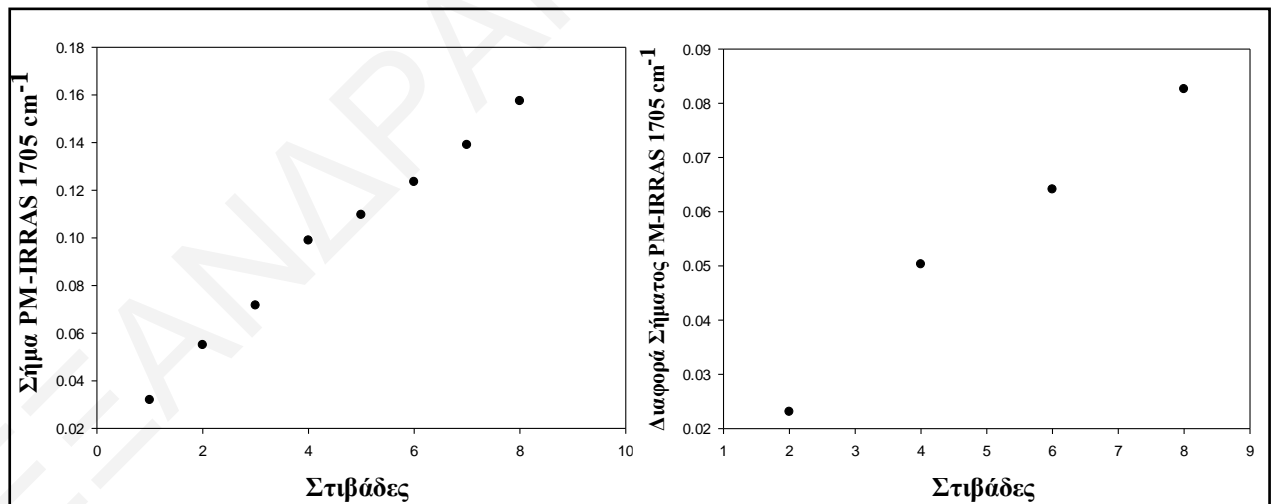
Σχήμα Π.25: Φάσματα PM-IRRAS για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα (α) για γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$ και (β) για γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 22.5$, σε pH = 4 με ανάδευση.



Σχήμα Π.26: Φάσματα PM-IRRAS για (α) το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 30$ και (β) το σύστημα πηκτίνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(\text{TA}) / n(\text{BSA}) = 15$ σε pH = 4.



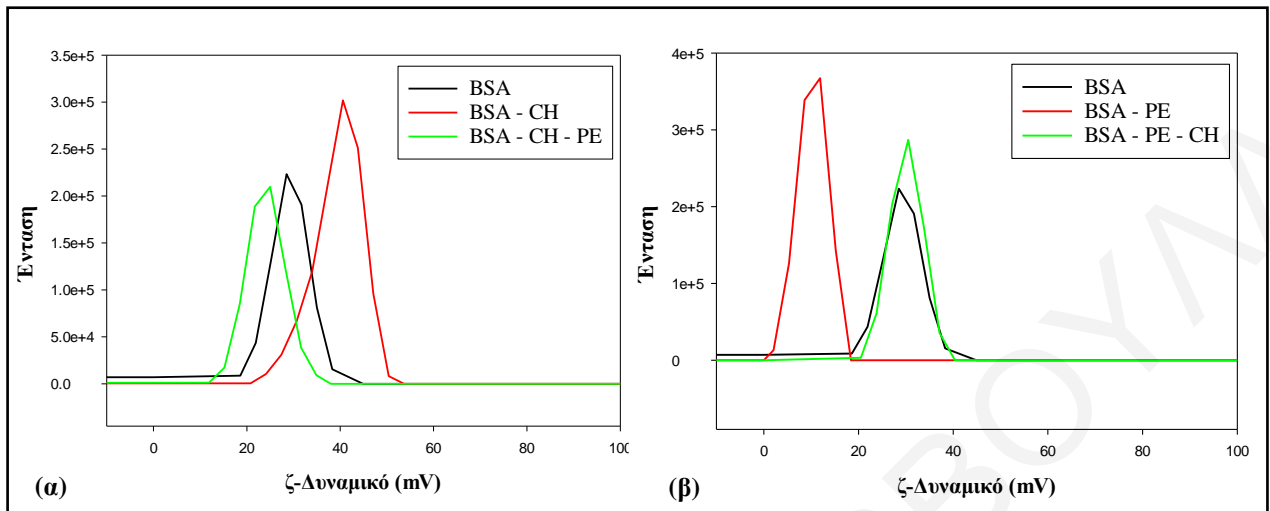
Σχήμα Π.27: Φάσματα PM-IRRAS (α) για το σύστημα θεϊκής χονδροϊτίνης στην περιττή στιβάδα και TA / BSA στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ και (β) για το σύστημα χιτοζάνης στην περιττή στιβάδα και TA / WPI στην άρτια στιβάδα για γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(WPI) = 15$ σε pH = 4.



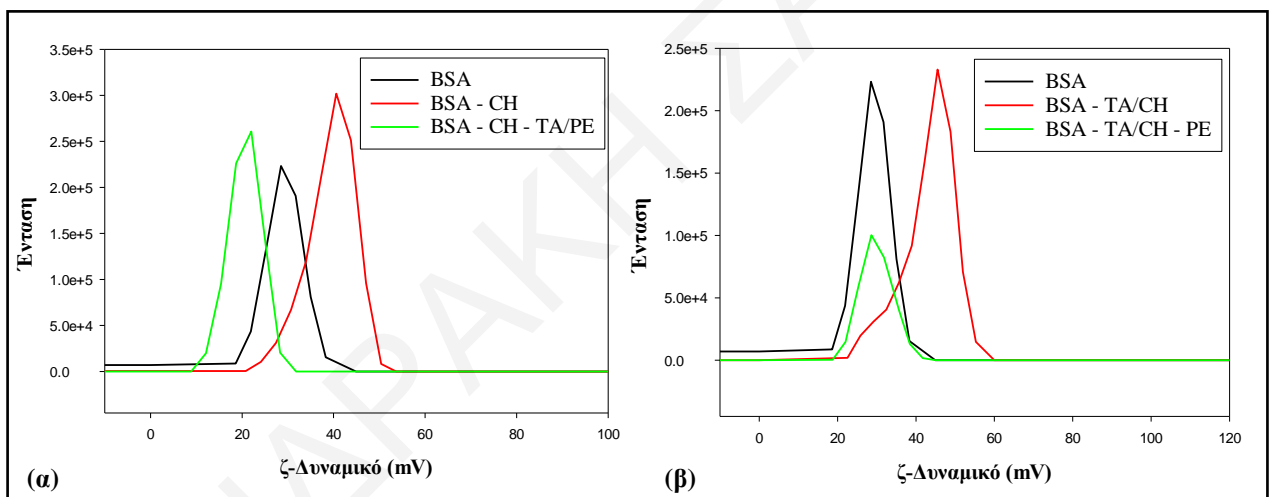
Σχήμα Π.28: Εναποτιθέμενη ποσότητα TA / BSA για τις άρτιες στιβάδες πολυστρωματικών υμενίων με τη μέθοδο LbL έχοντας ως περιττό στρώμα πηκτίνη με γραμμομοριακή αναλογία $n(TA) / n(BSA) = 15$ σε pH 4.

Π.1.3 ΤΡΙΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

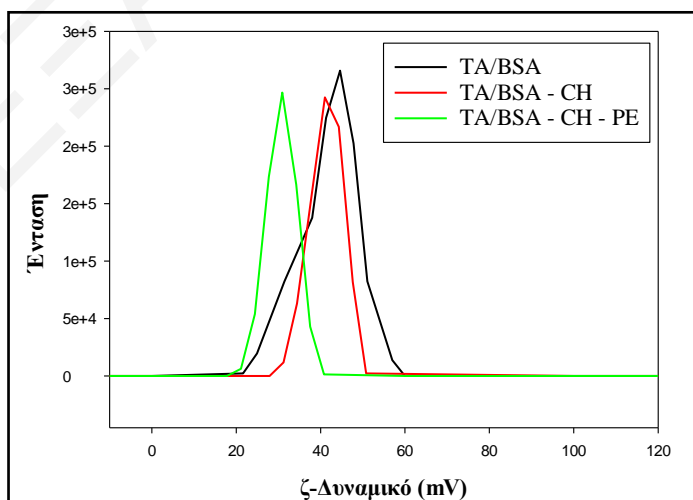
Π.1.3.1 Μετρήσεις ζήτα - δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων



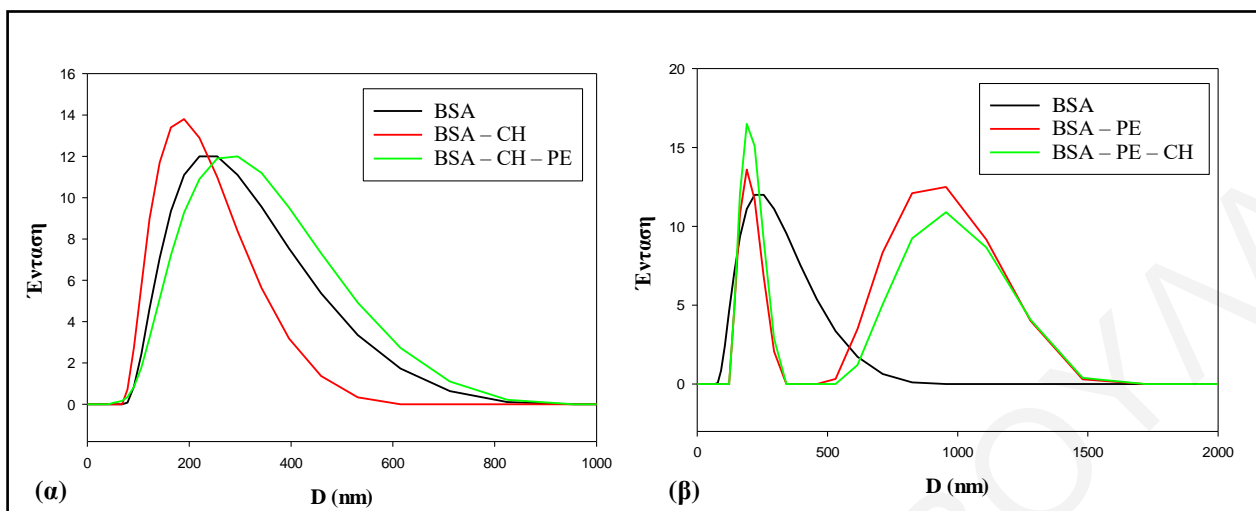
Σχήμα Π.29: Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα (α) BSA – CH – PE και (β) BSA – PE – CH.



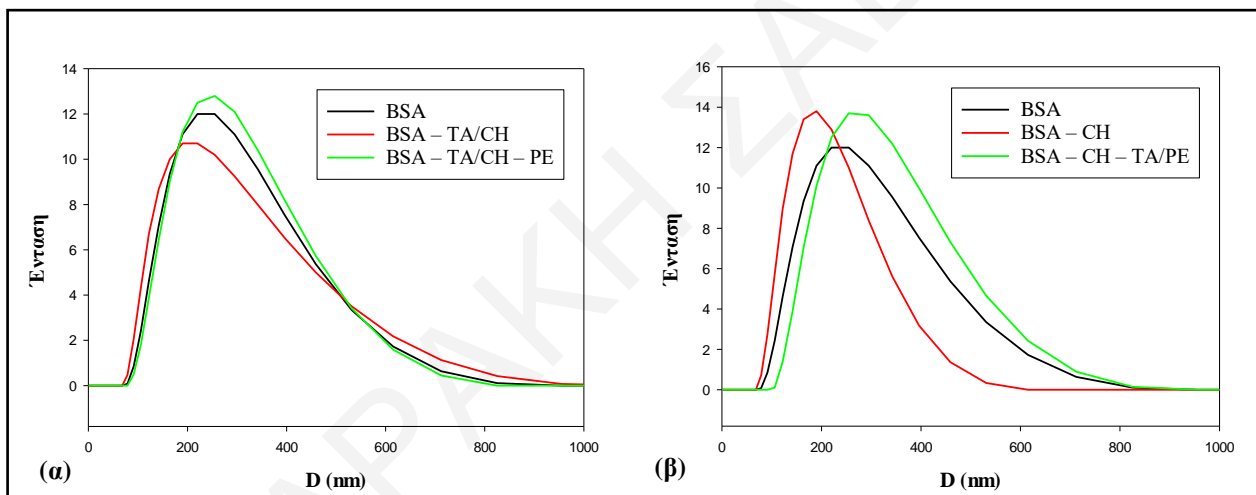
Σχήμα Π.30: Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα (α) BSA – CH – TA/PE και (β) BSA – TA/CH – PE.



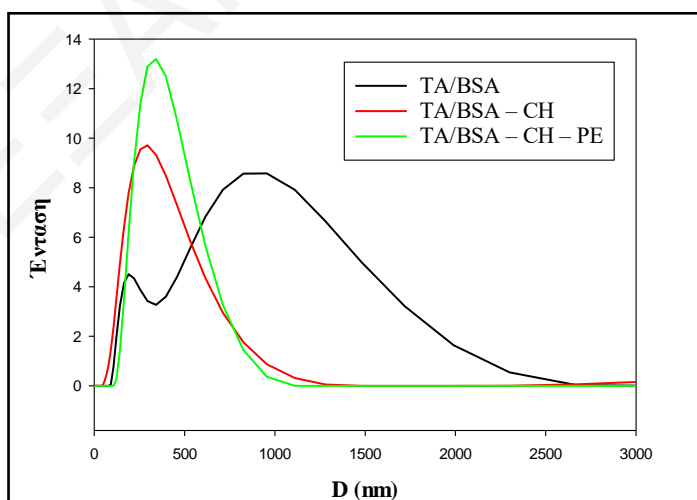
Σχήμα Π.31: Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα TA/BSA – CH – PE.



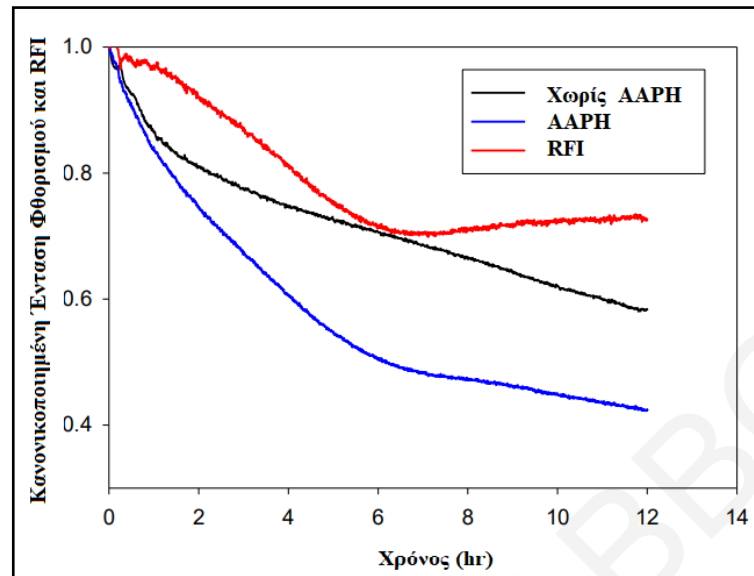
Σχήμα Π.32: Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα (α) BSA – CH – PE και (β) BSA – PE – CH.



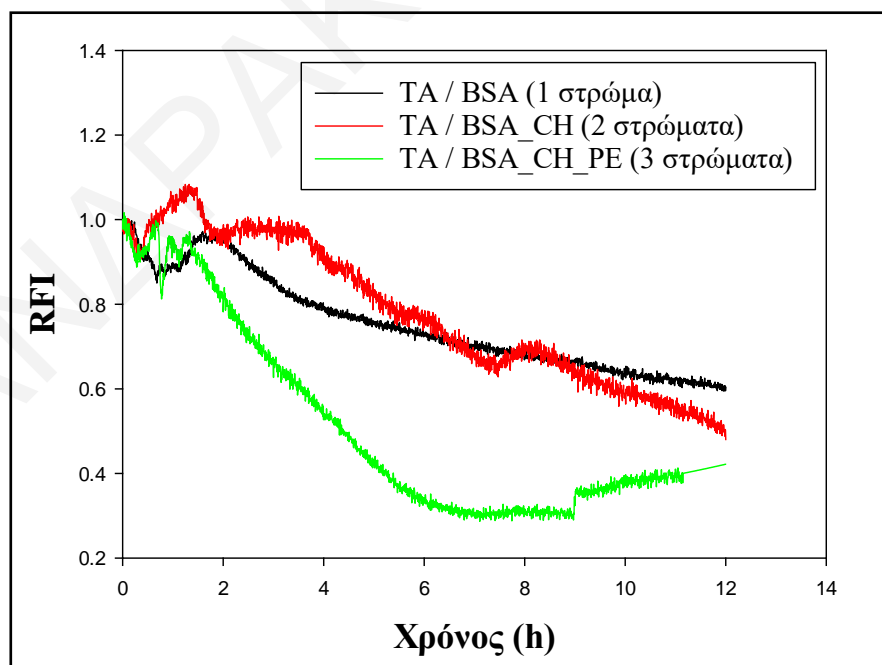
Σχήμα Π.33: Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα (α) BSA – TA/CH – PE και (β) BSA – CH – TA/PE.



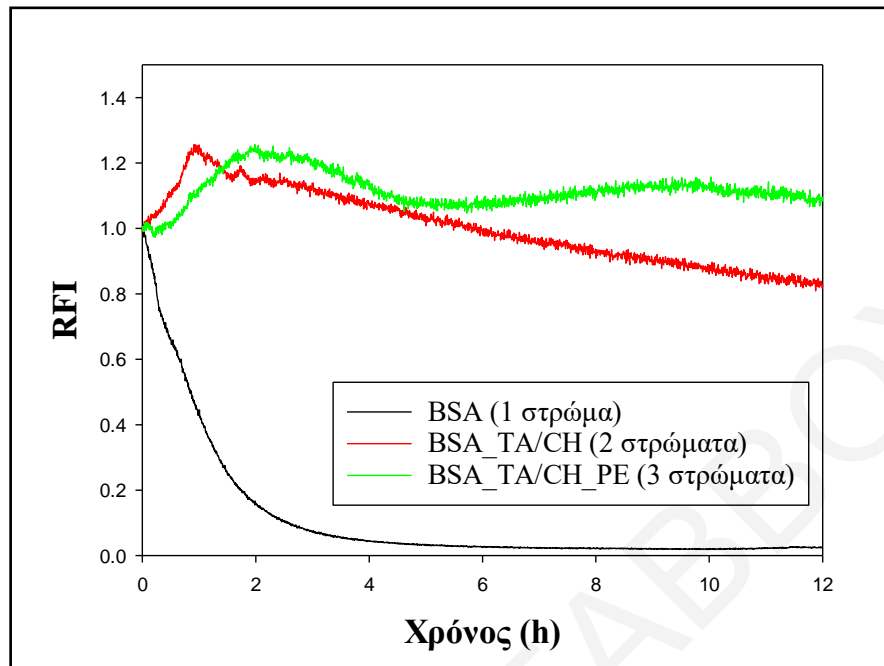
Σχήμα Π.34: Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα TA/BSA – CH – PE.



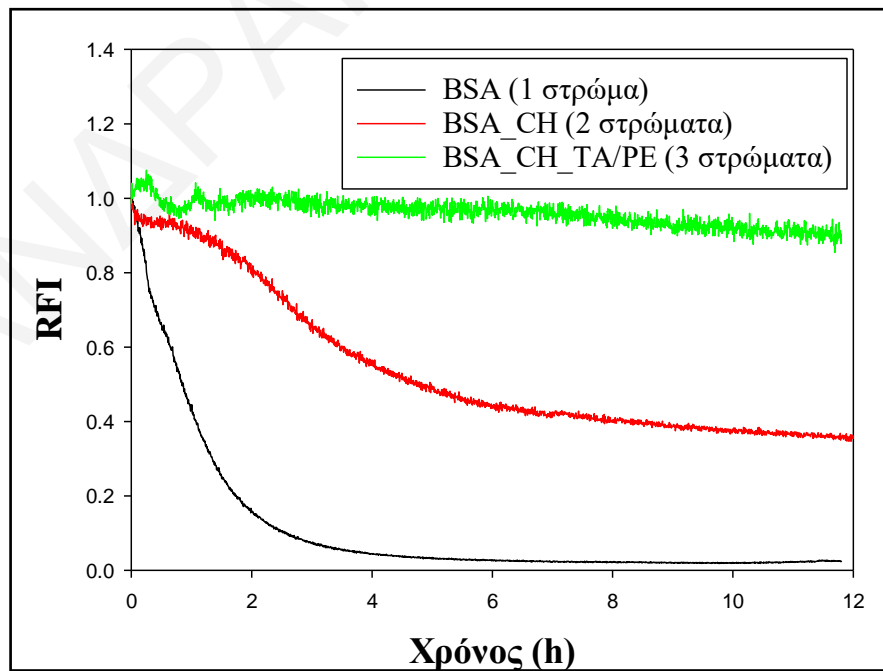
Σχήμα Π.35: Εξέταση της χρονικής διάσπασης φθορισμού της χρωστικής Nile Red διαλυτοποιημένη στη λιπιδική φάση, παρουσία και απουσία του εκκίνητη ριζών AAPH. Το RFI είναι ο λόγος από τις δύο άλλες καμπύλες.



Σχήμα Π.36: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα TA / BSA_CH_PE.



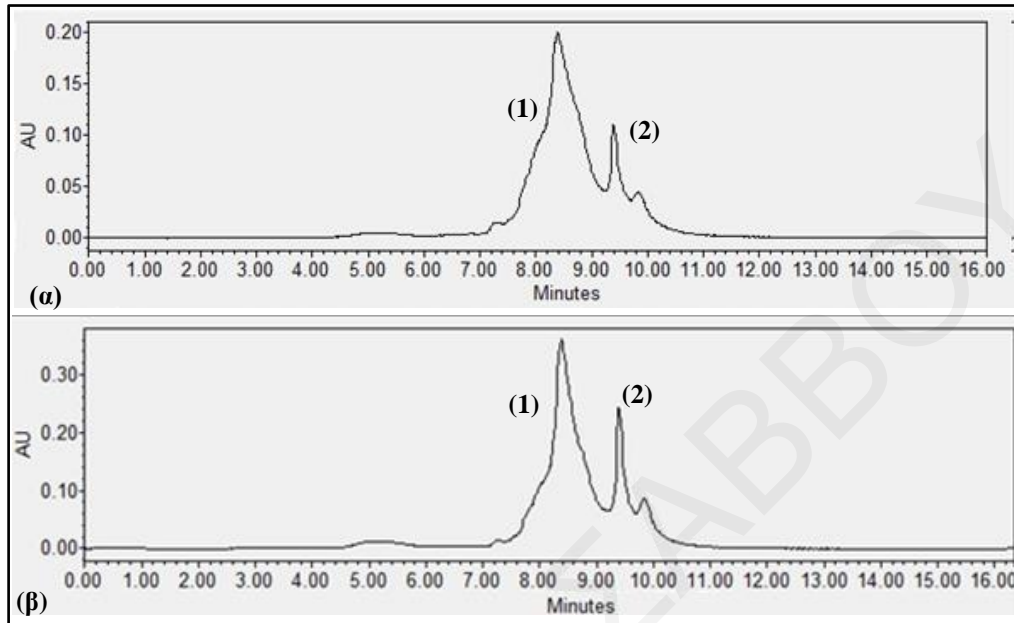
Σχήμα Π.37: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA_TA / CH_PE.



Σχήμα Π.38: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA_CH_TA / PE.

Π.2 Σχεδιασμός πολυστρωματικών γαλακτωμάτων με βηταλαΐνες: Η κολλοειδής προσέγγιση

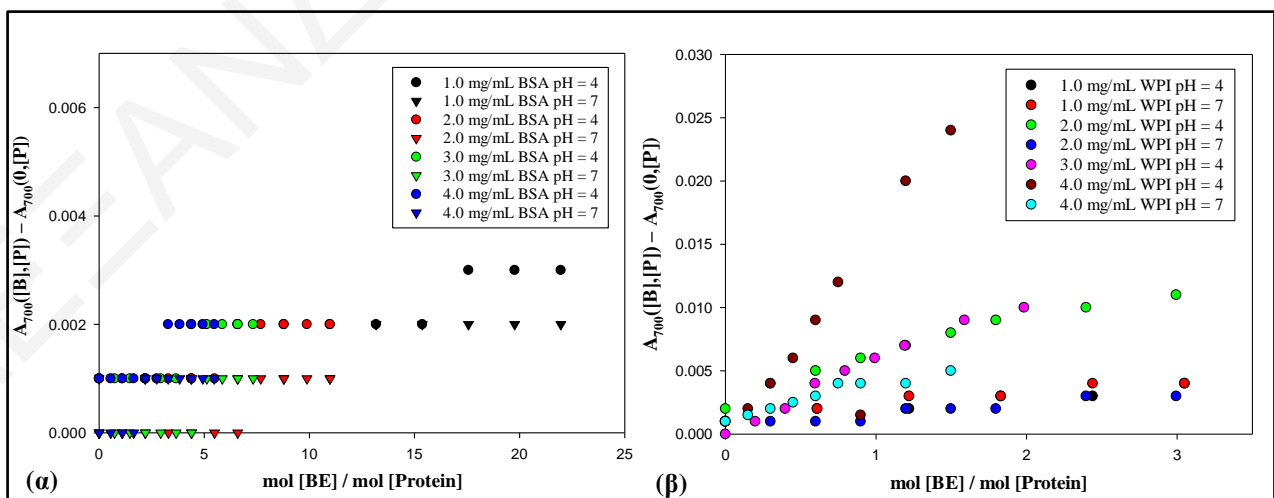
Π.2.1: Αποτελέσματα απομόνωσης βηταλαϊνών από κόκκινα τεύτλα



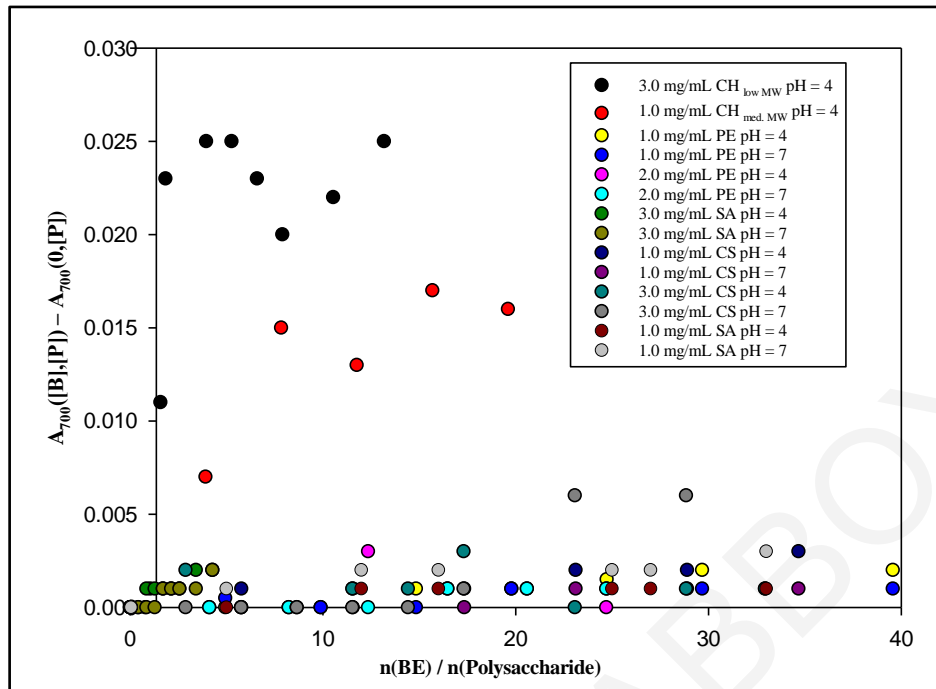
Σχήμα Π.39: Χρωματογράφημα HPLC του εκχυλίσματος βηταλαϊνών μέσω της μεθόδου ATPS, (α) στα 480 nm και (β) στα άνω φάση 538 nm. Η κορυφή (1) αντιστοιχεί στη βουλγαξανθίνης – I και η κορυφή (2) στη βητανίνη.

Π.2.2 ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Π.2.2.1: Αποτελέσματα πειραμάτων θολερότητας

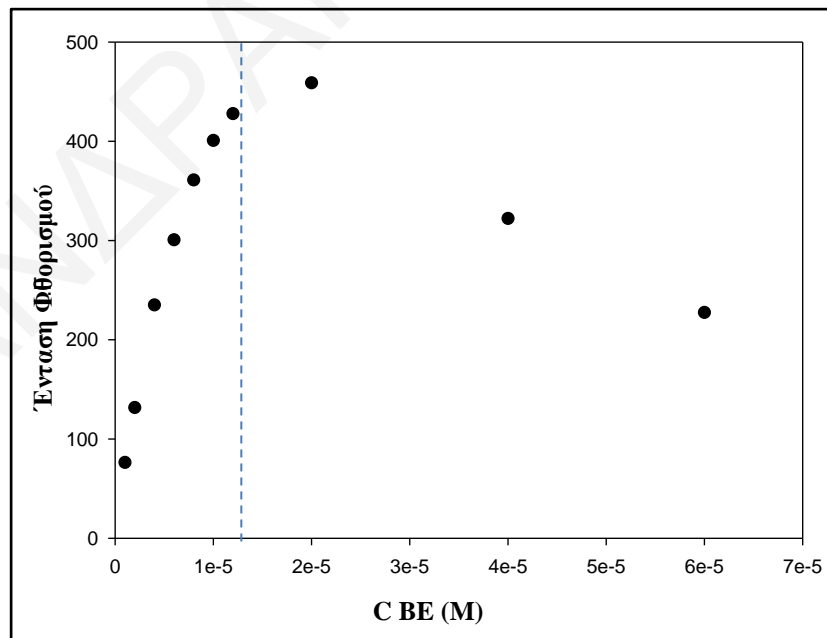


Σχήμα Π.40: Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων (α) BE / BSA και (β) BE / WPI, σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών.

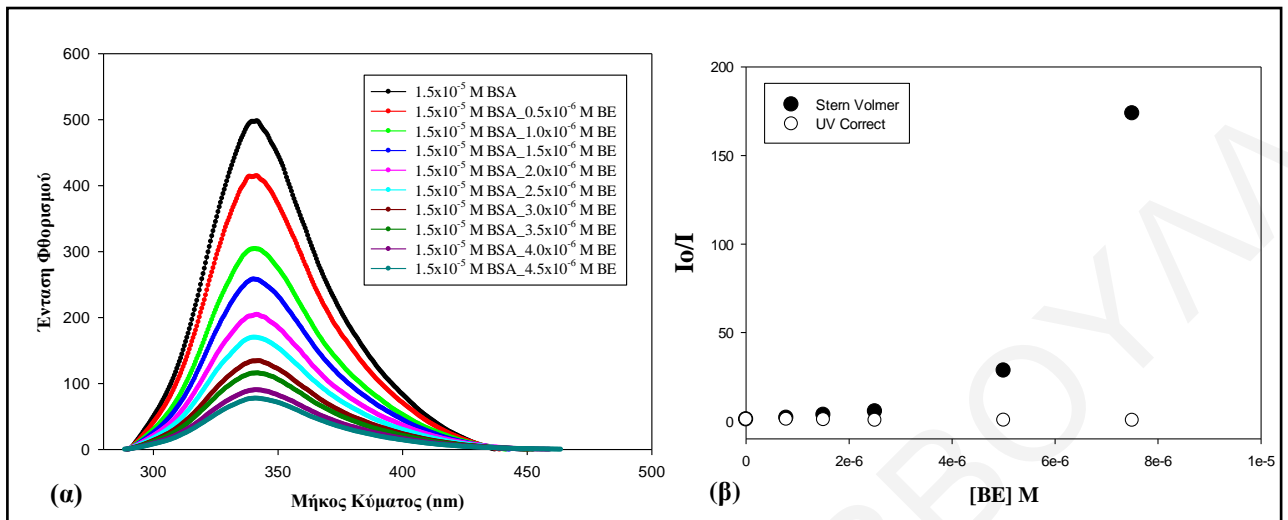


Σχήμα Π.41: Διάγραμμα θολερότητας των διαλυμάτων BE / Πολυσακχαρίτη σε pH = 4 και 7 ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας, για διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις πολυσακχαρίτη.

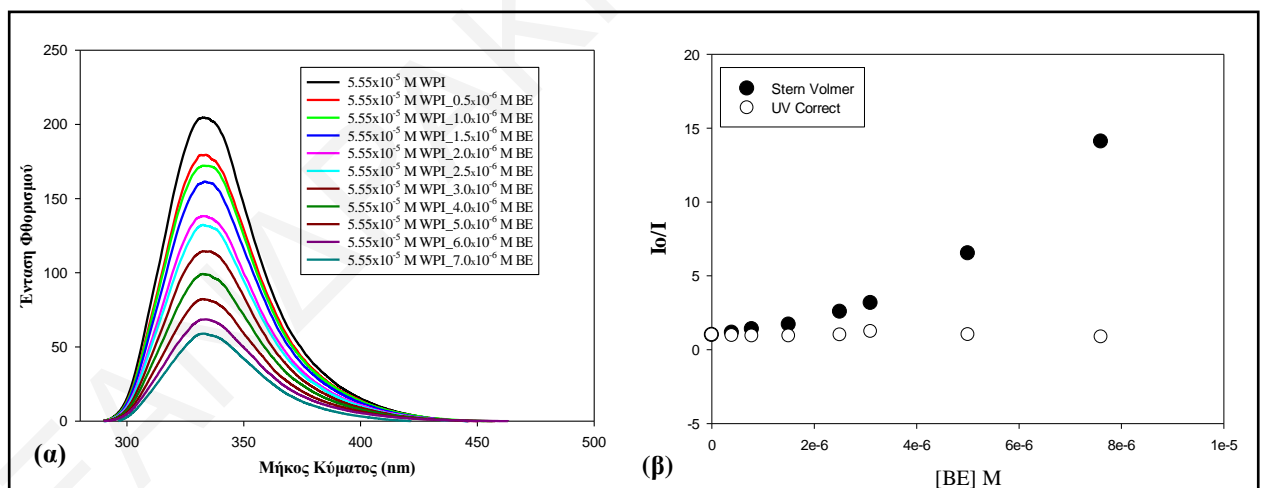
Π.2.2.2: Αποτελέσματα πειραμάτων φθορισμού



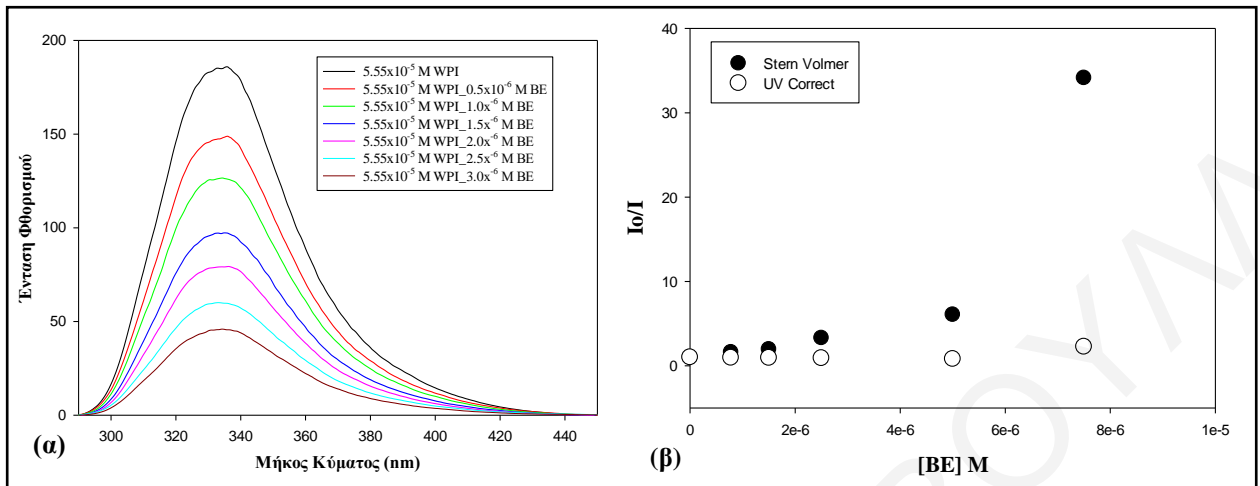
Σχήμα Π.42: Γραφική παράσταση της μέγιστης έντασης φθορισμού έναντι της συγκέντρωσης των βηταλαϊνών.



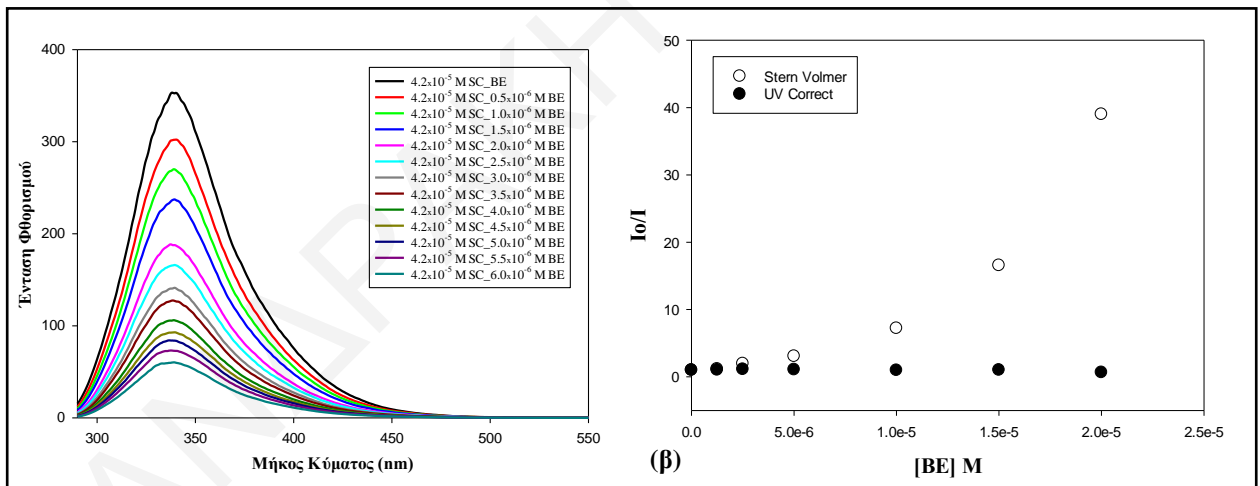
Σχήμα Π.43: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης BSA 1.5×10^{-5} M σε pH 7, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-4.5 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης BSA από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (●) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



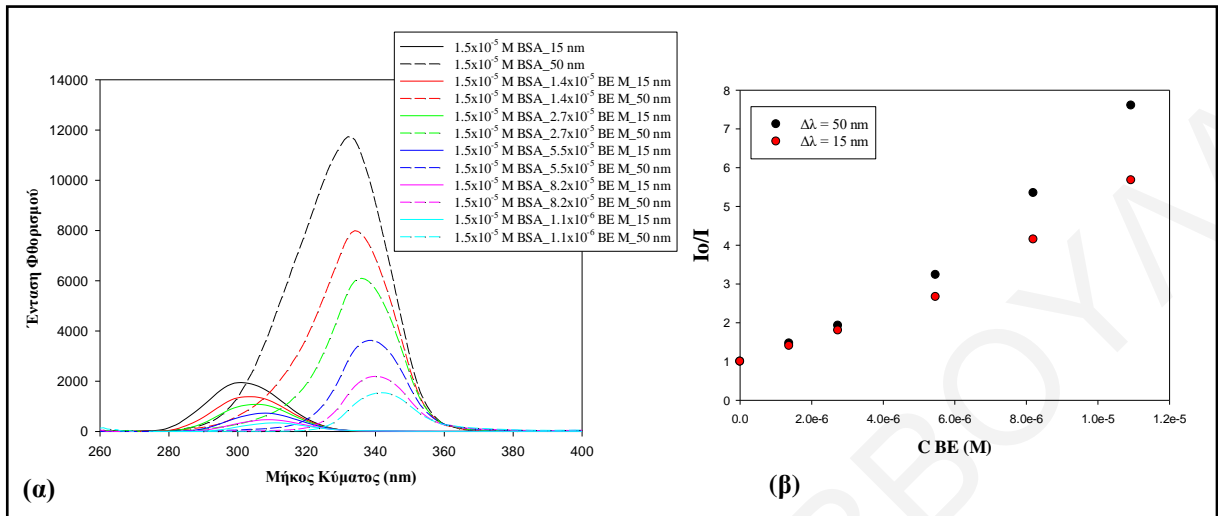
Σχήμα Π.44: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI 5.55×10^{-5} M σε pH 4, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-7.0 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (●) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



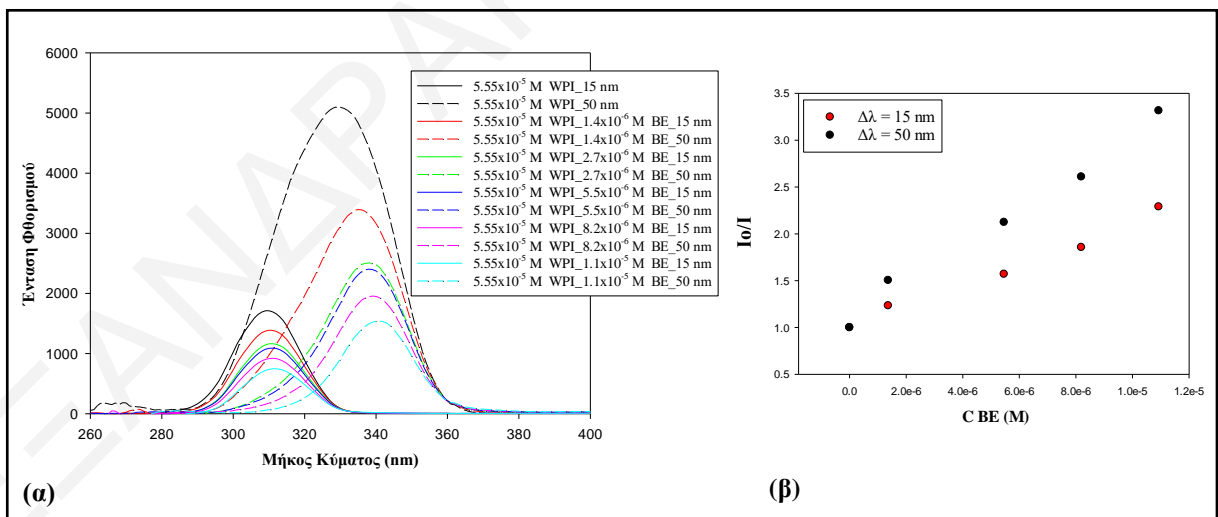
Σχήμα Π.45: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης WPI 5.5×10^{-5} M σε pH 7, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-3.0 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης WPI από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (●) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



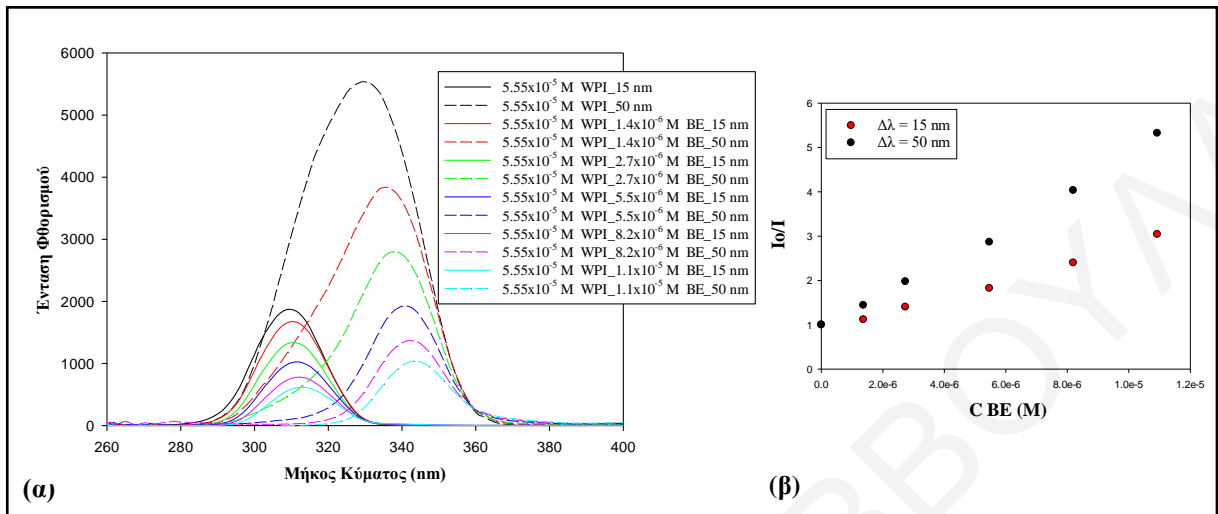
Σχήμα Π.46: (α) Φάσματα φθορισμού της πρωτεΐνης SC 4.2×10^{-5} M σε pH 7, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 280 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-6.0 \times 10^{-6}$ M) και (β) Εφαρμογή της Εξίσωσης Stern-Volmer για την απόσβεση του φθορισμού της πρωτεΐνης SC από μόρια BE. Διορθωμένα (ο) και μη (●) αποτελέσματα για το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



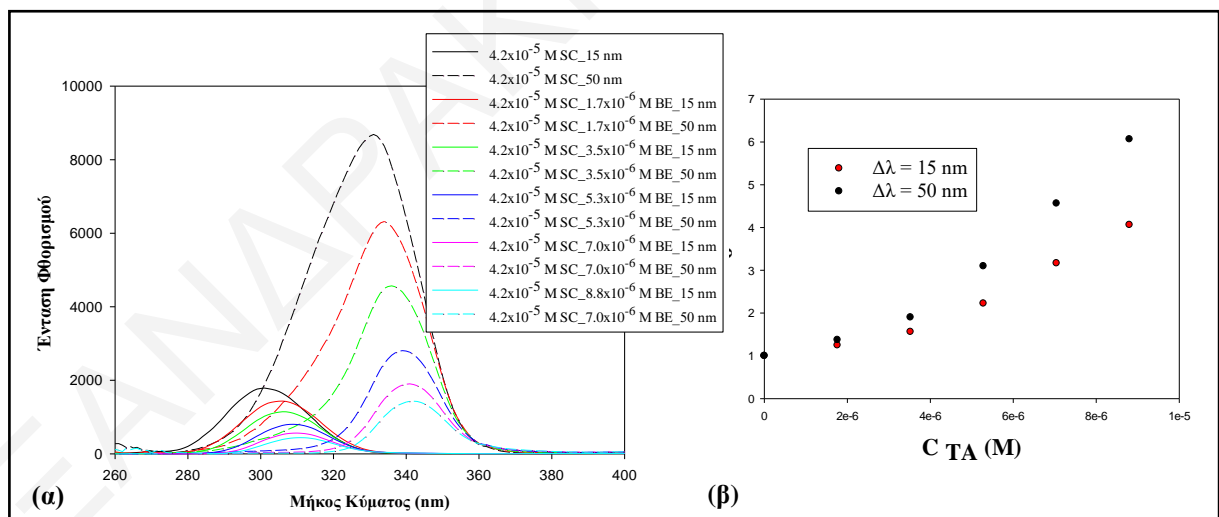
Σχήμα Π.47: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-1.1 \times 10^{-5}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.



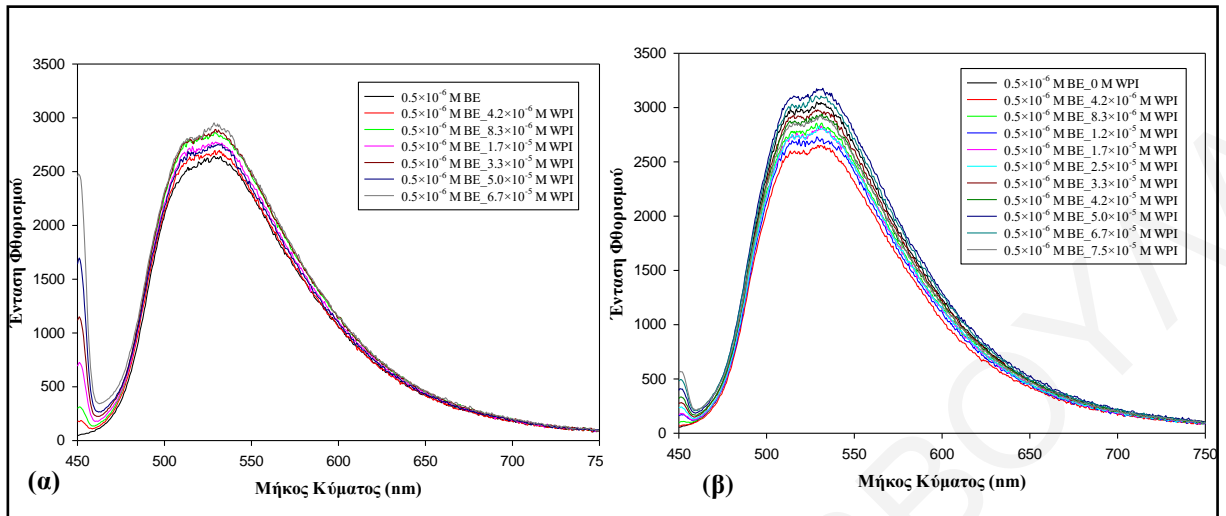
Σχήμα Π.48: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 4 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-1.1 \times 10^{-5}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.



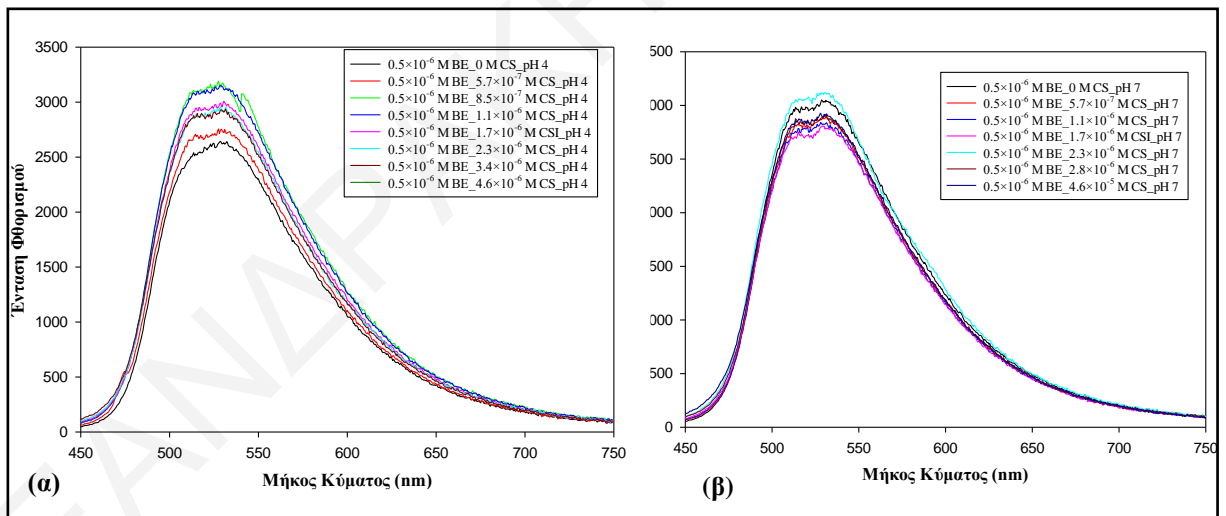
Σχήμα Π.49: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης WPI σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE ($0-1.1 \times 10^{-5}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.



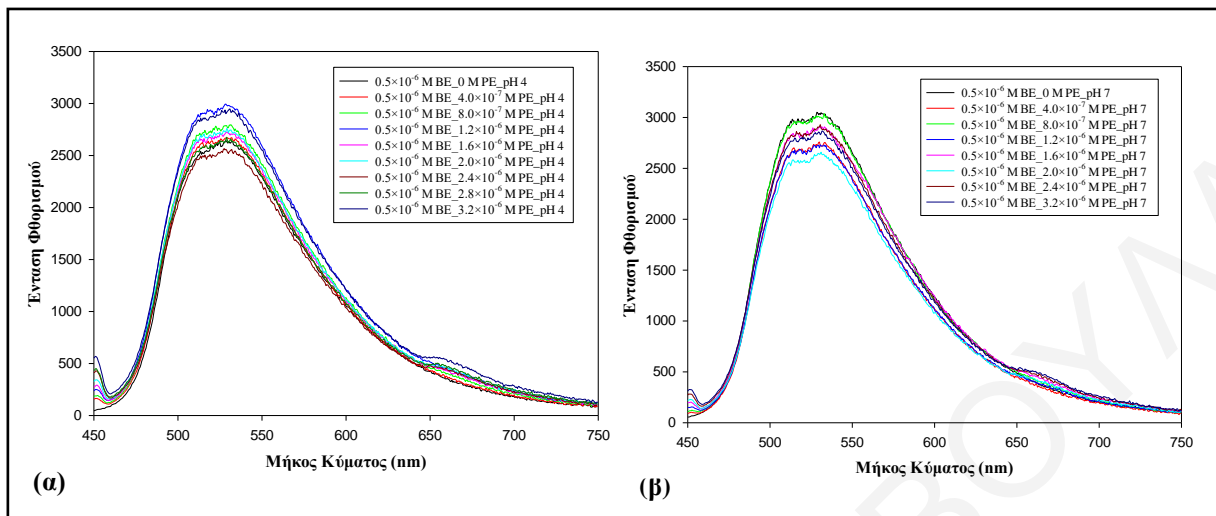
Σχήμα Π.50: (α) Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της πρωτεΐνης SC σε pH 7 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TA ($0-7.0 \times 10^{-6}$ M) για $\Delta\lambda = 15$ nm και 50 nm και (β) γραμμική παλινδρόμηση Stern-Volmer (Εξίσωση 6.1) για την απόσβεση του φθορισμού των ομάδων Tyr και Trp.



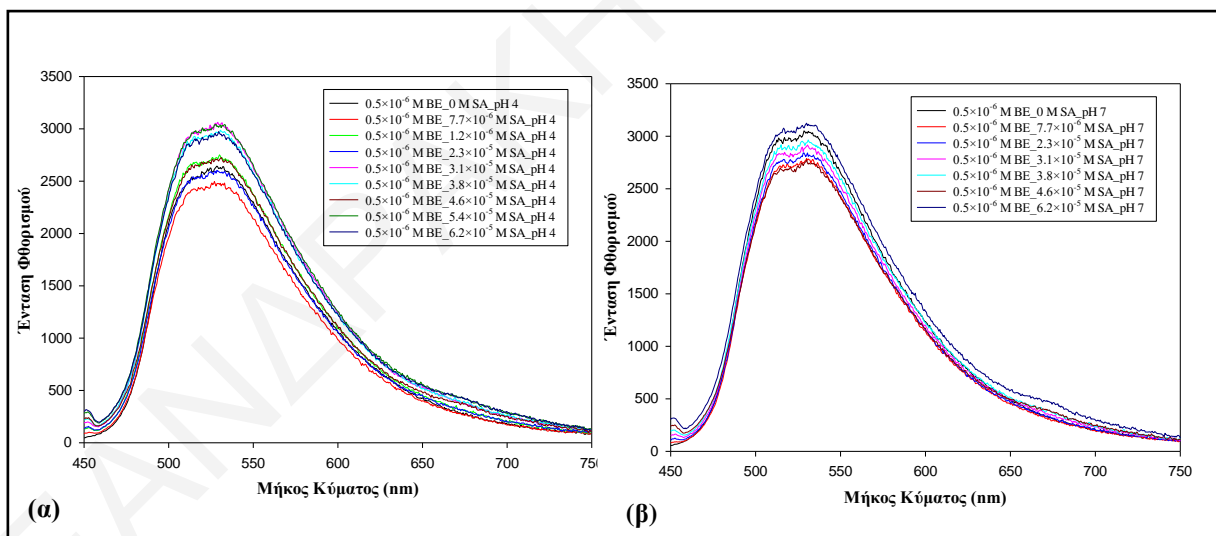
Σχήμα Π.51: Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 440 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης (α) WPI ($0-6.7 \times 10^{-5}$ M) σε pH 4 και (β) WPI ($0-7.5 \times 10^{-5}$ M) σε pH 7.



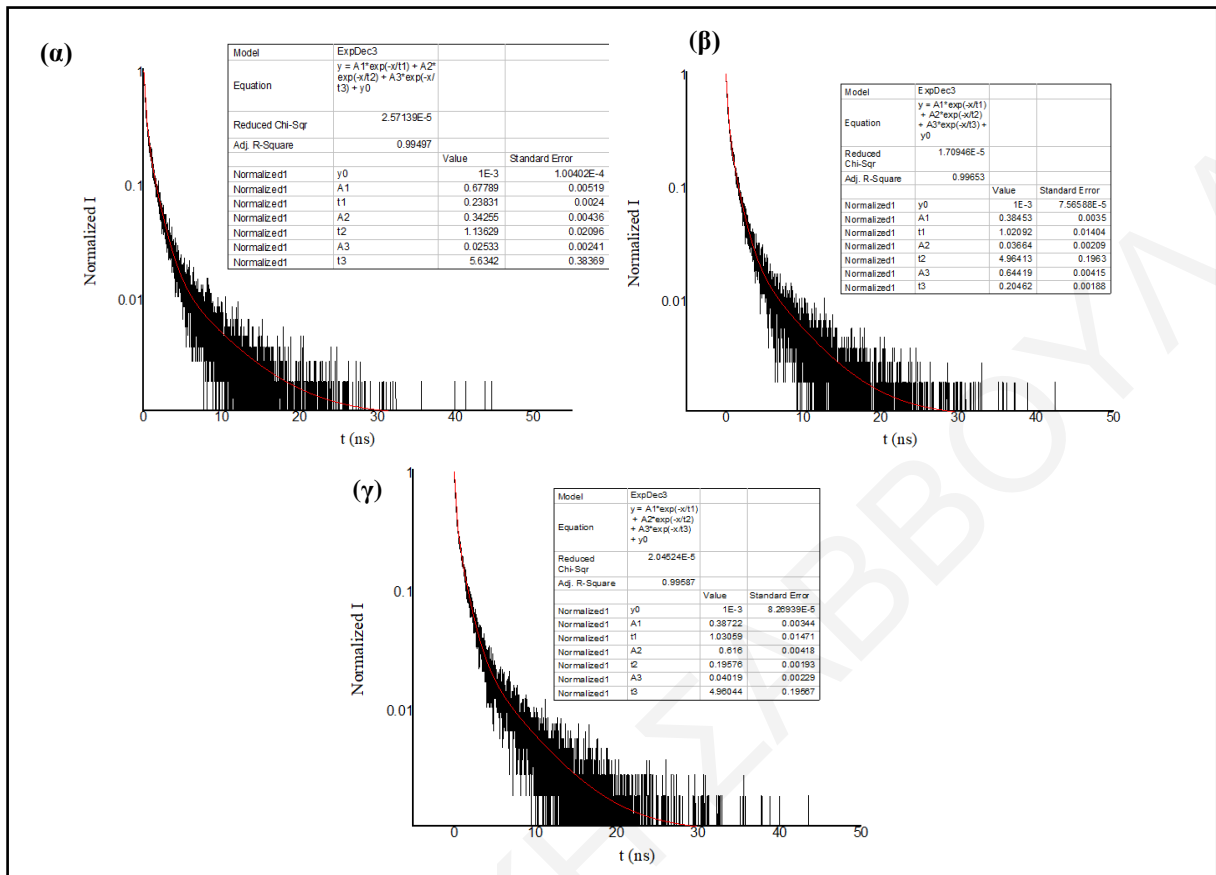
Σχήμα Π.52: Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πολυσακχαριτή CS ($0-4.6 \times 10^{-6}$ M), σε μήκος κύματος διέγερσης στα 440 nm, (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.



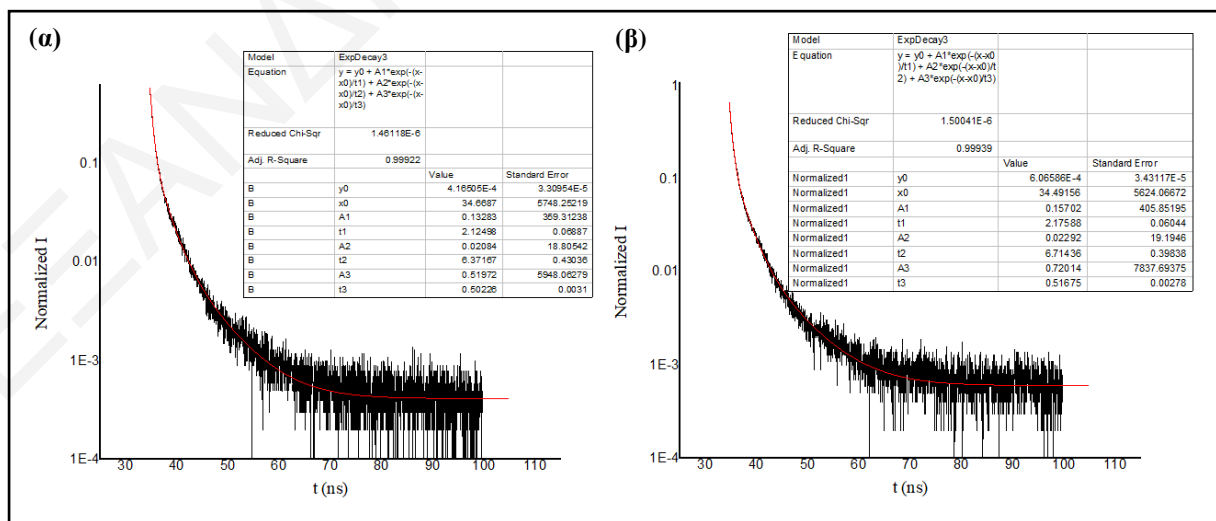
Σχήμα Π.53: Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 440 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πολυσακχαρίτη PE ($0-3.2 \times 10^{-6}$ M) (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.

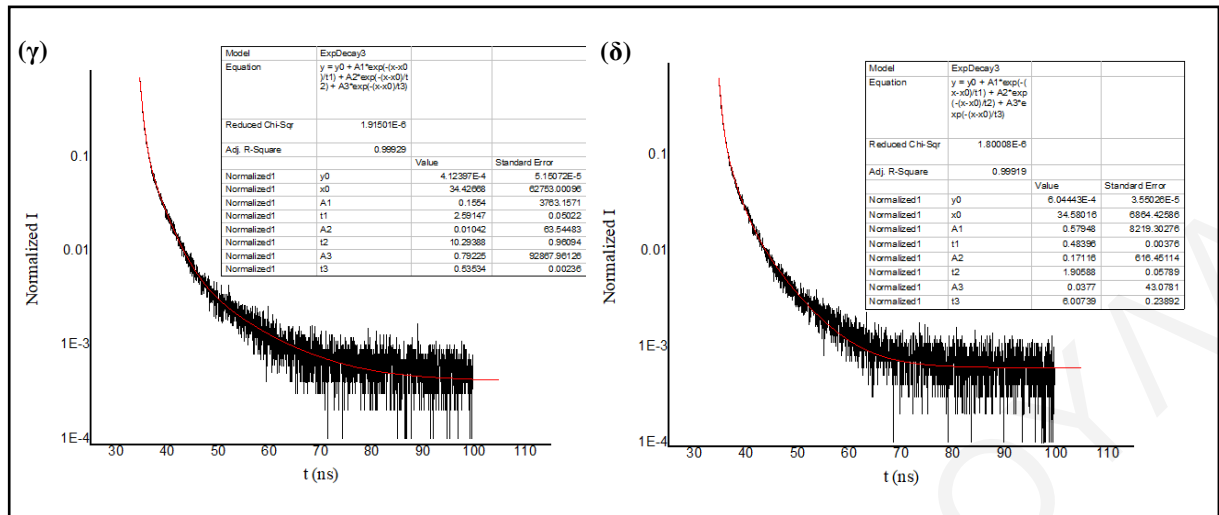


Σχήμα Π.54: Φάσματα φθορισμού της BE 0.5×10^{-6} M, σε μήκος κύματος διέγερσης στα 440 nm, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πολυσακχαρίτη SA ($0-6.2 \times 10^{-5}$ M) (α) σε pH 4 και (β) σε pH 7.

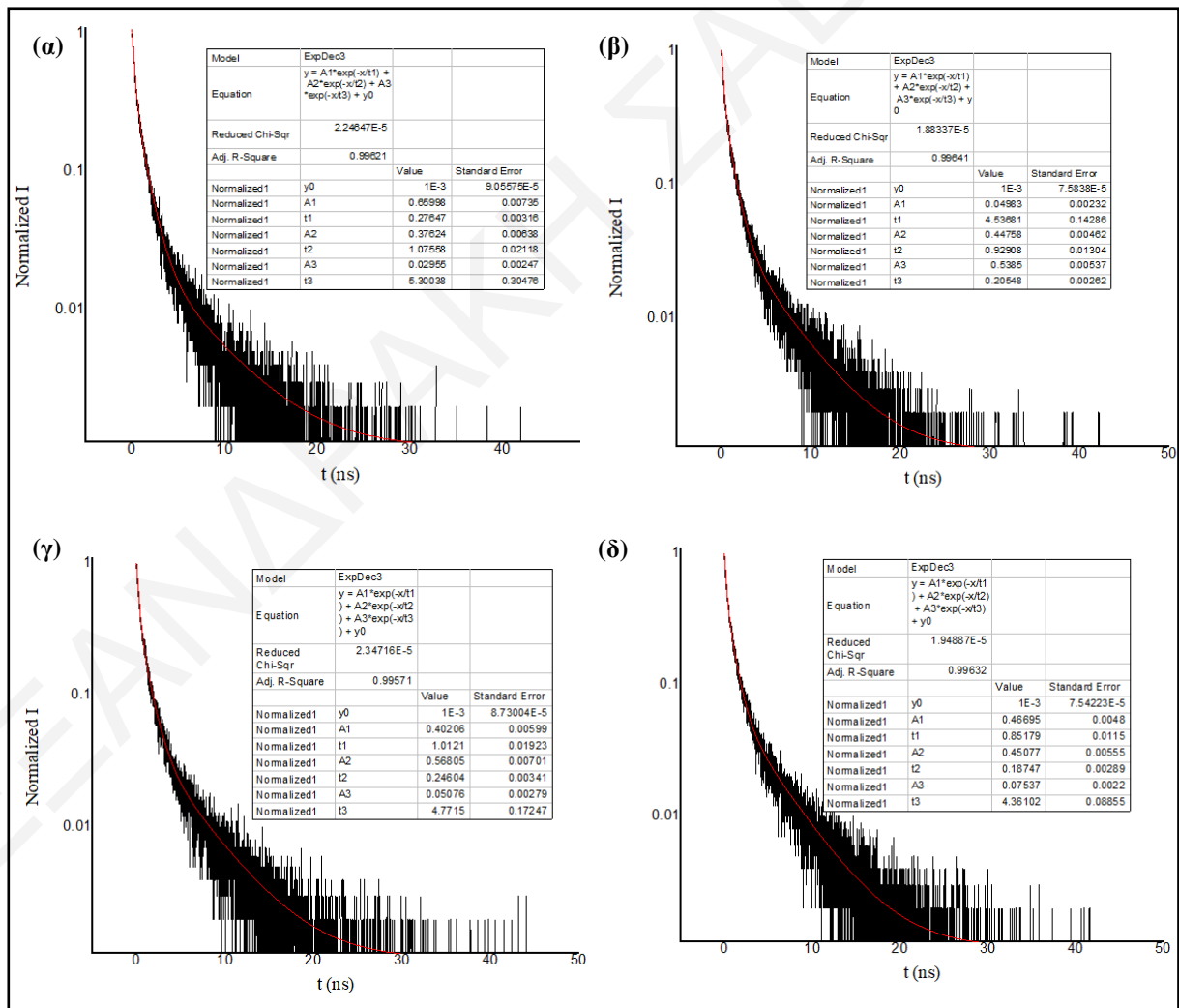


Σχήμα Π.55: Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της BE 2.0×10^{-6} M με διέγερση στα 405 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA (α) 3.0×10^{-6} , (β) 6.0×10^{-6} και (γ) 9.0×10^{-6} M σε pH 4.

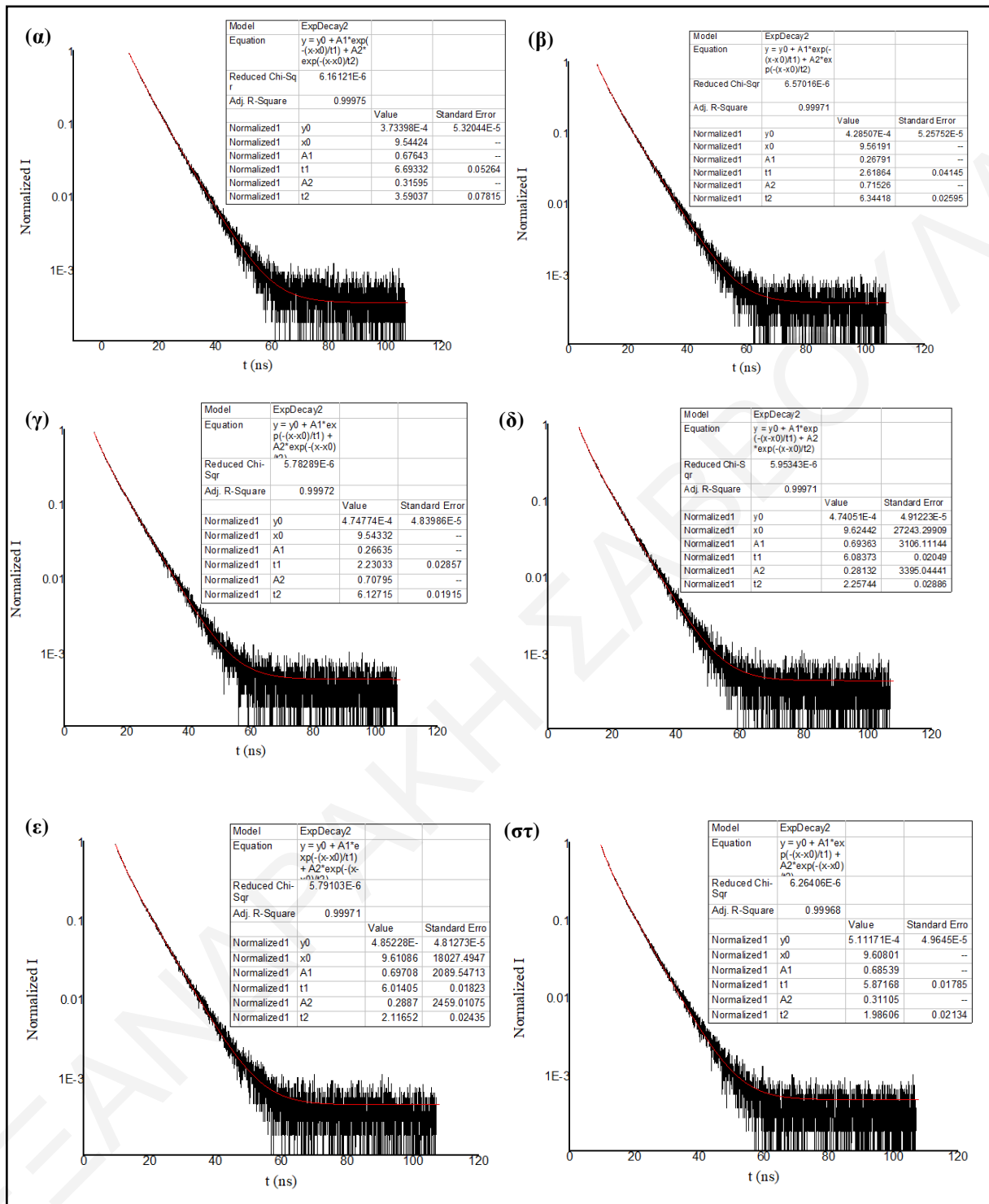




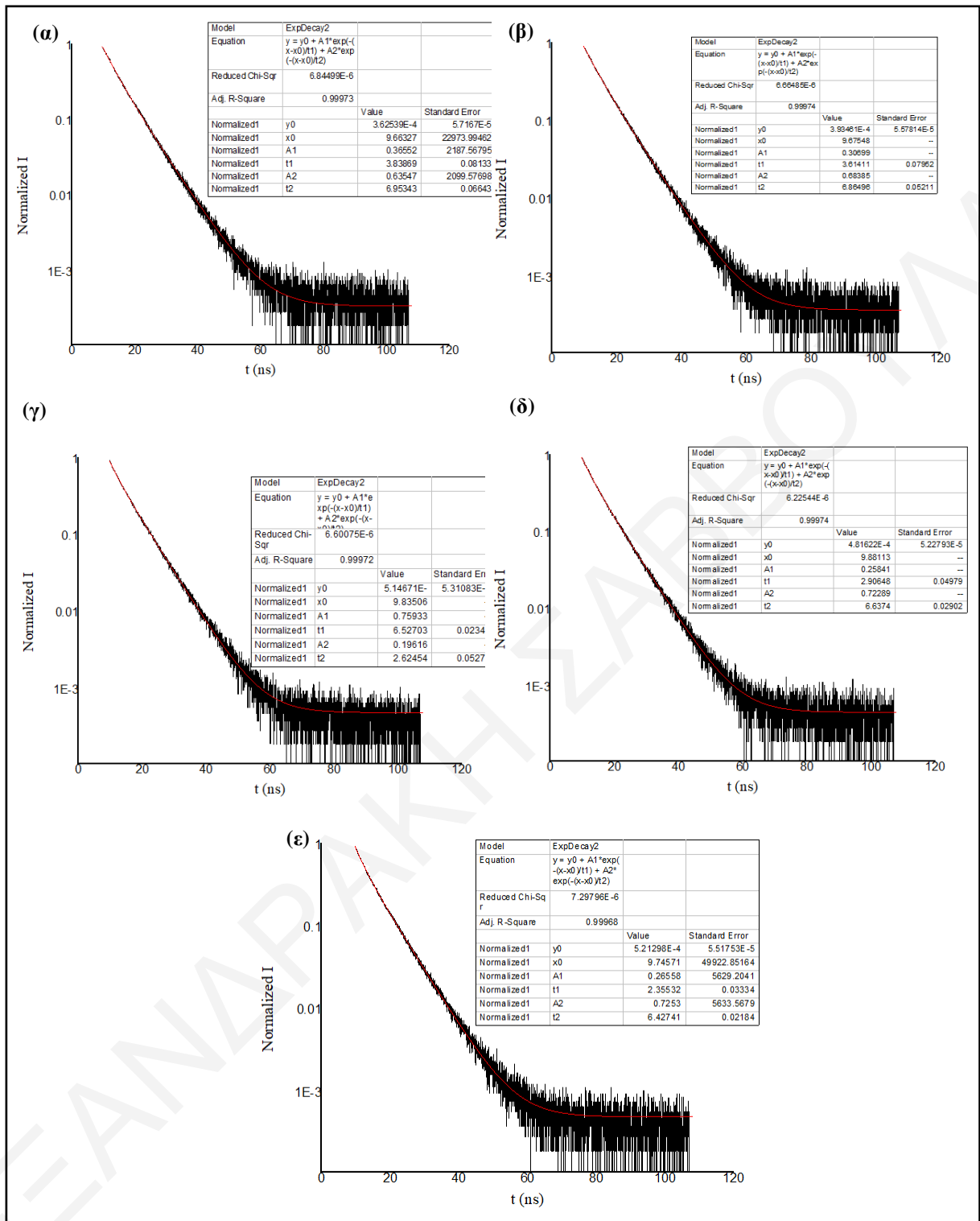
Σχήμα Π.56: Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της BE 2.0×10^{-6} M με διέγερση στα 405 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA (α) 0 M, (β) 3.0×10^{-6} , (γ) 6.0×10^{-6} M και (δ) 9.0×10^{-6} M σε pH 7.



Σχήμα Π.57: Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της BE 2.0×10^{-6} M με διέγερση στα 405 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης SC (α) 0 M, (β) 3.0×10^{-6} , (γ) 6.0×10^{-6} M και (δ) 9.0×10^{-6} M σε pH 7.



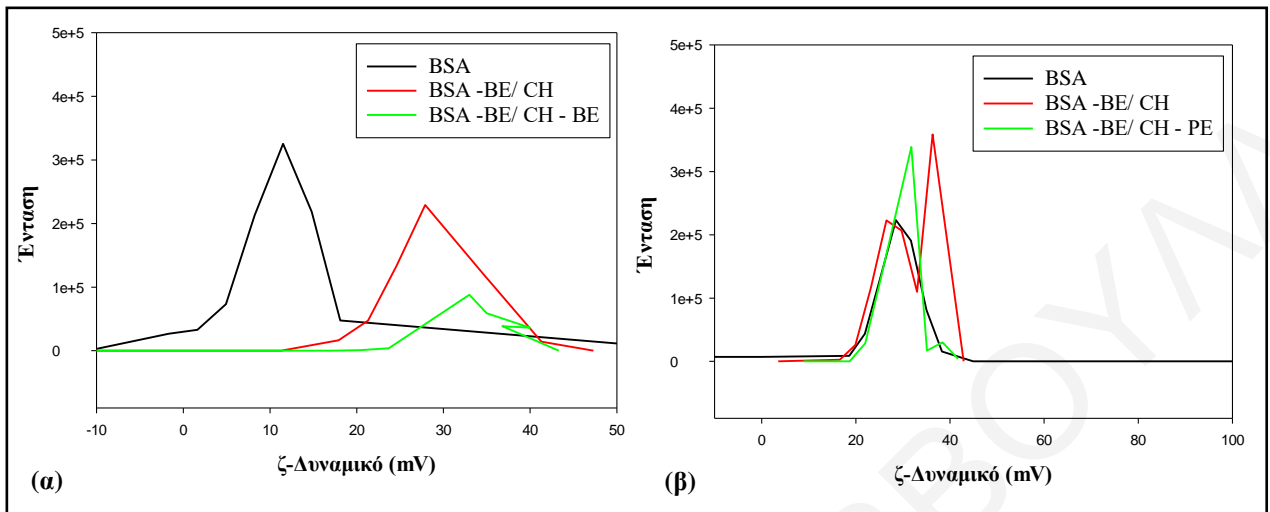
Σχήμα Π.58: Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA $1.5 \times 10^{-5}\text{ M}$ με διέγερση στα 266 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE (α) 0 M , (β) $2.0 \times 10^{-6}\text{ M}$, (γ) $4.0 \times 10^{-6}\text{ M}$ και (δ) $5.0 \times 10^{-6}\text{ M}$, (ε) $6.0 \times 10^{-6}\text{ M}$ και (στ) $8.0 \times 10^{-6}\text{ M}$ σε pH 4.



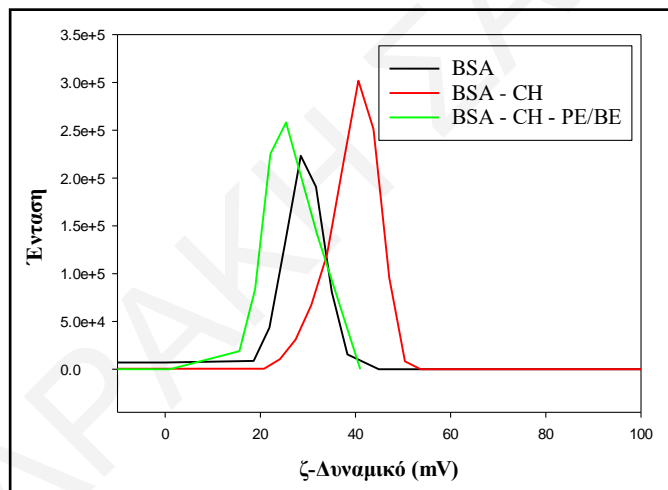
Σχήμα Π.59: Διαγράμματα χρονοεξαρτημένου φθορισμού της πρωτεΐνης BSA 1.5×10^{-5} M με διέγερση στα 266 nm παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων BE (α) 0 M, (β) 2.0×10^{-6} M, (γ) 4.0×10^{-6} M και (δ) 5.0×10^{-6} M και (ε) 6.0×10^{-6} M σε pH 7.

Π.2.3 ΤΡΙΤΟ ΣΤΑΔΙΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

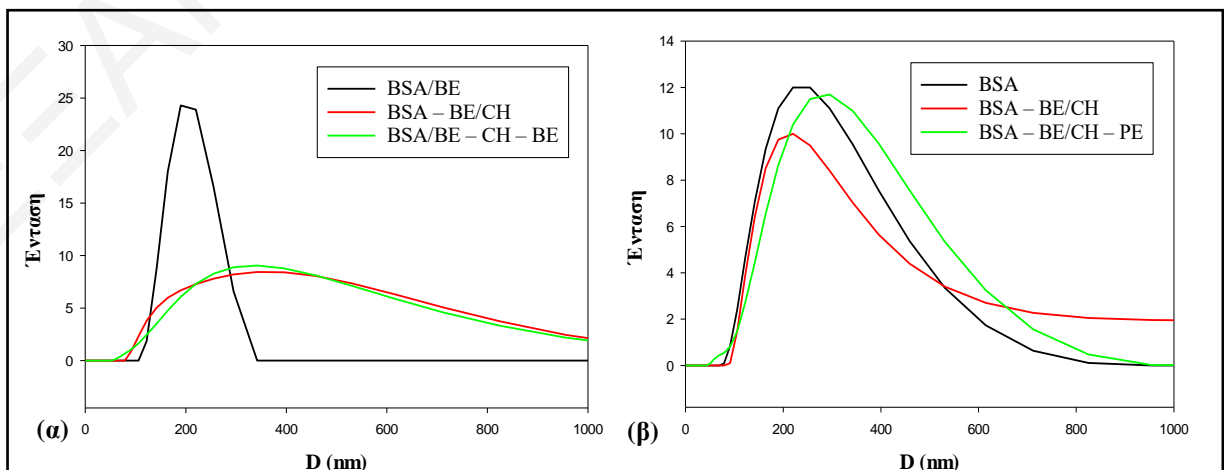
Π.2.3.1 Μετρήσεις ζήτα - δυναμικού και μεγέθους σταγονιδίων γαλακτωμάτων



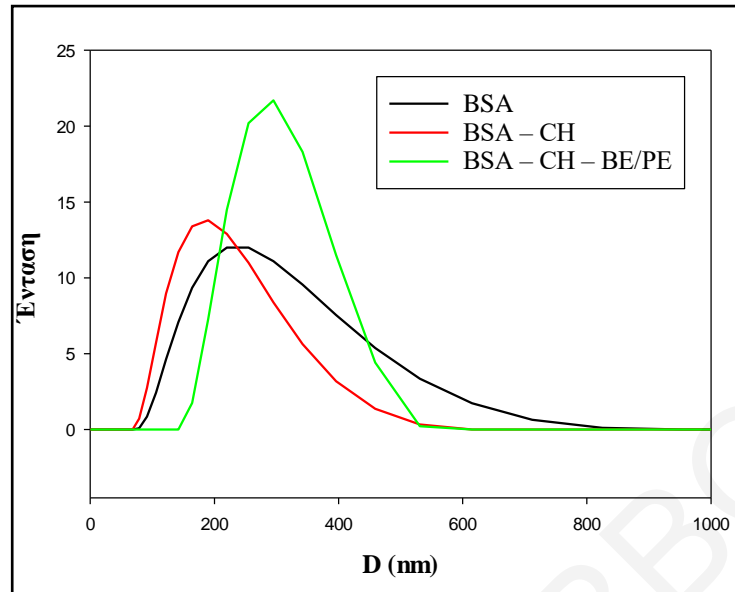
Σχήμα Π.60: Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα (α) BSA/BE – CH – PE και (β) BSA – CH/BE – CH.



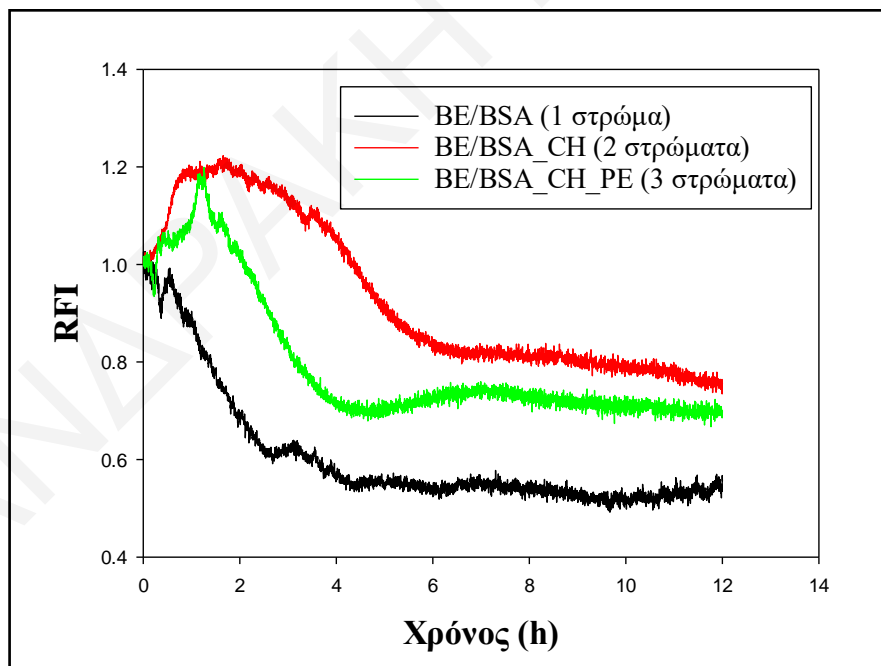
Σχήμα Π.61: Διαγράμματα ζήτα-δυναμικού για τα συστήματα BSA– CH – PE/BE.



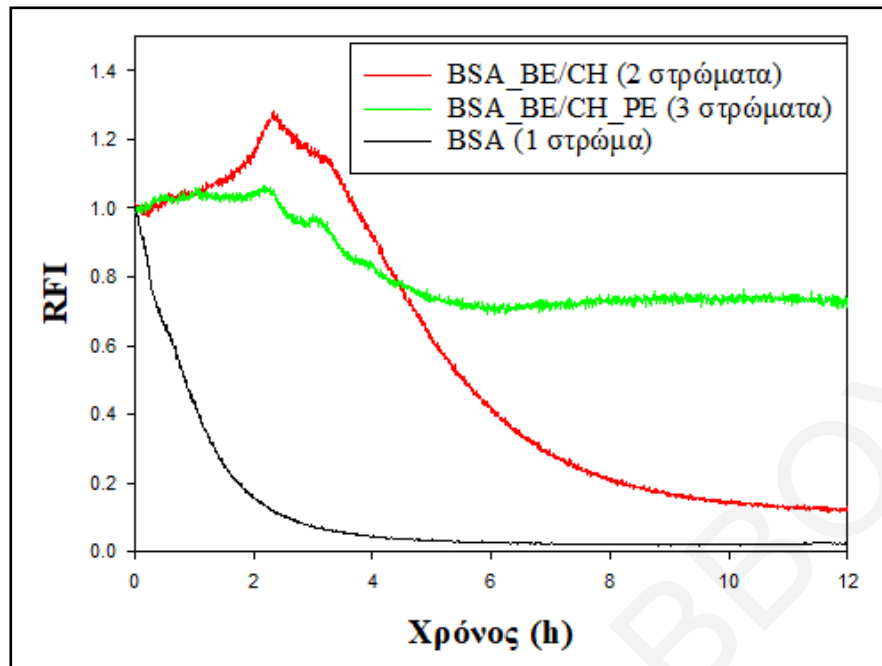
Σχήμα Π.62: Κατανομή μεγεθών για τα συστήματα (α) BSA/BE – CH – PE και (β) BSA – CH/BE – CH.



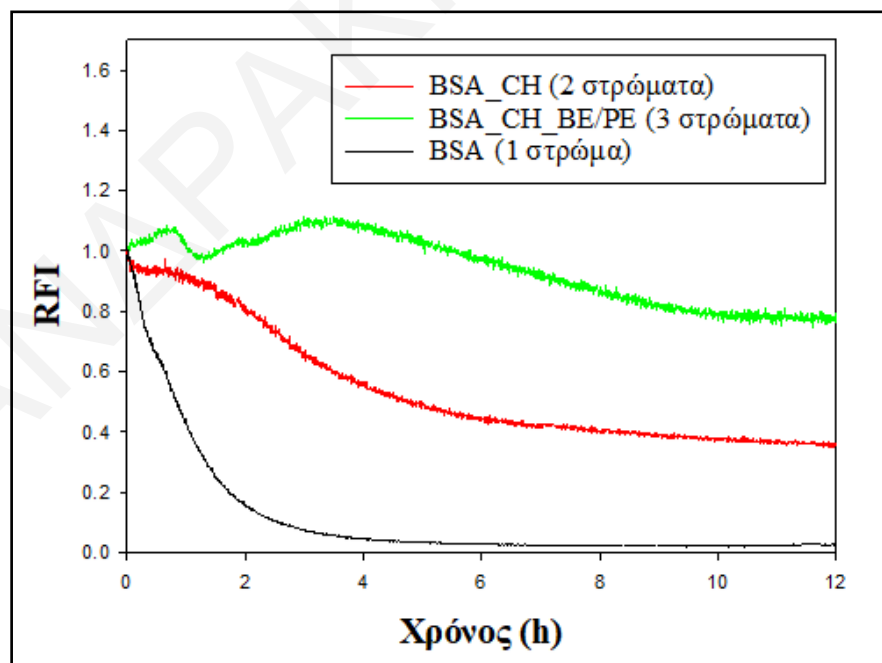
Σχήμα Π.63: Κατανομή μεγεθών για το σύστημα BSA- CH - PE/BE.



Σχήμα Π.64: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτόματα BSA/BE_CH_PE.



Σχήμα Π.65: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA _CH/BE_PE.



Σχήμα Π.66: Σχετική ένταση φθορισμού της χρωστικής Nile Red για το τριτοταγές γαλακτώματα BSA _CH_PE/BE.