

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

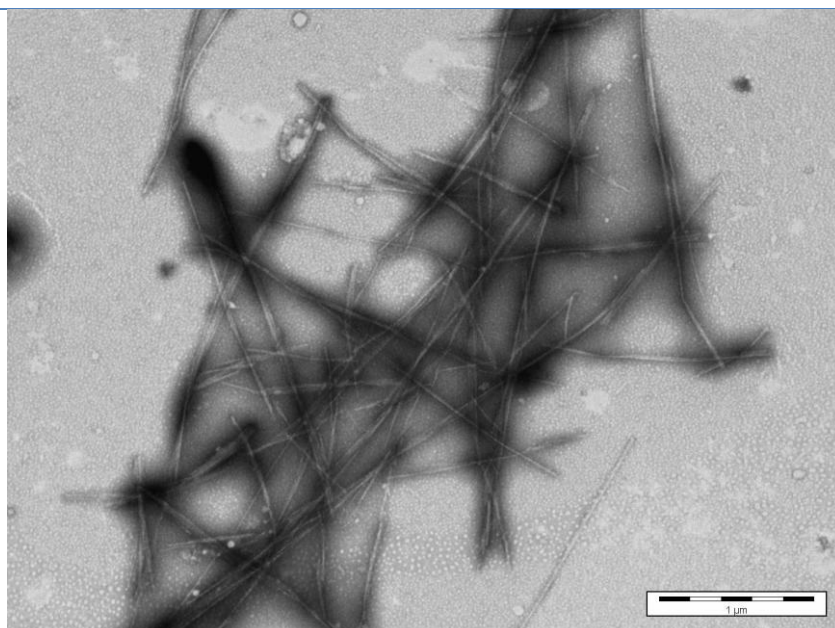


**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του
Ανθρώπου**

**Π.Μ.Σ. Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφή του
Ανθρώπου**

Μεταπτυχιακή Εργασία

**«Επίδραση διαφόρων δομών βακτηριακής
κυτταρίνης στις ιδιότητες γαλακτωμάτων»**



Ελένη- Αλκμήνη Δ. Δημητρακοπούλου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαντάλα Ι.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Π.Μ.Σ. Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Μεταπτυχιακή Εργασία

**«Επίδραση διαφόρων δομών βακτηριακής
κυτταρίνης στις ιδιότητες
γαλακτωμάτων»**

Ελένη- Αλκμήνη Δ. Δημητρακοπούλου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαντάλα Ι.

Μεταπτυχιακή Εργασία

**«Επίδραση διαφόρων δομών βακτηριακής κυτταρίνης
στις ιδιότητες γαλακτωμάτων»**

Ελένη-Αλκμήνη Δ. Δημητρακοπούλου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαντάλα Ι.

Εξεταστική Επιτροπή: Μαντάλα Ι.

Κουτίνας Α.

Στοφόρος Ν.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της κας Ιωάννας Μαντάλα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Μαντάλα Ιωάννα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη μελέτη αυτή, για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να κάνω την μεταπτυχιακή μου μελέτη και να εμβαθύνω σε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα κα Παξιμαδά Παρασκευή για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράστασή της. Η βοήθεια, η στήριξη και η συμβολή της τόσο στη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και στην αντιμετώπιση προβλημάτων που προέκυψαν κατά την πορεία της εργασίας ήταν πολύτιμη. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τα μέλη του εργαστηρίου Μηχανικής Τροφίμων για την εξαιρετική συνεργασία, την υποστήριξη και το ευχάριστο περιβάλλον εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένεια και τους φίλους μου για την απεριόριστη στήριξη, κατανόηση και αγάπη που μου έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Σκοπός της μελέτης ήταν η εξέταση της επίδρασης της επεξεργασίας με υπερήχους και της όξινης υδρόλυσης στις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης και τελικά η εξέταση της χρήσης της ως σταθεροποιητή σε γαλακτώματα ελαίου/νερού. Παρασκευάστηκαν διαλύματα κυτταρίνης (0,1-1%) τα οποία υπέστησαν επεξεργασία με υπερήχους για χρονικά διαστήματα 0-5 λεπτών. Το μέγεθος των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μειώθηκε μετά από επεξεργασία με υπερήχους για 1 λεπτό, ενώ αυξήθηκε για μεγαλύτερης διάρκειας επεξεργασία (3-5 λεπτά), γεγονός που αποδίδεται στην επίδραση των υπερήχων στη δομή των ινιδίων. Όλα τα δείγματα φέρουν αρνητικό φορτίο, ενώ αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση κυτταρίνης (1%) και χρόνο επεξεργασίας 5 λεπτών, είχαν τις μικρότερες τιμές. Ομογενοποίηση της βακτηριακής κυτταρίνης για 1 λεπτό προκάλεσε αύξηση της ικανότητας συγκράτησης νερού, ενώ για περισσότερο χρόνο επεξεργασίας η ικανότητα συγκράτησης νερού μειώθηκε. Ακόμα, φάνηκε ότι μεγαλύτερης διάρκειας επεξεργασία με υπερήχους, οδηγεί σε μεγαλύτερη σταθερότητα. Τα διαλύματα εμφάνισαν δύο περιοχές ψευδοπλαστικής συμπεριφοράς, στις οποίες παρεμβάλεται μια περιοχή σταθερού ιξώδους, λόγω της κατανομής των συσσωματωμένων ινιδίων στον χώρο. Όλα τα δείγματα επέδειξαν θιξοτροπική και έντονη gel-like συμπεριφορά. Τελικά, η επεξεργασία με υπερήχους για μικρό χρονικό διάστημα (1-3λεπτά) φαίνεται ότι ενισχύει τις φυσικές ιδιότητες διαλυμάτων κυτταρίνης.

Στη συνέχεια, ινίδια βακτηριακής κυτταρίνης υδρολύθηκαν με χρήση ισχυρών οξέων (H_2SO_4 , HCl) σε θερμοκρασίες 40 και 60°C για διάστημα 2-72 ωρών. Η υδρόλυση οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των ινιδίων, ενώ μεγαλύτερη μείωση καταγράφηκε για υδρόλυση με HCl για 72 ώρες στους 60°C. Όλα τα δείγματα φέρουν αρνητικό φορτίο, ενώ μικρότερο φορτίο για κυτταρίνη υδρολυμένη με H_2SO_4 στους 60°C για 72 ώρες. Το ίδιο δείγμα εμφάνισε και το μικρότερο διαχωρισμό φάσεων. Τα διαλύματα εμφάνισαν δύο περιοχές ψευδοπλαστικής συμπεριφοράς, στις οποίες παρεμβάλεται μια περιοχή σταθερού ιξώδους, και τυπική θιξοτροπική συμπεριφορά. Στα περισσότερα διαλύματα παρατηρήθηκε gel like συμπεριφορά, ενώ το διάλυμα κυτταρίνης που είχε υποστεί υδρόλυση με H_2SO_4 στους 60°C για 72 ώρες, παρουσίασε σημείο ζελατινοποίησης. Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι υδρόλυση με ισχυρά οξέα ενισχύει τις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης και μάλιστα όσο πιο έντονες είναι οι συνθήκες υδρόλυσης (μεγαλύτερη θερμοκρασία και περισσότερος χρόνος) τόσο βελτιώνονται οι ιδιότητες αυτές.

Τέλος, έγινε ενσωμάτωση της επεξεργασμένης βακτηριακής κυτταρίνης σε γαλακτώματα με ελαιόλαδο. Τα γαλακτώματα που περιείχαν κυτταρίνη επεξεργασμένη με υπερήχους για 3λεπτά είχαν μικρότερο μέγεθος σταγονιδίων και ελαφρώς μεγαλύτερη σταθερότητα από τα διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με H_2SO_4 στους 60°C για 72 ώρες. Συνεπώς, στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, προτείνεται η χρήση υπερήχων ως μεθόδου ομογενοποίησης γαλακτωμάτων βακτηριακής κυτταρίνης.

Abstract

In the present study, we investigated the effect of ultrasounds and acid hydrolysis as pretreatments for bacterial cellulose (BC) aqueous suspensions and examined the use of pretreated BC as stabilizer in oil in water emulsions. BC suspensions (0.1-1% wt) were subjected to an ultrasonic treatment for different time intervals (0-5 min) and their properties were evaluated. The size of BC fibrils decreased when low sonication time was applied (1 min), while for longer time intervals (3-5 min) there was an increase, which was attributed to the effect that ultrasonic treatment has on the structure of the fibrils. All samples were negatively charged with the ones with the higher concentrations (1% BC) and sonication periods (5 min) showing the lowest values. BC homogenization for 1 min caused an increase in WHC, while further homogenization (3-5 min) resulted in lower WHC values. Longer ultrasonic treatments, led to lower phase separation and thus higher stability. The rheological behavior of BC emulsions showed two shear thinning regions, in between which, the viscosity remained constant. This phenomenon was ascribed due to changes in BC floc size. Also, as the samples exhibited thixotropic behavior as well as a strong gel-like behavior. In conclusion, ultrasounds seem to enhance the physical properties of BC aqueous suspensions, while short treatment time (1-3 min) is considered the optimal for the present work.

Also, BC fibrils were hydrolysed with strong acids (H_2SO_4 , HCl) in different temperatures (40 and 60°C) and for different time intervals (2-72 hours). Hydrolysis leads to a decrease in the size of fibrils, especially when HCl is used in 60°C for 72hours. All samples were negatively charged with the ones hydrolysed with H_2SO_4 in 60°C for 72hours exhibiting the lowest values. The same sample showed the lowest phase separation. The rheological behavior of the samples showed two shear thinning regions, in between which, the viscosity remained constant. Furthermore, all samples showed thixotropic behavior. Most of the samples exhibited gel-like behavior, but the sample containing BC hydrolyzed by H_2SO_4 in 60°C for 72hours showed a gelation point, where a transition from liquid like to solid like behavior was observed. All in all, hydrolysis with strong acids in tense conditions (60°C for 72hours) seems to enhance significantly the properties of BC aqueous suspensions.

Finally, pretreated BC was incorporated in oil in water emulsions. Emulsions containing BC ultrasonicated for 3min showed smaller size of particles and slightly higher stability than the ones containing hydrolysed BC. As a result, for the present work, ultrasonication is considered a more efficient pretreatment method for oil in water emulsions containing BC as a stabilizer.

Περιεχόμενα

Περίληψη..... 2

Abstract 3

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βακτηριακή Κυτταρίνη 7

1.1.1 Ιδιότητες βακτηριακής κυτταρίνης 7

1.1.2 Χημική Δομή 8

1.1.3 Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης..... 9

1.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες διαλυμάτων κυτταρίνης 10

1.2.1 Ρεολογία..... 10

Κατηγορίες ρευστών ανάλογα με την ιξώδη συμπεριφορά..... 10

Ιξωδοελαστικές ιδιότητες- Συντελεστες αποθήκευσης (G') και απώλειας (G'')..... 13

Θιξοτροπική συμπεριφορά 14

1.2.2 ζ-δυναμικό 15

1.2.3 Ικανότητα συγκράτησης νερού 16

1.3 Όξινη υδρόλυση βακτηριακής κυτταρίνης..... 17

1.3.1 Μηχανισμός όξινης υδρόλυσης-επίδραση στις ιδιότητες της κυτταρίνης..... 17

1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την όξινη υδρόλυση 19

1.4 Επίδραση υπερήχων στις ιδιότητες πολυσακχαριτών..... 19

1.5 Γαλακτώματα..... 21

1.5.1 Κατηγοριοποίηση γαλακτωμάτων 21

1.5.2 Σταθεροποιητές..... 22

1.5.3 Σταθερότητα Γαλακτωμάτων 23

1.5.3.1 Μηχανισμοί αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων..... 24

1.6 Ομογενοποίηση..... 28

1.6.1 Μέθοδοι ομογενοποίησης 28

1.7 Σκοπός της μελέτης 30

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά και συσκευές 31

2.1.1 Υλικά 31

2.1.2 Συσκευές..... 31

2.2. Μέθοδοι..... 31

2.2.1 Παρασκευή βακτηριακής κυτταρίνης 31

2.2.2 Επεξεργασία βακτηριακής κυτταρίνης και παρασκευή διαλυμάτων 32

2.2.2.1 Υπερήχοι.....	32
2.2.2.2 Όξινη υδρόλυση	33
2.2.3 Ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC).....	33
2.2.4 Μέγεθος και μορφολογία των ινιδίων κυτταρίνης.....	34
2.2.4.3 Οπτικό μικροσκόπιο	34
2.2.4.4 Μικροσκόπιο TEM (Transmission Electron Microscopy)	35
2.2.5 ζ-δυναμικό.....	36
2.2.6 Σταθερότητα Δειγμάτων –Turbiscan.....	37
2.2.7 Ρεολογικές μετρήσεις.....	38
2.2.7.1 Γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων.....	39
2.2.7.1 Μέτρηση ιξώδους.....	41
2.2.7.2 Θιξοτροπική συμπεριφορά	41
2.2.7.3 Ιξωδοελαστική συμπεριφορά	41
2.2.8 Χρήση της βακτηριακής κυτταρίνης ως σταθεροποιητή σε γαλακτώματα.....	41

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Επίδραση υπερήχων στη μορφολογία και τις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης....	43
3.1.1 Μορφολογία ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης	43
3.1.2 ζ-δυναμικό.....	45
3.1.3 Ικανότητα συγκράτησης νερού	46
3.1.4 Σταθερότητα διαλυμάτων- Διαχωρισμός φάσεων	47
3.1.5 Ρεολογικές μετρήσεις.....	51
3.1.5.1 Ιξώδες	51
3.1.5.2 Θιξοτροπική συμπεριφορά	53
3.1.5.3 Ιξωδοελαστική συμπεριφορά	55
3.1.6 Χρήση της επεξεργασμένης με υπερήχους βακτηριακής κυτταρίνης σε γαλακτώματα	58
3.1.6.1 Διάμετρος σταγονιδίων γαλακτωμάτων	58
3.1.6.2 Διαχωρισμός φάσεων των γαλακτωμάτων.....	60
3.2. Επίδραση όξινης υδρόλυσης στη μορφολογία και τις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης.....	61
3.2.1 Μορφολογία ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μετά την υδρόλυση με οξέα	61
3.2.2 ζ-δυναμικό.....	65
3.2.3 Σταθερότητα διαλυμάτων- Διαχωρισμός φάσεων	66
3.2.4 Ρεολογικές μετρήσεις.....	70
3.2.4.1 Ιξώδες	70

3.2.4.2	Θιξοτροπική συμπεριφορά	74
3.2.4.3	Ιξωδοελαστική συμπεριφορά	77
3.2.5	Χρήση υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης σε γαλακτώματα.....	80
3.2.5.1	Διάμετρος σταγονιδίων γαλακτωμάτων	81
3.2.5.2	Διαχωρισμός φάσεων των γαλακτωμάτων	82
3.3.	Σύγκριση επεξεργασίας με υπερήχους και υδρόλυσης της βακτηριακής κυτταρίνης....	83
3.3.1	Μορφολογία και μέγεθος ινιδίων.....	84
3.3.2	ζ-δυναμικό.....	84
3.3.3	Διαχωρισμός φάσεων	84
3.3.4	Ρεολογική συμπεριφορά.....	84
3.3.4.1	Ιξώδες	84
3.3.4.2	Θιξοτροπική συμπεριφορά	85
3.3.4.3.	Ιξωδοελαστική συμπεριφορά	85
3.3.5	Χρήση της επεξεργασμένης βακτηριακής κυτταρίνης σε γαλακτώματα.....	86
3.3.5.1	Μορφολογία σταγονιδίων γαλακτωμάτων.....	86
3.3.5.2	Διαχωρισμός φάσεων γαλακτωμάτων.....	86
IV.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
V.	ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ	89
VI.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91
	Παράρτημα Α- Γραφήματα υδρόλυσης	97
	Παράρτημα Β- Συγκεντρωτικός πίνακας εικόνων	103
	Παράρτημα Γ- Συγκεντρωτικός πίνακας πινάκων.....	105
	Παράρτημα Δ- Συγκεντρωτικός πίνακας γραφημάτων.....	106

I. Εισαγωγή

1.1 Βακτηριακή Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι το βιοπολυμερές που συναντάται σε μεγαλύτερη αφθονία στη φύση, τόσο ως κύριο συστατικό της φυτικής βιομάζας αλλά και ως βακτηριακό εξωκυτταρικό πολυμερές. Η βακτηριακή κυτταρίνη (bacterial cellulose, BC) ανήκει στα προϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων και χρησιμεύει κυρίως ως προστατευτική επικάλυψη (Bielecki et al).

Η βακτηριακή κυτταρίνη παράγεται από διάφορα είδη βακτηρίων, όπως αυτά των γενών *Gluconacetobacter* (ή *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* και *Salmonella*. Παραγωγή κυτταρίνης από το βακτήριο *Acetobacter xylinum* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1886 από τον A.J. Brown, ο οποίος παρατήρησε ότι κύτταρα του *Acetobacter* παρήγαγαν κυτταρίνη παρουσία οξυγόνου και γλυκόζης (Chawla et al., 2009). Οι περισσότερο αποδοτικοί παραγωγοί βακτηριακής κυτταρίνης είναι τα Gram-αρνητικά βακτήρια *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) (Bielecki et al).

1.1.1 Ιδιότητες βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη ενώ έχει την ίδια χημική δομή, διαφέρει μορφολογικά από την φυτική, καθώς αποτελείται από ένα δίκτυο μικροϊνιδίων, σε αντίθεση με την κυτταρίνη των φυτών που αποτελείται από ινίδια ή δέσμες μικροϊνιδίων (Okuyama A., Motoki M., Yamanaoka S., 1993). Λόγω αυτής της δομής, η βακτηριακή, ζελατινώδης κυτταρίνη συγκρατεί ποσότητα νερού έως και παραπάνω από 100 φορές το βάρος της, ενώ η κυτταρίνη των φυτών διογκώνεται ελάχιστα παρουσία νερού (Okuyama A., Motoki M., Yamanaoka S., 1993).

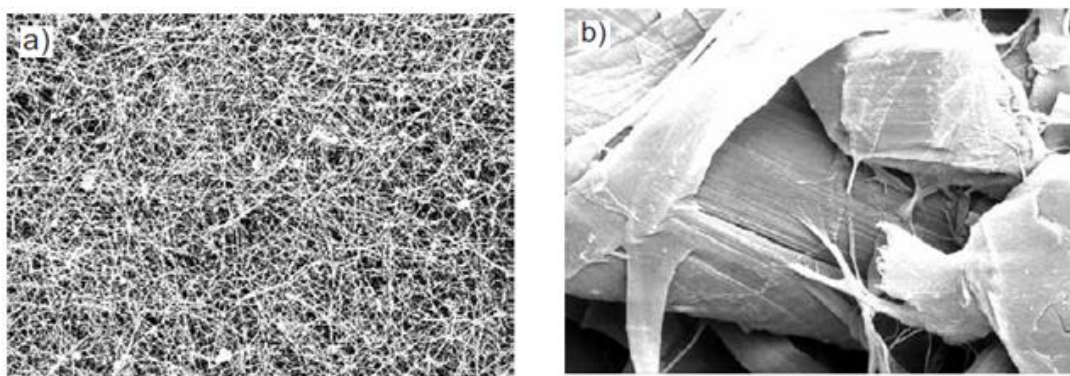
Επιπροσθέτως, η βακτηριακή κυτταρίνη παρουσιάζει υψηλή κρυσταλλικότητα, μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό, είναι αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες και έχει υψηλό βαθμό πολυμερισμού. Το πάχος των ινιδίων της κυτταρίνης είναι γενικά 0,1-10nm. Μακροσκοπικά, η μορφολογία της εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας, καθώς καλύπτει την ελεύθερη επιφάνεια του δοχείου μέσα στο οποίο γίνεται η καλλιέργεια. Ακόμα, είναι διαλυτή σε συμπυκνωμένα οξέα όπως το θειικό, το υδροχλωρικό και το νιτρικό οξύ αλλά και σε διαλύματα NaOH (Chawla et al, 2009) .

Το πάχος των ινιδίων της κυτταρίνης είναι συνήθως 0,1-10nm και τα ινίδια αυτά σχηματίζονται από την ένωση μικροϊνιδίων με πλάτος περίπου 5-15nm, που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Μακροσκοπικά, η μορφολογία της εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας, καθώς καλύπτει την ελεύθερη επιφάνεια του δοχείου μέσα στο οποίο γίνεται η καλλιέργεια (Chawla et al, 2009). Ακόμα, η μικρο-δομή της βακτηριακής κυτταρίνης εξαρτάται από την επεξεργασία στην οποία υπόκειται, όπως θα αποδειχθεί στη συνέχεια.



Εικόνα 1: Βακτηριακή κυτταρίνη όπως παραλαμβάνεται μετά την καλλιέργεια (προσωπικό αρχείο)

Η βακτηριακή κυτταρίνη προτιμάται σε σχέση με την φυτική καθώς παραλαμβάνεται σε μεγαλύτερη καθαρότητα. Αντίθετα, η φυτική κυτταρίνη περιέχει και ημικυτταρίνες και λιγνίνη, η απομάκρυνση των οποίων είναι αρκετά δύσκολη. Ακόμα, επιδεικνύει μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού και μεγαλύτερη αντοχή σε εφελκυσμό (Okigarna et al, 1993).

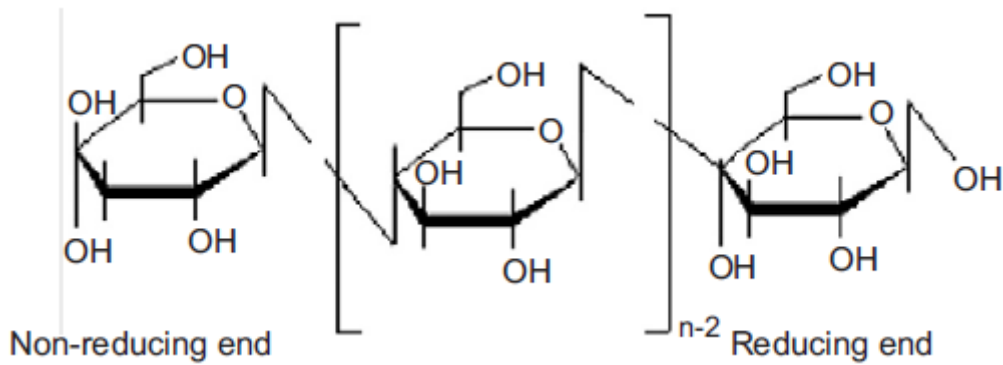


Εικόνα 2: Διαφορά στη δομή μεταξύ βακτηριακής (α) και φυτικής κυτταρίνης (β) όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο SEM (Chawla et al, 2009)

Παρά τα πλεονεκτήματα που διαθέτει η βακτηριακή κυτταρίνη, ο χαμηλός ρυθμός παραγωγής της, περιορίζει τη χρήση της σε μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές διεργασίες.

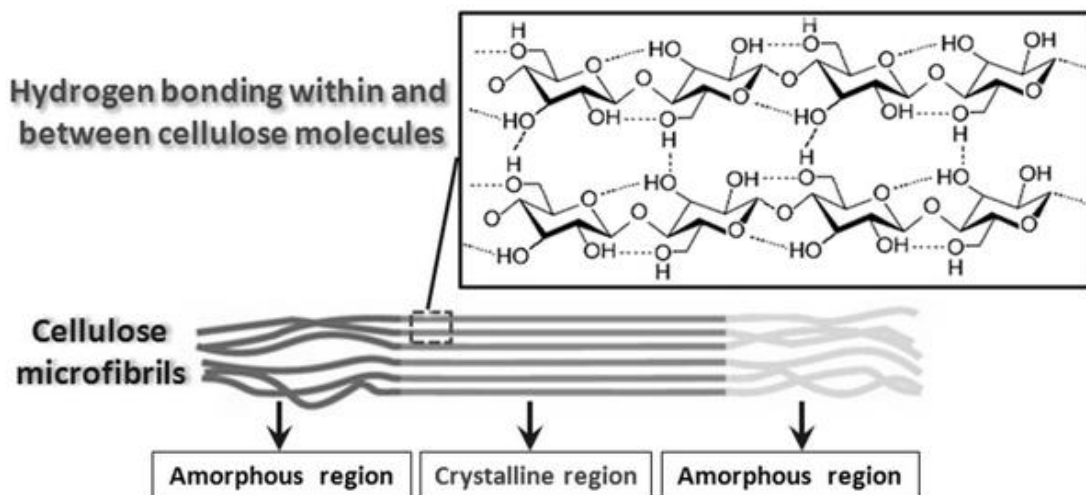
1.1.2 Χημική Δομή

Η κυτταρίνη είναι ένα ομοπολυμερές που αποτελείται από μονομερή γλυκόζης ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα έτσι ώστε το ένα μόριο να έχει περιστραφεί κατά 180° σε σχέση με το άλλο (Chawla et al, 2009).



Εικόνα 3: Επαναλαμβανόμενες μονάδες (μονομερή) της κυτταρίνης

Τα μονομερή της γλυκόζης, σχηματίζουν μόρια κυτταρίνης που συνδέονται με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου. Όπως προαναφέρθηκε η βακτηριακή κυτταρίνη, απαντάται σε ινίδια τα οποία σχηματίζουν δέσμες. Στο κέντρο των δεσμών, τα ινίδια συνδέονται με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας κρυσταλλικές περιοχές. Αντιθέτως, στα άκρα των δεσμών ινιδίων οι δεσμοί υδρογόνου δεν είναι τόσο ισχυροί, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται άμορφες ή παρακρυσταλλικές περιοχές, οι οποίες προσβάλλονται πιο εύκολα από οξέα, άλλα αντιδραστήρια ή και διάφορες μεθόδους επεξεργασίας.



Εικόνα 4: κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές των δεσμών ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης (Zhou & Wu, 2012)

1.1.3 Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης

Η χημικώς καθαρή κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επεξεργασμένα προϊόντα τροφίμων ως σταθεροποιητής. Η πρώτη χρήση της στη βιομηχανία τροφίμων έγινε στο επιδόρπιο nata de coco στις Φιλιππίνες. Οι ιδιότητες gel που παρουσιάζει η βακτηριακή κυτταρίνη, σε συνδιασμό με την αδυναμία πέψης της από τον άνθρωπο, την καθιστούν μια ελκυστική βάση για τρόφιμα. (Chawla et al, 2009).

Η απαλή υφή και η υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού, είναι βασικά χαρακτηριστικά της βακτηριακής κυτταρίνης. Σε υγρά τρόφιμα, η βακτηριακή κυτταρίνη σταθεροποιεί προϊόντα όπως σοκολατούχα ροφήματα και σούπες. Σε γαλακτώματα ελαίου/ νερού (oil in water), η βακτηριακή κυτταρίνη τείνει να καταβυθίζεται και το έλαιο επιπλέει. Σε στερεά τρόφιμα η βακτηριακή κυτταρίνη παρέχει λειτουργικά πλεονεκτήματα επηρεάζοντας τις ρεολογικές τους ιδιότητες. Όπως προαναφέρθηκε, λόγω της δομής της, η βακτηριακή,

ζελατινώδης κυτταρίνη συγκρατεί ποσότητα νερού έως και παραπάνω από 100 φορές το βάρος της. Η υδροφιλικότητα αυτή, καθιστά την κυτταρίνη πολύ χρήσιμη ως πυκνωτή υφής (thickener) ή σταθεροποιητή.

Ακόμα, ο μεγάλος βαθμός πολυμερισμού, η αντοχή σε εφελκυσμό και η ικανότητα συγκράτησης νερού, την καθιστούν κατάλληλη πρώτη ύλη για την παραγωγή ηχείων υψηλής πιστότητας, χαρτιού αλλά και για την επούλωση τραυμάτων στο δέρμα (Okigarna A., Motoki M., Yamanaoka S., 1993) .

1.2.Φυσικοχημικές ιδιότητες διαλυμάτων κυτταρίνης

1.2.1 Ρεολογία

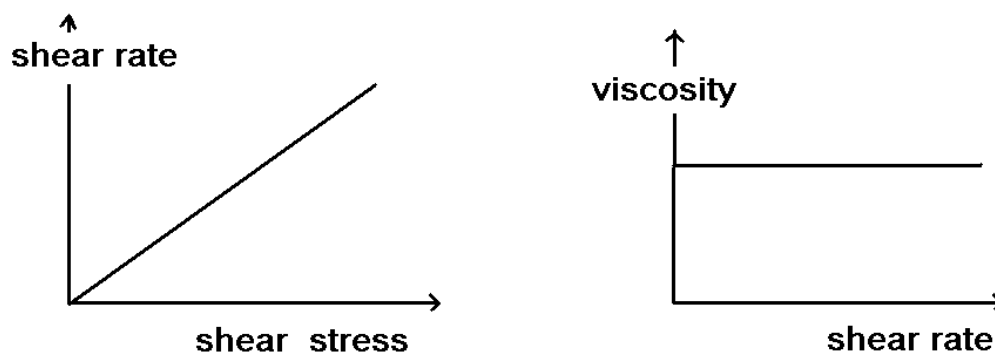
Η επιστήμη της ρεολογίας αφορά τη ροή και την παραμόρφωση της ύλης. Επίσης, η ρεολογία, προσπαθεί να προσδιορίσει τη σχέση μεταξύ της τάσης που εφαρμόζεται σε ένα δεδομένο υλικό και της παραμόρφωσης ή της ροής που αυτή δημιουργεί.

Βασικές έννοιες της ρεολογίας αποτελούν η τάση (stress=δύναμη/ εμβαδό) και η παραμόρφωση (strain),. Η τάση (τ) είναι η μέτρηση της δύναμης ανά μονάδα επιφάνειας και μετράται σε Pascal (Pa). Η κατεύθυνση της δύναμης σε σχέση με την επιφάνεια στην οποία ασκείται καθορίζει τον τύπο της τάσης. Διατμητική τάση (shear stress) εμφανίζεται όταν οι δυνάμεις δρουν παράλληλα προς την επιφάνεια. Αντίθετα, ο τύπος της παραμόρφωσης που ασκείται, καθορίζεται από την κατεύθυνση της εφαρμοζόμενης τάσης σε σχέση με την επιφάνεια του υλικού (Munizaga, Barbosa-Canovas, 2005) .

Κατηγορίες ρευστών ανάλογα με την ιξώδη συμπεριφορά

➤ Νευτώνεια ρευστά

Νευτώνεια ονομάζονται τα ρευστά εκείνα στα οποία η εξάρτηση της ιξώδους τάσης από το ρυθμό παραμόρφωσης του ρευστού είναι γραμμική. Το χαρακτηριστικό των νευτώνειων ρευστών είναι ότι το ιξώδες αποτελεί για αυτά ιδιότητα, η τιμή της οποίας εξαρτάται από τη μοριακή σύσταση και την κατάσταση (πίεση και θερμοκρασία) του ρευστού, ενώ είναι ανεξάρτητο από το ρυθμό διάτμησης και το προηγούμενο ιστορικό (Rao et al, 2005). Η καμπύλη που παριστάνει την εξάρτηση της διατμητικής τάσης από το ρυθμό γωνιακής παραμόρφωσης για τα νευτώνεια ρευστά είναι ευθεία γραμμή με σταθερή κλίση ίση με το ιξώδες του ρευστού (για σταθερή πίεση και θερμοκρασία). Νευτώνεια συμπεριφορά εμφανίζουν τα αέρια, τα περισσότερα από τα συνήθη υγρά και τα διαλύματα ουσιών μικρού μοριακού βάρους. Τα πιο κοινά νευτώνεια ρευστά είναι το νερό και ο αέρας (Παπαϊωάννου Θ.Α., 2002) .



Εικόνα 5: Ρεολογικά διαγράμματα νευτώνειων ρευστών

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροφίμων που ανήκουν στην κατηγορία των νευτώνειων ρευστών φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 1: Παραδείγματα τροφίμων- νευτώνειων ρευστών (Rao et al, 2005)

Γάλα	Προϊόντα Αυγού
Καθαροί χυμοί φρούτων	Ολόκληρο αυγό
Χυμός μήλου χωρίς πηκτίνες	Σταθεροποιημένο ασπράδι αυγού
Φιλτραρισμένος χυμός πορτοκαλιού	Απλός κρόκος αυγού
Χυμός σταφυλιού	Αλατισμένος κρόκος αυγού
	Διαλύματα Σακχαρόζης
	Μέλι

➤ **Μη νευτώνεια ρευστά**

Μη νευτώνεια ονομάζονται τα ρευστά στα οποία η εξάρτηση της ιξώδους τάσης από το ρυθμό παραμόρφωσης του ρευστού είναι μη γραμμική. Συνεπώς, η καμπύλη ροής των μη νευτώνειων ρευστών δεν είναι ευθεία γραμμή και η κλίση της, δηλαδή το ιξώδες, εξαρτάται εκτός από την θερμοκρασία και την πίεση και από το ρυθμό γωνιακής παραμόρφωσης (ή ρυθμό διάτμησης) του ρευστού (Παπαϊωάννου, 2002). Τα μη νευτώνεια ρευστά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: ανεξάρτητα από το χρόνο (**time-independent**) και εξαρτώμενα από το χρόνο (**time-dependent**). Σε σταθερή θερμοκρασία, το ιξώδες των πρώτων εξαρτάται μόνο από το ρυθμό διάτμησης, ενώ για τη δεύτερη κατηγορία, το ιξώδες εξαρτάται και από τη διάρκεια της διάτμησης.

Τα ανεξάρτητα από το χρόνο μη νευτώνεια ρευστά (**time-independent**) διακρίνονται σε ψευδοπλαστικά (**shear-thinning**) και διασταλτικά (**shear thickening**) ανάλογα με το αν το ιξώδες τους μειώνεται ή αυξάνεται, αντίστοιχα, με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης (Rao et al., 2005) .

➤ **Ψευδοπλαστικά ρευστά:** ονομάζονται τα μη νευτώνεια ρευστά το φαινόμενο ιξώδες των οποίων μειώνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης. Το φαινόμενο της μείωσης του ιξώδους με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης ονομάζεται **shear thinning**. (Paakko et al., 2007)

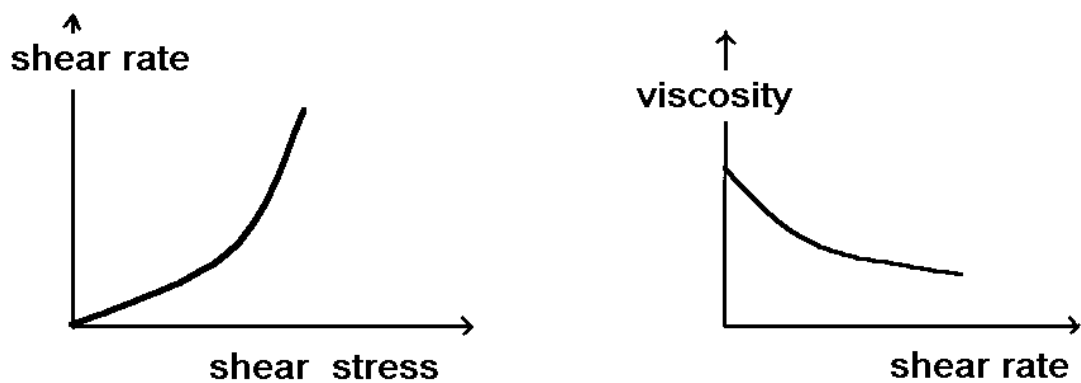
Τα ψευδοπλαστικά ρευστά αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία μη νευτώνειων ρευστών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροφίμων- ψευδοπλαστικών ρευστών, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 2: Παραδείγματα τροφίμων- ψευδοπλαστικών ρευστών (Rao et al, 2005)

Συμπυκνωμένοι χυμοί φρούτων	Κρέμα Γάλακτος
Μη αποπηκτινωμένος χυμός μήλου	Αποψυγμένο ολόκληρο αυγό
Χυμός passion fruit	Ασπράδι αυγού (unmixed)
Χυμός πορτοκαλιού	Πολτοί φρούτων και λαχανικών
Λιωμένη σοκολάτα	Διαλύματα κόμμεων- υψηλής συγκεντρώσεις
Γαλλική μουστάρδα	Συμπυκνώματα πρωτεϊνών

Η καμπύλη ροής των ψευδοπλαστικών ρευστών αποτελείται από τρία τμήματα, δύο ευθύγραμμα και ένα καμπύλο. Τα δυο ευθύγραμμα τμήματα, που υποδηλώνουν νευτώνεια συμπεριφορά, εμφανίζονται το πρώτο σε πολύ χαμηλούς και το δεύτερο σε πολύ υψηλούς ρυθμούς διάτμησης. Στην ενδιάμεση (μη νευτώνεια) περιοχή, το φαινόμενο ιξώδες του

ρευστού μειώνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης (Παπαϊωάννου, 2002).



Εικόνα 6: Καμπύλη ροής και εξάρτηση του φαινομένου ιξώδους ψευδοπλαστικού ρευστού από το ρυθμό διάτμησής του (<http://www.sju.edu/>)

Για την περιγραφή της ρεολογικής συμπεριφοράς ιξωδών ρευστών σε ένα ευρύ φάσμα διατμητικών τάσεων, χρησιμοποιείται η εξής σχέση (**power law**):

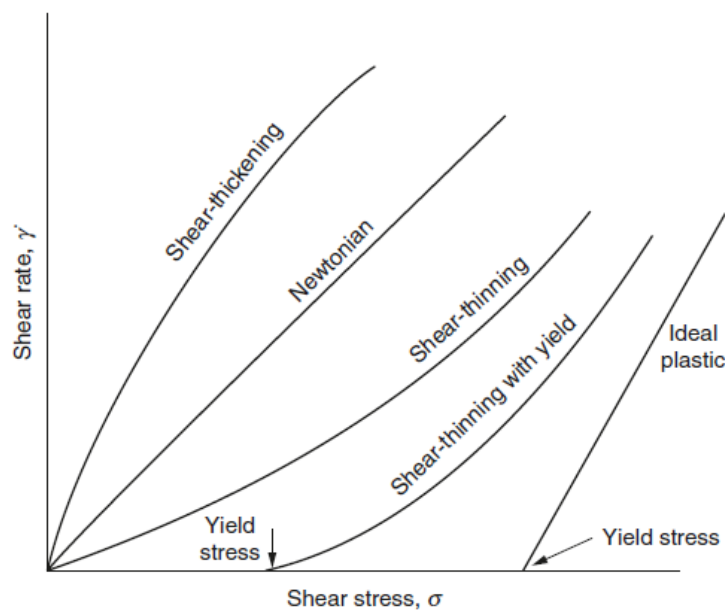
$$\sigma = \kappa \gamma^n$$

Ο συντελεστής κ είναι διαστατικό μέγεθος και ονομάζεται δείκτης συνοχής ή ρεολογική σταθερά του ρευστού (**consistency coefficient**) και αποτελεί μέτρο ευστάθειας του ρευστού. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του κ τόσο πιο ιξώδες είναι το ρευστό. Ο δείκτης συνοχής των νευτώνειων ρευστών είναι ίσος με το ιξώδες τους, $\kappa = \mu$.

Ο εκθέτης n είναι αδιάστατο μέγεθος και ονομάζεται δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς (**flow behavioral index**) του ρευστού. Ο δείκτης n λαμβάνει θετικές τιμές μικρότερες του ένα ($0 < n < 1$) και για τα νευτώνεια ρευστά ισούται με το 1. Όσο μεγαλύτερη είναι η απόκλιση του από τη μονάδα τόσο πιο έντονη είναι και η μη νευτώνεια συμπεριφορά του ρευστού.

Πίνακας 3: δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς και κατηγορίες ρευστών (Rao et al, 2005)

Δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς (n)	Κατηγορία Ρευστού
$n=1$	Νευτώνειο
$n<1$	Ψευδοπλαστικό (shear-thinning)
$n>1$	Διασταλτικό (shear-thickening)



Εικόνα 7: Καμπύλες ροής διαφόρων κατηγοριών ρευστών (Rao et al, 2005)

Διασταλτικά ρευστά: ονομάζονται τα μη νευτώνεια ρευστά το φαινόμενο ιξώδες των οποίων αυξάνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης (shear-thickening) (Παπαϊωάννου, 2002).

Ανεξάρτητα από το χρόνο μη- νευτώνεια ρευστά: Τα ρευστά αυτά σπάνια απαντώνται. Τέτοιου ίδους ρεολογική συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί σε κάποιες κατηγορίες μελιού και κάποια διαλύματα αμύλου. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα θιξοτροπικά και τα ρεοπηκτικά ρευστά. Στα θιξοτροπικά ρευστα, σε ένα συγκεκριμένο ρυθμό διάτμησης, το ιξώδες μειώνεται με το χρόνο, ενώ το ιξώδες των ρεοπηκτικών αυξάνεται με το χρόνο. Θιξοτροπική συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί στο συμπυκνωμένο γάλα. Ρεοπηκτική συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί σε ζελατινοποιημένα διαλύματα αμύλου (Rao et al, 2005).

Ιξωδοελαστικές ιδιότητες- Συντελεστες αποθήκευσης (G') και απώλειας (G'')

Τα ιδανικά στερεά υλικά παραμορφώνονται πεπερασμένα υπο την επίδραση μιας δύναμης και επανέρχονται όταν σταματήσει η εφαρμογή της δύναμης αυτής. Η συμπεριφορά αυτή ονομάζεται «ελαστική». Ένα μη ιδανικό ρευστό παραμορφώνεται και συνεχίζει να παραμορφώνεται όσο εφαρμόζεται η δύναμη. Το υλικό αυτό δεν επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση όταν η δύναμη σταματήσει να επιδρά. Η συμπεριφορά αυτή ονομάζεται «ιξώδης». Από ενεργειακή άποψη, υλικά με ελαστική συμπεριφορά παρουσιάζουν πλήρη ανάκτηση της ενέργειας που δαπανάται κατά την παραμόρφωση, ενώ τα ιξώδη υγρά παρουσιάζουν πλήρη απώλεια της ενέργειας, καθώς η ενέργεια αυτή διαχέεται ως θερμότητα. Η ιδανική ελαστική και η ιδανική ιξώδης συμπεριφορά, αντιστοιχούν σε δυο ακραίες αποκρίσεις υλικών σε εξωτερικές τάσεις, που αφορούν μόνο «ιδανικά» υλικά. Ωστόσο, τα πραγματικά υλικά, επιδεικνύουν μεγάλη ποικιλία αποκρίσεων μεταξύ της ιξώδους και της ελαστικής συμπεριφοράς. Κάποια υλικά, όπως τα περισσότερα τρόφιμα, επιδεικνύουν ταυτόχρονα ιξώδη και ελαστική συμπεριφορά και ονομάζονται «ιξωδοελαστικά».

Οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες των υλικών καθορίζονται μέσω δυναμικών δοκιμών (dynamic tests). Οι δυναμικές δοκιμές πραγματοποιούνται με εφαρμογή μικρής ημιτονοειδούς τάσης και μετρώντας το αποτέλεσμα αυτής. Οι τάσεις που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές αυτές, είναι πολύ μικρές (1-5%) ώστε να εξασφαλιστεί ότι η απόκριση του υλικού είναι στην γραμμική περιοχή.

Η απόκριση ενός γραμμικού ιξωδοελαστικού υλικού σε ημιτονοειδή τάση δίνεται ως:

$$\sigma(t) = \gamma_0 G'(\omega) \sin(\omega t) + \gamma_0 G''(\omega) \cos(\omega t)$$

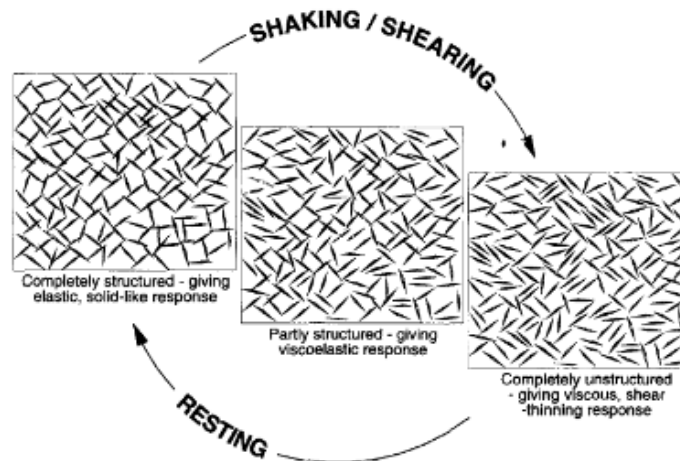
Οι εξαρτώμενες από την συχνότητα συναρτήσεις $G'(\omega)$ και $G''(\omega)$ ονομάζονται μέτρα αποθήκευσης (storage modulus) και απώλειας (loss modulus) αντίστοιχα. Ο συντελεστής αποθήκευσης (G') αντιστοιχεί στην ενέργεια που αποθηκεύεται και συνεπώς απελευθερώνεται ανά κύκλο παραμόρφωσης και ανα μονάδα όγκου και είναι η ιδιότητα που συσχετίζεται με την **ελαστική συμπεριφορά**. Ο συντελεστής απώλειας (G'') αντιστοιχεί στην ενέργεια που διαχέεται ως θερμότητα ανα κύκλο παραμόρφωσης και ανά μονάδα όγκου και είναι η ιδιότητα που σχετίζεται με την **ιξώδη συμπεριφορά**. Μια ακόμα, ευρέως χρησιμοποιούμενη δυναμική ιξωδοελαστική ιδιότητα, η εφαπτομένη απώλειας ($\tan\delta = G''/G'$), υποδηλώνει τη σχέση μεταξύ ιξωδών και ελαστικών συστατικών στην ιξωδοελαστική συμπεριφορά (Gunasekaran, Ak, 2000).

Στην περίπτωση των κλασικών ιξωδών ρευστών, οι συντελεστές G' και G'' εξαρτώνται από την συχνότητα (ω), ενώ ισχύει ότι $G' \ll G''$. Αντίθετα, στην περίπτωση των ιδανικών ελαστικών ρευστών (gel), το μέτρο αποθήκευσης (G') είναι ανεξάρτητο από τη συχνότητα και $G' \gg G''$ (Paakko et al., 2007).

Ακόμα, για στερεά που ακολουθούν το νόμο του Hook, είναι $\delta=0$ άρα και $G'=0$, καθώς δεν υπάρχει ιξώδης διάχυση την ενέργειας. Στην περίπτωση αυτή, ο συντελεστής αποθήκευσης (storage modulus) είναι σταθερός. Αν ένα υλικό συμπεριφέρεται ως νευτώνειο ρευστό, είναι $G'=0$, διότι το υλικό δεν αποθηκεύει ενέργεια. Τέλος, τα σημεία όπου $G'=G''$, είναι τα σημεία εκείνα στα οποία αλλάζει η συμπεριφορά του ρευστού από συμπεριφορά υγρού σε συμπεριφορά στερεού (Steffe J., 1996).

Θιξοτροπική συμπεριφορά

Θιξοτροπική συμπεριφορά παρουσιάζεται όταν το ιξώδες ενός ρευστού μειώνεται σημαντικά με το χρόνο διάτμησης και στη συνέχεια αυξάνεται σημαντικά όταν η δύναμη που προκαλεί τη ροή σταματήσει να δρα (Whelan, 1994).

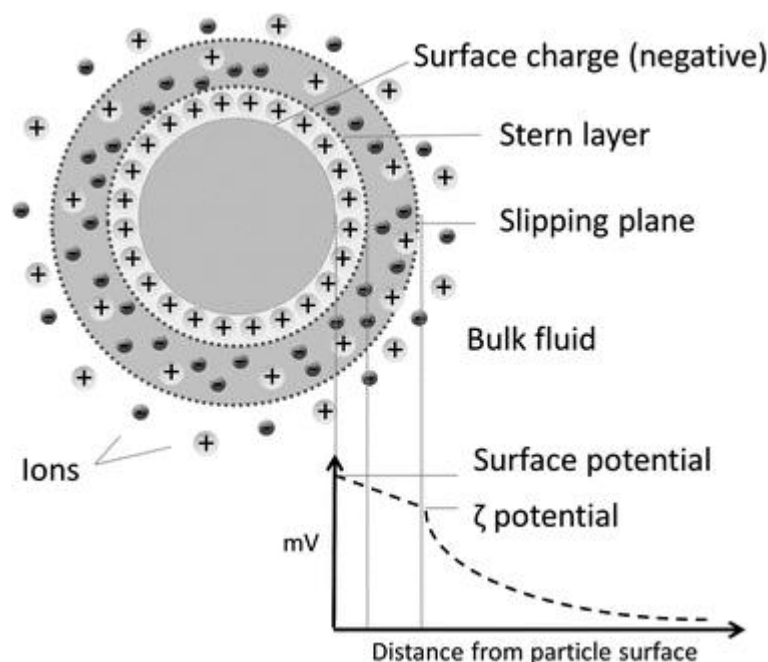


Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της θιξοτροπικής συμπεριφοράς (Barnes, 1997)

Η εξάρτηση από το χρόνο, είναι μια σημαντική ιδιότητα που πρέπει να διερευνάται για τους πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς επηρεάζει την ροή τους μέσω σωληνώσεων, τις εφαρμογές για επικαλύψεις, τη χρήση τους ως γαλακτωματοποιητές ή σταθεροποιητές κ.α. Εκτός από την εξάρτηση από το χρόνο, άλλη μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να εξετάζεται κατά τη μετρηση της θιξοτροπικής συμπεριφοράς των διαλυμάτων πολυσακχαριτών, είναι η υστέρηση που παρατηρείται μεταξύ των δύο καμπυλών (μείωσης ιξώδους και αύξησης ιξώδους). Μεγάλη υστέρηση μεταξύ των δύο καμπυλών, συνήθως οφείλεται σε δομικές αλλαγές των ρευστών κατά την επεξεργασία.

1.2.2 ζ-δυναμικό

Το ζ-δυναμικό είναι ένα μια ηλεκτρική ιδιότητα που διαθέτει κάθε σωματίδιο που βρίσκεται σε διασπορά. Πρακτικά, το ζ-δυναμικό αποτυπώνει την ηλεκτροστατική συνεισφορά στη σταθερότητα ενός γαλακτώματος και γι' αυτό αποτελεί μια από τις κύριες παραμέτρους που ελέγχονται για την σταθερότητα ενός διαλύματος. Επιπροσθέτως, μετράται πιο εύκολα από άλλες ηλεκτρικές ιδιότητες (όπως το ηλεκτρικό δυναμικό ή το επιφανειακό φορτίο) και για αυτό τα φορτία των σωματιδίων εντός ενός γαλακτώματος συνήθως χαρακτηρίζονται βάσει του ζ-δυναμικού. Ουσιαστικά, το ζ-δυναμικό αποτυπώνει την



Εικόνα 9: ζ- δυναμικό (Liese et al, 2013)

Το κάθε σωματίδιο, που έχει αρνητικό επιφανειακό φορτίο, περιβάλλεται από δύο περιοχές. Μια εσωτερική περιοχή, γύρω από το σωματίδιο, στην οποία τα ιόντα βρίσκονται ισχυρά συνδεδεμένα (stern layer) και μια εξωτερική περιοχή στην οποία τα ιόντα είναι λιγότερο ισχυρά συνδεδεμένα. Στην εξωτερική περιοχή, υπάρχει ένα όριο εντός του οποίου τα ιόντα και το σωματίδιο αποτελούν μια σταθερή ενότητα (slipping plane). **Η διαφορά δυναμικού που εμφανίζεται εντός του πεδίου αυτού, ονομάζεται ζ-δυναμικό** (Hunter, 1988). Το δυναμικό αυτό μεταβάλλεται ανάλογα με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου.

Αν σε μια διασπορά όλα τα σωματίδια διαθέτουν υψηλό αρνητικό ή θετικό ζ-δυναμικό, υπερισχύουν οι απωστικές δυνάμεις και έτσι δεν έχουν την τάση να πλησιάζουν και να ενωθούν. Αν όμως τα σωματίδια έχουν χαμηλό ζ-δυναμικό δεν υπάρχει δύναμη που να τα εμποδίζει να ενωθούν. Σύμφωνα με μελέτες, η διαχωριστική γραμμή μεταξύ σταθερών και μη σταθερών διαλυμάτων είναι στα +30 ή -30 mV. Αν τα ζ-δυναμικά είναι μεγαλύτερα του +30 ή μικρότερα του -30 το γαλάκτωμα θεωρείται σταθερό (Malvern Instruments).

Παράγοντες που επηρεάζουν το ζ-δυναμικό είναι:

- ✓ Το pH
- ✓ Η αγωγιμότητα
- ✓ Η συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή. (Hunter,2008)

1.2.3 Ικανότητα συγκράτησης νερού

Ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Holding Capacity, WHC) στα τρόφιμα ορίζεται η δυνατότητα του τροφίμου να συγκρατεί το ήδη υπάρχον αλλά και το προστιθέμενο νερό, κατά την εφαρμογή δυνάμεων, πίεσης, φυγοκέντρωσης ή θέρμανσης. Επίσης, η ικανότητα συγκράτησης νερού ορίζεται ως φυσική ιδιότητα και συγκεκριμένα ως η ικανότητα ενός τροφίμου να εμποδίζει το νερό από το να απελευθερωθεί από την τρισδιάστατη δομή του πολυσακχαρίτη.

Συνεπώς, το επίπεδο ενυδάτωσης των πολυσακχαριτών σχετίζεται με το ιξώδες υγρών συστημάτων τροφίμων. Η ικανότητα συγκράτησης νερού των πολυσακχαριτών σχετίζεται και με άλλες λειτουργικές ιδιότητες των τροφίμων, όπως είναι η διαλυτότητα, η ικανότητα δημιουργίας γαλακτώματος, το ιξώδες, η δημιουργία gel και η συναίρεση, ενώ επηρεάζει και την υφή του τελικού προϊόντος.

Η ικανότητα συγκράτησης νερού εξαρτάται από τη σύσταση και τη διαμόρφωση των μορίων του πολυσακχαρίτη. Το νερό αλληλεπιδρά με τους πολυσακχαρίτες με διάφορους τρόπους και σημαντικά ποσά νερού συνδεδεμένα με υδρόφιλα τμήματα των πολυσακχαριτών (π.χ. αμινο-ομάδες, υδροξυλ-ομάδες, καρβονυλ-ομάδες κ.α.) συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου.

Η ικανότητα ενός πολυσακχαρίτη να συγκρατεί νερό όταν υφίσταται διάφορες επεξεργασίες επηρεάζει σημαντικά κάποια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, όπως η υφή και η απελευθέρωση γεύσης και αρώματος (Fennema, 1996).

Παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα συγκράτησης νερού

- Συγκέντρωση πολυσακχαρίτη
- pH
- θερμοκρασία
- παρουσία άλλων συστατικών όπως υδρόφιλοι πολυσακχαρίτες, λιπίδια και άλατα
- ρυθμός και διάρκεια θερμικής επεξεργασίας
- συνθήκες αποθήκευσης (Zayas, 1997).

1.3 Όξινη υδρόλυση βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη, λόγω των ιδιοτήτων που διαθέτει, εκτός από τις διάφορες άλλες χρήσεις της, χρησιμοποιείται ευρέως ως σταθεροποιητής σε διάφορες περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων και των γαλακτωμάτων στα τρόφιμα.

Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην εφαρμογή αυτή της βακτηριακής κυτταρίνης, είναι επιθυμητή η μετατροπή των ινιδίων κυτταρίνης σε νανο-κρυστάλλους, οι οποίοι έχουν καλύτερη σταθεροποιητική δράση. Η μετατροπή των ινιδίων σε νανο-κρυστάλλους κυτταρίνης γίνεται μέσω όξινης υδρόλυσης, με τη χρήση πυκνών και ισχυρών οξέων, που επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στις μηχανικές της ιδιότητες (Chawla et al, 2009).

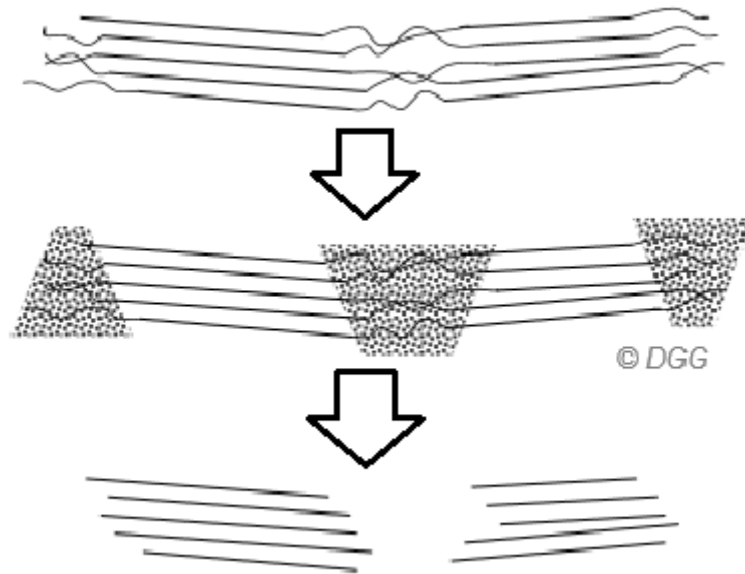
Στόχος της επεξεργασίας με οξέα είναι η δημιουργία υδατικών διαλυμάτων νανοκρυστάλλων κυτταρίνης που έχουν αρνητικά φορτία και συνεπώς δεν έχουν την τάση να συσσωματώνονται (Martinez- Sanz et al, 2011).

Τα οξέα που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης είναι το πυκνό θειικό (H_2SO_4) και το υδροχλωρικό (HCl), όμως χρησιμοποιούνται επίσης και το φωσφορικό (H_3PO_4) και το υδροβρωμικό οξύ (HBr) (Habibi et al, 2010). Συνήθως, η διαδικασία ολοκληρώνεται με φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση των δειγμάτων.

Η επίδραση της υδρόλυσης με πυκνό θειικό οξύ στο μέγεθος των ινιδίων της κυτταρίνης, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του '50 και από τότε, παράλληλα με την πρόοδο άλλων επιστημονικών πεδίων (π.χ. TEM), η υδρόλυση της κυτταρίνης έχει λάβει μεγάλο ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί σε βάθος.

1.3.1 Μηχανισμός όξινης υδρόλυσης-επίδραση στις ιδιότητες της κυτταρίνης

Η κύρια διεργασία για την απομόνωση νανο- κρυστάλλων από ινίδια κυτταρίνης βασίζεται στην όξινη υδρόλυση. Αποδιαταγμένες ή παρακρυσταλλικές περιοχές κυτταρίνης υδρολύονται πρώτες, ενώ οι κρυσταλλικές περιοχές που έχουν υψηλότερη αντίσταση στο οξύ, παραμένουν άθικτες, λόγω της διαφοράς στις κινητικές των αντιδράσεων ανάμεσα στις περιοχές αυτές της κυτταρίνης. Ακόμα, η όξινη υδρόλυση οδηγεί σε διαχωρισμό των δεσμών ινιδίων που δημιουργούνται στην ακατέργαστη βακτηριακή κυτταρίνη άρα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία λιγότερο πολύπλοκων δικτύων (Moon, Martini, Nairn, Simonsen & Youngblood, 2011).

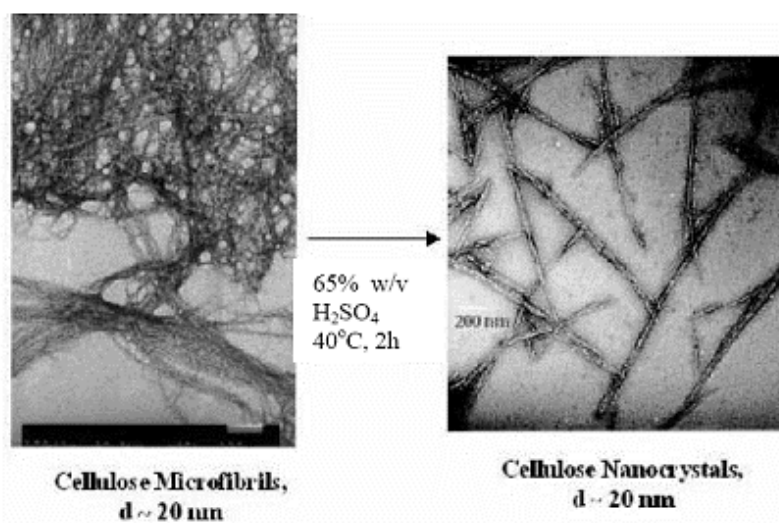


Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των αλλαγών που επιφέρει στη μορφολογία της κυτταρίνης η όξινη υδρόλυση (Gray,2011)

Όξινη υδρόλυση της βακτηριακή κυτταρίνης γίνεται συνήθως με χρήση θεικού ή υδροχλωρικού οξέος, ενώ έχει αναφερθεί και χρήση άλλων οξέων όπως το υδροβρωμικό.

Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης με θειικό οξύ γίνεται εστεροποίηση των επιφανειακών υδροξυλ-ομάδων της κυτταρίνης και κατά συνέπεια, θεικές ομάδες απελευθερώνονται στο διάλυμα. Οι αρνητικά φορτισμένες θειικές ομάδες οδηγούν στη δημιουργία σταθερότερων διαλυμάτων. Ωστόσο, η παρουσία τέτοιων ομάδων στην εξωτερική επιφάνεια του υλικού μειώνει τη θερμοσταθερότητά του (Martinez –Sanz et al, 2011).

Έτσι, συνέπεια της όξινης υδρόλυση είναι η παραγωγή ραβδόμορφων νανοκρυστάλλων. Αυτοί οι νανο-κρύσταλλοι έχουν παρόμοια μορφολογία και κρυσταλλικότητα με τις αρχικές ίνες κυτταρίνης, όμως διαθέτουν μικρότερο μέγεθος σε σχέση με τα αρχικά ινίδια, ενώ το τελικό τους μέγεθος εξαρτάται και από την προέλευση και τον τύπο της κυτταρίνης (Tingaut et al,2012).



Εικόνα 11: Διαφορές στη μορφολογία ινιδίων κυτταρίνης μετά την όξινη υδρόλυση (Winter, 2007)

1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την όξινη υδρόλυση

Οι τυπικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή νανο- κρυστάλλων κυτταρίνης, περιλαμβάνουν υδρόλυση της κυτταρίνης με ισχυρό οξύ υπό αυστηρά **ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, ανάδευσης και χρόνου**. Επίσης, σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της υδρόλυσης είναι η φύση του οξέος, η αναλογία οξέος/ κυτταρίνης και η προέλευση της κυτταρίνης.

1. Θερμοκρασία- Χρόνος

Η **θερμοκρασία** στην οποία λαμβάνει χώρα η υδρόλυση μπορεί να ποικίλει από θερμοκρασία δωματίου έως και τους 70°C, ενώ ο αντίστοιχος **χρόνος** της υδρόλυσης μπορεί να ποικίλει από 30 λεπτά έως και 72 ώρες, ανάλογα με τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται δεδομένα για επεξεργασία με οξέα σε θερμοκρασίες 50°C για 69h (Martinez- Sanz et al, 2011) , 100°C για 5 180 min (Shibazaki et al, 1995), .

2. Φύση οξέος

Εάν οι νανο-κρύσταλλοι παράγονται με χρήση **υδροχλωρικού οξέος** η ικανότητα διασποράς τους είναι περιορισμένη και τα υδατικά τους διαλύματα τείνουν να παρουσιάζουν κροκίδωση. Όμως, αν χρησιμοποιείται **θειικό οξύ**, αυτό αντιδρά με τις επιφανειακές υδροξυλ-ομάδες της κυτταρίνης, παράγοντας αρνητικά φορτισμένους επιφανειακούς θειικούς εστέρες που ενισχύουν την διασπορά των νανο-κρυστάλλων στην υδατική φάση και μειώνουν την τάση κροκίδωσης. Ωστόσο, οι νανο-κρύσταλλοι που παράγονται με αυτό τον τρόπο έχουν περιορισμένη θερμοσταθερότητα.

Ακόμα, ανάλογα με το οξύ το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την όξινη υδρόλυση, έχουν παρουσιαστεί διαφορές στα ρεολογικά χαρακτηριστικά των διαλυμάτων. Έτσι, νανο-κρύσταλλοι που προέρχονται από επεξεργασία με θειικό οξύ επιδεικνύουν ιξώδες ανεξάρτητο του χρόνου, ενώ νανο-κρύσταλλοι που προέρχονται από υδροχλωρικό οξύ έχουν θιξοτροπική συμπεριφορά (ανάλογα με τη συγκέντρωση τους). Επεξεργασία με συνδιασμό θειικού και υδροχλωρικού οξέος, φαίνεται να οδηγεί στη δημιουργία σφαιρικών νανο-κρυστάλλων κυτταρίνης, όταν γίνεται υπό την επίδραση υπερήχων. (Habibi et al, 2010).

3. Συγκέντρωση οξέος

Συνήθως, χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα θειικού οξέος (95-97%) σε περιεκτικότητες της τάξεως του 50- 65% (wt) (Habibi et al, 2010).

Συγκεκριμένα, στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται δεδομένα για επεξεργασία με θειικό οξύ 65% w/v σε 50°C για 69h (Martinez- Sanz et al, 2011) , με 2N υδροχλωρικό οξύ σε 100°C για 5- 180 min (Shibazaki et al, 1995) κ.α. Σε όλες τις περιπτώσεις, η επεξεργασία της βακτηριακής κυτταρίνης με ισχυρά οξέα οδήγησε στη δημιουργία νανοκρυστάλλων κυτταρίνης, με σημαντικά μειωμένο μήκος και πλάτος, με λιγότερες δέσμες ινιδίων και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βελτιωμένη σταθερότητα, μικρότερο ιξώδες κλπ).

1.4 Επίδραση υπερήχων στις ιδιότητες πολυσακχαριτών

Η τεχνολογία των υπερήχων, αφορά ηχητικά κύματα πέραν της συχνότητας που μπορεί να ακούσει το ανθρώπινο αυτί (>20 kHz). Όταν τα υπερηχητικά κύματα διέρχονται μέσα από ένα υγρό μέσο, το υγρό και ο διαλυμένος αέρας, δημιουργούν ένα φαινόμενο γνωστό ως **ακουστική σπηλαίωση** (acoustic cavitation). Εν συντομία, διαλυμένα μόρια αέρα ταλαντώνονται υπό την επίδραση του ακουστικού πεδίου λόγω της μεταβολής της πίεσης γύρω τους. Κατά την διάρκεια της ταλάντωσης, διαλυμένος αέρας και ατμός διαχέονται

εντός και εκτός των φυσαλίδων. Αυτή η διάχυση του αέρα εντός και εκτός των φυσαλίδων, οδηγεί αύξηση του μεγέθους των φυσαλίδων, μέχρι ένα μέγιστο μέγεθος εντός ενός ακουστικού κύκλου. Στη συνέχεια, γίνεται βίαιη κατάρρευση των φυσαλίδων, που οδηγεί σε ανάπτυξη υψηλής θερμοκρασίας. Ακόμα, το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης οδηγεί και στη δημιουργία φυσικών δυνάμεων όπως διατμητικές δυνάμεις, κύματα (shock waves) και τυρβώδεις δυνάμεις. Αυτές οι φυσικές δυνάμεις, καθώς και οι χημικές αντιδράσεις που προκαλούνται είναι χρήσιμες σε πολλές εφαρμογές, όπως η ομογενοποίηση γαλακτωμάτων, το φιλτράρισμα, η μετατροπή ιζώδους κ.α. (Chandrapala et al, 2012).

Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης των υπερήχων σε τεχνολογικές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων είναι η δυνατότητα ελεγχόμενης διαφοροποίησης της λειτουργικότητας του τροφίμου, χωρίς να επέρχονται αλλαγές στη χημική του σύσταση. Ακόμα, η τεχνολογία υπερήχων έχει θετική απήχηση στο καταναλωτικό κοινό, καθώς τα υπερηχητικά κύματα γενικά θεωρούνται ασφαλή, μη τοξικά και φιλικά προς το περιβάλλον (Barbosa-Cánovas et al, 2011). Η χρήση υπερήχων για την ομογενοποίηση γαλακτωμάτων, πέρα από τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, διαθέτει και άλλα πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων ομογενοποίησης που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία:

- Παραγωγή γαλακτωμάτων με μικρότερο μέγεθος σωματιδίων και στενότερη κατανομή μεγέθους σωματιδίων.
- Γαλακτώματα μεγαλύτερης σταθερότητας
- Απαιτείται μικρότερη ποσότητα σταθεροποιητών ή γαλακτωματοποιητών σε σχέση με άλλες μεθόδους,
- Μικρή κατανάλωση ενέργειας
- Μικρό κόστος παραγωγής
- Μικρότερος κίνδυνος επιμόλυνσης
- Συσκευές εύκολες στη χρήση, τον καθαρισμό και τον έλεγχο (Abbas et al, 2013).

Η επεξεργασία με υπερήχους επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία και κατ' επέκταση και στις ιδιότητες των πολυσακχαριτών, χωρίς όμως να αλλάζει οτιδήποτε στη χημική σύστασή τους. Έχει παρατηρηθεί ότι επεξεργασία με υπερήχους επιφέρει αλλαγές στο μέγεθος των πολυσακχαριτών (Tischer, Westfahl, Tischer & Sierakowski, 2010), αύξηση του αρνητικού τους φορτίου (Lee, Quero, Blaker, Hill, Eichhorn & Bismarck, 2011) και μείωση του ιζώδους.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα ινίδια κυτταρίνης αποτελούνται από δύο διαφορετικές περιοχές, μια έντονα κρυσταλλική περιοχή (crystalline- cellulose I) και μια άμορφη περιοχή (Chawla, 2008). Η επεξεργασία με υπερήχους αυξάνει την κρυσταλλικότητα της βακτηριακής κυτταρίνης, καθώς η άμορφη περιοχή μετατρέπεται σε κρυσταλλική, λαμβάνοντας την απαραίτητη ενέργεια ενεργοποίησης από το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης που λαμβάνει χώρα όταν οι υπέρηχοι διέρχονται δια μέσου της βακτηριακής κυτταρίνης (Tischer, Westfahl, Tischer & Sierakowski, 2010). Έτσι, τα άμορφα τμήματα γίνονται κρυσταλλικά και συνδέονται με τα αντίστοιχα τμήματα των γειτονικών μικρο-ινιδίων.

Οι τροποποιήσεις αυτές, εξαρτώνται από το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η κυτταρίνη υφίσταται επεξεργασία σε συσκευή υπερήχων.

1.5 Γαλακτώματα

Ένα γαλάκτωμα αποτελείται από δύο μη αναμίξιμα υγρά, από τα οποία το ένα βρίσκεται σε διασπορά ως μικρά σφαιρικά σταγονίδια εντός του άλλου υγρού (Mc Clements, 2007; Virangkumar et al, 2013).

Τα γαλακτώματα βρίσκουν εφαρμογή σε πολλές βιομηχανίες όπως οι φαρμακευτικές, οι βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, οι γεωργικές βιομηχανίες κ.α. Ειδικά στην βιομηχανία τροφίμων, τα γαλακτώματα παίζουν σημαντικό ρόλο ως βάση για τρόφιμα που περιέχουν νερό και έλαια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα γαλακτωμάτων σε τρόφιμα είναι τα γαλακτοκομικά, οι σάλτσες, η μαγιονέζα, η μαργαρίνη κ.α.

Σε συστήματα τροφίμων χρησιμοποιούνται κυρίως γαλακτώματα ελαίου σε νερό (O/W). Συχνά χρησιμοποιούνται ως συστήματα μεταφοράς υδρόφοβων θρεπτικών συστατικών ή φαρμάκων (Scholten et al, 2014).

1.5.1 Κατηγοριοποίηση γαλακτωμάτων

➤ **Ανάλογα με την κατανομή των δύο φάσεων**

Ένα γαλάκτωμα αποτελούμενο από λιποσφαίρια διασπαρμένα σε μια υδατική φάση ονομάζονται **oil in water (O/W)**, π.χ. γάλα, κρέμα, παγωτό, σάλτσες, μαγιονέζα, αναψυκτικά, σουπές κ.α. Ένα γαλάκτωμα που αποτελείται από σταγονίδια νερού διασπαρμένα σε ελαιώδη φάση αναφέρονται ως **water in-oil (W/O)**, π.χ. βούτυρο, μαργαρίνη. κ. α.

Το υλικό που δημιουργεί τα σταγονίδια αναφέρεται ως η «διασπαρμένη φάση», «ασυνεχής φάση» ή «εσωτερική φάση», ενώ το υλικό που αποτελεί την περιβάλλουσα φάση ονομάζεται «φάση διασποράς», «συνεχής φάση» ή «εξωτερική φάση».

Ακόμα, είναι δυνατή η δημιουργία διπλών γαλακτωμάτων, όπως oil-in-water-in-oil (O/W/O), water-in-oil-in-water (W/O/W), oil-in-water-in-water (O/W/W).

➤ **Ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων της διασπαρμένης φάσης**

Τα γαλακτώματα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων της φάσης που βρίσκεται σε διασπορά:

Πίνακας 4: Κατηγοριοποίηση γαλακτωμάτων

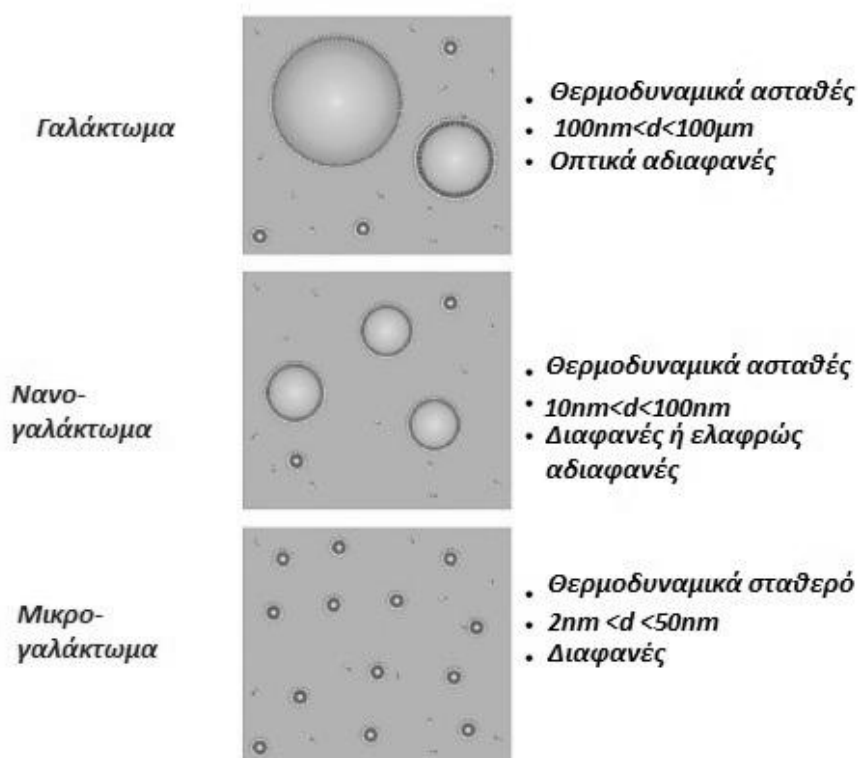
Μέγεθος σωματιδίων	Είδος γαλακτώματος
0.5-100μm	Μακρογαλακτώματα
100-1000nm	Νανογαλακτώματα
10-100nm	Μακρογαλακτώματα

Ένα **τυπικό γαλάκτωμα** έχει σταγονίδια με μέση διάμετρο μεταξύ 100nm και 100μm. Αυτό το είδος γαλακτώματος είναι θερμοδυναμικά ασταθές λόγω της σχετικά μεγάλης ελεύθερης ενέργειας (διεπιφανειακή τάση), που είναι αποτέλεσμα της επαφής μεταξύ των δύο φάσεων. Τα τυπικά γαλακτώματα τείνουν να είναι οπτικώς αδιαφανή, καθώς τα σταγονίδια έχουν διαστάσεις όμοιες με το μήκος κύματος του φωτός και έτσι σκεδάζουν το φως σε μεγάλο βαθμό.

Τα **νανο-γαλακτώματα** περιέχουν σωματίδια με μέση διάμετρο μεταξύ 10 και 100 nm. Τα γαλακτώματα αυτά είναι αδιαφανή, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα τυπικά γαλακτώματα. Ακόμα, το μικρό μέγεθος σωματιδίων συνεπάγεται ότι έχουν πολύ

μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι του διαχωρισμού λόγω βαρύτητας και συσσωμάτωσης σε σχέση με τα τυπικά γαλακτώματα. Ωστόσο, αυτά τα συστήματα εξακολουθούν να είναι θερμοδυναμικώς ασταθή, εφόσον οι δύο διακριτές φάσεις έχουν χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια από τις γαλακτωματοποιημένες φάσεις.

Τα **μικρο-γαλακτώματα** είναι θερμοδυναμικά σταθερά συστήματα που συνήθως περιέχουν σταγονίδια με διάμετρο μεταξύ 2 και 50 nm. Σε αυτή την περίπτωση, η ελεύθερη ενέργεια του μικρογαλακτώματος είναι μικρότερη από αυτή που διαθέτει το σύστημα όταν οι δύο φάσεις είναι διακριτές. Συνεπώς, τα μικρογαλακτώματα τείνουν να σχηματίζονται αυθόρμητα. Τα μικρογαλακτώματα είναι συνήθως διαφανή, ενώ τα σταγονίδια τους μπορεί να είναι σφαιρικού ή ελλειπτικού σχήματος, σε αντίθεση με τα νανογαλακτώματα που περιέχουν σωματίδια μόνο σφαιρικού σχήματος (McClements, 2011).



Εικόνα 12: Διαφορές τυπικών γαλακτωμάτων, νανο-γαλακτωμάτων και μικρο-γαλακτωμάτων (Piorkowski, 2014)

1.5.2 Σταθεροποιητές

Όπως προαναφέρθηκε, σε ένα τυπικό γαλάκτωμα, η συνολική διεπιφανειακή περιοχή επαφής των δύο φάσεων είναι πολύ μεγάλη και εφόσον συνδέεται με θετική ελεύθερη ενέργεια, **τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικώς εξαιρετικά ασταθή**. Έτσι, έχουν την τάση να διαχωρίζονται με την πάροδο του χρόνου. Συνεπώς, η δημιουργία γαλακτωμάτων που είναι κινητικώς σταθερά μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα είναι μεγάλης πρακτικής σημασίας για τη βιομηχανία τροφίμων.

Η δημιουργία τέτοιων γαλακτωμάτων απαιτεί την ενσωμάτωση ουσιών που ονομάζονται **«σταθεροποιητές»** (stabilizers). Οι σταθεροποιητές κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον μηχανισμό λειτουργίας τους είτε σε «γαλακτωματοποιητές» (emulsifiers) ή «τροποποιητές υφής» (texture modifiers).

- Οι **γαλακτωματοποιητές** είναι ουσίες που προσροφώνται στην επιφάνεια των σταγονιδίων του γαλακτώματος, σχηματίζοντας ένα προστατευτικό κάλυμα, το οποίο λειτουργεί ως ενεργειακό φράγμα και εμποδίζει τα σταγονίδια να συσσωματώνονται. Ως γαλακτωματοποιητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, φωσφολιπίδια, μικρά μόρια και στερεά σωματίδια. Οι γαλακτωματοποιητές, έχουν ακόμα τη δυνατότητα να μειώνουν την διεπιφανειακή τάση και συνεπώς διευκολύνουν την αποδόμηση των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων κατά την ομογενοποίηση, κάτι που βοηθά το σχηματισμό γαλακτωμάτων που περιέχουν μικρότερα σταγονίδια.

- Οι **μετατροπείς υφής** είναι ουσίες που είτε αυξάνουν το ιξώδες της συνεχούς φάσης (“thickening agent”) είτε σχηματίζουν ένα πλέγμα/gel εντός της συνεχούς φάσης (“gelling agent”), καθυστερώντας την κίνηση των σταγονιδίων λόγω της βαρύτητας. Πολλοί τύποι πολυσακχαριτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μετατροπείς υφής, όπως το άμυλο, η κυτταρίνη ή τροποποιημένη κυτταρίνη, η πηκτίνη, η καραγενάνη, η πρωτεΐνη αυγού και η πρωτεΐνη σόγιας (Claesson et al, 2010 ; Mc Clements,2007; Dickinson,2010).

Η προσθήκη τέτοιων ουσιών στα γαλακτώματα έχει σημαντική επίδραση τόσο στην ρεολογική συμπεριφορά, όσο και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των γαλακτωμάτων.

1.5.3 Σταθερότητα Γαλακτωμάτων

Ως **σταθερότητα γαλακτώματος** ορίζεται η δυνατότητα του γαλακτώματος να αντιστέκεται σε αλλαγές των ιδιοτήτων του με την πάροδο του χρόνου. Ένα γαλάκτωμα γίνεται ασταθές λόγω διαφόρων φυσικών και χημικών διεργασιών. Η φυσική αστάθεια οδηγεί σε αλλαγές στην κατανομή στο χώρο ή την δομή των σωματιδίων, ενώ η χημική αστάθεια οδηγεί σε μεταβολή του είδους των μορίων,π.χ. λόγω οξειδωσης ή υδρόλυσης (McClements, 2005).

Αναφορικά με την σταθερότητα ενός γαλακτώματος είναι σημαντικό να διακρίνεται η θερμοδυναμική σταθερότητα (που εξετάζει αν μια διεργασία έχει την τάση να διεξαχθεί ή όχι) από την κινητική σταθερότητα (που εξετάζει με ποιο ρυθμό θα διεξαχθεί η διεργασία). Θερμοδυναμικά, ο σχηματισμός ενός σταθερού γαλακτώματος δεν ευνοείται, λόγω της αύξησης της διεπιφανειακής περιοχής μετά την γαλακτωματοποίηση (McClements, 2005). Για το λόγο αυτό απαιτείται να προσδοθεί ενέργεια στα συστατικά του γαλακτώματος ώστε αυτό να σχηματιστεί, ενώ υπάρχει πάντα η τάση για αποσταθεροποίηση του.

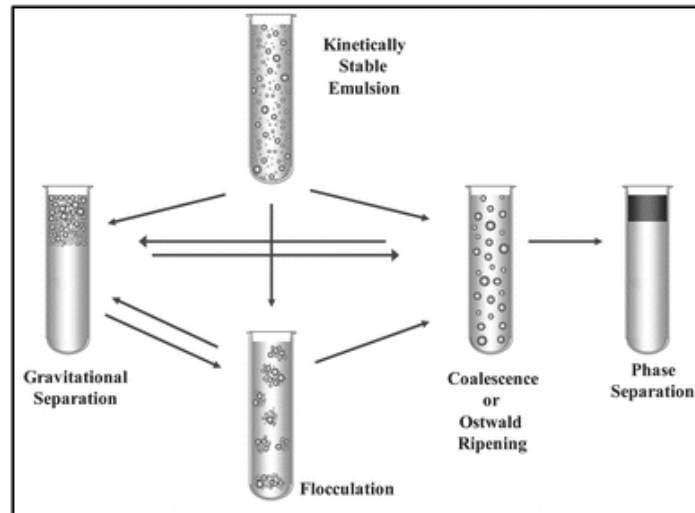
Παράμετροι που επηρεάζουν την σταθερότητα των γαλακτωμάτων είναι:

- η συγκέντρωση των σωματιδίων που βρίσκονται σε διασπορά εντός της υδατικής φάσης
- η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων
- το ηλεκτρικό φορτίο των σωματιδίων
- η πυκνότητα των δύο διαφορετικών φάσεων
- τα ρεολογικά χαρακτηριστικά της υδατικής φάσης
- οι κολλοειδείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων (Chanamai et al, 2000; McClements, 2007).

1.5.3.1 Μηχανισμοί αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων

Οι κύριοι μηχανισμοί (φυσικής) αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων είναι:

1. Η κορύφωση (creaming)
2. Η καθίζηση (sedimentation)
3. Η κροκίδωση (flocculation)
4. Η συνάθροιση (coalescence)
5. Η μερική συνάθροιση (partial coalescence)
6. Η ωρίμανση Ostwald (Ostwald ripening)



Εικόνα 13: Αποσταθεροποίηση γαλακτωμάτων (McClements, 2011)

Αποσταθεροποίηση υπό την επίδραση βαρυτικών δυνάμεων (gravitational separation)

Στα γαλακτώματα, τα σωματίδια που βρίσκονται σε διασπορά εντός της υδατικής φάσης, έχουν διαφορετική πυκνότητα από το υγρό που τα περιβάλλει (υδατική φάση). Αν τα σωματίδια έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από την υδατική φάση, συγκεντρώνονται στο κάτω μέρος του δοχείου (**καθίζηση**).

Αντίθετα, αν έχουν μικρότερη πυκνότητα από το υγρό, τείνουν να συγκεντρώνονται στο πάνω μέρος του δοχείου (**κορύφωση**). Το φαινόμενο της κορύφωσης παρατηρείται στα περισσότερα γαλακτώματα που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, καθώς τα βρώσιμα έλαια έχουν μικρότερη πυκνότητα από το νερό (McClements, 2007).

Η τάση κορύφωσης ή καθίζησης των σωματιδίων ενός γαλακτώματος δίνεται από την εξίσωση Stokes:

$$v_{\text{Stokes}} = -\frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta_1}$$

Όπου: u_{Stokes} : η ταχύτητα κορύφωσης ή καθίζησης (εξαρτάται από το πρόσημο), r : η ακτίνα του σωματιδίου, g : η επιτάχυνση της βαρύτητας, ρ : η πυκνότητα, η : το ιξώδες και οι δείκτες 1 και 2 αναφέρονται στη συνεχή και τη διασπαρμένη φάση αντίστοιχα (McClements, 2005).

Το φαινόμενο της κορύφωσης οδηγεί στη δημιουργία ορού στο γαλακτώμα, ο οποίος αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Η εκταση της κορύφωσης που λαμβάνει χώρα σε ένα γαλακτώμα, ποσοτικοποιείται με τον «**δείκτη κορύφωσης**» (Serum Index) και μετράται με τη μέθοδο σκέδασης του φωτός (light scattering).

Αποσταθεροποίηση λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σωματιδίων

Τα σωματίδια που βρίσκονται εντός της υδατικής φάσης, κινούνται συνεχώς υπό την επίδραση διαφόρων δυνάμεων και έχουν την τάση να συγκρούονται με τα γειτονικά σωματίδια. Ως συνέπεια αυτών των συγκρούσεων, τα σωματίδια είτε χωρίζονται ξανά είτε μετατρέπονται σε συσσωματώματα, ανάλογα με τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (McClements, 2005). Οι κύριοι τύποι συσσωμάτωσης είναι η κροκίδωση (flocculation) και η συνάθροιση (coalescence).

Κροκίδωση (Flocculation)

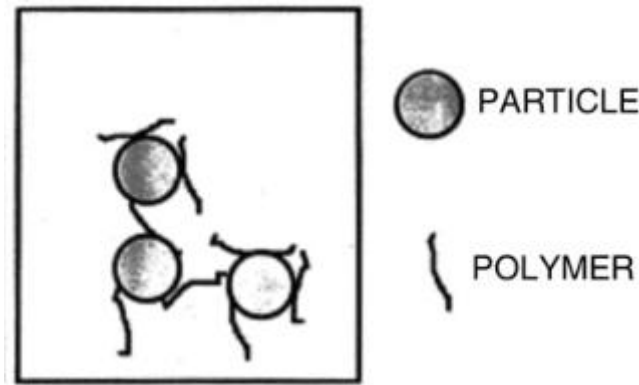
Κροκίδωση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο δύο ή περισσότερα σωματίδια συνδέονται μεταξύ τους, παραμένοντας πολύ κοντά, χωρίς όμως να συνενώνονται ώστε να αποτελέσουν ένα σωματίδιο, ενώ το κάθε ένα διατηρεί τις ιδιότητες του. Το φαινόμενο αυτό επιδρά συνήθως αρνητικά στις ιδιότητες του γαλακτώματος, όπως η εμφάνιση, η ρεολογία (συνήθως αύξηση ιξώδους) και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η κροκίδωση είναι επιθυμητή (π.χ. σε κάποια αναψυκτικά) (Chanamai et al, 2000).

Η τάση για κροκίδωση σε ένα γαλάκτωμα εξαρτάται από τις ελκτικές και απωστικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων. Ανάλογα με την πυκνότητα των σωματιδίων, η αποσταθεροποίηση ενός γαλακτώματος λόγω κροκίδωσης πολλές φορές συνδυάζεται και με τα φαινόμενα της κορύφωσης (creaming) ή της καθίζησης (sedimentation).

Υπάρχουν δύο κατηγορίες κροκίδωσης, ανάλογα με την ισχύ των δυνάμεων που εμφανίζονται μεταξύ των σωματιδίων: **κροκίδωση λόγω γεφύρωσης (bridging flocculation)** και η **οσμωτική κροκίδωση (depletion flocculation)**. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων του γαλακτώματος εξαρτώνται από την παρουσία γαλακτωματοποιητή, κατά συνέπεια και το ποια από τις δύο κατηγορίες κροκίδωσης θα παρατηρηθεί σε ένα γαλάκτωμα, εξαρτάται από τη συγκέντρωση, το είδος του γαλακτωματοποιητή και το φορτίο του. Έτσι, αν η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή είναι χαμηλή παρατηρείται κροκίδωση γεφύρωσης (bridging flocculation), ενώ αν η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή είναι υψηλή παρατηρείται οσμωτική κροκίδωση (depletion flocculation).

➤ Κροκίδωση λόγω γεφύρωσης (bridging flocculation)

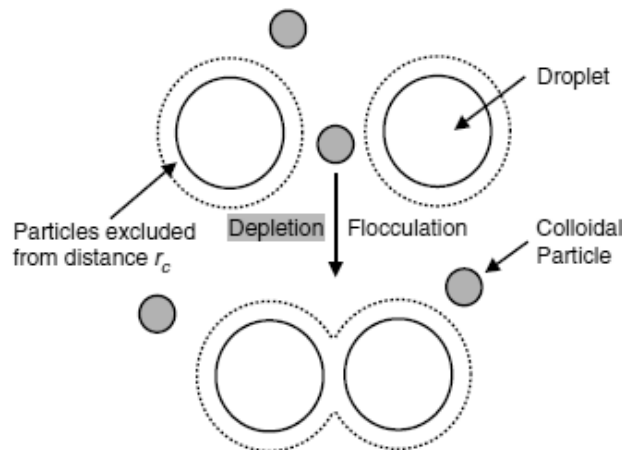
Γενικά, η κροκίδωση λόγω γεφύρωσης συνδέεται με ισχυρά ελκτικές δυνάμεις, σε αντίθεση με την οσμωτική κροκίδωση. Το φαινόμενο αυτό, λαμβάνει χώρα όταν δεν υπάρχει αρκετή πρωτεΐνη (γαλακτωματοποιητής) διαθέσιμη κατά την γαλακτωματοποίηση ώστε να καλυφθούν πλήρως οι εξωτερικές επιφάνειες όλων των σωματιδίων. Έτσι, τα πρωτεϊνικά μόρια ή σύμπλοκα τελικά μοιράζονται μεταξύ δύο γειτονικών σωματιδίων (Dickinson 2010; Dickinson 2012).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού κροκίδωσης γεφύρωσης (bridging flocculation) (Garti et al, 2013)

➤ **Οσμωτική Κροκίδωση (Depletion flocculation)**

Η κροκίδωση αυτού του είδους παρατηρείται λόγω της παρουσίας πλεονάσματος μη-προσοφημένων πολυμερών με τη μορφή διακριτών νανοσωματιδίων στην υδατική φάση (Dickinson 2010). Συνέπεια της μεγάλης συγκέντρωσης γαλακτωματοποιητή είναι η αύξηση των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των σωματιδίων. Αυτές οι ελκτικές δυνάμεις, αυξάνονται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση κολλοειδών σωματιδίων, έως ότου τελικά να ξεπεραστούν οι απωστικές δυνάμεις και τα σωματίδια να συνενωθούν (κροκίδωση).



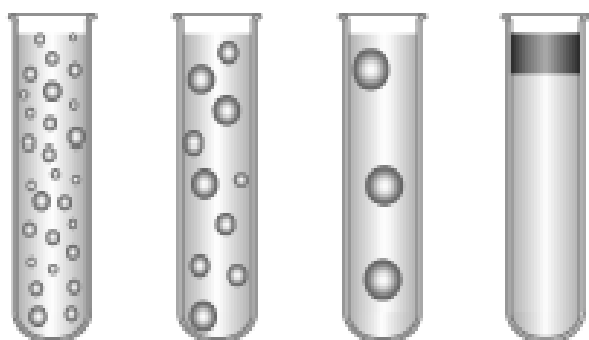
Εικόνα 15: Μηχανισμός οσμωτικής κροκίδωσης (McClements, 2005)

Συνάθροιση (Coalescence)

Συνάθροιση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο δύο ή περισσότερα σωματίδια του γαλακτώματος ενώνονται σχηματίζοντας μεγαλύτερα σωματίδια. Το φαινόμενο της συνάθροισης αν αφεθεί να εξελιχθεί για κάποιο χρονικό διάστημα, προκαλεί το διαχωρισμό του γαλακτώματος σε δύο φάσεις (έλαιο και νερό). Η συνάθροιση οφείλεται στη λέπτυνση του «φιλμ» υγρού που υπάρχει ανάμεσα στα σωματίδια με αποτέλεσμα αυτά να υπερνικούν τις απωστικές δυνάμεις και τελικά να πλησιάσουν τόσο ώστε να αποτελέσουν ένα σωματίδιο. (Tadros, 2013)

Η διεργασία αυτή, ευνοείται θερμοδυναμικά, καθώς έτσι το σύστημα οδεύει προς μια πιο σταθερή κατάσταση, καθώς μειώνεται η επιφάνεια επαφής μεταξύ των δύο φάσεων. Ακόμα, το μέγεθος των σωματιδίων αυξάνεται, συνεπώς, η συγχώνευση ακολουθείται από την εμφάνιση κορύφωσης ή καθίζησης.

Το φαινόμενο της συνάθροισης (όπως και η κροκίδωση) μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση κατάλληλου γαλακτωματοποιητή, ο οποίος δεν επιτρέπει στα σωματίδια να έρθουν σε επαφή μεταξύ τους.



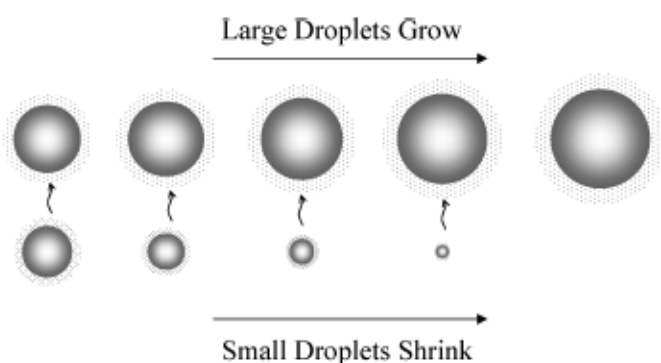
Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της συγχώνευσης σωματιδίων γαλακτωμάτων τύπου O/W (McClements, 2007)

Μερική συνάθροιση (Partial Coalescence)

Το φαινόμενο της μερικής συνάθροισης σωματιδίων συμβαίνει όταν δύο ή περισσότερα σωματίδια λιπιδίων ενός γαλακτώματος έρχονται σε στενή επαφή και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο ακανόνιστου σχήματος. Το φαινόμενο αυτό, αφορά κυρίως γαλακτοκομικά προϊόντα λόγω της μερικής κρυσταλλικότητας των μορίων του λίπους του γάλακτος (McClements, 2007).

Ωρίμανση Ostwald (Ostwald Ripening)

Η ωρίμανση κατά Ostwald, αφορά στην εξαφάνιση των μικρών σωματιδίων λόγω διάλυσης και απόθεσης πάνω στα μεγαλύτερα σωματίδια. Αίτιο αυτού του φαινομένου είναι η διαφορά διαλυτότητας μεταξύ των μικρών και των μεγαλύτερο σωματιδίων. Καθώς τα μικρότερα σωματίδια έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα, με την πάροδο του χρόνου διαλύονται και τα μόρια τους διαχέονται στην υδατική φάση και στη συνέχεια εναποθέτονται επάνω στα μεγαλύτερα σωματίδια. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η αύξηση της κατανομής μεγέθους σωματιδίων (Tadros, 2013) .

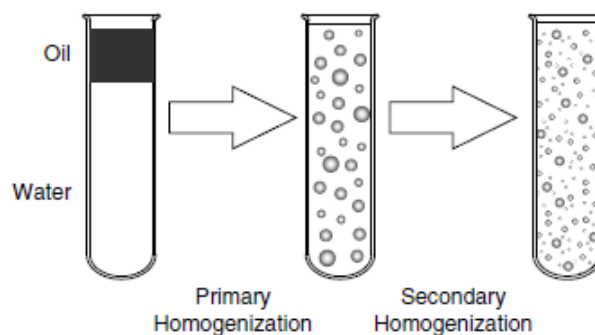


Εικόνα 17: Ωρίμανση Ostwald (Ostwald Ripening) (McClements, 2005)

1.6 Ομογενοποίηση

Η διεργασία μετατροπής ελαίου και νερού σε γαλάκτωμα ή της μείωσης του μεγέθους των σταγονιδίων σε ένα ήδη υπάρχον γαλάκτωμα, ονομάζεται «**ομογενοποίηση**» και επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής έντονης μηχανικής ανάδευση σε ένα υγρό μίγμα με χρήση συσκευών που ονομάζονται ομογενοποιητές (McClements, 2007). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές που ονομάζονται **ομογενοποιητές**. Η ομογενοποίηση ενός γαλακτώματος, μπορεί να γίνεται σε ένα ή δύο στάδια ανάλογα με τη φύση του αρχικού υλικού αλλά και τη μέθοδο που χρησιμοποιείται.

Ανάλομα με τη φύση του αρχικού υλικού, η ομογενοποίηση διακρίνεται σε δύο κατηγορίες. Η δημιουργία γαλακτωμάτων απευθείας από δύο διακριτά μη αναμείξιμα υγρά καλείται **πρωτογενής** (primary) ομογενοποίηση, ενώ η μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων ενός ήδη υπάρχοντος γαλακτώματος καλείται **δευτερογενής** (secondary) ομογενοποίηση.



Εικόνα 18: Πρωτογενής και δευτερογενής ομογενοποίηση γαλακτωμάτων (McClements,2005)

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, είναι αδύνατο από την πρωτογενή ομογενοποίηση να προκύψει γαλάκτωμα με τις επιθυμητές ιδιότητες. Συνεπώς, γίνεται ομογενοποίηση δύο σταδίων: αρχικά οι ξεχωριστές φάσεις ελαίου και νερού αναμειγνύονται σε ένα αρχικό γαλάκτωμα (coarse emulsion) που περιέχει μεγάλα σωματίδια, με τη χρήση ενός τύπου ομογενοποιητή (π.χ. αναδευτήρα μεγάλης ταχύτητας) και στη συνέχεια το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται, χρησιμοποιώντας έναν άλλο τύπο ομογενοποιητή (π.χ. υψηλής πίεσης, υπερήχων κ.α.).

1.6.1 Μέθοδοι ομογενοποίησης

Ανάλογα με τις ιδιότητες των μη αναμείξιμων ρευστών αλλά και τις επιθυμητές τελικές ιδιότητες του γαλακτώματος χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι ομογενοποιητών. Η επιλογή του κατάλληλου ομογενοποιητή γίνεται ανάλογα με τη φύση των μη αναμείξιμων ρευστών, την ποσότητα και τη φύση του γαλακτώματος κ.α. Οι ευρύτερα διαδεδομένες συσκευές είναι οι αναδευτήρες υψηλής ταχύτητας, οι μύλοι κολλοειδών, οι ομογενοποιητές υψηλής πίεσης, οι ομογενοποιητές υπερήχων, οι μικρορευστοποιητές και οι ομογενοποιητές μεμβρανών (McClements, 2005), όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5: Βασικοί τύποι ομογενοποιητών και χαρακτηριστικά τους (με βάση το McClements, 2005)

Τύπος Ομογενοποιητή	Διάμετρος σταγονιδίων	Ιξώδες Διαλύματος	Αρχή λειτουργίας	Ομογενοποίηση	Αύξηση Θερμοκρασίας
Αναδευτήρας υψηλής ταχύτητας (High Speed Mixer)	2μm	Χαμηλό έως μέσο	Περιστρεφόμενη κεφαλή, δημιουργεί δυνάμεις που διαταράσσουν τις διεπιφάνειες μεταξύ των δύο φάσεων	Πρωτογενής	Μικρή αύξηση θερμοκρασίας (λόγω της μετατροπής μηχανικής ενέργειας σε θερμότητα)
Μύλος κολλοειδών (Colloid Mill)	1μm	Μέσο έως υψηλό	Ένας στατικός δίσκος και ένας περιστρεφόμενος. Ανάπτυξη διατμητικής τάσης και φυγόκεντρων δυνάμεων	Δευτερογενής	Αύξηση θερμοκρασίας (λόγω αλλαγής ιξώδους)
Ομογενοποιητές υψηλής πίεσης	0.1 μm	Χαμηλό έως μέσο	Εφαρμογή υψηλής πίεσης	Δευτερογενής	Ελάχιστη αύξηση θερμοκρασίας
Ομογενοποιητές υπερήχων (ultrasound homogenizers)	0.1 μm	Χαμηλό έως μέσο	Έντονες διακυμάνσεις διατμητικής τάσης και πίεσης, λόγω φαινομένων σπηλαίωσης και τύρβης	Κυρίως δευτερογενής	Σημαντική αύξηση θερμοκρασίας
Μικρορευστοποιητές (microfluidizers)	<0.1 μm	Χαμηλό έως μέσο	Κίνηση ρευστών με υψηλή ταχύτητα εντός του ομογενοποιητή και σύγκρουση των σωματιδίων επάνω σε στερεή επιφάνεια	Πρωτογενής ή δευτερογενής	Μικρή αύξηση θερμοκρασίας.
Ομογενοποιητές μεμβράνης (Membrane Homogenizers)	<0.3 μm	Χαμηλό έως μέσο	Το ένα ρευστό κατευθύνεται προς το άλλο ρευστό μέσω πορώδους μεμβράνης.	Κυρίως δευτερογενής	Μικρή αύξηση θερμοκρασίας

1.7 Σκοπός της μελέτης

Τα γαλακτώματα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων με πολλές εφαρμογές σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων αλλά και εφαρμογές σε άλλους κλάδους όπως τα καλλυντικά και η ιατρική. Η δημιουργία γαλακτωμάτων με υψηλή σταθερότητα για μεγάλα χρονικά διαστήματα και επιθυμητές φυσικές και οργανοληπτικές ιδιότητες απαιτεί την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας ή και την προσθήκη κατάλληλων ουσιών που δρουν ως σταθεροποιητές.

Πολυσακχαρίτες όπως η βακτηριακή κυτταρίνη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σταθεροποιητές γαλακτωμάτων και ως μηχανισμοί ενθυλάκωσης βιοενεργών συστατικών (π.χ. φάρμακα). Για το λόγο αυτό, είναι σημαντική η μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων της βακτηριακής κυτταρίνης όπως η μορφολογία, το φορτίο και η ρεολογική συμπεριφορά. Ωστόσο, ενώ οι ιδιότητες αυτές για άλλα είδη κυτταρίνης έχουν μελετηθεί σε βάθος, παρουσιάζεται ένα σημαντικό κενό στην μέχρι τώρα έρευνα των αντίστοιχων ιδιοτήτων της βακτηριακής κυτταρίνης αλλά και των διάφορων μεθόδων που μπορούν να εφαρμοστούν για να ενισχυθεί ο ρόλος της βακτηριακής κυτταρίνης ως σταθεροποιητή. Συνεπώς, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγινε αξιολόγηση των ιδιοτήτων της βακτηριακής κυτταρίνης μετά από επεξεργασία με δύο διαφορετικές μεθόδους (υπέρηχοι και όξινη υδρόλυση) και βελτιστοποίηση των μεθόδων αυτών.

II. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά και συσκευές

2.1.1 Υλικά

- Χρωστική Sodium (Potassium) Phosphotungstate (PTA) για την αρνητική χρώση των δειγμάτων που παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εκπομπής ηλεκτρονίων
- Θειικό οξύ 98% κ.β. (Merck, Germany)
- Υδροχλωρικό οξύ 1N (Merck, Germany)
- Ελαιόλαδο εμπορίου (Elais Unilever, Athens, Greece)
- Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)
- Νιτρικό αζίδιο (NaN_3) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)
- Μεμβράνες διαπίδυσης Spectra Por (Spectrum Labs, Netherlands)

2.1.2 Συσκευές

- Μπλέντερ υψηλής διατμητικής ταχύτητας Ultra Turrax T25 (IKA, Germany)
- Συσκευή υπερήχων Sonopuls 3200, εξοπλισμένη με εξάρτημα MS 73-492 διαμέτρου 13 mm (Bandelin Gmbh & Co, Berlin, Germany)
- Συσκευή φυγοκέντρησης Econospin (Sorvall Instruments)
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εκπομπής ηλεκτρονίων (TEM) JEOL 100s
- Οπτικό μικροσκόπιο Kruss (Optronik, Germany)
- Συσκευή Dynamic Laser Light Scattering (ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK)
- Συσκευή Turbiscan MA 2000 (FormulAction, Toulouse, France).
- Ρεόμετρο Discovery HR-3 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) με γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων

2.2. Μέθοδοι

2.2.1 Παρασκευή βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη, όπως προαναφέρθηκε, παράγεται ως εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης από την πλειοψηφία των βακτηρίων, λειτουργώντας ως προστατευτικός «φάκελος» γύρω από τα κύτταρα των βακτηρίων.

Στην παρούσα μελέτη, για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Komagataeibacter sucrofermentans* (DSM 15973). Οι καλλιέργειες έγιναν σε κατάλληλο συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα, όπως περιγράφεται από τους Hestrin & Schramm (1954).

Πίνακας 6: Σύσταση θρεπτικού μέσου (Hestrin & Schramm, 1954)

Συστατικό	Συγκέντρωση
Γλυκόζη	20 g/L
Εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract)	5 g/L
Na ₂ HPO ₄	2.7 g/L
Πεπτόνη	5 g/L
Κιτρικό οξύ	1.15 g/L

Η αρχική καλλιέργεια τοποθετώντας τον μικροοργανισμό σε θερμοκρασία 30 °C, υπό ανάδευση στις 100-120 rpm για 2 ημέρες, στο θρεπτικό υπόστρωμα που περιγράφηκε παραπάνω. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού έγινε σε κωνικές φιάλες όγκου 250 mL, που περιείχαν 50mL θρεπτικού μέσου και εμβολιάστηκαν με 10% v/v καλλιέργεια μικροοργανισμού. Όλες οι φιάλες, επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30 °C, χωρίς ανάδευση για χρονικό διάστημα 15 ημερών.

Μετά την καλλιέργεια η βακτηριακή κυτταρίνη (σχηματίζεται ως στρώμα στο επάνω μέρος του δοχείου) αφαιρέθηκε και πλύθηκε με νερό, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, προστέθηκε NaOH συγκέντρωσης 2M ώστε να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα βακτηριακά κύτταρα. Τέλος, η βακτηριακή κυτταρίνη πλύθηκε ξανά με νερό μέχρι να αποκτήσει ουδέτερο pH και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη σε θερμοκρασία 4 °C.

2.2.2 Επεξεργασία βακτηριακής κυτταρίνης και παρασκευή διαλυμάτων

Οι μεμβράνες βακτηριακής κυτταρίνης, μετά τον καθαρισμό τους, κόπηκαν με ψαλίδι σε μικρά κομμάτια και αναμείχθηκαν με απιονισμένο νερό ώστε να παραχθούν διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης τελικής συγκέντρωσης 2% κ.β. Ακολούθως, διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης αναδεύτηκαν περαιτέρω με αναδευτήρα υψηλής διατμητικής τάσης (13500 RPM, Ultra Turrax T25, IKA, Germany) για 20 λεπτά εως ότου ομογενοποιηθούν.

Για την παρασκευή των υπό μελέτη διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων, έγινε αραιώση του αρχικού διαλύματος με απιονισμένο νερό μέχρι τις απαιτούμενες τελικές συγκεντρώσεις (0.1, 0.5 και 1% κ.β.).

2.2.2.1 Υπέρηχοι

Έγινε επεξεργασία των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης στη συσκευή υπερήχων Sonopuls 3200 (Bandelin GmbH & Co, Berlin, Germany) για κάθε διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης, σε συχνότητα 20 kHz και εύρος 60% για χρόνο 0,1,3 και 5 λεπτών.



Εικόνα 19: Συσκευή υπερήχων Sonopuls 3200, Bandelin GmbH & Co, Berlin, Germany

Κατά την επεξεργασία με υπερήχους, υπάρχει ο κίνδυνος μεγάλης αύξησης της θερμοκρασίας του δείγματος, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τις ιδιότητες του. Για το λόγο αυτό τα δείγματα, κατά την επεξεργασία τους στη συσκευή υπερήχων, τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο, ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία σταθερή στους 25 °C.

2.2.2.2 Όξινη υδρόλυση

Η όξινη υδρόλυση των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης έγινε με θειικό οξύ 60% κ.β. και υδροχλωρικό οξύ 2N. Αρχικά, τα ινίδια κυτταρίνης αναμείχθηκαν με απιονισμένο νερό και οξύ και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασίες 60°C και 40°C και για χρονικά διαστήματα από 0 έως 72h. Στη συνέχεια, τα δείγματα ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό μέσω επαναλαμβανόμενων φυγοκεντρίσεων και επαναδιαλύσεων, έως ότου το pH το υπερκειμένου να φθάσει περίπου στο 1.5-2. Ακολούθως, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κατάλληλες μεμβράνες διαπίδυσης (SpectraPor, Spectrum Labs) μέσα σε απιονισμένο νερό, έως ότου το pH των διαλυμάτων φτάσει περίπου στο 4-5. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη συσκευή υπερήχων για 2 λεπτά ώστε να ομογενοποιηθούν (Elazzouzi-Hafraoui et al, 2008; Revol et al, 1992).

Τέλος, τα διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 4 °C μετά από προσθήκη θειικού αζιδίου (sodium azide 0.01% wt) ως αντιμικροβιακού παράγοντα.

2.2.3 Ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC)

Για τη μέτρηση της ικανότητας συγκράτησης νερού των διαλυμάτων της βακτηριακής κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε με κάποιες προσαρμογές, η μέθοδος που περιγράφεται από τους Shezad, Khan & Park (2010).

Αρχικά, τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 στροφές ανά λεπτό, για 15 λεπτά.



Εικόνα 20: Φυγοκεντρος Econospin (Sorvall Instruments)

Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα ιζήματα ζυγίστηκαν και ξηράνθηκαν στους 60°C για 48 ώρες. Η ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC) υπολογίστηκε από την παρακάτω εξίσωση:

$$WHC (\%) = \frac{W_r}{W_c} * 100 \text{ (Εξ.2)}$$

Όπου:

W_r : μάζα του νερού που απομακρύνθηκε κατά την ξήρανση

W_c : το ξηρό περιεχόμενο σε κυτταρίνη.

2.2.4 Μέγεθος και μορφολογία των ινιδίων κυτταρίνης

Η μέτρηση του μεγέθους αλλά και η παρατήρηση της μορφολογίας των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης, καθώς και η μέτρηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων, έγινε με χρήση μικροσκοπίων (οπτικού και εκπομπής ηλεκτρονίων). Συγκεκριμένα, ελήφθησαν φωτογραφίες των δειγμάτων, οι οποίες στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού επεξεργασίας εικόνας Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Rockville USA).

2.2.4.3 Οπτικό μικροσκόπιο

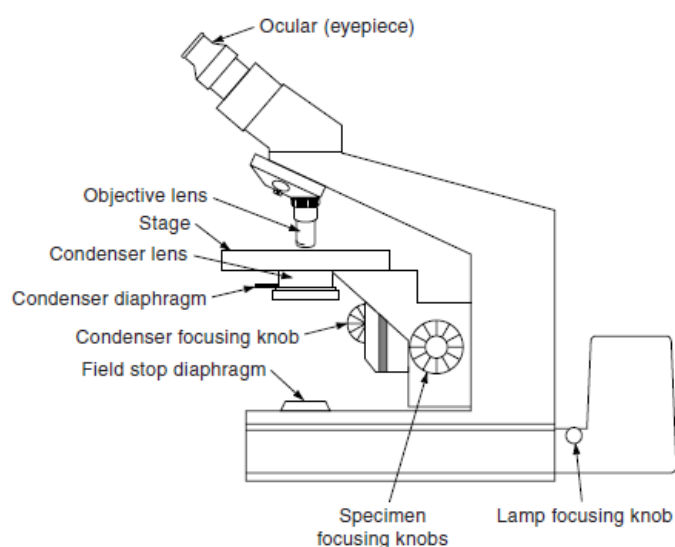
Το οπτικό μικροσκόπιο (μικροσκόπιο φωτός, light microscope) είναι ένα οπτικό όργανο που χρησιμοποιεί το ορατό φως και ένα σύστημα φακών, για να παράξει μια μεγενθυμένη εικόνα ενός αντικειμένου που προβάλλεται στο μάτι του παρατηρητή ή σε μια συσκευή απεικόνισης (συνήθως κατάλληλη κάμερα). Τα βασικά οπτικά μικροσκόπια μπορούν να είναι πολύ απλά, ωστόσο υπάρχουν πολλά σύνθετα σχέδια, με στόχο τη βελτίωση της ανάλυσης και της αντίθεσης του δείγματος. Τα οπτικά μικροσκόπια χρησιμοποιούνται ευρέως διότι είναι οικονομικά και εύκολα στη χρήση, καθώς χρησιμοποιούν ορατό φως. Έτσι, το δείγμα μπορεί να παρατηρηθεί και απευθείας από το ανθρώπινο μάτι. Ακόμα, η

εικόνα από ένα οπτικό μικροσκόπιο μπορεί να καταγραφεί από τυπικές φωτο-ευαίσθητες κάμερες και στη συνέχεια να επεξεργαστεί σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό επεξεργασίας εικόνας (Image Analysis).

Οι βασικές παράμετροι που επηρεάζουν το σχηματισμό της εικόνας σε ένα οπτικό μικροσκόπιο είναι:

- 1) Ο αντικειμενικός φακός (objective lens) που συλλέγει το φως που διαθλάται από το δείγμα και δημιουργεί τη μεγεθυμένη εικόνα
- 2) Ο φακός- συμπυκνωτής (condenser lens), ο οποίος συγκεντρώνει το φως από τη πηγή φωτός του μικροσκοπίου σε μια μικρή περιοχή του δείγματος.

Άλλα τμήματα του οπτικού μικροσκοπίου είναι οι προσοφθάλμιοι φακοί, η πηγή φωτός, τα φίλτρα κ.α. Η τελική εικόνα του δείγματος που παρατηρείται μέσω του μικροσκοπίου ρυθμίζεται κατάλληλα από μοχλούς που ρυθμίζουν την εστίαση αλλά και τη θέση του δείγματος πάνω στην ειδική υποδοχή.



Εικόνα 21: Τα χαρακτηριστικά μέρη ενός οπτικού μικροσκοπίου (Murphy D., 2001)

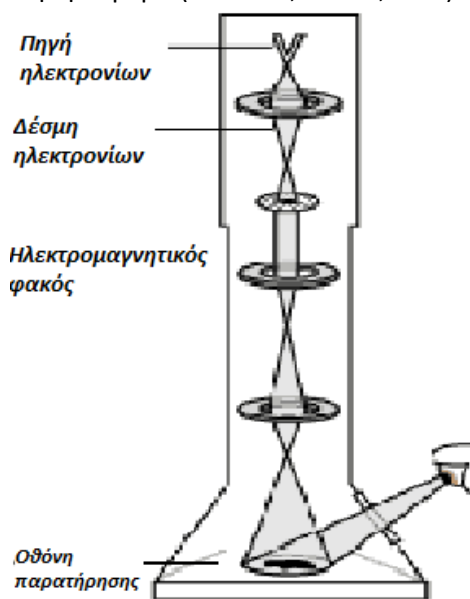
2.2.4.4 Μικροσκόπιο TEM (Transmission Electron Microscopy)

Η λειτουργία του μικροσκοπίου TEM βασίζεται στις ίδιες αρχές με το οπτικό μικροσκόπιο, με τη διαφορά ότι αντί του ορατού φωτός, χρησιμοποιούνται ηλεκτρόνια ως πηγή φωτός, τα οποία έχουν πολύ μικρότερο μήκος κύματος, κάτι που δίνει τη δυνατότητα έως και χιλιάδες φορές μεγαλύτερης ανάλυσης στην εικόνα. Συνεπώς, μπορούν να παρατηρηθούν δείγματα μεγέθους έως και μερικών angstrom (10^{-10} m).

Τρόπος λειτουργίας του μικροσκοπίου TEM

Μια πηγή φωτός στην κορυφή του μικροσκοπίου εκπέμπει τα ηλεκτρόνια που κινούνται μέσα σε κενό στη στήλη του μικροσκοπίου. Αντί για γυάλινους φακούς που χρησιμοποιούνται στα οπτικά μικροσκόπια, το TEM χρησιμοποιεί ηλεκτρομαγνητικούς φακούς για τη συγκέντρωση των ηλεκτρονίων σε μια πολύ λεπτή δέσμη. Αυτή η δέσμη των ηλεκτρονίων περνά μέσα από το δείγμα που πρόκειται να μελετηθεί. Ανάλογα με την πυκνότητα του υλικού, κάποια από τα ηλεκτρόνια σκεδάζονται και απομακρύνονται από τη δέσμη. Στο κάτω μέρος του μικροσκοπίου, τα μη σκεδασμένα ηλεκτρόνια χτυπούν μια φωσφορίζουσα οθόνη, που δημιουργεί μια εικόνα (shadow image) του δείγματος, όπου τα διαφορετικά τμήματά του απεικονίζονται με διαφορετική φωτεινότητα ανάλογα με την

πυκνότητά τους. Η εικόνα αυτή είτε παρατηρείται απευθείας από τον παρατηρητή είτε φωτογραφίζεται με κατάλληλη κάμερα (Williams, Carter, 2009).



Εικόνα 22: Μέρη του μικροσκοπίου TEM

2.2.5 ζ-δυναμικό

Όπως προαναφέρθηκε, το ζ-δυναμικό των σωματιδίων ενός διαλύματος, είναι μια παράμετρος ενδεικτική για πολλές από τις ιδιότητες του διαλύματος αυτού, όπως το ιζώδες, ο διαχωρισμός των φάσεων κλπ. Στην παρούσα μελέτη το ζ-δυναμικό των σωματιδίων μετρήθηκε με τη χρήση της συσκευής ZetasizerNano (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).



Εικόνα 23: Η συσκευή ZetasizerNano

Η συσκευή χρησιμοποιεί τη μέθοδο Laser Doppler μικρο-ηλεκτροφόρησης για τη μέτρηση του ζ-δυναμικού. Κατά τη μέθοδο αυτή, εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σε ένα διάλυμα μορίων ή σε μια διασπορά σωματιδίων. Λόγω του ηλεκτρικού πεδίου, τα σωματίδια κινούνται με ταχύτητα αντίστοιχη του ζ-δυναμικού. Η ταχύτητα μετράται με την τεχνική M3-PALS (Phase analysis Light Scattering). Έτσι, υπολογίζεται η ηλεκτροφορητική κινητικότητα και από αυτή υπολογίζεται το ζ-δυναμικό των σωματιδίων. Τέλος, η συσκευή συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή που διαθέτει κατάλληλο λογισμικό που επιτρέπει την επεξεργασία των δεδομένων (Ιστοσελίδα Malvern Instruments).

Στην παρούσα εργασία, η μέτρηση του ζ-δυναμικού έγινε σε θερμοκρασία 25°C, ενώ τα δείγματα είχαν προηγουμένως αραιωθεί με απιονισμένο νερό (1:100) ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα πολλαπλής σκέδασης.

2.2.6 Σταθερότητα Δειγμάτων -Turbiscan

Ως σταθερότητα γαλακτώματος ορίζεται η δυνατότητα του γαλακτώματος να αντιστέκεται σε αλλαγές των ιδιοτήτων του με την πάροδο του χρόνου (McClements, 2005).

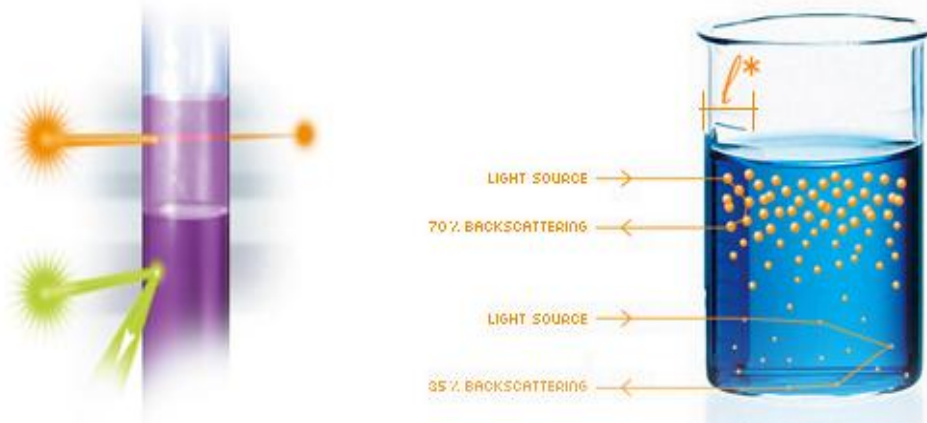
Στην παρούσα εργασία, για τη μέτρηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Turbiscan™ Classic MA 2000 (Formulaction, Toulouse, France).



Εικόνα 24: Η συσκευή Turbiscan Classic MA 2000

Η λειτουργία του οργάνου βασίζεται στην καταγραφή της πολλαπλής σκέδασης φωτός, όταν αυτό διέρχεται μέσα από ένα δείγμα.

Η συσκευή διαθέτει πηγή η οποία εκπέμπει δέσμη φωτός μήκους κύματος 880nm. Όταν η δέσμη φωτός διέρχεται μέσα από το δείγμα και είτε το διαπερνά (στα σημεία όπου το δείγμα είναι διαφανές) είτε σκεδάζεται και εκπέμπεται προς την ίδια διεύθυνση από την οποία εκπέμπεται η ακτινοβολία (στα σημεία όπου η δέσμη προσπίπτει επάνω σε σωματίδια, δηλαδή το δείγμα είναι αδιαφανές). Ακόμα, η συσκευή διαθέτει δύο ανιχνευτές, οι οποίοι ανιχνεύουν το φως ανάλογα με το αν εκπέμπεται στις 0° από την πηγή, δηλαδή εκπέμπεται διαμέσου του δείγματος (transmission) ή στις 135° από την πηγή εκπομπής φωτός (backscattering).



Εικόνα 25: Αρχή λειτουργίας της συσκευής Turbiscan MA 2000 (www.formulaction.com)

Η συσκευή Turbiscan MA 2000 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της σταθερότητας γαλακτωμάτων με συγκεντρώσεις από 0 έως 60% v/v και για σωματίδια με διάμετρο από 0.1 έως 1000μm. Η κεφαλή ανίχνευσης λαμβάνει δεδομένα εκπομπής και οπισθοσκέδασης ανά 40μm και σε μέγιστο ύψος 80mm. Από τις μετρήσεις αυτές, λαμβάνονται πληροφορίες για το αν το δείγμα είναι ομογενές, για τη συγκέντρωση και τη μέση διάμετρο των σωματιδίων. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στο σχετικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, με τη μορφή καμπύλης που δείχνει το ποσοστό του φωτός που εκπέμπεται ή σκεδάζεται συναρτήσει του ύψους του δείγματος (σε mm).

2.2.7 Ρεολογικές μετρήσεις

Πολλά είδη οργάνων χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των ιδιοτήτων που σχετίζονται με τη ρεολογία. Τα όργανα αυτά, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα ιξωδόμετρα (viscometer) τα οποία έχουν σχεδιαστεί αποκλειστικά για να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το ιξώδες του ρευστού και τα ρεόμετρα (rheometers) που παρέχουν πληροφορίες και για άλλες ρεολογικές παραμέτρους, εκτός του ιξώδους, όπως αυτές που σχετίζονται με την ιξωδοελαστική συμπεριφορά (Rao et al, 2005).

Τα ρεόμετρα, μετρούν τις ρεολογικές ιδιότητες ρευστών μέσω της αντίστασης τους στη ροή, υπο την επίδραση γνωστής δύναμης ή της παραγόμενης τάσης από μια γνωστή ποσότητα ροής, και αποτελούν ουσιαστικό εργαλείο για τις ρεολογικές μελέτες τροφίμων (Munizaga, 2004).

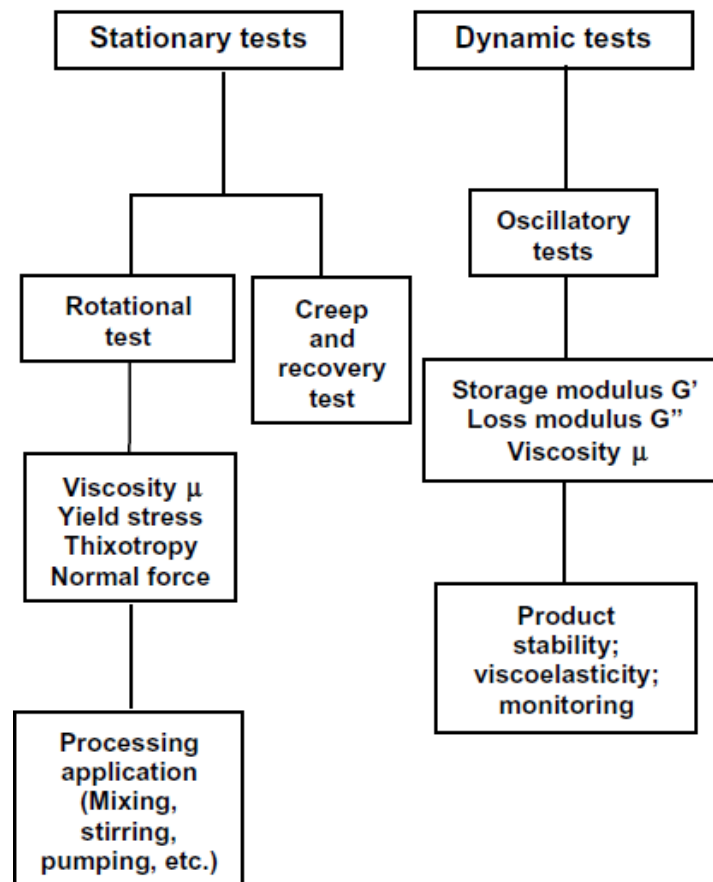
Οι βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το είδος της γεωμετρίας που χρησιμοποιείται στις εξής κατηγορίες: τριχοειδή (capillary), Couette (ομόκεντροι κύλινδροι), πλάκας-κώνου (plate and cone) και παράλληλων πλακών.

Για όλες τις παραπάνω κατηγορίες υπάρχουν τρεις απαιτήσεις:

1. Στρωτή ροή του ρευστού (laminar flow)
2. Ισοθερμοκρασιακή λειτουργία
3. Μη ολίσθηση (no slip) στις διεπιφάνειες στερεού- ρευστού.

Επίσης, ανάλογα με την κάθε κατηγορία υπάρχουν και επιπρόσθετες απαιτήσεις (Rao et al, 2005). Οι προδιαγραφές του εξοπλισμού αφορούν: την ελάχιστη και μέγιστη ροπή, την ελάχιστη και μέγιστη γωνιακή ταχύτητα, την αυτόματη ρύθμιση κενού, τον έλεγχο θερμοκρασίας, την ανάλυση του κενού, το εύρος δύναμης και το λογισμικό (Munizaga, 2004).

Στην παρούσα μελέτη για τη μέτρηση ρεολογικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων.



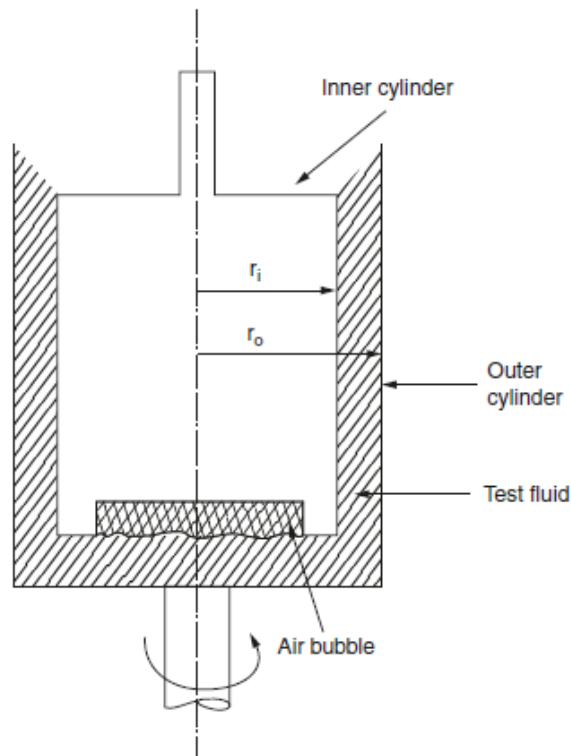
Εικόνα 26: Ρεολογικά τεστ που χρησιμοποιούνται στην μελέτη ιδιοτήτων τροφίμων (Munizaga, 2004)

2.2.7.1 Γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων

Οι συσκευές αυτές, ανήκουν στην κατηγορία των περιστροφικών (rotational) ρεομέτρων. Το ρευστό τοποθετείται στο κενό μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού κυλίνδρου, όπου είτε ο εσωτερικός (Couette) είτε ο εξωτερικός κύλινδρος (Searle) περιστρέφονται (Munizaga, 2004).

Έτσι, το ρευστό υφίσταται σχεδόν ομοιόμορφη διατμητική τάση. Στην απλούστερη κατάσταση, ο ένας κύλινδρος είναι στατικός και ο άλλος κινείται είτε με σταθερή ταχύτητα είτε με σταθερή ροπή.

Οι ομόκεντροι κύλινδροι χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μέτρηση ιξωδών διάτμησης για «πολύπλοκα υγρά», δηλαδή υγρά των οποίων οι μικροδομές απαιτούν παραπάνω από μικροseconds και συνήθως milliseconds ή περισσότερο, για να εξισωθούν τυπικά εντός μιας ροής. Κοινά παραδείγματα είναι τα διαλύματα πολυμερών, κάποια επιφανειοδραστικά διαλύματα, συμπυκνωμένα διαλύματα κολλειδών και πολύ σύμπλοκα κολλοειδή και πολυμερή διαλύματα στην τεχνολογία τροφίμων (Dontula et al, 2005).



Εικόνα 27: Γεωμετρία ρεομέτρου ομόκεντρων κυλίνδρων (Rao et al, 2005)

Οι παραδοχές για αυτή τη γεωμετρία είναι :

1. Σταθερή ροή
2. Απουσία αξονικών και ακτινικών συνισταμένων της ταχύτητας
3. Απουσία παραμόρφωσης του πεδίου ροή από τα άκρα των κυλίνδρων.

Στη γεωμετρία αυτή, είτε ο εξωτερικός είτε ο εσωτερικός κύλινδρος μπορούν να περιστρέφονται.

Επίσης, από μελέτες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι το πλάτος του κενού μεταξύ των δύο κυλίνδρων επηρεάζει πολύ τις μετρήσεις και σημαντικά σφάλματα μπορούν να υπάρξουν στην περίπτωση συστημάτων με μεγάλο κενό, ειδικά στην περίπτωση ψευδοπλαστικών (shear thinning) ρευστών. Η απαίτηση για μικρό κενό (narrow gap) μεταξύ των κυλίνδρων αποκλείει τη μελέτη τροφίμων που περιέχουν μεγάλα σωματίδια (Rao et al, 2005).

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το ρεόμετρο DHR-3 (Discovery Hybrid Rheometer -3) της εταιρίας TA Instruments. Πρόκειται για ένα ρεόμετρο όπου η διάτμηση ελέγχεται από την τάση, με πολλές δυνατότητες μετρήσεων. Το όργανο αυτό δίνει τη δυνατότητα να μετρηθούν διάφορες ιδιότητες όπως: το ιξώδες, η διατμητική τάση (shear stress), τα μέτρα αποθήκευσης και απώλειας (storage and loss moduli), η τάση και η διαφορά φάσης. Όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται γεωμετρία ομόκεντρων κυλίνδρων, διαμέτρου 25 και 40 mm αντίστοιχα.



Εικόνα 28: Το ρεόμετρο DHR-3 (TA Instruments)

Το ρεόμετρο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου γίνεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω του λογισμικού Trios (Trios Software) (TA Instruments, 2014).

Στην παρούσα μελέτη, με χρήση του ρεομέτρου μελετήθηκαν το ιξώδες, η θιξοτροπική και η ιξωδοελαστική συμπεριφορά των δειγμάτων.

2.2.7.1 Μέτρηση ιξώδους

Το ιξώδες των δειγμάτων μετρήθηκε με χρήση γεωμετρίας ομόκεντρων κυλίνδρων σε σταθερή θερμοκρασία (25.0 ± 0.1 °C) και με κενό 0.1 cm μεταξύ των δύο κυλίνδρων. Η μέτρηση έγινε για διατμητικές τάσεις από 0.01 έως 1000 s^{-1} και ο συνολικός χρόνος μέτρησης ήταν περίπου 10 λεπτά.

2.2.7.2 Θιξοτροπική συμπεριφορά

Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για την εξέταση της θιξοτροπικής συμπεριφοράς των δειγμάτων. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν οι ίδιες με αυτές που υπήρχαν κατά τη μέτρηση του ιξώδους. Η διατμητική τάση αρχικά αυξανόταν από 0.01 έως 1000 s^{-1} , στη συνέχεια έγινε παύση στα 1000 s^{-1} για 10 λεπτά και τέλος έγινε μείωση της διατμητικής τάσης από 1000 έως 0.01 s^{-1} .

2.2.7.3 Ιξωδοελαστική συμπεριφορά

Τέλος, έγιναν δυναμικές μετρήσεις για την εξέταση της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς των δειγμάτων. Πριν τη διεξαγωγή των μετρήσεων καθορίστηκε η ιξωδοελαστική περιοχή των δειγμάτων (δηλαδή η περιοχή όπου οι συντελεστές G' και G'' είναι παράλληλοι). Έτσι, επιλέχθηκε οι μετρήσεις αυτές να γίνουν σε σταθερή τάση 0.3%, η οποία βρίσκεται εντός της ιξωδοελαστικής περιοχής όλων των δειγμάτων και για γωνιακές συχνότητες από 0.1 έως 100 rad/s. Έτσι, υπολογίστηκαν οι συντελεστές G' και G'' συναρτήσει της συχνότητας.

2.2.8 Χρήση της βακτηριακής κυτταρίνης ως σταθεροποιητή σε γαλακτώματα

Στα πλαίσια της μελέτης εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της βακτηριακής κυτταρίνης ως σταθεροποιητή γαλακτωμάτων. Για το σκοπό αυτό, η βακτηριακή κυτταρίνη που είχε υποστεί επεξεργασία με υπερήχους αλλά και η βακτηριακή κυτταρίνη που είχε υποστεί όξινη υδρόλυση, ενσωματώθηκαν σε γαλακτώματα τύπου O/W.

Στην περίπτωση της επεξεργασίας με υπερήχους, ετοιμάστηκαν γαλακτώματα που περιείχαν βακτηριακή κυτταρίνη επεξεργασμένη με υπερήχους για 3 λεπτά (σε

συγκεντρώσεις 0.1, 0.3, 0.5 και 1% κ.β.), 20% ελαιόλαδο (Elais Unilever, Athens, Greece) και ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland). Η επεξεργασία της βακτηριακής κυτταρίνης έγινε όπως περιγράφηκε και παραπάνω (ανάδευση με αναδευτήρα υψηλής διατμητικής τάσης – Turrax, ομογενοποίηση στη συσκευή υπερήχων και προσθήκη νιτρικού αζιδίου). Για τα δείγματα αυτά, μετρήθηκε η διάμετρος των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων μέσω απεικόνισης σε οπτικό μικροσκόπιο με τη βοήθεια λογισμικού ανάλυσης εικόνας και ο διαχωρισμός φάσεων μετά από αποθήκευση 14 ημερών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με χρήση της συσκευής Turbiscan).

Αντίστοιχα, στην περίπτωση των ναοκρυστάλλων βακτηριακής κυτταρίνης που έχουν προέλθει από όξινη υδρόλυση, επιλέχθηκε η κυτταρίνη που υδρολύθηκε με H_2SO_4 στους $60^\circ C$ για 72 ώρες, η οποία ενσωματώθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.1, 0.3, 0.5 και 1% κ.β.) σε γαλακτώματα με 20% περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο. Όπως και παραπάνω, στα δείγματα αυτά, μετρήθηκε η διάμετρος των σταγονιδίων και ο διαχωρισμός φάσεων μετά από αποθήκευση 14 ημερών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

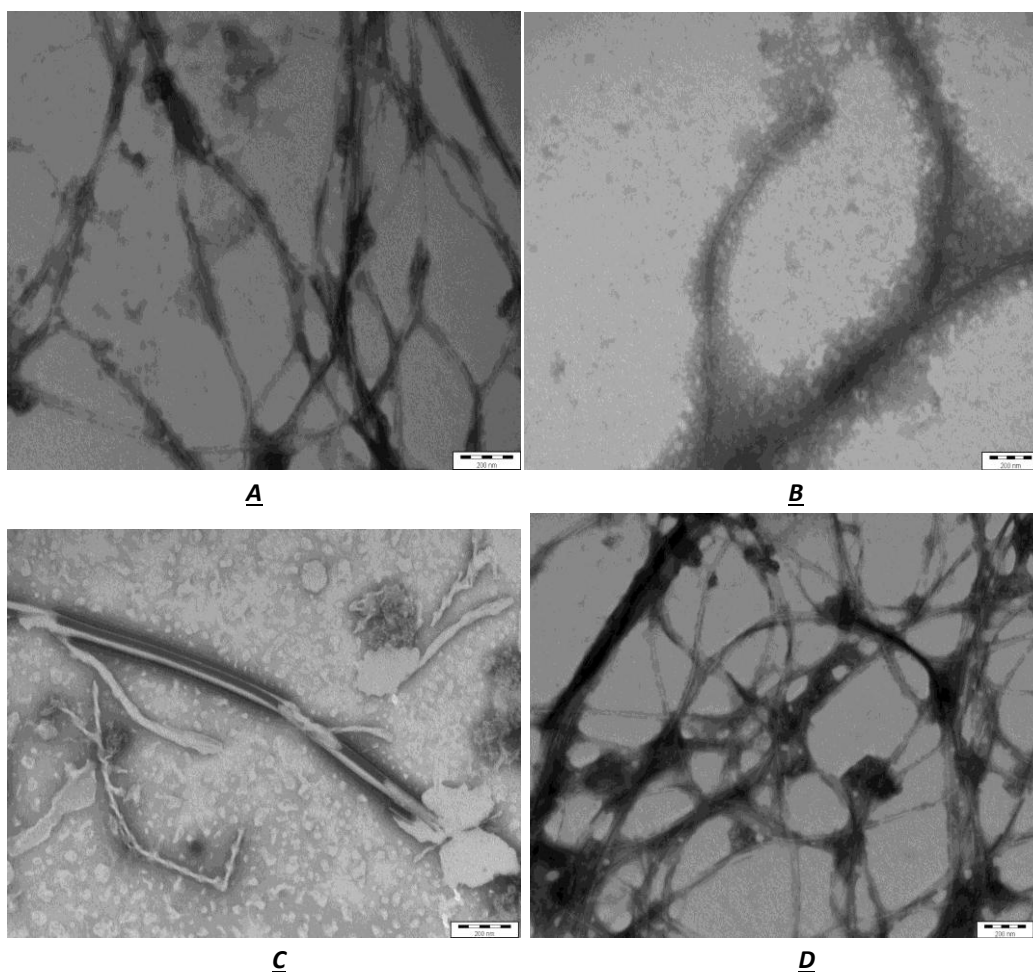
III. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1.Επίδραση υπερήχων στη μορφολογία και τις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης

3.1.1 Μορφολογία ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης

Η μορφολογία της βακτηριακής κυτταρίνης, όπως και όλων των πολυσακχαριτών, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο με τον οποίο θα χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία. Για παράδειγμα, η μορφολογία και το μέγεθος των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης επηρεάζουν σημαντικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων μέσα στα οποία χρησιμοποιείται η βακτηριακή κυτταρίνη, όπως είναι το ιξώδες, η σταθερότητα κ.α. Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, η βακτηριακή κυτταρίνη αποτελείται από μικροϊνίδια ή δέσμες μικροϊνιδίων που σχηματίζουν δίκτυο (Okuyama A., Motoki M., Yamanaoka S., 1993).

Για την μελέτη της επίδρασης των υπερήχων στη μορφολογία της βακτηριακής κυτταρίνης, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0.5% κ.β., τα οποία τοποθετήθηκαν στη συσκευή υπερήχων για 0 λεπτά (untreated), 1, 3 και 5 λεπτά. Με χρήση του μικροσκοπίου TEM και κατάλληλου λογισμικού μετρήθηκε το μήκος των ίνιδιων.



Εικόνα 29: Απεικόνιση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο TEM (κλίμακα 200nm): A: Μη επεξεργασμένο δείγμα (untreated), B: Επεξεργασία με υπερήχους για 1 λεπτό, C: Επεξεργασία με υπερήχους για 3 λεπτά, D: επεξεργασία με υπερήχους για 5 λεπτά

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, στο μη επεξεργασμένο δείγμα, τα μικροϊνίδια κυτταρίνης συνενώνονται σε μεγάλο βαθμό, δημιουργώντας ένα πολύπλοκο και πυκνό δίκτυο μεγαλύτερων ινιδίων. **Μετά από επεξεργασία 1 λεπτού, τα ινίδια κυτταρίνης αποκτούν μικρότερο πλάτος και το δίκτυο γίνεται αραιό και λιγότερο πολύπλοκο.** Ωστόσο, όταν αυξάνεται ο χρόνος επεξεργασίας με υπερήχους, τα μικρο-ινίδια κυτταρίνης συσσωματώνονται και πάλι δημιουργώντας ινίδια με μεγαλύτερο πλάτος και πιο πυκνό δίκτυο. Το φαινόμενο αυτό γίνεται ακόμα πιο έντονο όταν το δείγμα υφίσταται επεξεργασία για 5 λεπτά.

Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από τη μέτρηση του πλάτους των ινιδίων, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 7: Πλάτος ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μετά την επεξεργασία με υπερήχους (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση, ενώ τα γράμματα a και b συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές, $p < 0.05$)

Δείγμα	Untreated	1 λεπτό	3 λεπτά	5 λεπτά
Πλάτος (nm)	114.3 ^a (17.4)	62.8 ^b (4.8)	102.5 ^a (2.64)	134.9 ^a (13.6)

Στον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι το πλάτος των ινιδίων στο μη επεξεργασμένο δείγμα είναι περίπου 114 nm. Η μέτρηση αυτή καθώς και το γεγονός ότι τα ινίδια της κυτταρίνης σχηματίζουν πολύπλοκο και πυκνό δίκτυο, επιβεβαιώνεται και από τους Lin, Li, Lopez-Sanchez & Li (2015), οι οποίοι βρήκαν ότι το πλάτος των ινιδίων κυμαίνεται μεταξύ 90 και 100 nm, τους Okiyama, Motoki & Yamanaka (1993) οι οποίοι αναφέρουν πλάτος ινιδίων από 20 έως 100 nm και τους Tischer, Westfahl, Tischer & Sierakowski (2010), οι οποίοι αναφέρουν πλάτος ινιδίων 110–140 nm.

Μικρής διάρκειας επεξεργασία (1 λεπτό) οδηγεί σε σημαντική **μείωση του πλάτους** των ινιδίων (62,8nm), αλλά και σε **αλλαγή στη μορφολογία** του δικτύου, με λιγότερα συσσωματώματα ινιδίων. Ωστόσο, μετά από επεξεργασία 3 λεπτών, το πλάτος των μικρο-ινιδίων αυξάνεται (περίπου 102nm), όμως παρατηρούνται και αλλαγές στη δομή του δικτύου, καθώς δημιουργούνται συσσωματώματα, αποτελούμενα από μικρότερα ινίδια, συνδεδεμένα με δεσμούς υδρογόνου.

Μετά από ακόμα μεγαλύτερη επεξεργασία (5 λεπτά), η μείωση στο πλάτος των ινιδίων είναι ακόμα μικρότερη (περίπου 135 nm), ενώ δημιουργείται ξανά ένα πυκνό και περίπλοκο δίκτυο, που δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από τη μη επεξεργασμένο δείγμα. Συνεπώς, το δείγμα αυτό θεωρείται υπερεπεξεργασμένο και για το λόγο αυτό δεν θα μελετηθούν όλες οι ιδιότητές του.

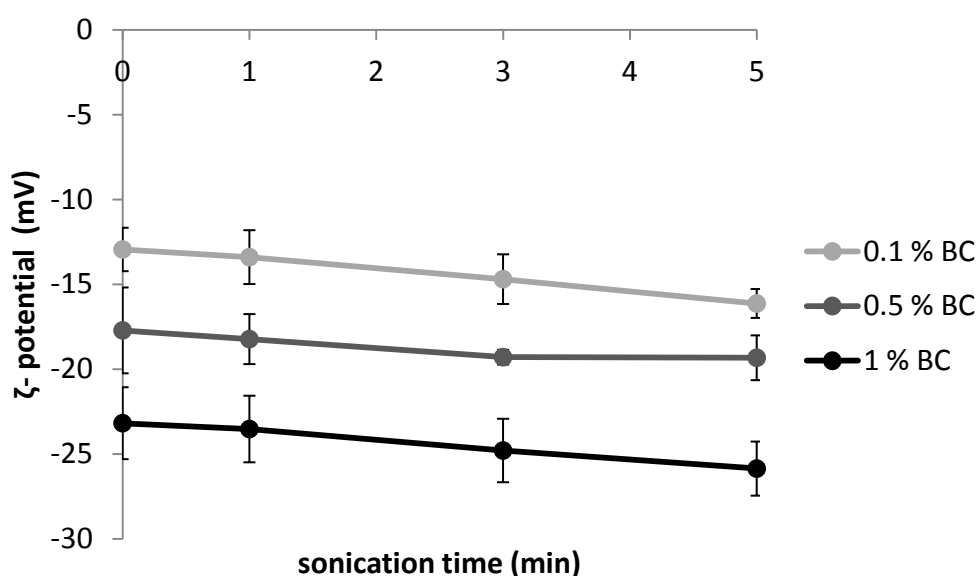
Η τάση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τις περισσότερες έρευνες, σύμφωνα με τις οποίες η επεξεργασία με υπερήχους οδηγεί σε μείωση του πλάτους και αλλαγή στη μικροδομή της βακτηριακής κυτταρίνης. Ωστόσο, η τάση αύξησης του μεγέθους των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υπερεπεξεργασία με υπερήχους έχει αναφερθεί ξανά (Tischer, Westfahl, Tischer & Sierakowski, 2010).

Το φαινόμενο αυτό, μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα ινίδια κυτταρίνης αποτελούνται από δύο διαφορετικές περιοχές, την κρυσταλλική κυτταρίνη (crystalline- cellulose I) και την άμορφη περιοχή κυτταρίνης (Chawla, 2008). Ωστόσο, σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, η επεξεργασία με υπερήχους αυξάνει την κρυσταλλικότητα της βακτηριακής κυτταρίνης, καθώς η άμορφη περιοχή μετατρέπεται σε κρυσταλλική, λαμβάνοντας την απαραίτητη ενέργεια ενεργοποίησης από το φαινόμενο της

ακουστικής σπηλαίωσης που λαμβάνει χώρα όταν οι υπέρηχοι διέρχονται δια μέσου της βακτηριακής κυτταρίνης (Tischer, Westfahl, Tischer & Sierakowski, 2010). Έτσι, τα άμορφα τμήματα γίνονται κρυσταλλικά και συνδέονται με τα αντίστοιχα τμήματα των γειτονικών μικρο-ινιδίων, με αποτέλεσμα την αύξηση του πλάτους των ινιδίων. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το φαινόμενο αυτό, πιθανοτατα λαμβάνει χώρα στα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με υπερήχους για 3 και 5 λεπτά.

3.1.2 ζ-δυναμικό

Η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών δυνάμεων στη σταθερότητα των διαλυμάτων αποτυπώθηκε μέσω της μέτρησης του ζ-δυναμικού των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης. Η επίδραση του χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους, στο ζ-δυναμικό των ινιδίων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων παρουσιάζεται στο γράφημα που ακολουθεί:



Γράφημα 1: Επίδραση χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους στο ζ-δυναμικό διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων βακτηριακής κυτταρίνης

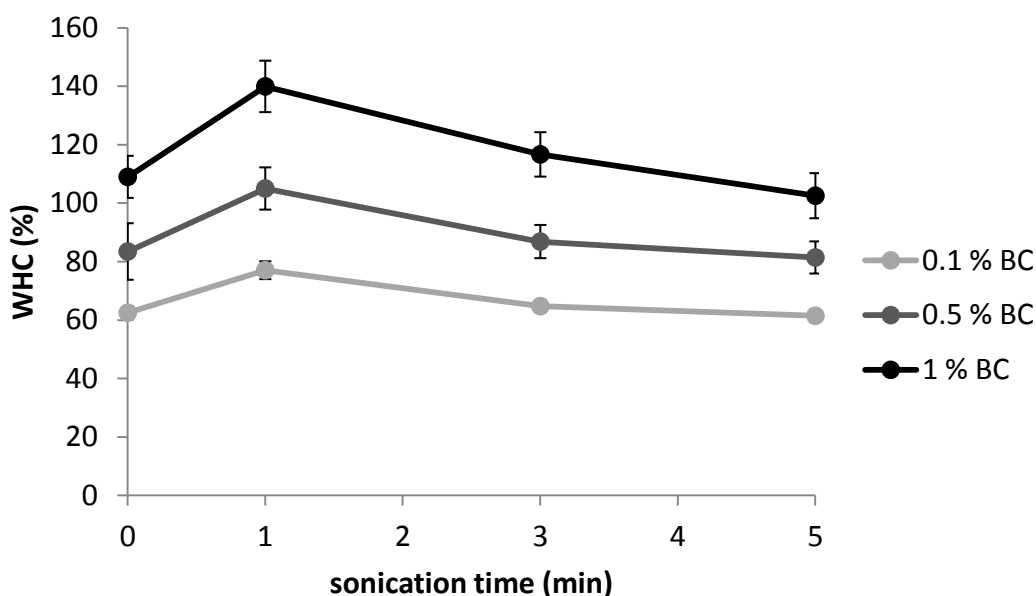
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης εμφανίζουν **αρνητικό ζ-δυναμικό**, κάτι που επισημαίνεται και σε προηγούμενες μελέτες (Lee, Quero, Blaker, Hill, Eichhorn & Bismarck, 2011; Winuprasith & Supphantharika, 2013, Martinez-Sanz, Lopez-Rubio & Lagaron, 2011).

Ο χρόνος επεξεργασίας με υπερήχους φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά το ζ-δυναμικό των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, **όσο αυξάνεται ο χρόνος επεξεργασίας, μειώνεται η τιμή του ζ-δυναμικού** (ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης). Η μείωση αυτή, ουσιαστικά δηλαδή η εμφάνιση μεγαλύτερου κατ' απόλυτη τιμή αρνητικού φορτίου, οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης αρνητικά φορτισμένων ιόντων. Τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα υπό την επίδραση των υπερηχητικών κυμάτων κινούνται προς την επιφάνεια των συσσωματωμάτων που δημιουργούν τα ινίδια. Έτσι, όσο αυξάνεται ο χρόνος επεξεργασίας, τόσο περισσότερα αρνητικά φορτισμένα ιόντα κινούνται προς τα σωματίδια, μειώνοντας το συνολικό φορτίο (Lee, Quero, Blaker, Hill, Eichhorn & Bismarck, 2011).

Ακόμα, σε ότι αφορά τη συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης, φαίνεται ότι **το ζ-δυναμικό παραμένει αρνητικό και αυξάνεται κατά απόλυτη τιμή, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση** βακτηριακής κυτταρίνης, ανεξάρτητα από το χρόνο επεξεργασίας. Έτσι, για συγκέντρωση 0.1% το ζ-δυναμικό είναι περίπου -15 mV, για συγκέντρωση 0.5% ισούται με περίπου -19 mV και για συγκέντρωση 1% το ζ-δυναμικό φτάνει περίπου στα -25 mV. Η μείωση του ζ-δυναμικού οφείλεται μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης, η οποία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω παρουσιάζει αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού (Winuprasith & Suphantharika, 2013).

3.1.3 Ικανότητα συγκράτησης νερού

Η ικανότητα συγκράτησης νερού (water holding capacity) σχετίζεται με πολλές ιδιότητες του τελικού προϊόντος, όπως η σταθερότητα, το ιξώδες και η υφή. Η επίδραση του χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους και της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης στην ικανότητα συγκράτησης νερού, παρουσιάζονται στο γράφημα που ακολουθεί:



Γράφημα 2: Επίδραση του χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους και της συγκέντρωσης βακτηριακής κυτταρίνης στην ικανότητα συγκράτησης νερού.

Αναφορικά με την **επίδραση του χρόνου επεξεργασίας**, φαίνεται ότι επεξεργασία για μικρό χρονικό διάστημα (1 λεπτό) οδηγεί σε αύξηση της ικανότητας συγκράτησης νερού, για όλες τις συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης. Για παράδειγμα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται για συγκέντρωση 1% κ.β., όπου η ικανότητα συγκράτησης νερού αυξάνεται από το 109% στο 140%. Ωστόσο, περαιτέρω επεξεργασία (για 3 και 5 λεπτά) οδηγεί σε μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού.

Γενικά, η ικανότητα συγκράτησης νερού, συνδέεται με το μέγεθος και τη μορφολογία των ινιδίων (Okuyama A., Motoki M., Yamanaka S., 1993). Συνεπώς, τροποποιήσεις στη δομή των ινιδίων, επιφέρουν και αλλαγές σε φυσικές ιδιότητες όπως η ικανότητα συγκράτησης νερού. Οι διαφορές αυτές στην ικανότητα συγκράτησης νερού, πιθανότατα οφείλονται σε διαφορές στο μέγεθος των πόρων και τις επιφανειακές περιοχές των ινιδίων. Τα μόρια του νερού εγκλωβίζονται στην επιφάνεια αλλά και στο εσωτερικό του δικτύου ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης. Εάν υπάρχουν πολλά κενά σημεία μεταξύ των ινιδίων, τότε

περισσότερα μόρια νερού εισέρχονται και προσροφώνται. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η επιφανειακή περιοχή και το μέγεθος των πόρων, τόσο αυξάνεται η ικανότητα συγκράτησης νερού (Ul-Islam M., Khan T., Park K. J., 2012).

Στην παρούσα μελέτη, όπως φαίνεται από τα παραπάνω γραφήματα, βρέθηκε ότι μετά από επεξεργασία 1 λεπτού η βακτηριακή κυτταρίνη εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού κάτι που δικαιολογείται από το γεγονός ότι σε αυτή την περίπτωση το δίκτυο των ινιδίων είναι αραιότερο (μεγαλύτεροι «πόροι»), αφήνοντας έτσι τα μόρια νερού να εισέρχονται και να προσροφώνται μεταξύ των ινιδίων. Αντίστοιχα, μετά από επεξεργασία 3 και 5 λεπτών, η ικανότητα συγκράτησης νερού μειώνεται καθώς το δίκτυο των ινιδίων γίνεται πυκνότερο.

Σε ότι αφορά την **εξάρτηση της ικανότητας συγκράτησης νερού από τη συγκέντρωση** της βακτηριακής κυτταρίνης, παρατηρήθηκε ότι είναι ανάλογες. Δηλαδή, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης, αυξάνεται και η ικανότητα συγκράτησης νερού, ξεκινώντας από περίπου 64% για συγκέντρωση κυτταρίνης 0.1% κ.β. και φθάνοντας περίπου στο 110% για συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 1% κ.β.

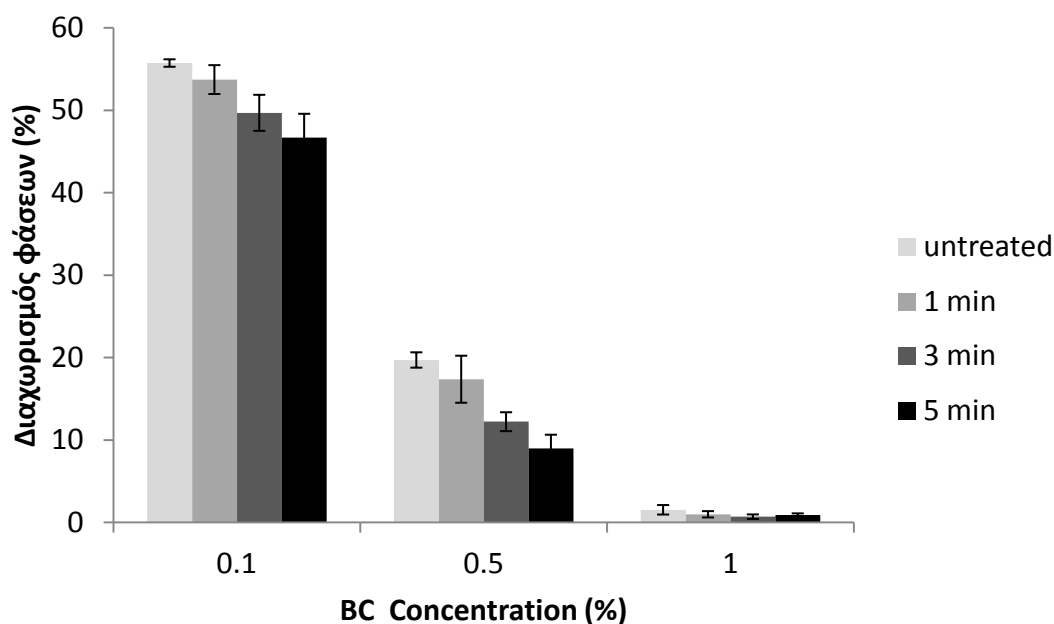
Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη καθώς όταν υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης, δημιουργείται μεγαλύτερο δίκτυο ινιδίων, με αποτέλεσμα να δεσμεύονται περισσότερα μόρια νερού.

3.1.4 Σταθερότητα διαλυμάτων- Διαχωρισμός φάσεων

Ως σταθερότητα ενός διαλύματος βιοπολυμερούς ορίζεται η ικανότητά του να αντιστέκεται σε αλλαγές των ιδιοτήτων του με την πάροδο του χρόνου (McClements, 2005). Η σταθερότητα εξαρτάται από τη φύση του πολυμερούς και αποτελεί σημαντικό παράγοντα καθώς επηρεάζει τις ιδιοότητες των προϊόντων στα οποία θα ενσωματωθεί το πολυμερές αυτό.

Στην παρούσα εργασία, με χρήση της συσκευής Turbiscan καταγράφηκε ο διαχωρισμός φάσεων των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 ημέρες, όπως παρουσιάζεται στο γράφημα που ακολουθεί:

Σταθερότητα διαλυμάτων



Γράφημα 3: Διαχωρισμός φάσεων των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από 20 ημέρες

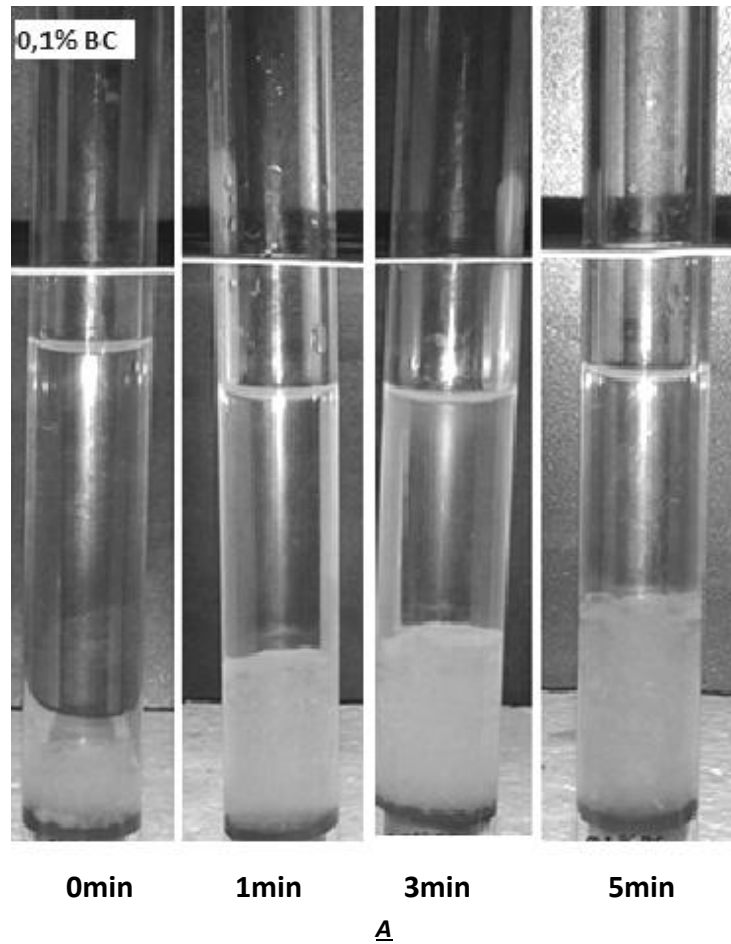
Όπως φαίνεται από το γράφημα, **αύξηση του χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους οδηγεί σε μεγαλύτερη σταθερότητα** του διαλύματος (μικρότερος διαχωρισμός φάσεων), για όλες τις συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης. Για παράδειγμα, σε συγκέντρωση κυτταρίνης 0.5% ο διαχωρισμός φάσεων φτάνει στο 20% για το μη επεξεργασμένο δείγμα, ενώ μετά από επεξεργασία 1 λεπτού μειώνεται στο 16%, μετά από επεξεργασία 3 λεπτών μειώνεται στο 12% και τελικά μετά από 5 λεπτά φτάνει στο 9%. Αντίστοιχα, μείωση του διαχωρισμού φάσεων από 20% σε περίπου 6% έχει αναφερθεί και από τους (Lin, Li, Lopez- Sanchez & Li, 2014).

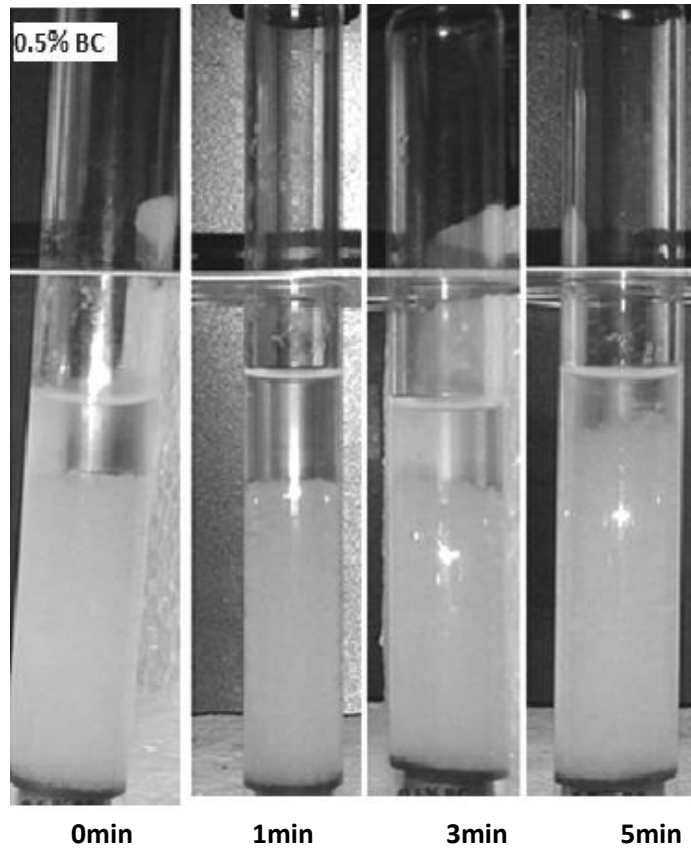
Γενικά, η επεξεργασία με υπερήχους θεωρείται ότι αυξάνει τη σταθερότητα διαλυμάτων πολυσακχαριτών και γαλακτωμάτων (Abismaïl, Canselier, Wilhelm, Delmas, & Gourdon, 1999; Kaltsa, Michon, Yanniotis, & Mandala, 2013; Abbas, Hayat, Karangwa, Bashari, Zhang, 2013). Ωστόσο, μεγάλης διάρκειας επεξεργασία με υπερήχους μπορεί να φέρει και το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή μείωση της σταθερότητας του διαλύματος (Abbas, Hayat, Karangwa, Bashari, Zhang, 2013).

Σε ότι αφορά την **εξάρτηση της σταθερότητας από τη συγκέντρωση** της βακτηριακής κυτταρίνης, φαίνεται ότι αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί σε σημαντική μείωση του διαχωρισμού φάσεων του διαλύματος, ανεξαρτήτως του χρόνου επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, για συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 0,1% ο διαχωρισμός φάσεων είναι περίπου 45-55%, για συγκέντρωση 0,5% μειώνεται στο 9-20% και τέλος για συγκέντρωση κυτταρίνης 1% φτάνει στο 0.7-1,5 %. Το φαινόμενο της αύξησης της σταθερότητας του διαλύματος, με την αύξηση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης είναι κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Paximada, Tsouko, Kopsahelis, Koutinas, & Mandala, 2014; Abismaïl, Canselier, Wilhelm, Delmas, & Gourdon, 1999; Kaltsa, Michon, Yanniotis, & Mandala, 2013). Τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης έχουν την τάση να

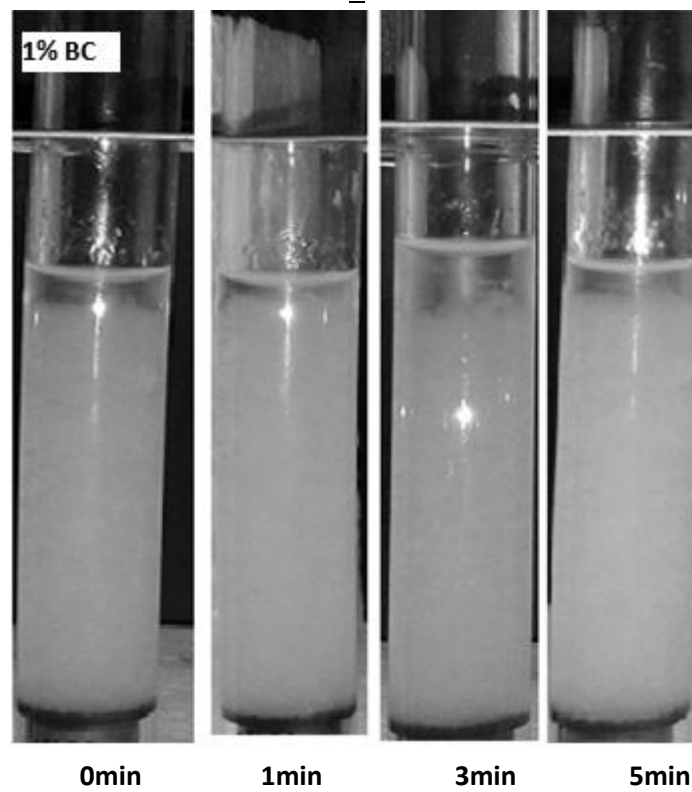
συνενώνονται. Ωστόσο, όταν αυξάνεται η συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης τα συσσωματώματα ινιδίων εξακολουθούν μεν να δημιουργούνται, όμως η καθίζησή τους εμποδίζεται λόγω του σχηματισμού πυκνού δικτύου.

Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζεται η εμφάνιση των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από αποθήκευση 20 ημερών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος:





B



C

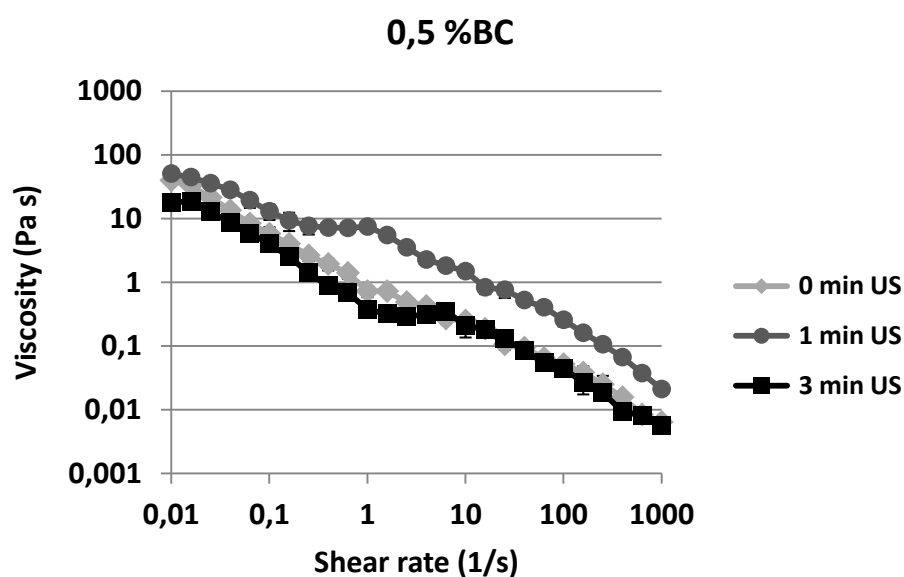
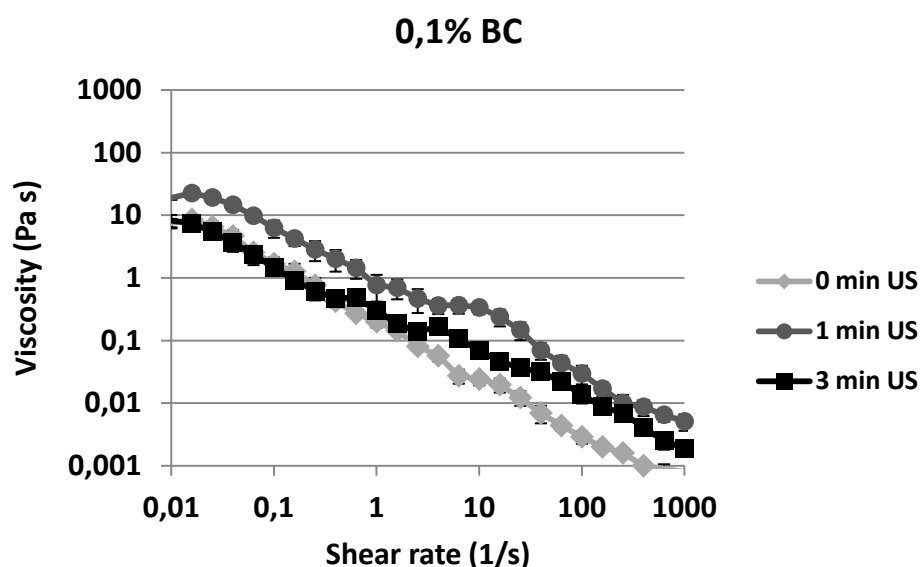
Εικόνα 30: Διαχωρισμός φάσεων διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από 20 ημέρες. Α: διαλύματα συγκέντρωσης 0.1% , Β: διαλύματα συγκέντρωσης 0.5%, C: διαλύματα συγκέντρωσης 1%, επεξεργασμένα για 0,1,3 και 5 λεπτά αντίστοιχα.

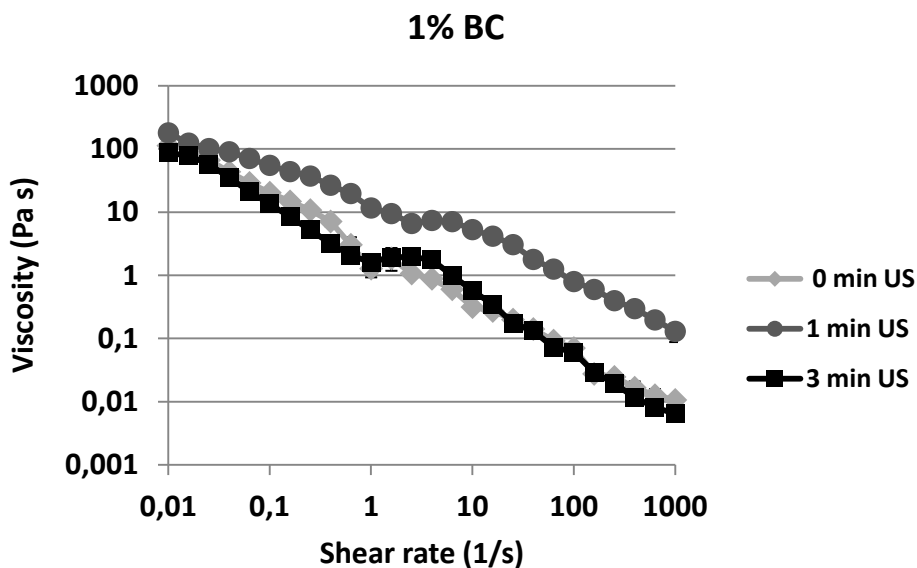
Όπως φαίνεται από τις εικόνες, τα διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης αποσταθεροποιούνται παρουσιάζοντας το φαινόμενο της καθίζησης (sedimentation) κάτι που έχει παρατηρηθεί και από τους (Lin, Li, Lopez-Sanchez & Li, 2015). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις βαρυτικές δυνάμεις που οδηγούν το δίκτυο των ινιδίων κυτταρίνης (το οποίο έχει και μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό) να καθιζάνει (McClements, 2007).

3.1.5 Ρεολογικές μετρήσεις

3.1.5.1 Ιξώδες

Η μελέτη των ρεολογικών ιδιοτήτων της βακτηριακής κυτταρίνης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς οι ρεολογικές της ιδιότητες επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος στο οποίο θα ενσωματωθεί. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση της επεξεργασίας με υπερήχους στο ιξώδες διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης.





Γράφημα 4: Ιξώδες των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης

Αρχικά, σε ότι αφορά τη συμπεριφορά των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης, βλέπουμε ότι όλα τα δείγματα, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και χρόνου επεξεργασίας, εμφανίζουν **ψευδοπλαστική (shear thinning) συμπεριφορά**, καθώς το ιξώδες τους μειώνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης (Paakko et al., 2007). Τέτοιου είδους ιξώδης συμπεριφορά παρατηρείται για τα περισσότερα διαλύματα που περιέχουν κυτταρίνη (Lin, Li, Lopez-Sanchez & Li, 2015; Jia et al, 2014).

Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν **τρεις περιοχές ιξώδους** στο ρεολογικό τους προφίλ. Αρχικά, σε μικρές τιμές ρυθμού διάτμησης ($<1 \text{ s}^{-1}$) τα μικρού μεγέθους συσσωμάτωμα που έχουν στενή κατανομή μεγεθών παραμένουν σταθερά, ενώ το δίκτυο ινιδίων που συνδέονται με αδύναμους δεσμούς υδρογόνου και δίνουν την τρισδιάστατη δομή της κυτταρίνης, αποδομείται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης οδηγώντας σε μείωση του ιξώδους. Στη συνέχεια, σε ενδιάμεσες τιμές ρυθμού διάτμησης (περίπου $1-10 \text{ s}^{-1}$) παρουσιάζεται ένα πλατώ, όπου το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό αποκτώντας ευρύτερη κατανομή μεγεθών. Σε αυτό το σημείο η διατμητική τάση είναι αρκετά ισχυρή ώστε να διασπάσει την τρισδιάστατη δομή της βακτηριακής κυτταρίνης, αλλά αυξάνει και τη συχνότητα συγκρούσεων μεταξύ των ινιδίων, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται νέες αλληλεπιδράσεις και να μην παρατηρείται περαιτέρω μείωση του ιξώδους. Η περιοχή διατμητικών τάσεων που εμφανίζεται αυτό το πλατώ είναι ελαφρώς διαφορετική ανάλογα με τη συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης. Τέλος, σε υψηλότερες τιμές διατμητικής τάσης ($>10 \text{ s}^{-1}$), τα συσσωματώματα ινιδίων αποδομούνται με την αύξηση της διατμητικής τάσης, οδηγώντας σε απότομη μείωση του ιξώδους και εμφάνιση ψευδοπλαστικής συμπεριφοράς (Karppinen et al, 2012). Η συμπεριφορά αυτή έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Paakko et al., 2007; Lin, Li, Lopez-Sanchez & Li, 2015; Jia et al, 2014).

Ακόμα, φαίνεται ότι η **διάρκεια της επεξεργασίας με υπερήχους**, επηρεάζει το ιξώδες των διαλυμάτων, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης. Έτσι, τα μη επεξεργασμένα δείγματα βακτηριακής κυτταρίνης έχουν το μικρότερο ιξώδες, ενώ μετά από 1 λεπτό επεξεργασίας όλα τα δείγματα παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ιξώδες.

Αντιθέτως, μετά από επεξεργασία διάρκειας 3 λεπτών το ιξώδες όλων των διαλυμάτων μειώνεται σημαντικά. Τέλος, έγινε προσπάθεια μέτρησης του ιξώδους διαλυμάτων μετά από επεξεργασία με υπερήχους, διάρκειας 5 λεπτών, κάτι το οποίο δεν ήταν δυνατό καθώς τα ινίδια της κυτταρίνης δημιουργούσαν συσσωματώματα, μη επιτρέποντας να ληφθούν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Η μη αναμενόμενη αυτή τάση είναι σύμφωνη με την τάση που παρουσιάστηκε για το πλάτος των ινιδίων της κυτταρίνης, όπως φάνηκε παραπάνω. Αντίστοιχη τάση έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες για άλλα πολυμερή όπως η χιτοζάνη (Baxter, Zivanovic & Weiss, 2005) και φυσικά πολυμερή όπως το άμυλο και το άγαρ (Price, 1990). Το φαινόμενο αυτό, μπορεί να αποδοθεί στη μείωση του μεγέθους των ινιδίων (Baxter, Zivanovic & Weiss, 2005) ή και στην αλλαγή της κρυσταλλικότητας τους (Santos et al, 2015). Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε παραπάνω ότι αύξηση του χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους οδηγεί σε αύξηση της κρυσταλλικότητας των ινιδίων. Αυτή η αύξηση κρυσταλλικότητας οδηγεί σε μικρότερες τιμές ιξώδους (McClements, 2005).

Συνεπώς, μικρής διάρκειας επεξεργασία με υπερήχους (1 λεπτό), μπορεί να οδηγήσει σε δείγματα με υψηλότερο ιξώδες.

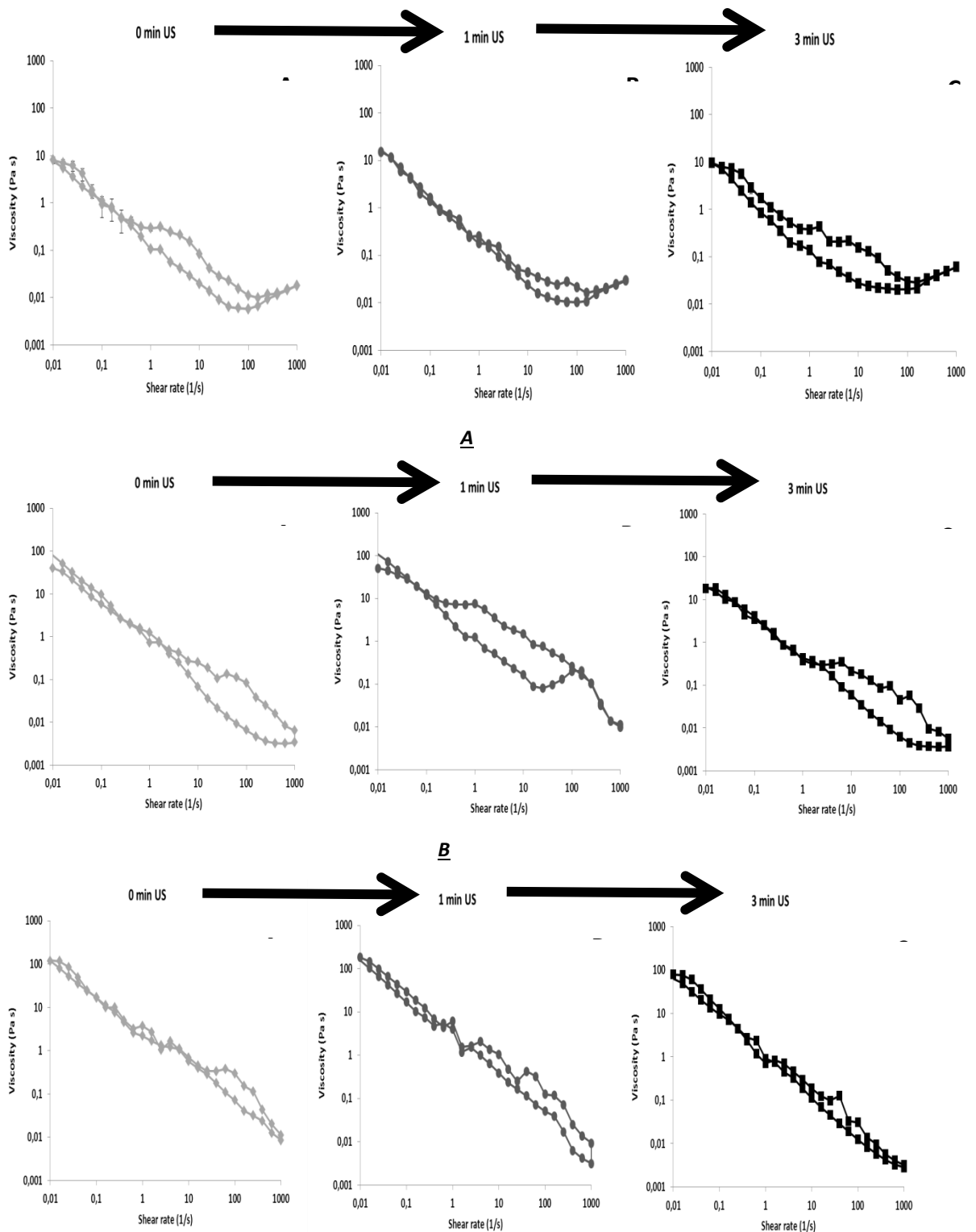
Τέλος, φαίνεται ότι **η συγκέντρωση της βακτηριακής** κυτταρίνης επηρεάζει τις τιμές του ιξώδους. Έτσι, για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρούνται μεγαλύτερες τιμές ιξώδους. Για παράδειγμα, για συγκέντρωση 0.1% παρατηρούμε τιμές ιξώδους περίπου στα 10 Pas (γράφημα 4A), ενώ για συγκέντρωση 1% το ιξώδες φτάνει στα 150 Pas (γράφημα 4C). Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς το ιξώδες των διαλυμάτων αυξάνεται όταν αυξάνεται και η συγκέντρωσή τους (Rao et al, 2005). Στην περίπτωση της βακτηριακής κυτταρίνης, ο ισχυρισμός αυτός ενισχύεται καθώς μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης οδηγεί στο σχηματισμό πυκνότερου δικτύου.

Οι τιμές ιξώδους που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι μεγαλύτερες από αυτές που βρίσκονται στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, για συγκέντρωση κυτταρίνης 1% άλλες μελέτες παρουσιάζουν τιμές ιξώδους περίπου 100Pas (Paako et al, 2007; Winuprasith & Suphantharika, 2013; Nechyorchuk, Belgacem & Pignon, 2014) ή ακόμα και 10 Pas (Jia et al, 2014). Ωστόσο, σε όλες τις παραπάνω μελέτες τα διαλύματα κυτταρίνης επιδεικνύουν ψευδοπλαστική συμπεριφορά όπως και στην παρούσα μελέτη.

3.1.5.2 Θιξοτροπική συμπεριφορά

Θιξοτροπική συμπεριφορά παρουσιάζεται όταν το ιξώδες ενός ρευστού μειώνεται σημαντικά με το χρόνο διάτμησης και στη συνέχεια αυξάνεται και πάλι όταν η δύναμη που προκαλεί τη ροή σταματήσει να δρα (Whelan, 1994). Η εξάρτηση από το χρόνο, είναι μια σημαντική ιδιότητα που πρέπει να διερευνάται για τους πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς επηρεάζει την ροή τους μέσω σωληνώσεων, τις εφαρμογές για επικαλύψεις, τη χρήση τους ως γαλακτωματοποιητές ή σταθεροποιητές κ.α.

Η επίδραση του χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους, στη θιξοτροπική συμπεριφορά διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης συγκέντρωσης 0.1% κ.β, 0.5% κ.β. και 1% κ.β., παρουσιάζεται στο γράφημα που ακολουθεί:



Γράφημα 5: Επίδραση χρόνου επεξεργασίας στη θιξοτροπική συμπεριφορά διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης συγκέντρωσης 0.1 % (A), 0.5 % (B) και 1% κ.β. (C).

Αρχικά, φαίνεται ότι όλα τα δείγματα εμφανίζουν τυπική **θιξοτροπική συμπεριφορά**, κάτι που αναφέρεται και σε άλλες μελέτες της συμπεριφοράς διαλυμάτων κυτταρινών (Paakko et al., 2007; Jia et al, 2014; Nechyorchuk, Belgacem & Pignon, 2014; Araki, Wada, Kuga & Okano, 1998).

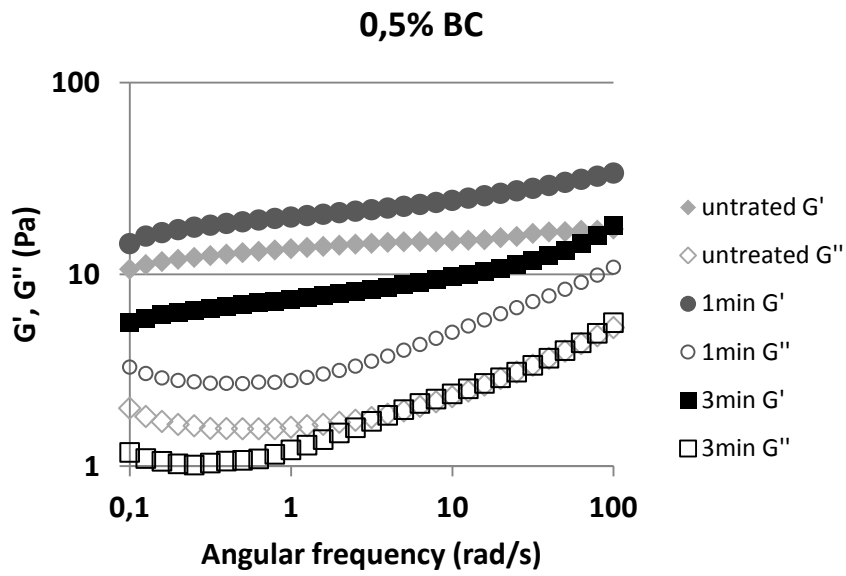
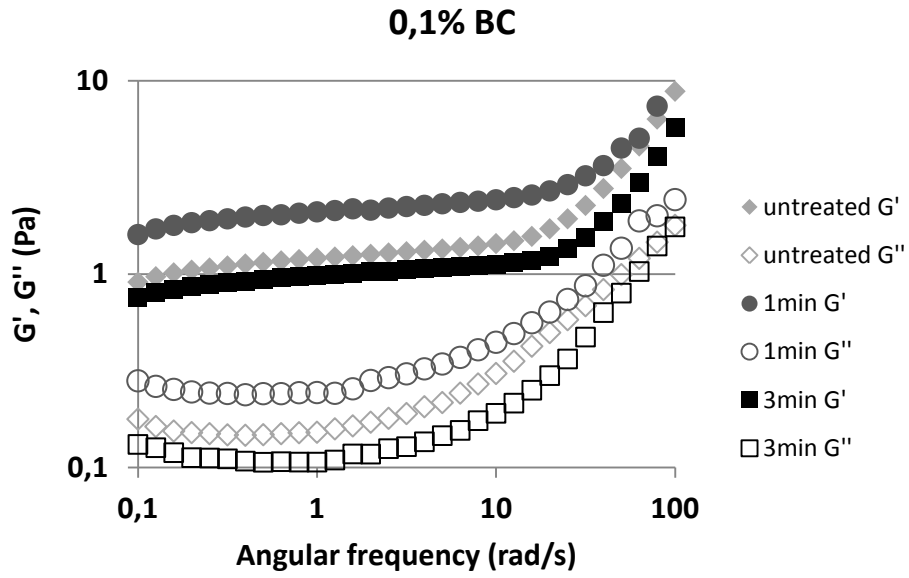
Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να εξεταστεί, είναι η **υστέρηση** μεταξύ των δύο καμπυλών, δηλαδή η διαφορά μεταξύ της καμπύλης μείωσης του ιξώδους και της καμπύλης αύξησης του ιξώδους. Αναφορικά με την **εξάρτηση της από το χρόνο** επεξεργασίας, παρατηρούμε ότι για επεξεργασία 1 λεπτού, η υστέρηση εμφανίζεται σε χαμηλότερους ρυθμούς διάτμησης από ότι στα μη επεξεργασμένα δείγματα, ενώ για επεξεργασία 3 λεπτών η υστέρηση εμφανίζεται περίπου στις ίδιες περιοχές ρυθμών διάτμησης όπως και στα μη επεξεργασμένα δείγματα. Η τάση αυτή είναι περισσότερο εμφανής στα δείγματα συγκέντρωσης 0.5% κ.β., ενώ ακολουθείται η ίδια τάση που παρουσιάζεται και για το ιξώδες των δειγμάτων. Η παρουσία υστέρησης οφείλεται στις αλλαγές που επέρχονται στη μορφολογία των ινιδίων κυτταρίνης κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με υπερήχους. Η εμφάνιση θιξοτροπικής συμπεριφοράς με σχετικά μικρή υστέρηση, είναι συνηθισμένη για δείγματα που περιέχουν κροκιδωμένα σωματίδια ή ευθύγραμμα ινίδια (Barnes,1997)

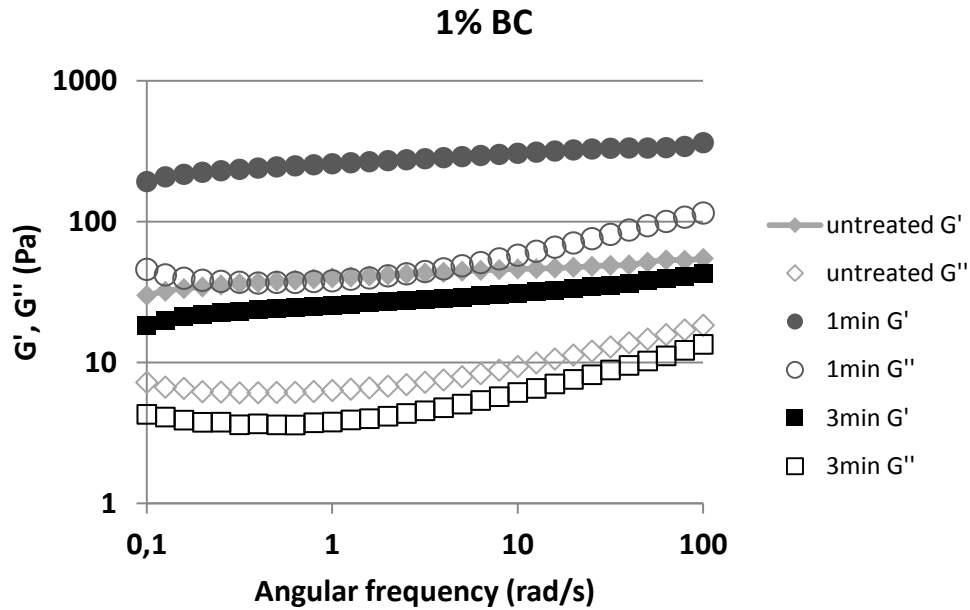
Το φαινόμενο αυτό έχει εξηγηθεί (για την περίπτωση της κυτταρίνης MFC) από τους (Iotti, Gregersen, Moe & Lenes, 2011) και θα μπορούσαμε να δεχθούμε ότι ο ίδιος μηχανισμός ισχύει και για την βακτηριακή κυτταρίνη. Συγκεκριμένα, το γεγονός ότι οι δύο καμπύλες δεν συμπίπτουν οφείλεται στο ότι τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης υφίστανται αλλαγές στη δομή, ενώ η έκταση αυτών των αλλαγών μπορεί να υπολογιστεί από το εμβαδό της περιοχής υστέρησης. Αρχικά, όσο αυξάνεται ο ρυθμός διάτμησης η καμπύλη επιδεικνύει όλο και ισχυρότερη ψευδοπλαστική (shear thinning) συμπεριφορά. Ωστόσο, όταν το δείγμα υφίσταται μείωση της διατμητικής τάσης δεν μπορεί να διατηρήσει τη δομή που απέκτησε με την αύξηση της διατμητικής τάσης και έτσι επιστρέφει σε τιμές μεγαλύτερου ιξώδους. Συνεπώς, το δείγμα εμφανίζει ξεκάθαρα θιξοτροπική συμπεριφορά. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία η περιοχή υστέρησης που εμφανίζεται είναι σχετικά μικρή, γεγονός που αποδίδεται στο ότι η κυτταρίνη έχει ασθενή θιξοτροπική τάση, ενώ η μικροδομή που καταστρέφεται λόγω διατμητικής τάσης, μπορεί να επανέλθει μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα (Jia et al, 2014).

Αναφορικά με την εξάρτηση της θιξοτροπικής συμπεριφοράς των δειγμάτων από τη συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης, φαίνεται από τα παραπάνω γραφήματα ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις οδηγούν σε υψηλότερο ιξώδες (όπως αναλύθηκε και στην προηγούμενη ενότητα). Ακόμα, αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί στην παρουσία πολύ μικρότερης περιοχής υστέρησης (γράφημα 5C). Μικρότερη περιοχή υστέρησης σημαίνει ότι τυχόν αλλαγές στη δομή της βακτηριακής κυτταρίνης μπορούν να αναιρεθούν μέσα σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Αντίστοιχη μείωση της περιοχής υστέρησης με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυτταρίνης έχει καταγραφεί από τους (Iotti, Gregersen, Moe & Lenes, 2011).

3.1.5.3 Ιξωδοελαστική συμπεριφορά

Οι συντελεστές αποθήκευσης (elastic or storage modulus, G') και απώλειας (loss modulus, G'') συναρτήσκει της γωνιακής συχνότητας (angular frequency, rad/s) των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης παρουσιάζονται στο γράφημα που ακολουθεί. Σε όλα τα δείγματα διατηρήθηκε σταθερή τάση 0.3% ώστε να βρίσκονται εντός της γραμμικής ιξωδοελαστικής περιοχής.





Γράφημα 6: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων με διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, σε όλα τα δείγματα ισχύει ότι $G' > G''$, γεγονός που δείχνει ότι το δείγμα εμφανίζει περισσότερο ελαστική συμπεριφορά, δηλαδή μπορεί να επανέρθει στην αρχική του κατάσταση όταν σταματήσει η επίδραση του φορτίου (Paakko et al., 2007; Munizaga & Barbosa-Ca'novas, 2005; Nechporchuk, Belgacem & Pignon, 2014). Όλα τα δείγματα δηλαδή, εμφανίζουν συμπεριφορά gel (gel-like behavior) (Jia et al, 2014).

Σε σχέση με **την επίδραση του χρόνου επεξεργασίας των δειγμάτων**, όπως φαίνεται από το παραπάνω γράφημα, οι συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας ακολουθούν την ίδια τάση με το ιξώδες. Δηλαδή, τα μη επεξεργασμένα δείγματα έχουν μικρότερους συντελεστές G' και G'' , ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης. Μετά από επεξεργασία 1 λεπτού οι συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας αυξάνονται σημαντικά, ενώ μετά από επεξεργασία 3 λεπτών, τα μέτρα όλων των δειγμάτων εμφανίζουν σημαντική μείωση. Το φαινόμενο αυτό, πιθανότατα οφείλεται στις αλλαγές στη μορφολογία της βακτηριακής κυτταρίνης που λαμβάνουν χώρα κατά την επεξεργασία της με υπερήχους, καθώς όπως φαίνεται ακολουθείται η ίδια τάση που παρουσιάζεται και στις μορφολογικές αλλαγές.

Επίσης, φαίνεται ότι **αύξηση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης οδηγεί σε σημαντική αύξηση τόσο του συντελεστή G' όσο και του συντελεστή G''** . Έτσι, σε συχνότητες 0,1 rad/s για συγκέντρωση 0,1% το μέτρο αποθήκευσης είναι περίπου 1 Pa, για συγκέντρωση 0,5% αυξάνεται σε περίπου 5Pa και τελικά για συγκέντρωση 1% φτάνει περίπου στα 100Pa. Το αποτέλεσμα αυτό, οφείλεται στην ισχυροποίηση του δικτύου των ινιδίων κυτταρίνης που συνδέεται με την αύξηση της συγκέντρωσης (Jia et al, 2014; Tzoumaki, Moschakis, Kiosseoglou & Biliaderis, 2011).

Αντίστοιχες τιμές με αυτές που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν αναφερθεί από τους (Tzoumaki, Moschakis, Kiosseoglou & Biliaderis, 2011) για τη διάλυμα χιτοζάνης συγκέντρωσης 0,5% και από τους (Jia et al, 2014) οι οποίοι ανέφεραν τιμή 10 Pa για το συντελεστή αποθήκευσης σε συγκέντρωση 1% άμορφης κυτταρίνης.

Ωστόσο, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης, ο συντελεστής G' είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερος του G'' , παρατήρηση που αποδίδεται στο ότι τα ινίδια κυτταρίνης ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις δημιουργούν ένα σχετικά ισχυρό δίκτυο (Lavoine, Desloges, Dufresne & Bras, 2012).

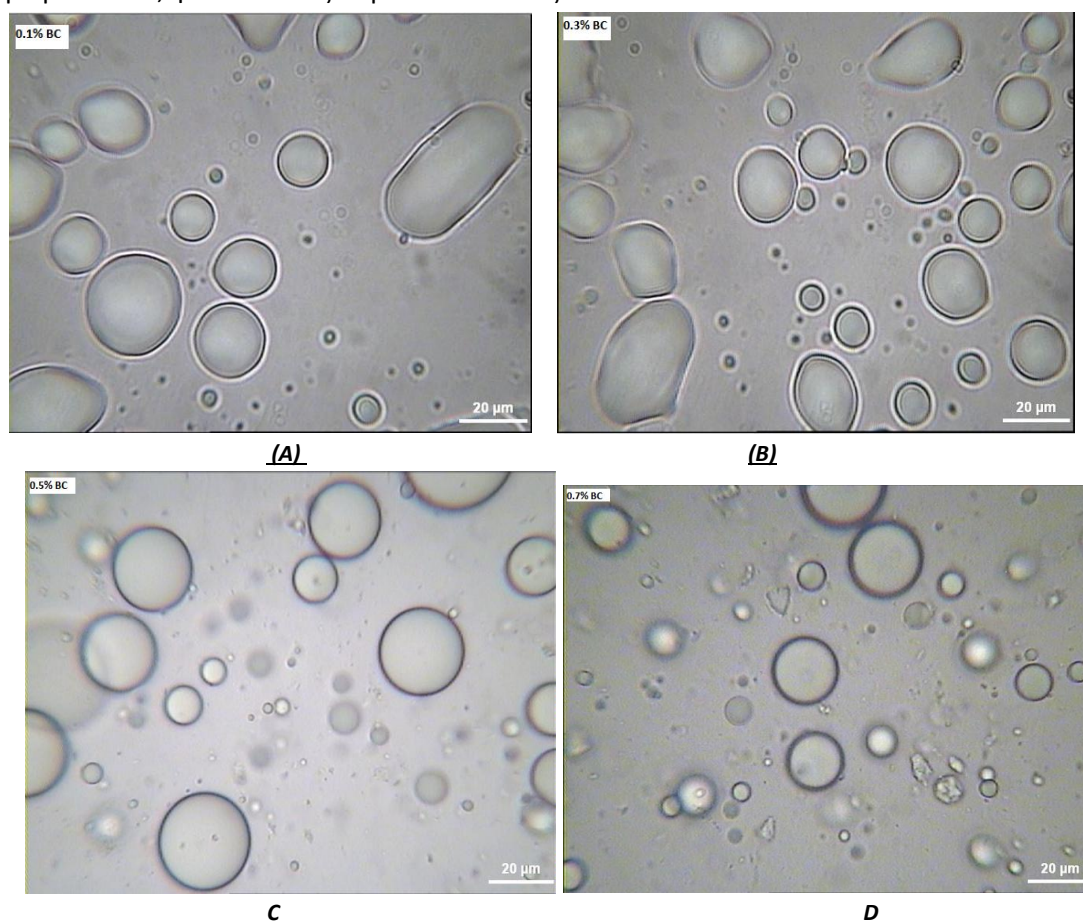
Τέλος, παρατηρούμε ότι για **συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 0,1%** οι συντελεστές G' και G'' παρουσιάζουν μικρή εξάρτηση από τη συχνότητα, κάτι που αποτελεί ένδειξη ασθενούς συμπεριφοράς gel. Επίσης, για συγκέντρωση 0,5% η εξάρτηση αυτή γίνεται ασθενέστερη και τελικά απουσιάζει για συγκέντρωση 1%. Η απουσία εξάρτησης των μέτρων G' και G'' από τη συχνότητα αποτελεί ένδειξη ισχυρής συμπεριφοράς gel.

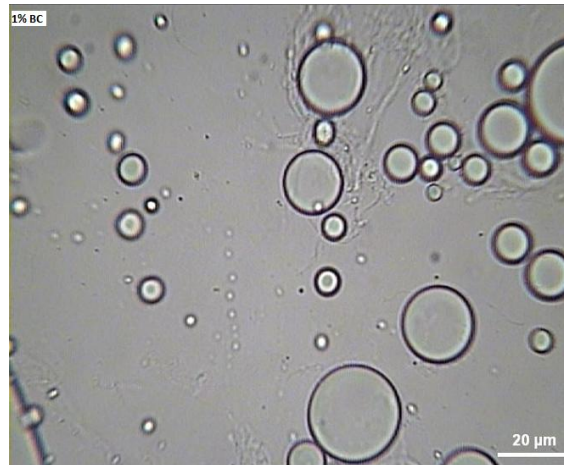
3.1.6 Χρήση της επεξεργασμένης με υπερήχους βακτηριακής κυτταρίνης σε γαλακτώματα

Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικώς ασταθή, γι' αυτό απαιτείται να ενσωματώνονται σε αυτά, ουσίες που ονομάζονται σταθεροποιητές (ή γαλακτωματοποιητές) και ενισχύουν τη σταθερότητά τους, δημιουργώντας ένα προστατευτικό κάλυμα, το οποίο εμποδίζει τα σταγονίδια να συσσωματώνονται. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η απόδοση ως σταθεροποιητή διαφόρων συγκεντρώσεων βακτηριακής κυτταρίνης που είχε επεξεργαστεί με υπερήχους για 3 λεπτά.

3.1.6.1 Διάμετρος σταγονιδίων γαλακτωμάτων

Η μορφολογία των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων βακτηριακής κυτταρίνης και 10% ελαιολάδου, όπως καταγράφηκε με το οπτικό μικροσκόπιο, φαίνεται στις παρακάτω εικόνες:





(E)

Εικόνα 31: Απεικόνιση σταγονιδίων γαλακτωμάτων που περιέχουν 20% ελαιόλαδο και διάφορες συγκεντρώσεις κυτταρίνης επεξεργασμένης με υπερήχους για 3 λεπτά

Η διάμετρος των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων, παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 8: Επίδραση της συγκέντρωσης κυτταρίνης επεξεργασμένης με υπερήχους στη διάμετρο σταγονιδίων των γαλακτωμάτων (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση και οι δείκτες a,b,c αντιστοιχούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές, για $p < 0.05$)

Δείγμα	Διάμετρος (D50)(μm)
0.1% BC + 20% λάδι	6.3 (3.6) ^a
0.3% BC + 20% λάδι	5.5 (1.6) ^b
0.5% BC + 20% λάδι	3.9 (2.6) ^c
0.7% BC + 20% λάδι	4.0 (2,0) ^c
1% BC + 20% λάδι	3.6 (1.9) ^c

Από τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι **αύξηση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων** των γαλακτωμάτων. Ωστόσο, για συγκέντρωση μεγαλύτερη του 0,5%, η μείωση του μεγέθους δεν είναι στατιστικά σημαντική.

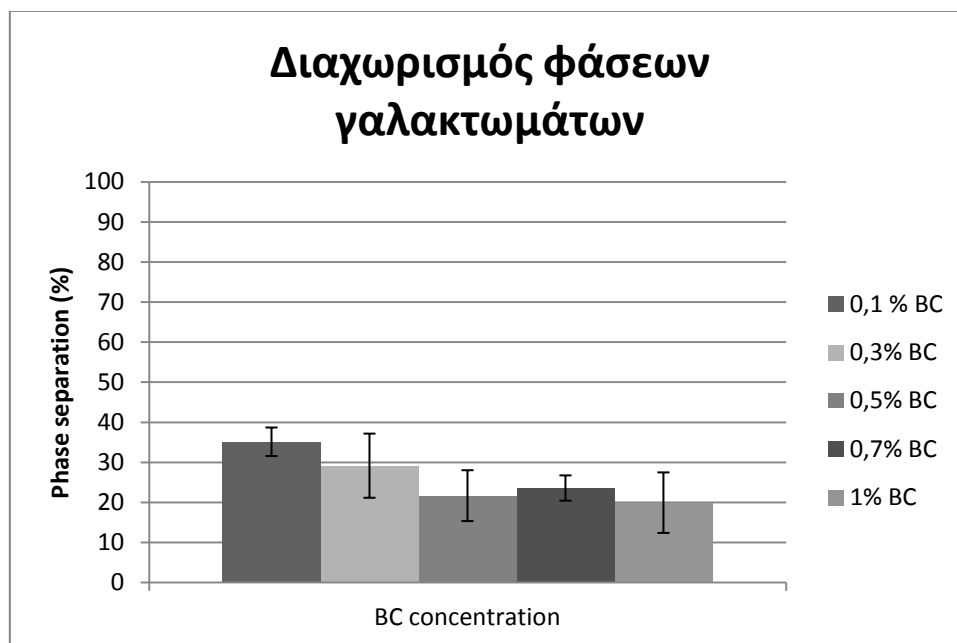
Μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων με την αύξηση συγκέντρωσης πολυσακχαριτών που δρουν ως σταθεροποιητές έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Abbas et al,2013; Kalashnikova et al,2011). Ωστόσο, αναφέρεται και το γεγονός ότι πάνω από κάποια συγκέντρωση πολυσακχαρίτη, η μείωση αυτή σταματά να εμφανίζεται (Leong et al,2009).

Το μέγεθος των σταγονιδίων ενός γαλακτώματος εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ των σταγονιδίων που αποδομούνται και των σταγονιδίων που συσσωματώνονται (Tadros et al, 2004). Οι πολυσακχαρίτες όπως η βακτηριακή κυτταρίνη, λειτουργούν ως σταθεροποιητές καθώς συσσωρεύονται στην διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μη αναμειξιμων ρευστών, δημιουργώντας ένα προστατευτικό φιλμ που εμποδίζει τα σταγονίδια να έρθουν σε επαφή και να σχηματίσουν νέα συσσωματώματα. Οι σταθεροποιητές βοηθούν στη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, μειώνοντας των διεπιφανειακή τάση η οποία μειώνει την αντίσταση των σταγονιδίων στην αποδόμηση. Έτσι, ο ρόλος του σταθεροποιητή είναι να εμποδίζει την άμεση επανασυσσωμάτωση των νέων σταγονιδίων που σχηματίζονται μέσω άμεσης προσρόφησης του στις νέες διεπιφάνειες που σχηματίζονται. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του σταθεροποιητή, υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα

σταθεροποιητή διαθέσιμη να προσροφηθεί στην επιφάνεια των σταγονιδίων και έτσι τελικά σχηματίζονται σταγονίδια μικρότερου μεγέθους (Kalashnikova et al,2011; Leong et al,2009).

3.1.6.2 Διαχωρισμός φάσεων των γαλακτωμάτων

Η επίδραση της συγκέντρωσης της επεξεργασμένης με υπερήχους βακτηριακής κυτταρίνης στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων φαίνεται στο γράφημα που ακολουθεί:



Γράφημα 7: Διαχωρισμός φάσεων γαλακτωμάτων με βακτηριακή κυτταρίνη επεξεργασμένη με υπερήχους

Από το γράφημα φαίνεται ότι **αύξηση της συγκέντρωσης βακτηριακής κυτταρίνης, οδηγεί σε γαλακτώματα μεγαλύτερης σταθερότητας**. Ωστόσο, για συγκέντρωση από 0,5% και πάνω, η αύξηση της σταθερότητας δεν είναι στατιστικά σημαντική. Ακολουθείται δηλαδή, η ίδια τάση που παρατηρήθηκε για το μέγεθος των σταγονιδίων του γαλακτώματος.

Στην περίπτωση των γαλακτωμάτων που περιέχουν ελαιόλαδο και βακτηριακή κυτταρίνη, η αποσταθεροποίηση οφείλεται στο φαινόμενο της κορύφωσης, καθώς τα σταγονίδια του ελαιολάδου έχουν μικρότερη πυκνότητα από την υδατική φάση και έτσι έχουν την τάση να μετακινούνται προς το επάνω μέρος του γαλακτώματος. Συγκεκριμένα στα γαλακτώματα αυτά εμφανίζεται το φαινόμενο της οσμωτικής κροκίδωσης (depletion flocculation) που οδηγεί στη δημιουργία σταγονιδίων μεγαλύτερου μεγέθους και τελικά στην εμφάνιση κορύφωσης. Η οσμωτική κροκίδωση παρατηρείται λόγω της παρουσίας πλεονάσματος μη-προσοφημένων ινιδίων κυτταρίνης στην υδατική φάση (Dickinson 2010). Συνέπεια της μεγάλης συγκέντρωσης βακτηριακής κυτταρίνης είναι η αύξηση των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των σωματιδίων έως ότου τελικά να ξεπεραστούν οι απωστικές δυνάμεις και τα σωματίδια να συνενωθούν (κροκίδωση).

Η αύξηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων όσο αυξάνεται η συγκέντρωση πολυσακχαρίτη έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Chamanai & Mc Clements,2000; Paximada et al,2015; Moschakis, Murray & Dickinson 2005 ; Zinoviadou et al.2012) και

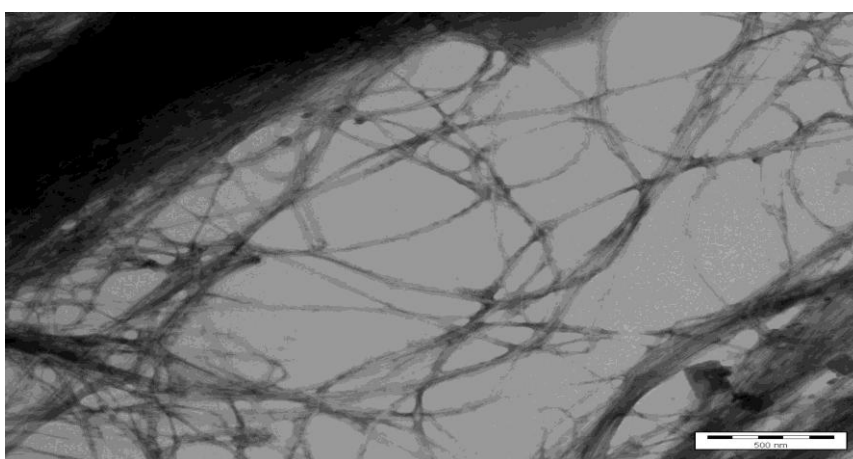
αποδίδεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σταγονιδίων. Συγκεκριμένα, η μείωση εμφάνισης του φαινομένου της κορύφωσης οφείλεται στην ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Σταγονίδια με ισχυρά φορτία δεν μπορούν να πλησιάσουν όσο τα μη φορτισμένα σταγονίδια και συνεπώς δεν έχουν τάσεις κορύφωσης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η βακτηριακή κυτταρίνη διαθέτει αρνητικό φορτίο. Συνεπώς προσρόφηση ινιδίων κυτταρίνης στην επιφάνεια των σταγονιδίων συνεπάγεται ανάπτυξη αρνητικών φορτίων, ενώ όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης τόσο μεγαλύτερα είναι και τα αρνητικά φορτία που εμφανίζονται. Έτσι, μεγαλύτερη συγκέντρωση κυτταρίνης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερότερων γαλακτωμάτων.

3.2. Επίδραση όξινης υδρόλυσης στη μορφολογία και τις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης

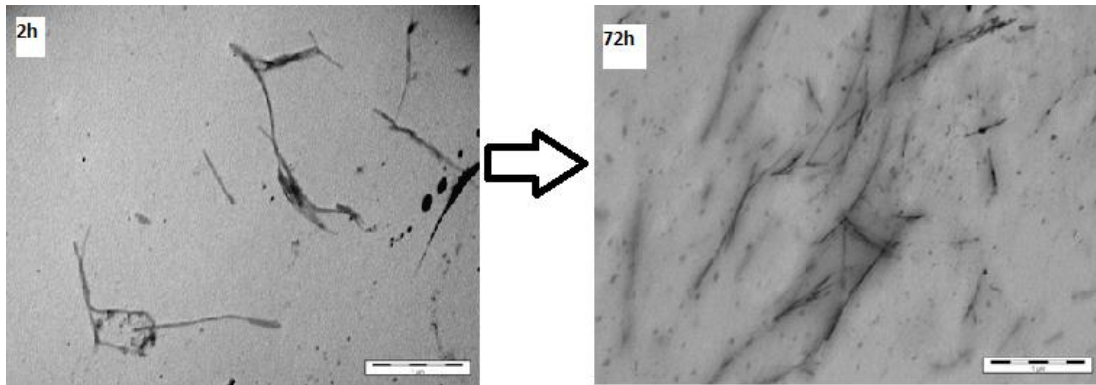
Στην παρούσα εργασία έγινε υδρόλυση των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης και εξετάστηκε η επίδραση του οξέος (θεικού ή υδροχλωρικού) αλλά και των συνθηκών της υδρόλυσης (χρόνος και θερμοκρασία) στις ιδιότητες της κυτταρίνης.

3.2.1 Μορφολογία ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μετά την υδρόλυση με οξέα

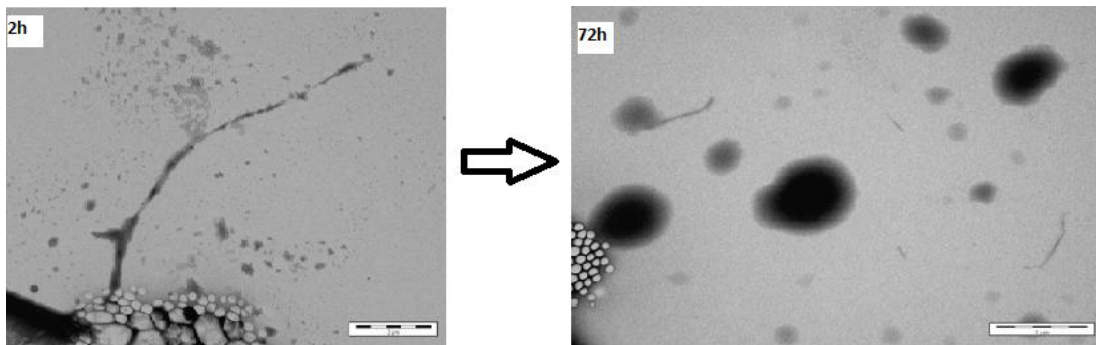
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η επεξεργασία που υφίσταται η κυτταρίνη επιφέρει αλλαγές στη δομή και τη μορφολογία των ινιδίων της. Οι αλλαγές αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο θα χρησιμοποιηθεί κυτταρίνη στη βιομηχανία και για το λόγο αυτό πρέπει να εξετάζονται. Συγκεκριμένα, με τη χρήση μικροσκοπίου TEM εξετάστηκε η μορφολογία των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μετά την επεξεργασία με θεικό και με υδροχλωρικό οξύ, σε διαφορετικές θερμοκρασίες (40°C και 60°C) και για χρονικά διαστήματα 2 και 72 ωρών. Η μορφολογία των ινιδίων παρουσιάζεται στις παρακάτω εικόνες:



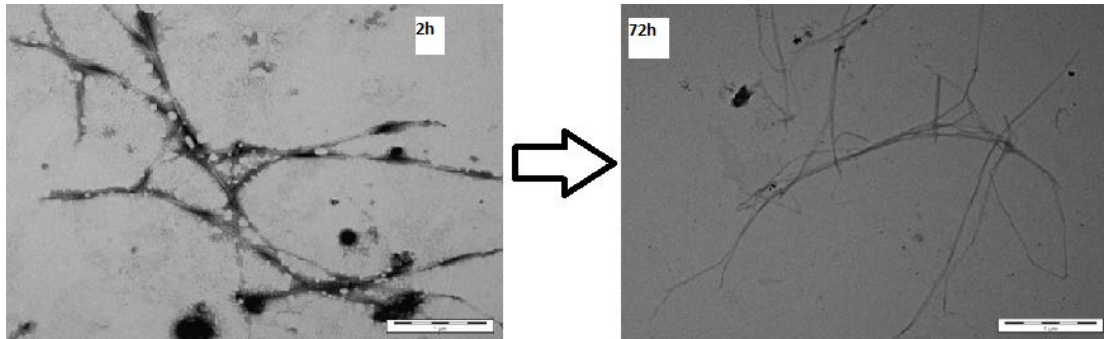
Εικόνα 32: Δίκτυο ινιδίων στο μη επεξεργασμένο δείγμα



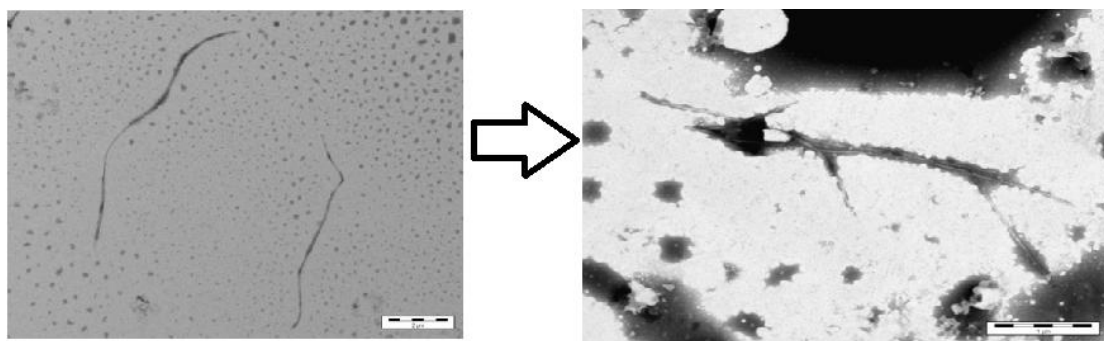
Εικόνα 33: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με H_2SO_4 στους $40^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα $1\mu m$).



Εικόνα 34: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με H_2SO_4 στους $60^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα $2\mu m$).



Εικόνα 35: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με HCl στους $40^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα $1\mu m$).



Εικόνα 36: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με HCl στους $60^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα $2\mu m$ και $1\mu m$ αντίστοιχα)

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, στο μη επεξεργασμένο δείγμα τα μικροϊνίδια κυτταρίνης έχουν μεγάλο μήκος και πλάτος και δημιουργούν ένα πυκνό και πολύπλοκο δίκτυο. **Επεξεργασία με H_2SO_4 οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των ινιδίων ήδη από τις 2 ώρες, ενώ μετά από 72 ώρες τα ινίδια κυτταρίνης αποκτούν σημαντικά μικρότερο μήκος και πλάτος.** Η μείωση αυτή, γίνεται περισσότερο εμφανής όταν η υδρόλυση γίνεται σε θερμοκρασία 60°C. Ακόμα, το δίκτυο ινιδίων γίνεται πολύ αραιότερο έως και μη εμφανές. Αντίθετα, στην περίπτωση της χρήσης HCl η μείωση του μήκους των ινιδίων δεν είναι τόσο έντονη στις 2 ώρες επεξεργασίας, όσο μετά από 72 ώρες. Παρατηρείται ωστόσο αραιώση του πλέγματος ινιδίων και μείωση του πλάτους τους.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και από τις μετρήσεις του μήκους και του πλάτους των ινιδίων, όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 9: Διαφορές στο μέγεθος των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μετά την όξινη υδρόλυση (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση, ενώ τα γράμματα a,b,c,d,e,f δείχνουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)

Μη επεξεργασμένο δείγμα	H_2SO_4 40°C		H_2SO_4 60°C	
	2h	72h	2h	72h
Μήκος	Μήκος		Μήκος	
37.5 μm^a (6.8)	1.833 μm^c (1.036)	0.912 μm^c (0.614)	6.896 μm^b (1.94)	0.947 μm^c (0.557)
Πλάτος	Πλάτος		Πλάτος	
0.120 μm^d (0.088)	0.004 μm^e (0.001)	0.021 μm^e (0.01)	0.031 μm^e (0.007)	0.033 μm^e (0.01)

Μη επεξεργασμένο δείγμα	HCl 40°C		HCl 60°C	
	2h	72h	2h	72h
Μήκος	Μήκος		Μήκος	
37.5 μm^a (6.8)	2.312 μm^c (0.972)	2.134 μm^c (0.896)	6.754 μm^b (0.789)	0.89 μm^c (0.416)
Πλάτος	Πλάτος		Πλάτος	
0.120 μm^d (0.088)	0.021 μm^e (0.007)	0.023 μm^e (0.008)	0.057 μm^e (0.026)	0.021 μm^e (0.009)

Από τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στον παραπάνω πίνακα, επιβεβαιώνονται οι παρατηρήσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Δηλαδή, **όξινη υδρόλυση με H_2SO_4 οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των ινιδίων ήδη από τις 2 ώρες σε θερμοκρασία 40°C και ακόμα μεγαλύτερη μείωση του μεγέθους μετά από 72 ώρες.** Ακόμα, στην περίπτωση της υδρόλυσης με H_2SO_4 σε θερμοκρασία 60°C, η τελική μείωση στο μέγεθος (72 ώρες) είναι σημαντικά μεγαλύτερη, ωστόσο παρατηρείται καθυστέρηση στην αλλαγή μεγέθους, καθώς μετά από δύο ώρες, οι διαφορές στο μέγεθος δεν είναι τόσο μεγάλες.

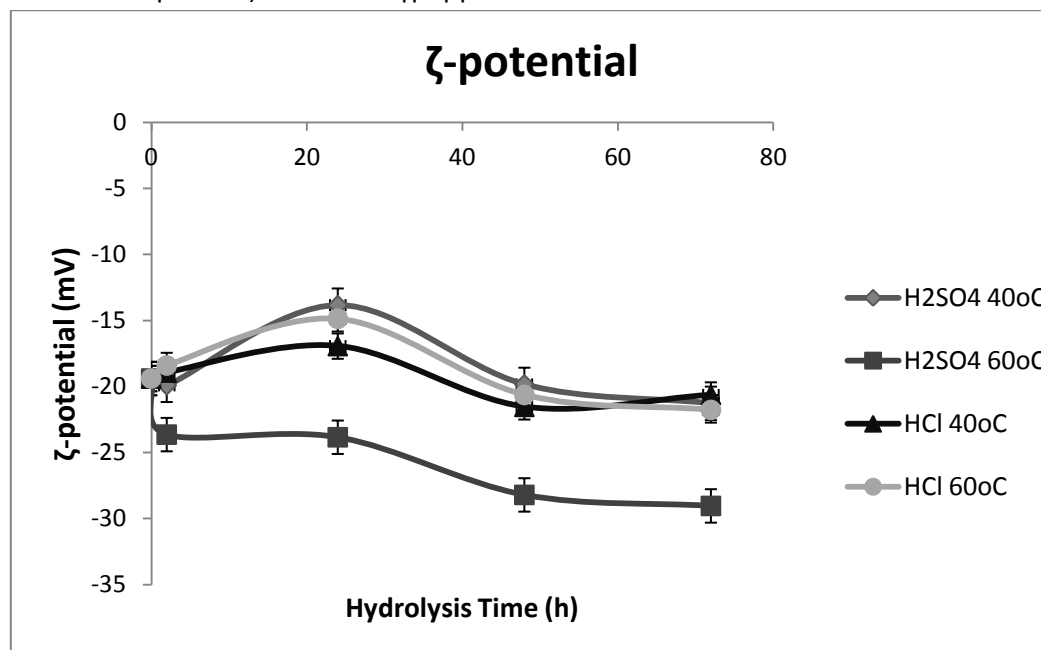
Η ίδια τάση παρατηρείται και για την όξινη υδρόλυση με HCl, ωστόσο η τελική μείωση μεγέθους στους 40°C είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη μείωση για επεξεργασία με H_2SO_4 . Σε ότι αφορά την υδρόλυση σε θερμοκρασία 60°C φαίνεται ότι τα αποτελέσματα είναι περίπου όμοια και για τα δύο οξέα.

Αντίστοιχες τάσεις μείωσης του μεγέθους των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης με την αύξηση του χρόνου όξινης υδρόλυσης έχουν αναφερθεί από τους (Martinez-Sanz, Lopez-Rubio & Lagaron, 2011) για υδρόλυση με H_2SO_4 από 2 έως 48 ώρες στους $50^\circ C$, από τους (Shibazaki, Kuga & Onabe, 1995) για υδρόλυση με HCl στους $100^\circ C$ για χρονικό διάστημα 1 ώρας, από τους (Bondeson, Mathew & Oksman, 2006) για υδρόλυση με H_2SO_4 , οι οποίοι αναφέρουν μάλιστα ότι και η αύξηση της θερμοκρασίας υδρόλυσης επηρεάζει το μέγεθος των ινιδίων. Ακόμα, σύμφωνα με τους (Roman & Winter, 2004) όταν η κυτταρίνη υδρολύεται σε πιο δραστικές συνθήκες τείνει να δημιουργεί αραιότερα δίκτυα και να συσσωματώνεται λιγότερο.

Η μείωση του μεγέθους που παρουσιάζεται μετά την υδρόλυση με ισχυρά οξέα οφείλεται στο γεγονός ότι τα οξέα αυτά αποδομούν τις άμορφες περιοχές των ινιδίων κυτταρίνης, με αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους τους. Συνεπώς, η μείωση του μεγέθους των ινιδίων όσο αυξάνεται ο χρόνος υδρόλυσης σημαίνει ότι μεγαλύτερης διάρκειας επεξεργασία οδηγεί σε περισσότερο κρυσταλλική κυτταρίνη, εφόσον οι άμορφες περιοχές έχουν αποδομηθεί από τα οξέα (Azizi Samir, Alloin, & Dufresne, 2005; Martinez-Sanz, Lopez-Rubio & Lagaron, 2011).

3.2.2 ζ-δυναμικό

Η επίδραση του οξέως, της θερμοκρασίας και του χρόνου υδρόλυσης, στο ζ-δυναμικό των ινιδίων παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί:



Γράφημα 8: ζ- δυναμικό των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης για υδρόλυση με διαφορετικά οξέα και σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Μετά την επεξεργασία με ισχυρά οξέα, η βακτηριακή κυτταρίνη εξακολουθεί να παρουσιάζει αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού, όπως και άλλα δείγματα κυτταρινών (βλ. παραπάνω).

Σχετικά με το **χρόνο επεξεργασίας**, παρατηρείται αύξηση του ζ-δυναμικού μετά από 24 ώρες υδρόλυσης, ενώ οι μικρότερες τιμές παρουσιάζονται μετά από 72 ώρες (για όλα τα οξέα και τις θερμοκρασίες). Σε ότι αφορά το **είδος του οξέος και τη θερμοκρασία**, οι χαμηλότερες τιμές ζ- δυναμικού (μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο) παρουσιάζονται για κατεργασία μεθειικό οξύ στους 60°C και οι μεγαλύτερες τιμές (μικρότερο αρνητικό φορτίο) παρουσιάζονται για κατεργασία μεθειικό οξύ στους 40°C. Για την επεξεργασία με υδροχλωρικό οξύ παρουσιάζεται αντίθετη τάση, ωστόσο οι διαφορές μεταξύ των δύο θερμοκρασιών δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Αντίστοιχη τάση αύξησης του αρνητικού φορτίου με την αύξηση του χρόνου υδρόλυσης μεθειικό οξύ, έχει αναφερθεί και από τους (Kargarzadeh, Ahmad, Abdullah, Dufresne, Zainudin & Sheltami, 2005). Η παρατήρηση αυτή θεωρείται ότι οφείλεται στην παρουσία μεγάλου αριθμού αρνητικά φορτισμένωνθειικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοκρυστάλλων κυτταρίνης, που προκαλούν αύξηση στα επιφανειακά φορτία των κρυστάλλων (Bondeson, Mathew & Oksman, 2006; Habibi et al, 2010; Roman & Winter, 2004). Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στην περίπτωση του υδροχλωρικού οξέος, γεγονός που εξηγεί τις μικρότερες διαφορές τιμές ζ-δυναμικού που παρουσιάζονται στην περίπτωση αυτή.

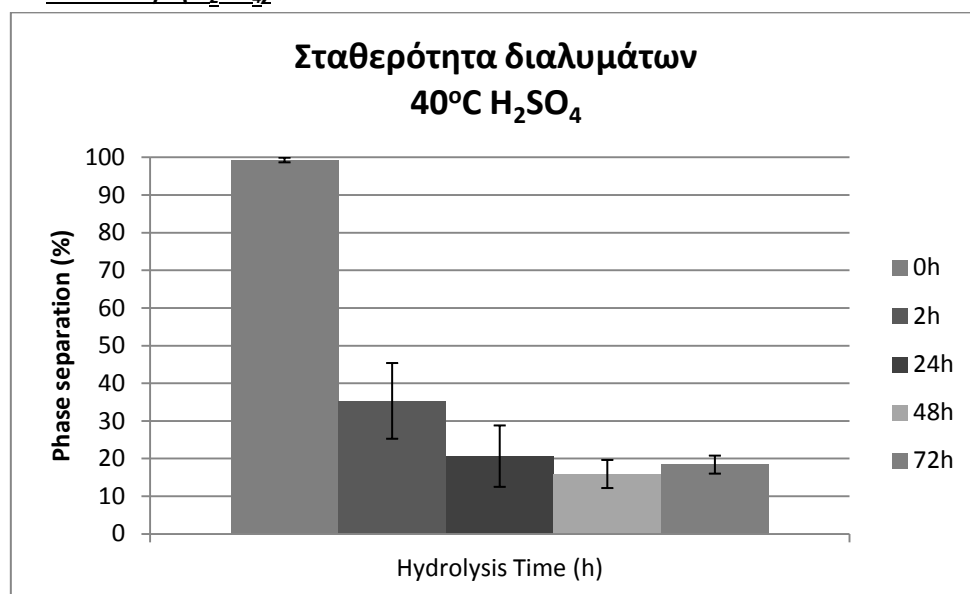
Σε ότι αφορά την **επίδραση της θερμοκρασίας**, παρατηρείται και εδώ ότι υψηλότερη θερμοκρασία οδηγεί σε περισσότερο αρνητικό φορτίο. Η ίδια παρατήρηση αναφέρεται και από τους (Roman & Winter, 2004), σύμφωνα με τους οποίους υδρόλυση μεθειικό οξύ στους

60°C οδηγεί στην παρουσία περισσότερων θειικών ομάδων (οι οποίες διαθέτουν αρνητικό φορτίο) στην επιφάνεια των νανοκρυστάλλων κυτταρίνης από ότι η υδρόλυση στους 40°C.

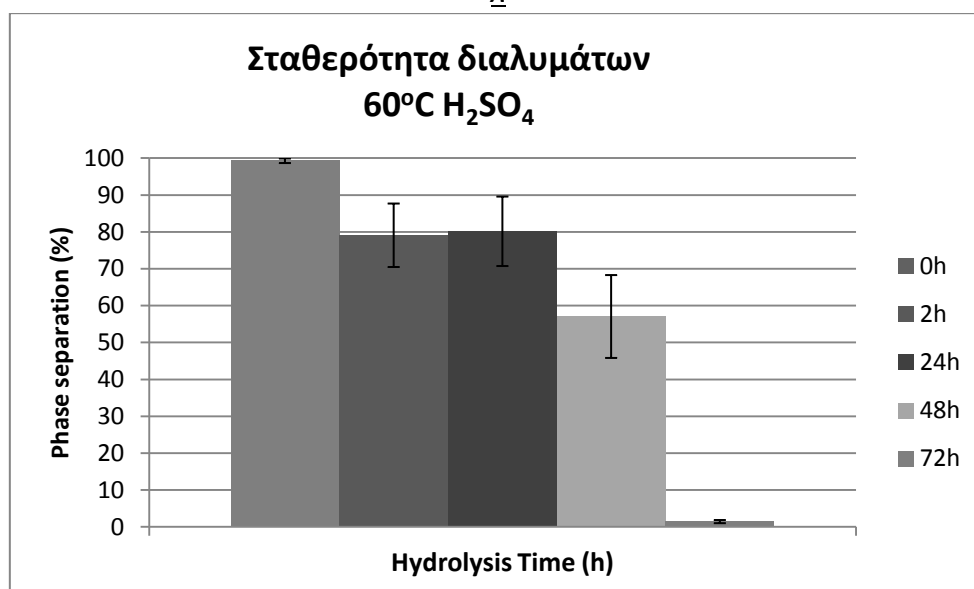
3.2.3 Σταθερότητα διαλυμάτων- Διαχωρισμός φάσεων

Ο διαχωρισμός φάσεων των διαλυμάτων υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης συγκέντρωσης 1% μετά από αποθήκευση 18 ημερών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετρήθηκε με χρήση του οργάνου Turbiscan MA 2000 και παρουσιάζεται στα γραφήματα που ακολουθούν:

➤ Θειικό οξύ (H₂SO₄)



A



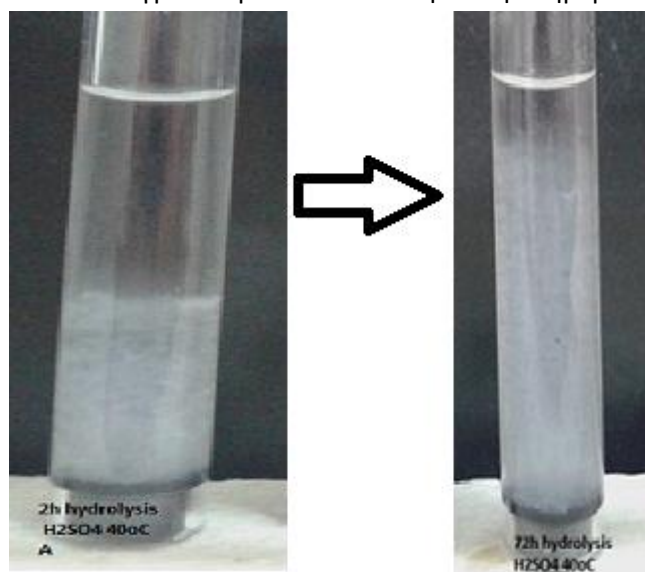
B

Γράφημα 9: Διαχωρισμός φάσεων διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση με H₂SO₄ τους 40°C (A) και 60°C (B)

Από τα παραπάνω γραφήματα βλέπουμε μείωση του ποσοστού διαχωρισμού φάσεων, όσο αυξάνεται ο χρόνος υδρόλυσης, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία. Ωστόσο, στην περίπτωση των 40°C η μείωση στο διαχωρισμό φάσεων είναι αρκετά μεγάλη ήδη από τις 2

πρώτες ώρες (από 99% για το μη επεξεργασμένο δείγμα, μετά από υδρόλυση 2 ωρών γίνεται περίπου 35%) ενώ με αύξηση του χρόνου επεξεργασίας δεν παρατηρούνται τόσο μεγάλες μειώσεις στο ποσοστό διαχωρισμού φάσεων. Αντίθετα, στην περίπτωση των 60 °C, η μείωση στα ποσοστά διαχωρισμού φάσεων δεν είναι τόσο μεγάλη για τις πρώτες 2 και 24 ώρες (από 99% γίνεται 76% και 74%) ενώ παρατηρείται απότομη μείωση μετά από 48 ώρες (57%) και τελικά μεγάλη μείωση (10%) μετά από υδρόλυση διάρκειας 72 ωρών. Ακόμα, το ποσοστό διαχωρισμού φάσεων μετά από 72 ώρες είναι μικρότερο όταν η υδρόλυση γίνεται στους 60 °C (10%) συγκριτικά με την υδρόλυση στους 40 °C (18%). Αντίστοιχη τάση παρατηρήθηκε και σχετικά με το μέγεθος των ινιδίων και την πολυπλοκότητα του δικτύου της υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανή και στις φωτογραφίες που δείχνουν το επίπεδο διαχωρισμού φάσεων των δειγμάτων μετά από αποθήκευση 18ημερών:

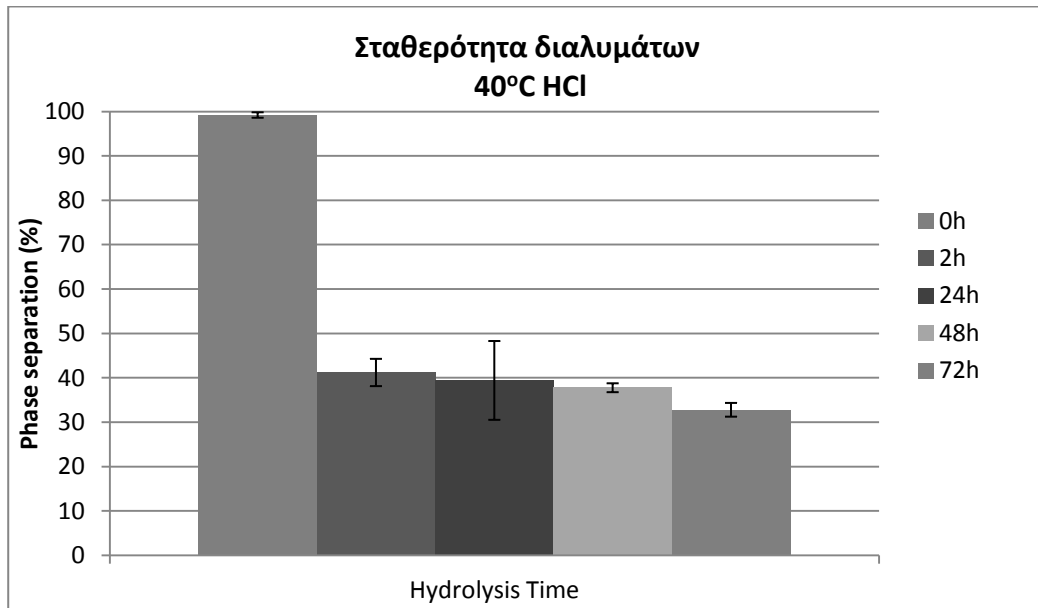


Εικόνα 37: Εμφάνιση διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με 65% H₂SO₄ για 2 και 72 ώρες στους 40°C

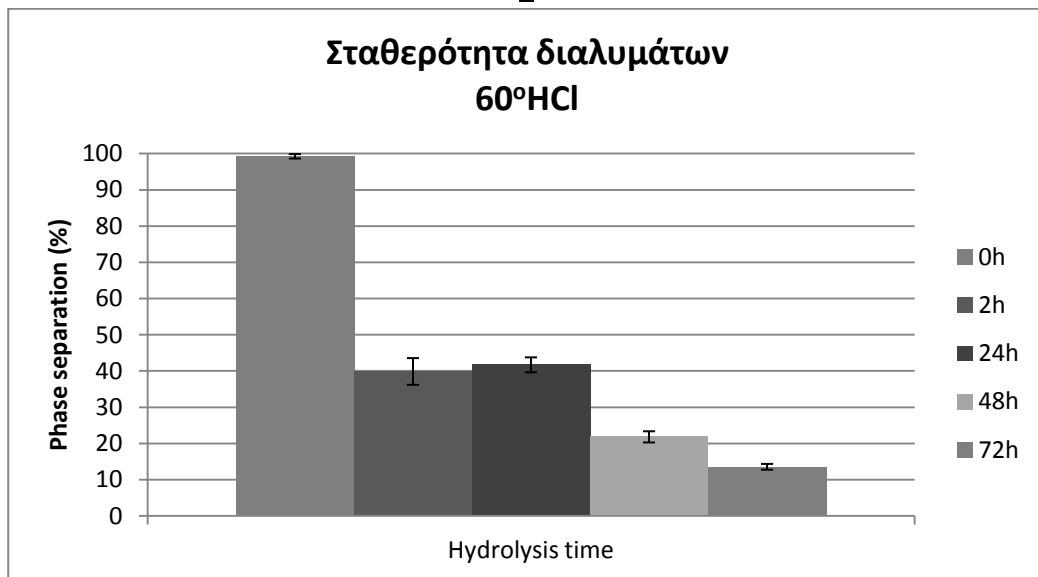


Εικόνα 38: Εμφάνιση διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με 65% H₂SO₄ για 2 και 72 ώρες στους 60°C

➤ Υδροχλωρικό οξύ (HCl)



A

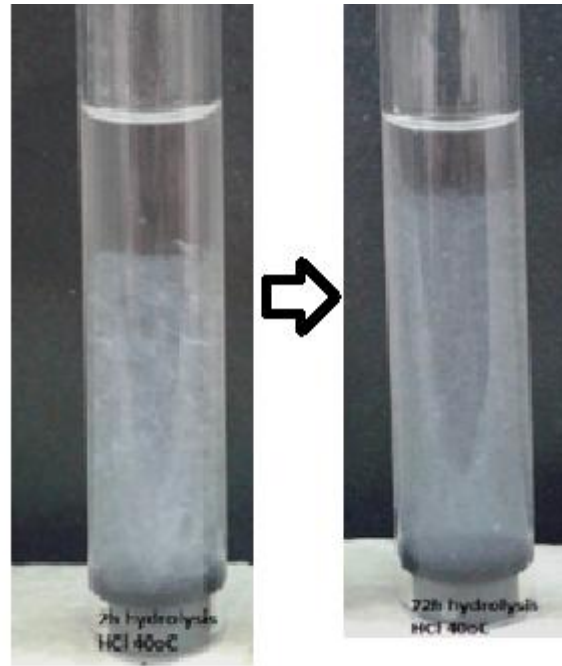


B

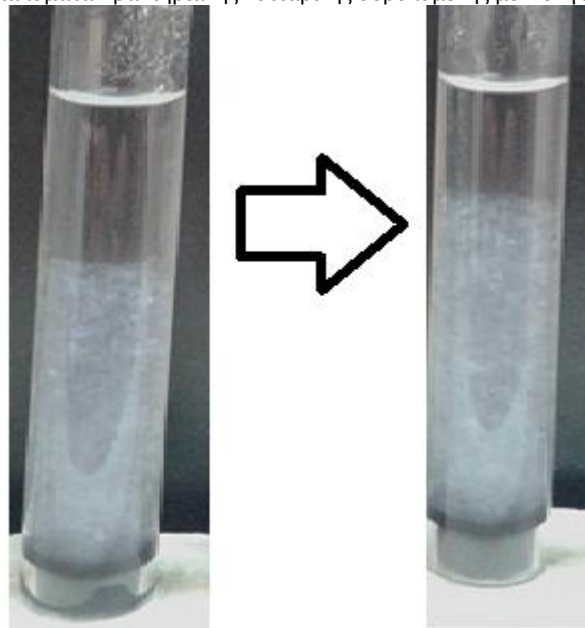
Γράφημα 10: Διαχωρισμός φάσεων διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση με HCl στους 40°C (A) και 60°C (B)

Όπως και προηγουμένως, από τα παραπάνω γραφήματα συμπεραίνουμε ότι αύξηση του χρόνου υδρόλυσης οδηγεί σε διαλύματα μεγαλύτερης σταθερότητας. Ωστόσο, και πάλι στην περίπτωση των 40°C μετά τις 2 ώρες υδρόλυσης δεν παρατηρούνται πολύ μεγάλες διαφορές στη σταθερότητα των διαλυμάτων (περίπου 35-40%). Αντιθέτως, στην περίπτωση των 60°C μετά από 48 ώρες όξινης υδρόλυσης παρατηρείται σημαντική μείωση διαχωρισμού φάσεων (από 40% μειώνεται στο 20%) και ακόμα μεγαλύτερη μείωση του διαχωρισμού φάσεων μετά από 72 ώρες (13%).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανή και στις φωτογραφίες που δείχνουν το επίπεδο διαχωρισμού φάσεων των δειγμάτων μετά από αποθήκευση 18ημερών:



Εικόνα 39: Εμφάνιση διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με HCl για 2 και 72 ώρες στους 40°C



Εικόνα 40: διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με HCl για 2 και 72 ώρες στους 60°C

➤ **Σύγκριση των δύο μεθόδων**

Συνοψίζοντας, σε ότι αφορά το γεγονός ότι η βακτηριακή κυτταρίνη επιδεικνύει **μεγαλύτερη σταθερότητα μετά από υδρόλυση σε θερμοκρασία 60°C** ανεξαρτήτως του οξέος που χρησιμοποιήθηκε, η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση των Roman & Winter(2004). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όταν η κυτταρίνη υδρολύεται σε πιο δραστικές συνθήκες τείνει να δημιουργεί αραιότερα δίκτυα και να εμφανίζει λιγότερα συσσωματώματα, λόγω των μεγαλύτερων αρνητικών φορτίων που αποκτούν τα ινίδια της. Τα φορτία αυτά ενισχύουν τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ινιδίων, μη επιτρέποντάς τους να πλησιάσουν και να συνενωθούν και έτσι αποφεύγεται η δημιουργία συσσωματωμάτων που στη συνέχεια καθιζάνουν.

Ακόμα, το γεγονός της άμεσης αύξησης στη σταθερότητα των διαλυμάτων μετά από 2 ώρες υδρόλυσης στην περίπτωση των 40°C και της υστέρησης στην μείωση αυτή που παρατηρείται στους 60°C, πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι σε υψηλότερη θερμοκρασία οι άμορφες περιοχές της κυτταρίνης (οι οποίες προσβάλλονται από τα οξέα) αποδομούνται αργότερα. Ωστόσο, σε θερμοκρασία 60°C η αντίδραση αποικοδόμησης των περιοχών αυτών γίνεται με γρηγορότερο ρυθμό όπως είναι αναμενόμενο.

Συνολικά, από τα παραπάνω φαίνεται ότι όξινη υδρόλυση με πυκνό θειικό οξύ οδηγεί σε διαλύματα μεγαλύτερης σταθερότητας από ότι η υδρόλυση με υδροχλωρικό οξύ, κυρίως όταν η υδρόλυση διεξάγεται σε θερμοκρασία 60°C. Το συμπέρασμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα συμπεράσματα των Bondeson (2006), Roman & Winter (2004) και Angellier (2005). Η μεγαλύτερη σταθερότητα των διαλυμάτων αυτών, οφείλεται στην παρουσία μεγάλου αριθμού αρνητικά φορτισμένων θειικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοκρυστάλλων κυτταρίνης. Αυτές οι ομάδες θερμαίνονται το αίτιο για τη μεγαλύτερη σταθερότητα που επιδεικνύουν οι νανοκρυστάλλοι που παράγονται από υδρόλυση με θειικό οξύ, ενώ σε νανοκρυστάλλους που παράγονται από υδρόλυση με υδροχλωρικό παρατηρείται έλλειψη ηλεκτροστατικών απωθητικών δυνάμεων μεταξύ των νανοκρυστάλλων και έτσι έχουν την τάση να συσσωματώνονται (Araki et al, 1998).

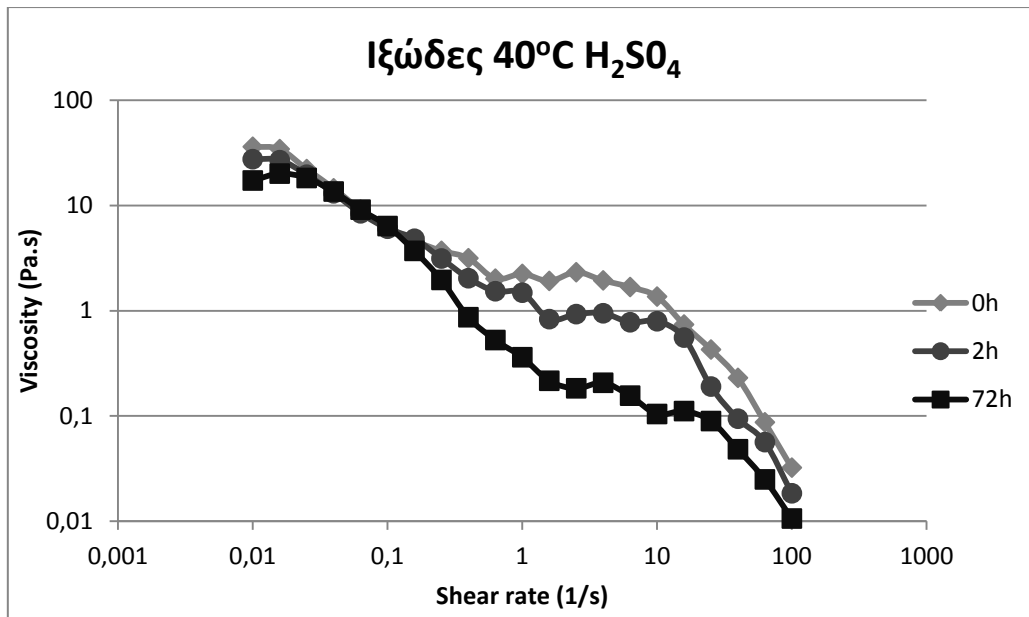
3.2.4 Ρεολογικές μετρήσεις

3.2.4.1 Ιξώδες

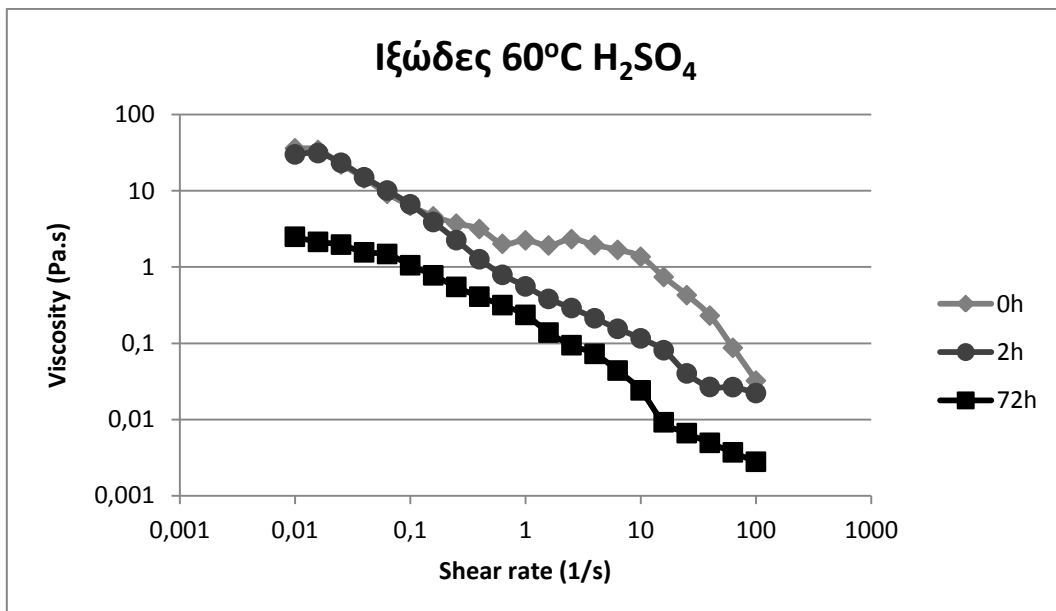
Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του οξέος και του χρόνου υδρόλυσης στην εξάρτηση του ιξώδους διαλυμάτων υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης από τη διατμητική τάση.

➤ Θειικό οξύ (H₂SO₄)

Για υδρόλυση με χρήση θειικού οξέος η επίδραση της όξινης υδρόλυσης στο ιξώδες των διαλυμάτων φαίνεται στα γραφήματα που ακολουθούν. Στο παρακάτω γράφημα, παρατίθενται τα αποτελέσματα για χρόνους υδρόλυσης 2 και 72 ωρών. Ακόμα, μελετήθηκε και η επίδραση στο ιξώδες μετά από 24 και 48 ώρες υδρόλυσης, ωστόσο οι μετρήσεις αυτές δεν δίνονται εδώ για λόγους ευκολίας παρατήρησης. Τα αποτελέσματα για όλους τους χρόνους υδρόλυσης δίνονται στο Παράρτημα (Γράφημα Π1).



A



B

Γράφημα 11: Εξάρτηση ιξώδους από τη διατμητική τάση για διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, υδρολυμένης με H₂SO₄ για 2 και 72 ώρες σε θερμοκρασίες 40°C (A) και 60°C (B).

Αρχικά, από τα παραπάνω γραφήματα φαίνεται ότι τα διαλύματα υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης εξακολουθούν να παρουσιάζουν **ψευδοπλαστική (shear thinning) συμπεριφορά**, καθώς το ιξώδες τους μειώνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης (Paakko et al., 2007), ανεξαρτήτως θερμοκρασίας και χρόνου υδρόλυσης.

Σε ότι αφορά την **επίδραση του χρόνου υδρόλυσης** στο ιξώδες της βακτηριακής κυτταρίνης, φαίνεται ότι αύξηση του χρόνου αυτού οδηγεί σε μείωση του ιξώδους.

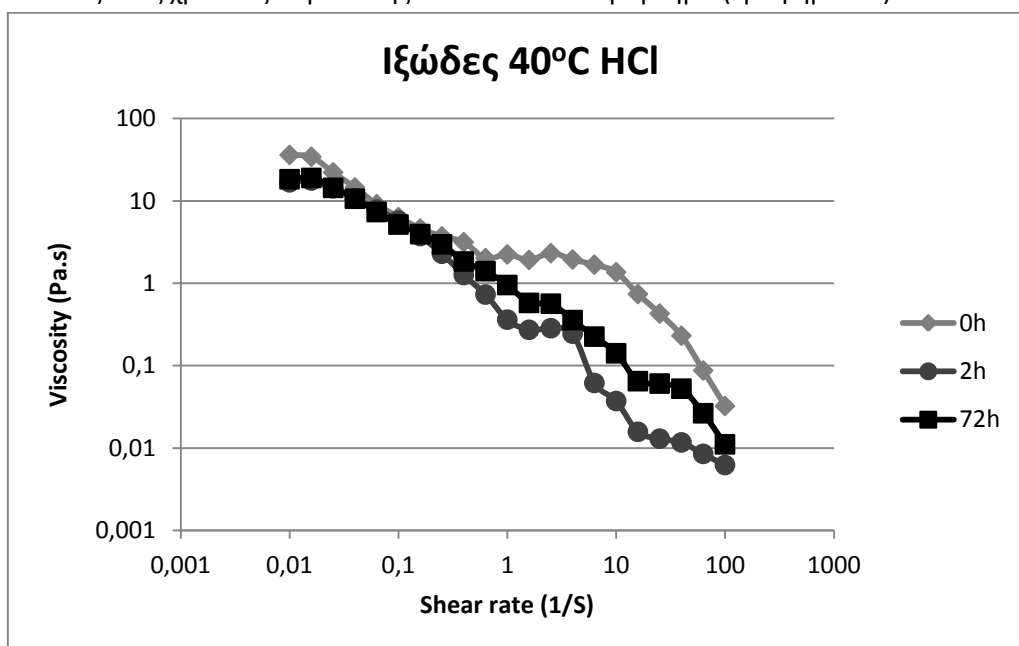
Σχετικά με την **επίδραση της θερμοκρασίας υδρόλυσης** στο ιξώδες της βακτηριακής κυτταρίνης, φαίνεται ότι για θερμοκρασία 40°C υπάρχει μείωση ιξώδους ήδη από τις 2 ώρες υδρόλυσης, ωστόσο μετά από 72 ώρες η μείωση στο ιξώδες δεν είναι πολύ σημαντική. Αντίθετα, για θερμοκρασία υδρόλυσης 60°C, η μείωση του ιξώδους μετά από 2 ώρες υδρόλυσης είναι μηδαμινή, ωστόσο παρατηρείται πολύ μεγάλη μείωση του ιξώδους

μετά από υδρόλυση 72 ωρών (από 36 Pas για το μη επεξεργασμένο δείγμα, γίνεται 2,5 Pas για το δείγμα που έχει υποστεί υδρόλυση για 72 ώρες). Η τάση αυτή μείωσης του ιξώδους ακολουθεί την αντίστοιχη τάση που εμφανίστηκε στη μορφολογία των ινιδίων αλλά και στο διαχωρισμό φάσεων των διαλυμάτων.

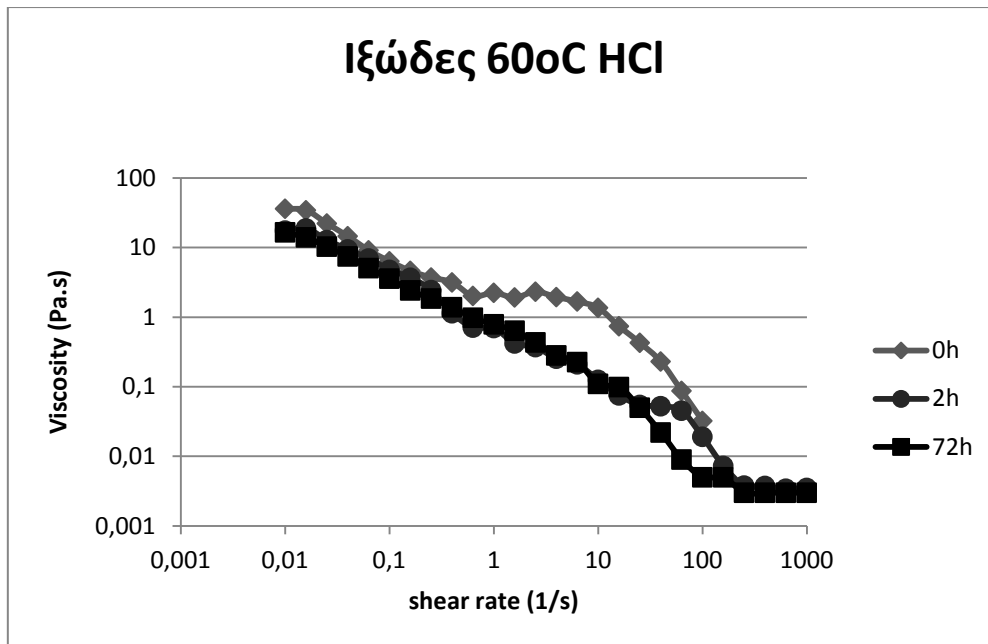
Τέλος, και σε αυτή την περίπτωση παρουσιάζονται **τρεις περιοχές ιξώδους στο ρεολογικό τους προφίλ**. Αρχικά, σε μικρές τιμές διατμητική τάσης τα δείγματα επιδεικνύουν μείωση του ιξώδους με την αύξηση της διατμητικής τάσης (ψευδοπλαστική συμπεριφορά). Στη συνέχεια, εμφανίζεται πλατώ, το οποίο στην περίπτωση υδρόλυσης σε 40°C εμφανίζεται σε περιοχές με διατμητική τάση περίπου $1-10 \text{ s}^{-1}$, ενώ στη περίπτωση των 60°C εμφανίζεται σε μεγαλύτερες τιμές διατμητικής τάσης ($>10 \text{ s}^{-1}$). Τέλος, μετά το πλατώ τα δείγματα εμφανίζουν και πάλι ψευδοπλαστική συμπεριφορά.

➤ Υδροχλωρικό οξύ (HCl)

Για υδρόλυση με χρήση υδροχλωρικού οξέος η επίδραση της όξινης υδρόλυσης στο ιξώδες των διαλυμάτων φαίνεται στα γραφήματα που ακολουθούν. Στο παρακάτω γράφημα, παρατίθενται τα αποτελέσματα για χρόνους υδρόλυσης 2 και 72 ωρών. Ακόμα, μελετήθηκε και η επίδραση στο ιξώδες μετά από 24 και 48 ώρες υδρόλυσης, ωστόσο οι μετρήσεις αυτές δεν δίνονται εδώ για λόγους ευκολίας παρατήρησης. Τα αποτελέσματα για όλους τους χρόνους υδρόλυσης δίνονται στο Παράρτημα (Γράφημα Π2).



A



B

Γράφημα 12: Εξάρτηση ιξώδους από τη διατμητική τάση για διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, υδρολυμένης με HCl για 2 και 72 ώρες σε θερμοκρασίες 40°C (A) και 60°C (B).

Όπως και προηγουμένως τα διαλύματα επιδεικνύουν **ψευδοπλαστική (shear thinning) συμπεριφορά**, ανεξαρτήτως χρόνου και θερμοκρασίας υδρόλυσης.

Σε ότι αφορά την **επίδραση του χρόνου υδρόλυσης** στο ιξώδες της βακτηριακής κυτταρίνης, παρατηρούμε ότι παρουσιάζεται σχετική μείωση του ιξώδους όσο αυξάνεται ο χρόνος υδρόλυσης. Ωστόσο, η μείωση αυτή δεν είναι σημαντική.

Σχετικά με την **επίδραση της θερμοκρασίας υδρόλυσης** στο ιξώδες της βακτηριακής κυτταρίνης, φαίνεται ότι για θερμοκρασία 40°C υπάρχει μείωση ιξώδους ήδη από τις 2 ώρες υδρόλυσης, ενώ μετά από 72 ώρες οι τιμές του ιξώδους είναι σχεδόν ίσες ή και ελαφρώς μεγαλύτερες από τις τιμές για τις 2 ώρες. Η ίδια τάση παρουσιάζεται και για υδρόλυση σε θερμοκρασία 60°C.

Τέλος, και σε αυτή την περίπτωση τα δείγματα παρουσιάζουν **τρεις περιοχές ιξώδους συμπεριφοράς**. Ωστόσο, η τάση αυτή δεν είναι τόσο έντονη όσο στις προηγούμενες περιπτώσεις.

➤ Σύγκριση των δύο μεθόδων- Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Αρχικά, παρατηρούμε και στις δύο περιπτώσεις ότι, η βακτηριακή κυτταρίνη εξακολουθεί να παρουσιάζει **ψευδοπλαστική συμπεριφορά**, όπως τα περισσότερα διαλύματα κυτταρίνης (Lin, Li, Lopez-Sanchez & Li, 2015; Moon et al, 2011; Araki et al, 1998). Ωστόσο, στην περίπτωση του **υδροχλωρικού οξέος οι νανοκρύσταλλοι βακτηριακής κυτταρίνης εμφανίζουν πιο έντονη μείωση του ιξώδους συναρτήσει της διατμητικής τάσης**. Η τάση αυτή έχει αναφερθεί και από τους Moon, Martini, Nairn, Simonsen & Youngblood (2011) και τους Araki et al (1998) και συνδέεται με την γρήγορη αποδόμηση των συσσωματωμάτων που δημιουργούνται όταν η κυτταρίνη υδρολύεται με υδροχλωρικό οξύ. Αντίθετα, τα διαλύματα που υπέστησαν επεξεργασία με θειικό οξύ επιδεικνύουν μικρότερη εξάρτηση από τη διατμητική τάση, γεγονός που αποδίδεται στον προσανατολισμό που αποκτούν οι νανοκρύσταλλοι λόγω της ροής.

Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι **νανοκρύσταλλοι που προέρχονται από υδρόλυση με υδροχλώριο δημιουργούν χαλαρά συσσωμάτωματα στο νερό** μέσω ελκτικών δυνάμεων Van der Waals λόγω έλλειψης επιφανειακού φορτίου. Έτσι, το ιζώδες αυτών των διαλυμάτων είναι αρκετές φορές μεγαλύτερο από το ιζώδες διαλυμάτων που προκύπτουν από υδρόλυση με θειικό οξύ στα οποία οι κρύσταλλοι σταθεροποιούνται λόγω των επιφανειακών φορτίων που δημιουργούνται κατά την όξινη υδρόλυση και δεν έχουν την τάση να συσσωματώνονται (Araki,1998). Τα αποτελέσματα αυτά, είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ειδικά στην περίπτωση που τα διαλύματα υφίστανται υδρόλυση για 72 ώρες.

Ακόμα, φαίνεται πως τα δείγματα της υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης διατηρούν την **εμφάνιση τριών περιοχών** ιζώδους συμπεριφοράς (ψευδοπλαστική-πλατό-ψευδοπλαστική), κάτι που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες της ρεολογίας της κυτταρίνης (Paakko et al., 2007; Lin, Li, Lopez-Sanchez & Li, 2015; Moon et al,2011). Η εμφάνιση του πλατό εξηγείται με βάση το γεγονός ότι σε κάποια κρίσιμη τιμή διατμητικής τάσης, οι νανοκρύσταλλοι κυτταρίνης ευθυγραμίζονται λόγω του ραβδόμορφου σχήματος τους, διευκολύνοντας τη ροή. Στη συνέχεια, με εφαρμογή μεγαλύτερης διατμητικής τάσης, οι κρύσταλλοι χάνουν αυτή την ευθυγράμμιση και εμφανίζουν ξανά ψευδοπλαστική συμπεριφορά (Moon, Martini, Nairn, Simonsen & Youngblood, 2011).

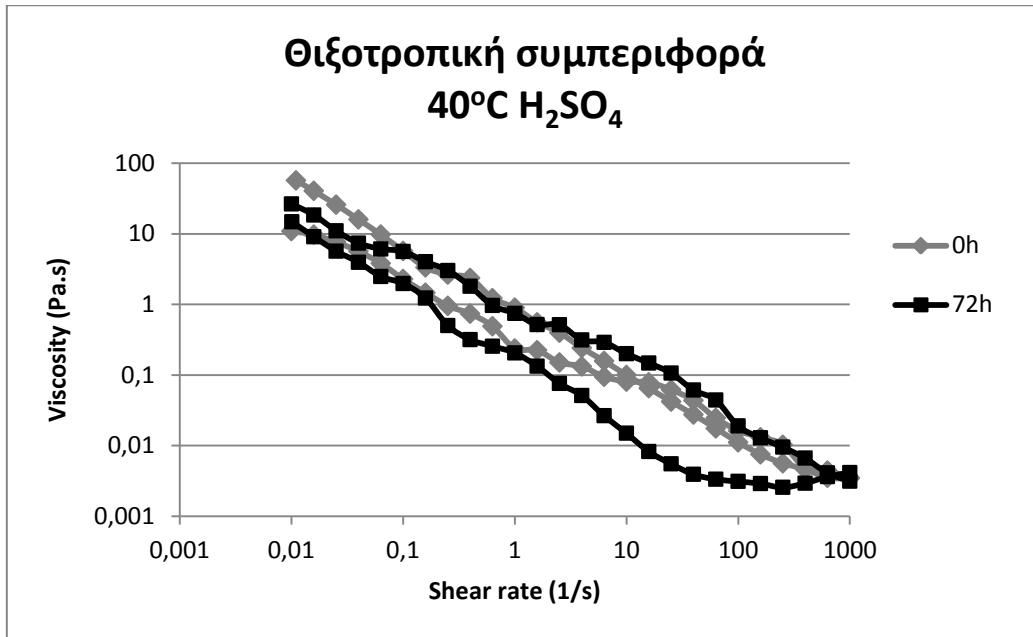
Όπως αναλύθηκε και παραπάνω, υδρόλυση της κυτταρίνης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και σε πιο έντονες συνθήκες (θειικό οξύ στους 60 °C) οδηγεί σε μεγαλύτερη αποδόμηση των άμορφων, μη κρυσταλλικών περιοχών της και άρα σε αύξηση της κρυσταλλικότητας της βακτηριακής κυτταρίνης (Roman & Winter, 2004; Azizi Samir, Alloin, & Dufresne, 2005; Martinez-Sanz, Lopez-Rubio & Lagaron, 2011) και τελικά σε μείωση της τιμής του ιζώδους. (Baxter, Zivanovic & Weiss, 2005; Santos et al, 2015; McClements, 2005).

3.2.4.2 Θιξοτροπική συμπεριφορά

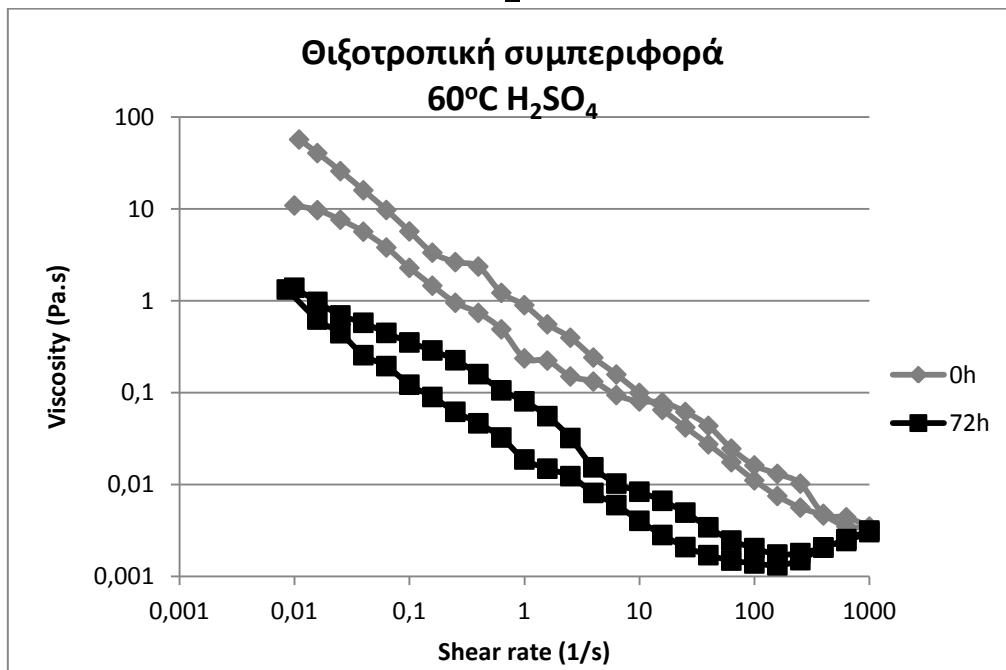
Θιξοτροπική συμπεριφορά παρουσιάζεται όταν το ιζώδες ενός ρευστού μειώνεται με το χρόνο διάτμησης και στη συνέχεια αυξάνεται και πάλι όταν η δύναμη που προκαλεί τη ροή σταματήσει να δρα (Whelan, 1994).

Η επίδραση του οξέος, της θερμοκρασίας και του χρόνου υδρόλυσης στη θιξοτροπική συμπεριφορά διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης για χρόνους υδρόλυσης 0 και 72 ώρες, παρουσιάζεται στα παρακάτω γραφήματα. Ακόμα, μελετήθηκε και η επίδραση στη θιξοτροπική συμπεριφορά μετά από 2, 24 και 48 ώρες υδρόλυσης, ωστόσο οι μετρήσεις αυτές δεν δίνονται εδώ για λόγους ευκολίας παρατήρησης. Τα αποτελέσματα για όλους τους χρόνους υδρόλυσης δίνονται στο Παράρτημα (Γραφήματα Π3 και Π4).

➤ Θειικό οξύ (H_2SO_4)



A



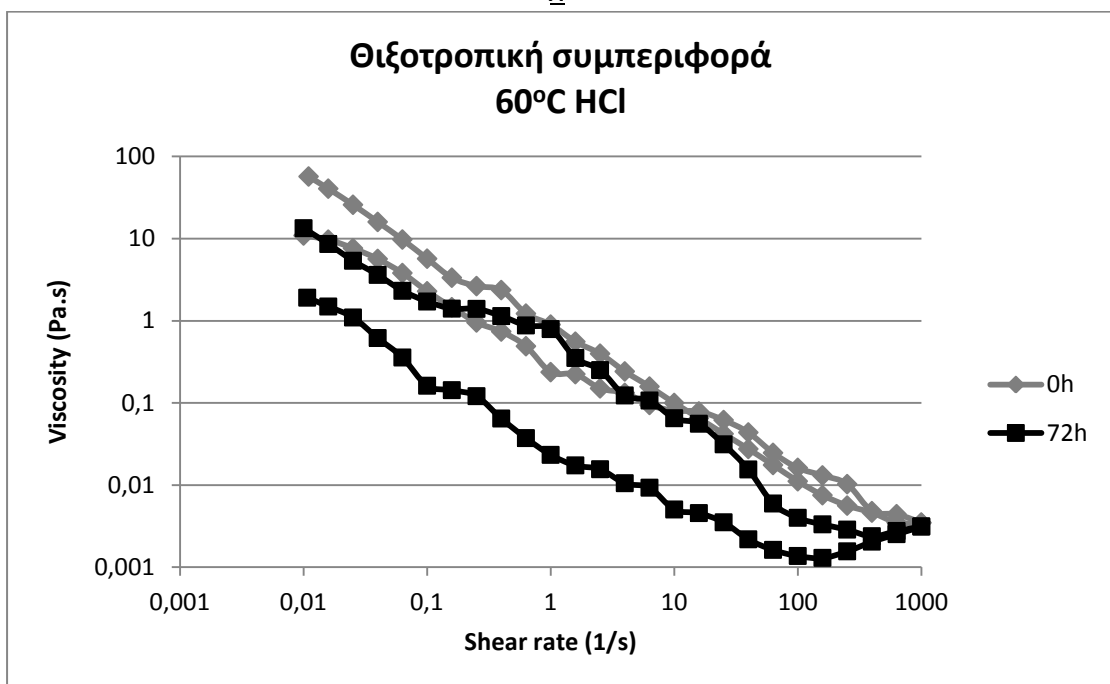
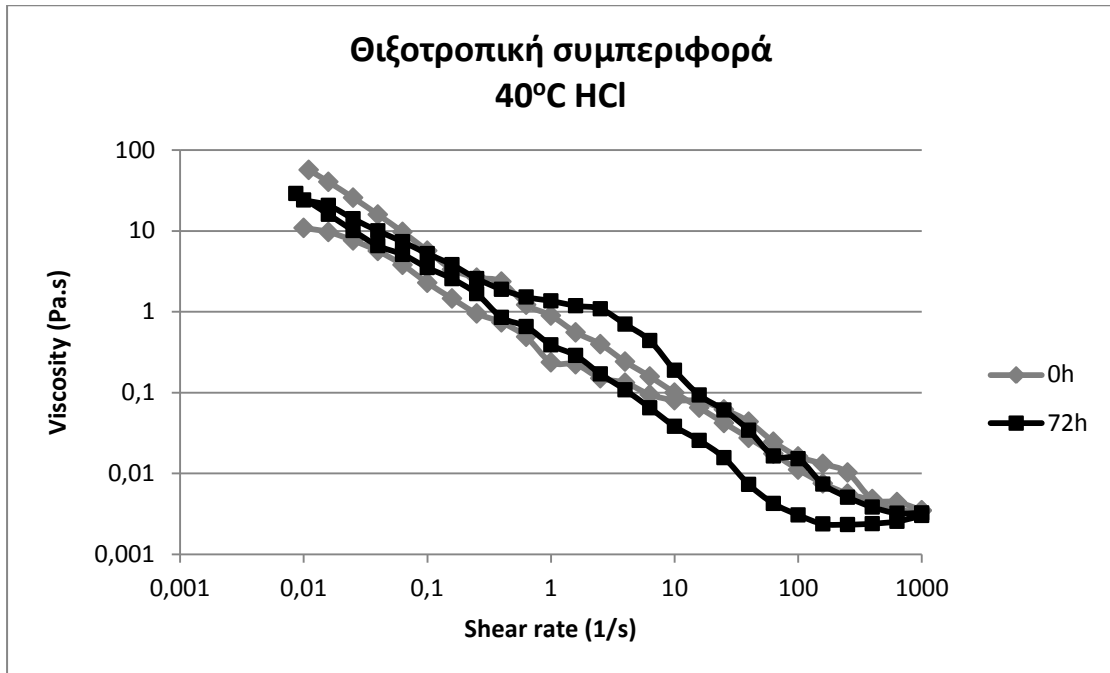
B

Γράφημα 13: Θιξοτροπική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0 και 72 ώρες με H_2SO_4 σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)

Αρχικά, παρατηρούμε ότι όλα τα δείγματα εμφανίζουν τυπική **θιξοτροπική συμπεριφορά**, ενώ ακολουθείται η τάση που παρατηρήθηκε και στις μετρήσεις του ιξώδους (χαμηλότερο ιξώδες για επεργασία 72ωρών στους 60°C και όχι τόσο σημαντική μείωση στη θερμοκρασία 40°C).

Σε ότι αφορά την **υστέρηση** μεταξύ των δύο καμπυλών, φαίνεται ότι για θερμοκρασία 40°C εμφανίζεται σε υψηλότερες διατμητικές τάσεις από ότι στην περίπτωση των 60°C. Η εμφάνιση υστέρησης σχετίζεται με τις αλλαγές στη μορφολογία της κυτταρίνης (Iotti, Gregersen, Moe & Lenes, 2011).

➤ Υδροχλωρικό οξύ (HCl)



Γράφημα 14: Θιξοτροπική συμπεριφορά βακτηριακής κутταρίνης μετά από υδρόλυση για 0 και 72 ώρες με HCl σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)

Αρχικά, παρατηρούμε ότι όλα τα δείγματα εμφανίζουν τυπική **θιξοτροπική συμπεριφορά**, ενώ ακολουθείται η τάση που παρατηρήθηκε και στις μετρήσεις του ιξώδους (χαμηλότερο ιξώδες για επεργασία 72ωρών στους 60°C και όχι τόσο σημαντική μείωση στη θερμοκρασία 40°C).

Σε ότι αφορά την **υστέρηση** μεταξύ των δύο καμπυλών, φαίνεται ότι για θερμοκρασία 40°C είναι μικρότερη και εμφανίζεται σε υψηλότερες διαμηθικές τάσεις από ότι στην περίπτωση των 60°C. Η εμφάνιση υστέρησης σχετίζεται με τις αλλαγές στη μορφολογία της κутταρίνης.

➤ **Σύγκριση των δύο μεθόδων-Σχολιασμός αποτελεσμάτων**

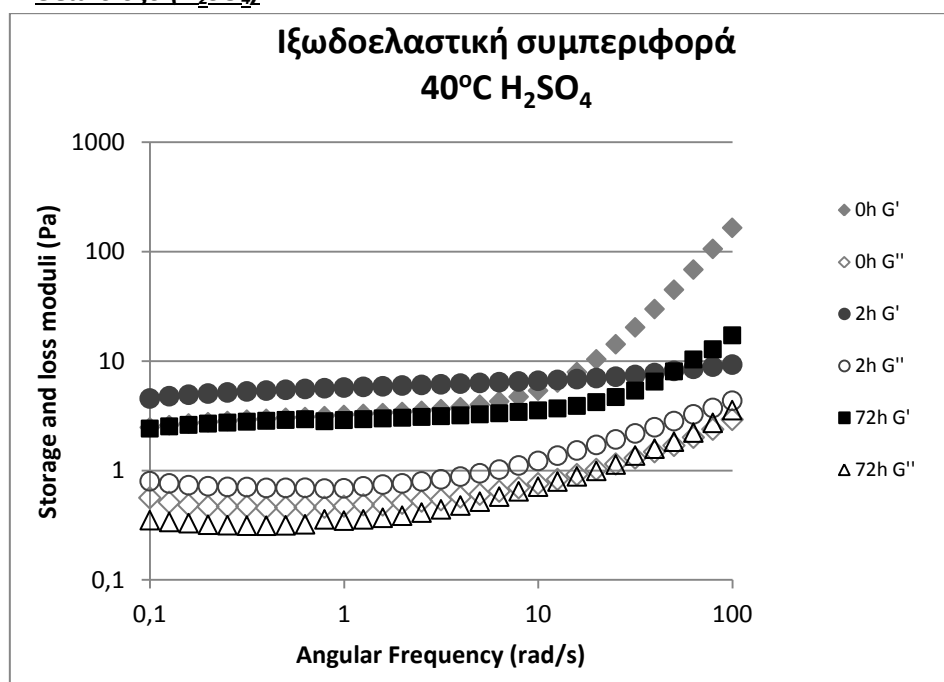
Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι **εντονότερες συνθήκες υδρόλυσης** (θειικό οξύ στους 60°C για 72 ώρες) **έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του ιξώδους των διαλυμάτων** (όπως αναφέρθηκε και παραπάνω) αλλά και την **πιο έντονη εμφάνιση θιξοτροπικής συμπεριφοράς**, καθώς στην περίπτωση αυτή εμφανίζεται η μικρότερη υστέρηση.

Σε ότι αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας, παρατηρούμε ότι για όξινη υδρόλυση με **θειικό οξύ, αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται μικρότερη υστέρηση**. Αντίθετα στην περίπτωση του υδροχλωρικού οξέος αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μεγαλύτερη υστέρηση. Η υστέρηση αυτή, οφείλεται σε αλλαγές στη μορφολογία των ινιδίων κυτταρίνης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικής ρεολογικής συμπεριφοράς (Iotti, Gregersen, Moe & Lenes, 2011). Στην περίπτωση της υδρόλυσης με θειικό οξύ στους 60°C τα ινίδια κυτταρίνης αποκτούν μεγαλύτερη κρυσταλλικότητα με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν τόσο μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο καμπυλών. Αντίθετα, στην περίπτωση του υδροχλωρικού οξέος, τα ινίδια βακτηριακής κυτταρίνης δεν διαθέτουν τόσο μεγάλη κρυσταλλικότητα και έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα. Επομένως, κατά τη μείωση της διατμητικής τάσης παρατηρείται σημαντική διαφορά στο ιξώδες σε σχέση με την φάση αύξησης της διατμητικής τάσης.

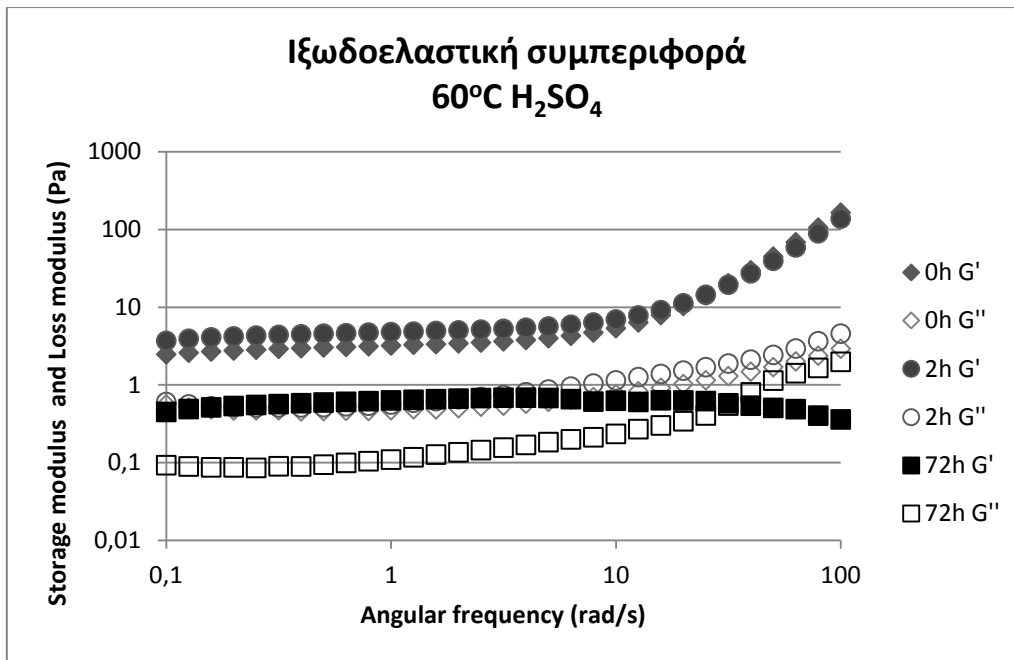
3.2.4.3 Ιξωδοελαστική συμπεριφορά

Η επίδραση του οξέος, της θερμοκρασίας και του χρόνου υδρόλυσης στην ιξωδοελαστική συμπεριφορά διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης για χρόνους υδρόλυσης 0, 2 και 72 ώρες, παρουσιάζεται στα παρακάτω γραφήματα. Ακόμα, μελετήθηκε και η επίδραση στη θιξοτροπική συμπεριφορά μετά από 24 και 48 ώρες υδρόλυσης, ωστόσο οι μετρήσεις αυτές δεν δίνονται εδώ για λόγους ευκολίας παρατήρησης. Τα αποτελέσματα για όλους τους χρόνους υδρόλυσης δίνονται στο Παράρτημα (Γραφήματα Π5 και Π6).

➤ **Θειικό οξύ (H_2SO_4)**



A



B

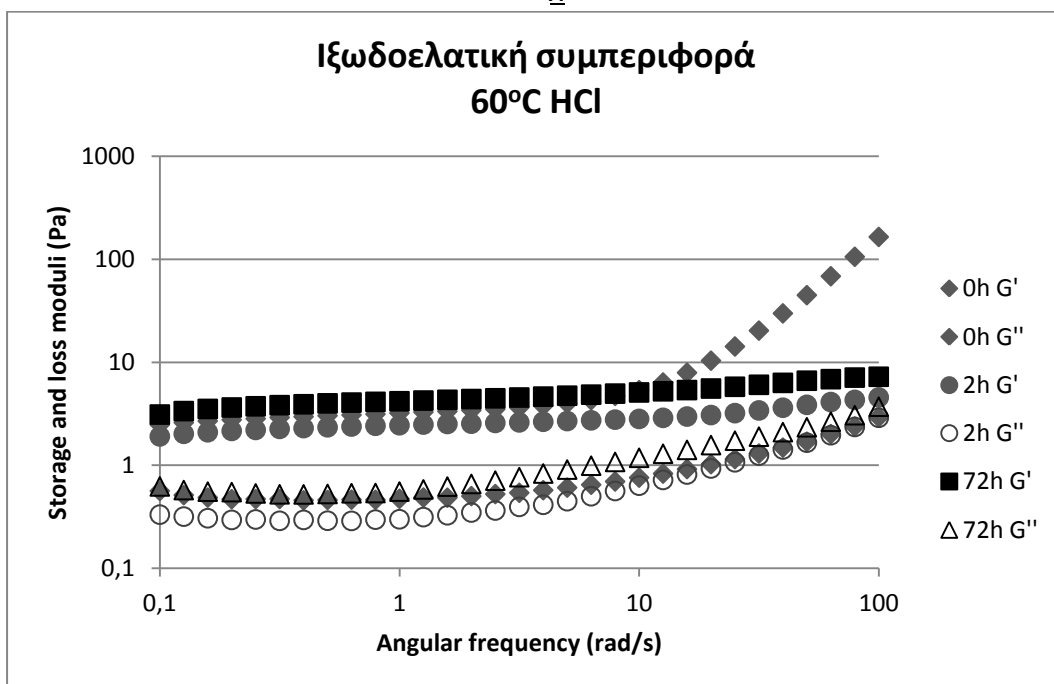
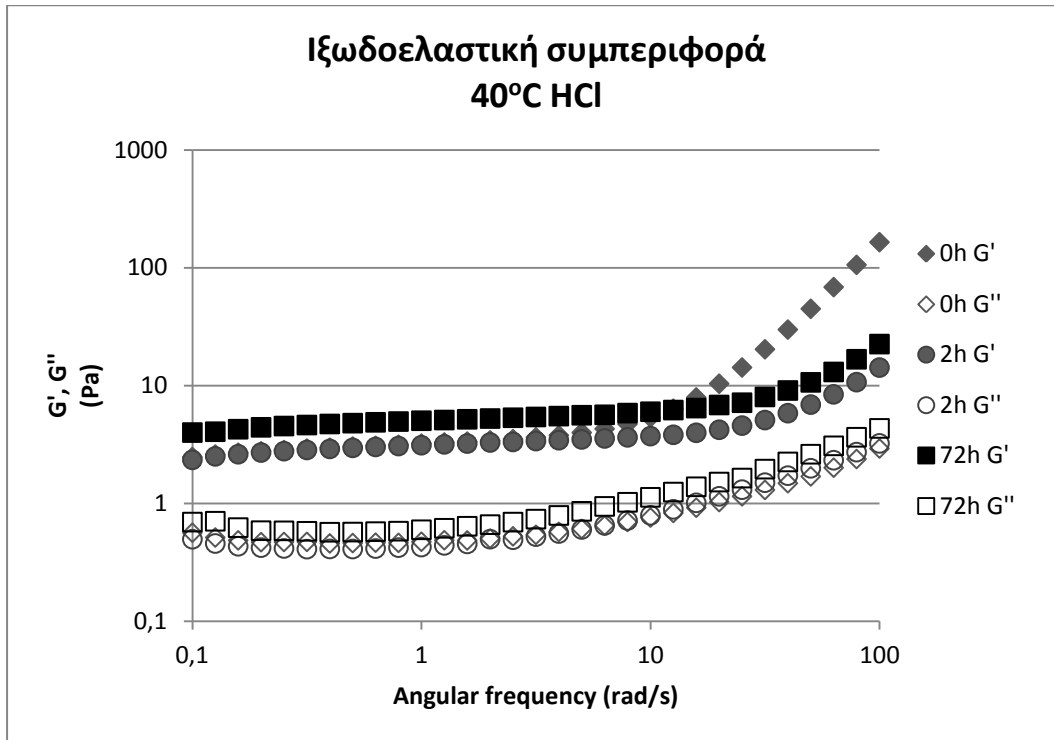
Γράφημα 15: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0,2 και 72 ώρες με H_2SO_4 σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, στα περισσότερα δείγματα ισχύει ότι $G' > G''$, δηλαδή τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν τυπική gel-like συμπεριφορά. Ωστόσο, στην περίπτωση υδρόλυσης με θειικό οξύ σε θερμοκρασία 60°C για 72 ώρες παρατηρείται διασταύρωση των τιμών των G' και G'' , γεγονός που δείχνει τη μετάβαση από συμπεριφορά υγρού (liquid like) σε συμπεριφορά στερεού (solid like).

Ακόμα, **αύξηση της θερμοκρασίας υδρόλυσης** οδηγεί σε μείωση των τιμών των συντελεστών G' και G'' , ενώ μετά από 72 ώρες υδρόλυσης οδηγεί και σε αλλαγή συμπεριφοράς ($G' = G''$).

Επίσης, παρατηρούμε ότι για τιμές γωνιακής συχνότητας μικρότερες των 10 rad/s, σε όλες τις περιπτώσεις οι **συντελεστες δεν εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό** από τη γωνιακή συχνότητα, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές η εξάρτηση αυτή γίνεται πιο έντονη. Έντονη εξάρτηση από τη γωνιακή συχνότητα συνεπάγεται εμφάνιση ιξώδους συμπεριφοράς. Η συμπεριφορά αυτή εμφανίζεται πιο έντονα στα μη επεξεργασμένα δείγματα, στα δείγματα που έχουν υποστεί επεξεργασία 72 ωρών αλλά και στο δείγμα που υπέστη υδρόλυση με θειικό οξύ για 2 ώρες στους 60°C.

➤ Υδροχλωρικό οξύ (HCl)



Γράφημα 16: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0, 2 και 72 ώρες με HCl σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)

Στην περίπτωση του υδροχλωρικού οξέος, για όλα τα δείγματα ισχύει ότι $G' > G''$, δηλαδή τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν τυπική gel-like συμπεριφορά. Ωστόσο, στην περίπτωση των 60°C, τόσο μετά από επεξεργασία για 2 όσο και για 72 ώρες, φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η γωνιακή συχνότητα τόσο οι συντελεστές τείνουν να εξισωθούν.

Ακόμα, **αύξηση της θερμοκρασίας υδρόλυσης** δεν οδηγεί σε μείωση των τιμών των συντελεστών G' και G'' , σε αντίθεση με την περίπτωση του θειικού οξέος. Επίσης,

παρατηρούμε ότι στην περίπτωση των 40°C υπάρχει **εντονότερη εξάρτηση των συντελεστών από τη γωνιακή συχνότητα**. Έντονη εξάρτηση από τη γωνιακή συχνότητα συνεπάγεται εμφάνιση ιξώδους συμπεριφοράς. Η μεγαλύτερη εξάρτηση από τη γωνιακή συχνότητα εμφανίζεται στα μη επεξεργασμένα δείγματα.

➤ **Σύγκριση μεθόδων- Συζήτηση αποτελεσμάτων**

Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω βλέπουμε ότι τα περισσότερα διαλύματα υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης επιδεικνύουν **ελαστική (gel-like) συμπεριφορά κατά την αύξηση της γωνιακής συχνότητας**, εκτός από την περίπτωση της υδρόλυσης με θειικό οξύ στους 60°C για 72 ώρες. Στην περίπτωση αυτή, σε μεγάλες τιμές γωνιακής συχνότητας, το μέτρο G' γίνεται μικρότερο από το μέτρο G'' , δηλαδή υπάρχει αλλαγή από ελαστική (gel like) συμπεριφορά σε ιξώδη (solid like) συμπεριφορά (Steffe J., 1996). Συνεπώς, από το σημείο εξίσωσης των δύο μέτρων (cross over) και μετά, το ρευστό δεν επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση όταν η δύναμη σταματήσει να επιδρά. Το σημείο αυτό ονομάζεται **σημείο ζελατινοποίησης** (gelation point) και είναι το σημείο στο οποίο σχηματίζεται ένα στερεό δίκτυο σε όλη την έκταση του δείγματος.

Η αλλαγή αυτή στη συμπεριφορά της βακτηριακής κυτταρίνης οφείλεται στην αλλαγή της μορφολογίας των ινιδίων που παρατηρήθηκε στην περίπτωση αυτή. Στο σημείο ζελατινοποίησης, η σύνδεση μεταξύ των ινιδίων της κυτταρίνης εκτείνεται σε «άπειρο μέγεθος» που καταλαμβάνει όλο το υλικό. Η σύνδεση αυτή μεταξύ των ινιδίων, οφείλεται κυρίως στο σχηματισμό δικτύου. Τα διάφορα υλικά στο σημείο ζελατινοποίησής τους (critical gels) αποκτούν χαρακτηριστικά τόσο υγρών όσο και στερεών. Η γνώση του σημείου ζελατινοποίησης για ένα υλικό είναι πολύ σημαντική, καθώς στο σημείο αυτό παρουσιάζονται σημαντικές αλλαγές στις ιδιότητές του (Winter, 2003).

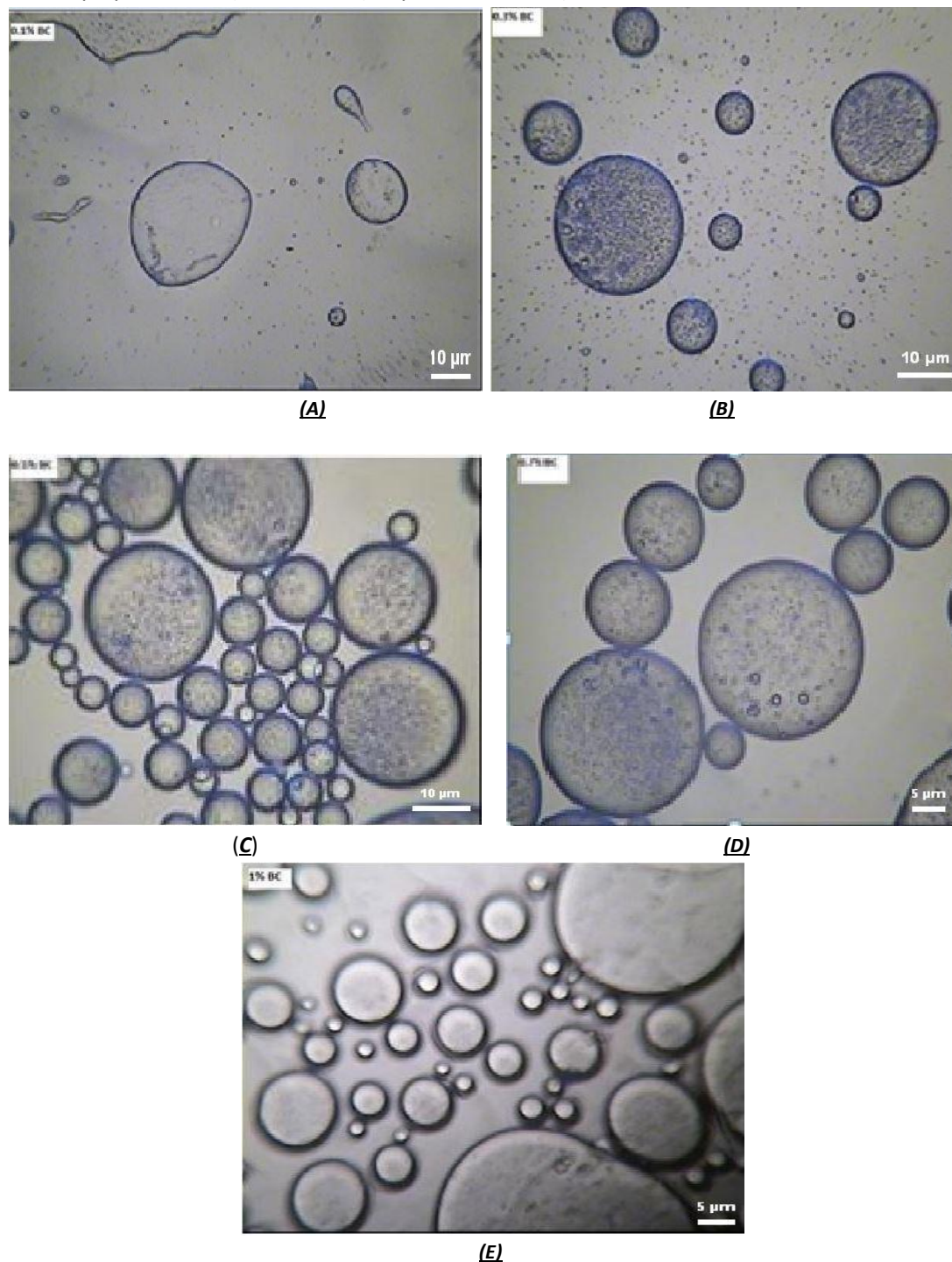
Σχετικά με την **εξάρτηση των G' και G'' από την γωνιακή συχνότητα**, παρατηρούμε ότι εμφανίζεται έντονη εξάρτηση στο μη επεξεργασμένο δείγμα, η οποία επανεμφανίζεται στην περίπτωση της υδρόλυσης με θειικό οξύ για 2 ώρες στους 60°C και (σε μικρότερο βαθμό) μετά από 72 ώρες υδρόλυσης ανεξαρτήτως οξέος και θερμοκρασίας. Ωστόσο, η μικρότερη εξάρτηση παρουσιάζεται στην περίπτωση του υδροχλωρικού οξέος και για θερμοκρασία 60°C. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η εξάρτηση των συντελεστών από την γωνιακή συχνότητα είναι ένδειξη ιξώδους συμπεριφοράς.

3.2.5 Χρήση υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης σε γαλακτώματα

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η απόδοση ως σταθεροποιητή διαφόρων συγκεντρώσεων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με θειικό οξύ για 72 ώρες στους 60°C. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη επεξεργασία καθώς σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα μετά από τέτοια επεξεργασία η κυτταρίνη αποκτά τις επιθυμητές ιδιότητες.

3.2.5.1 Διάμετρος σταγονιδίων γαλακτωμάτων

Η μορφολογία των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης και 20% ελαιολάδου, όπως καταγράφηκε με το οπτικό μικροσκόπιο, φαίνεται στις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα 41: απεικόνιση σε οπτικό μικροσκόπιο (ανάλυση 40x) των σωματιδίων γαλακτωμάτων με υδρολυμένη βακτηριακή κυτταρίνη συγκέντρωσης 0.1% (A), 0.3% (B), 0.5% (C), 0.7% (D) και 1% (E) και 20% ελαιολάδο

Από τις παραπάνω εικόνες φαίνεται ότι αύξηση της συγκέντρωσης συνεπάγεται μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Η διάμετρος των σωματιδίων φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 10: Επίδραση της συγκέντρωσης υδρολυμένης κυτταρίνης στη διάμετρο σταγονιδίων των γαλακτωμάτων (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση και οι δείκτες a,b,c αντιστοιχούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές, για $p < 0.05$)

Δείγμα	Διάμετρος (D50)(μm)
0.1% BC + 20% λάδι	12.5 (7.8) ^a
0.3% BC + 20% λάδι	10.7 (3.2) ^b
0.5% BC + 20% λάδι	10.4 (3.7) ^b
0.7% BC + 20% λάδι	9.6 (4.1) ^b
1% BC + 20% λάδι	7.5 (2.3) ^c

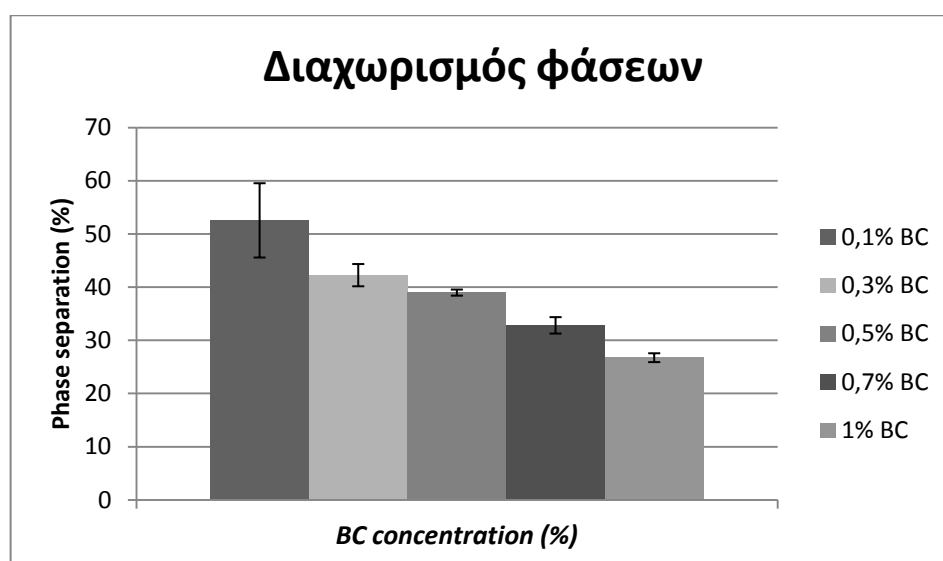
Από τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι αύξηση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική μείωση το μεγέθους των σωματιδίων παρατηρείται για συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 1%.

Μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων με την αύξηση συγκέντρωσης πολυσακχαριτών που δρουν ως σταθεροποιητές έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Abbas et al,2013; Kalashnikova et al,2011).

Το τελικό μέγεθος των σταγονιδίων σε ένα γαλάκτωμα εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ των σταγονιδίων που αποδομούνται λόγω επεξεργασίας και των σταγονιδίων που συσσωματώνονται (Tadros et al, 2004). Η βακτηριακή κυτταρίνη δρα ως σταθεροποιητής καθώς συσσωρεύεται στην διεπιφάνεια μεταξύ των σταγονιδίων και της υδατικής φάσης, δημιουργώντας ένα προστατευτικό φιλμ που δεν επιτρέπει στα σταγονίδια να έρθουν σε επαφή. Στην περίπτωση της κυτταρίνης που έχει υποστεί υδρόλυση με θειικό οξύ, τα ινίδια της κυτταρίνης έχουν αποκτήσει ισχυρά αρνητικό φορτίο. Έτσι, όταν δημιουργούν το φιλμ γύρω από τα σταγονίδια, αναπτύσσονται ισχυρές απωστικές δυνάμεις που δεν επιτρέπουν στα σταγονίδια να πλησιάσουν και να συσσωματωθούν. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης, υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα σταθεροποιητή διαθέσιμη να προσροφηθεί στην επιφάνεια των σταγονιδίων και έτσι τελικά σχηματίζονται σταγονίδια μικρότερου μεγέθους (Kalashnikova et al,2011; Leong et al,2009).

3.2.5.2 Διαχωρισμός φάσεων των γαλακτωμάτων

Η επίδραση της συγκέντρωσης της υδρολυμένης με θειικό οξύ βακτηριακής κυτταρίνης στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων φαίνεται στο γράφημα που ακολουθεί:



Γράφημα 17: Διαχωρισμός φάσεων γαλακτωμάτων με υδρολυμένη βακτηριακή κυτταρίνη επεξεργασμένη

Από το παράπάνω γράφημα φαίνεται ότι αύξηση της συγκέντρωσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ποσοστού διαχωρισμού φάσεων των διαλυμάτων. Ακόμα, όπως και στην περίπτωση της επεξεργασμένης με υπερήχους κυτταρίνης, για συγκεντρώσεις κυτταρίνης από 0,5% και πάνω, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στο διαχωρισμό φάσεων.

Η αύξηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων όσο αυξάνεται η συγκέντρωση πολυσακχαρίτη έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Chamanai & Mc Clements, 2000; Paximada et al, 2015; Moschakis, Murray & Dickinson 2005 ; Zinoviadou et al. 2012).

Η μείωση του διαχωρισμού φάσεων με την αύξηση της συγκέντρωσης υδρολυμένης βακτηριακής κυτταρίνης οφείλεται στο γεγονός ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση συνεπάγεται εντονότερα αρνητικά φορτία στο φιλμ που σχηματίζεται γύρω από τα σταγονίδια και άρα εμφάνιση εντονότερων απωστικών δυνάμεων. Οι έντονες αυτές απωστικές δυνάμεις δεν επιτρέπουν στα σταγονίδια να έρθουν σε επαφή και να συσσωματωθούν, με αποτέλεσμα να μειώνεται το ποσοστό διαχωρισμού των φάσεων.

3.3. Σύγκριση επεξεργασίας με υπερήχους και υδρόλυσης της βακτηριακής κυτταρίνης

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση δύο διαφορετικών μεθόδων (υπέρηχοι και όξινη υδρόλυση) στη μορφολογία και τις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης αλλά και την δυνατότητα χρήσης της ως σταθεροποιητή σε γαλακτώματα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης ιδιοτήτων που απέκτησε η βακτηριακή κυτταρίνη μετά την επεξεργασία με κάθε μια από τις δύο μεθόδους:

Πίνακας 11: Σύγκριση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων (σε παρένθεση δίνονται οι τυπικές αποκλίσεις)

Δείγμα	Υπέρηχοι 3 λεπτά, 1% BC	Υδρόλυση με H₂SO₄ 60°C (72h)
Πλάτος ινιδίων (nm)	102.5 (2.64)	33 (0.01)
ζ-δυναμικό (mV)	-24.8 (1.59)	-29 (1.92)
Διαχωρισμός φάσεων (%)	0.707 (0.27)	10.4 (0.426)
Ιξώδες (Pa.s)	86.87 (9.04)	2.5 (0.763)
Θιξοτροπική συμπεριφορά	Μικρή υστέρηση	Μεγαλύτερη υστέρηση
Ιξωδοελαστική συμπεριφορά	-Σχεδόν ανεξάρτητη από τη γωνιακή συχνότητα -Ελαστική συμπεριφορά (G' > G'')	-Εξάρτηση από τη γωνιακή συχνότητα - μετάβαση από συμπεριφορά υγρού σε συμπεριφορά στερεού (G' = G'')
Ενσωμάτωση σε γαλακτώματα (1% BC)		
Διάμετρος σταγονιδίων (μm)	3.648 (1.908)	7.5 (2.3)
Διαχωρισμός φάσεων (%)	20% (7.55)	26.7% (0.8)

3.3.1 Μορφολογία και μέγεθος ινιδίων

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η μείωση στο μέγεθος των ινιδίων μετά από την επεξεργασία, οφείλεται στην αποδόμηση των άμορφων, μη-κρυσταλλικών περιοχών της βακτηριακής κυτταρίνης.

Φαίνεται λοιπόν, ότι υδρόλυση με ισχυρά οξέα (ανεξάρτητα από το είδος τους οξέος, τη θερμοκρασία και το χρόνο υδρόλυσης) οδηγεί σε σημαντική αποδόμηση των άμορφων περιοχών και τελικά μείωση του μεγέθους των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης. Η παρατήρηση αυτή, επαληθεύεται και από τις αντίστοιχες φωτογραφίες, από τις οποίες φαίνεται ότι η όξινη υδρόλυση οδηγεί και σε αραιότερα και λιγότερο πολύπλοκα δίκτυα ινιδίων.

3.3.2 ζ-δυναμικό

Μετά από επεξεργασία με υπερήχους για 3 λεπτά και σε συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 1% το ζ-δυναμικό μετρήθηκε ίσο με -24,8 mV, ενώ μετά από υδρόλυση με H₂SO₄ για 72 ώρες στους 60°C το ζ-δυναμικό βρέθηκε ίσο με -29 mV. Η διαφορά των τιμών, οφείλεται στο γεγονός ότι η επεξεργασία με θειικό οξύ οδηγεί στην παρουσία μεγάλου αριθμού αρνητικά φορτισμένων θειικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοκρυστάλλων κυτταρίνης. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στην περίπτωση των υπερήχων όπου η μικρή μείωση της τιμής του ζ-δυναμικού οφείλεται στην κίνηση αρνητικά φορτισμένων ιόντων υπό την επίδραση των υπερήχων προς την επιφάνεια των ινιδίων.

3.3.3 Διαχωρισμός φάσεων

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι επεξεργασία με υπερήχους για 3 λεπτά, διαλύματος βακτηριακής κυτταρίνης συγκέντρωσης 1% οδηγεί σε πολύ μικρό διαχωρισμό φάσεων (0.707%), ενώ στην περίπτωση επεξεργασίας με H₂SO₄ για 72 ώρες στους 60°C ο διαχωρισμός φάσεων υπολογίστηκε περίπου 10.4%.

Παρατηρούμε δηλαδή, ότι η επεξεργασία με υπερήχους οδηγεί σε διασπορές ή γαλακτώματα με μεγαλύτερη σταθερότητα.

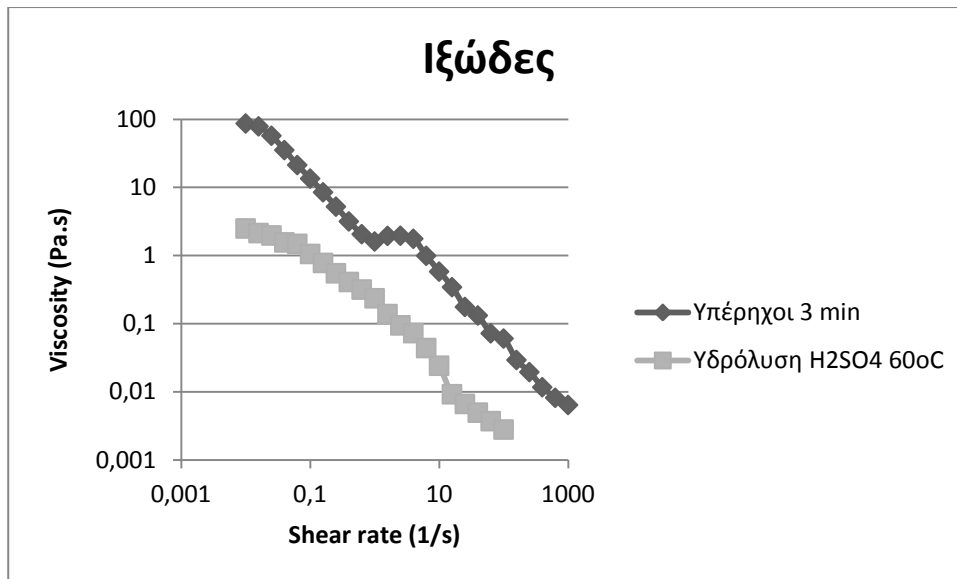
3.3.4 Ρεολογική συμπεριφορά

3.3.4.1 Ιξώδες

Αρχικά, πρέπει να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις, η βακτηριακή κυτταρίνη επιδεικνύει ψευδοπλαστική (shear thinning) συμπεριφορά και εμφανίζει τρεις περιοχές ιξώδους συμπεριφοράς όσο αυξάνεται η διατμητική τάση (μείωση ιξώδους-πλατό-μείωση ιξώδους).

Ωστόσο, στην περίπτωση της όξινης υδρόλυσης το ιξώδες του διαλύματος (2.5 Pa.s) είναι πολύ χαμηλότερο από ότι στην περίπτωση των υπερήχων (86.9 Pa.s).

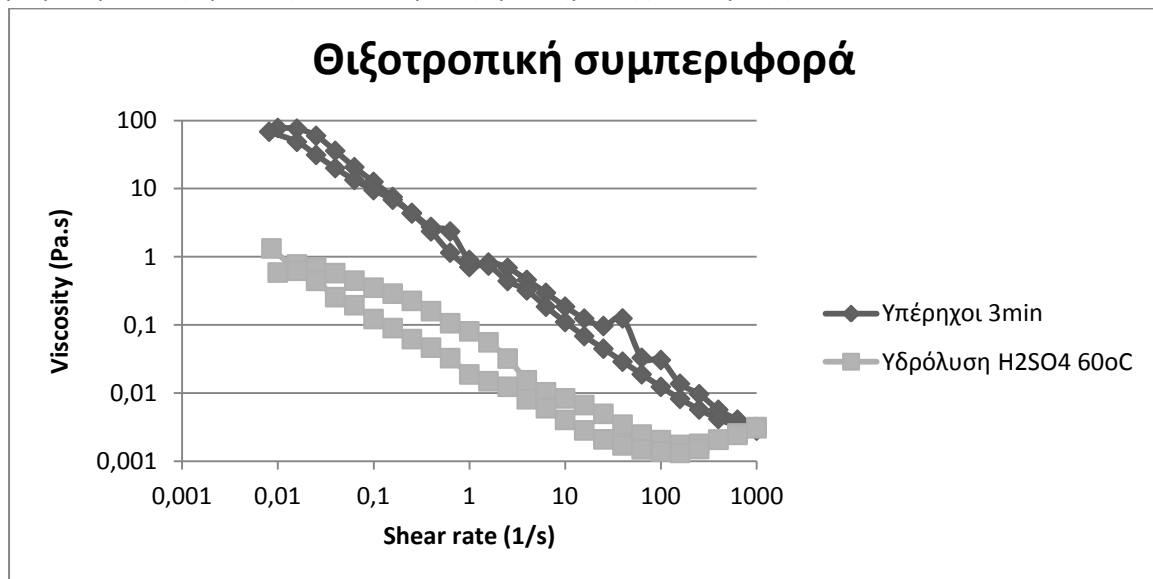
Το ιξώδες αποτελεί μια πολύ σημαντική ιδιότητα των γαλακτωμάτων και συνεπώς είναι πολύ σημαντικό τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης να αποκτούν μικρές τιμές ιξώδους μετά την επεξεργασία τους.



Γράφημα 18: Σύγκριση ιξώδους μεταξύ των δύο μεθόδων

3.3.4.2 Θιξοτροπική συμπεριφορά

Σε ότι αφορά τη θιξοτροπική συμπεριφορά των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρούμε ότι και στις δύο περιπτώσεις τα διαλύματα εμφανίζουν τυπική θιξοτροπική συμπεριφορά ενώ και σε αυτή την περίπτωση εμφανίζεται η ίδια τάση ως προς το ιξώδες. Ωστόσο, στην περίπτωση της επεξεργασίας με υπερήχους εμφανίζεται ελαφρώς μικρότερη υστέρηση στην καμπύλη θιξοτροπικής συμπεριφοράς, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει μικρότερη διαφοροποίηση στη δομή της βακτηριακής κυτταρίνης.

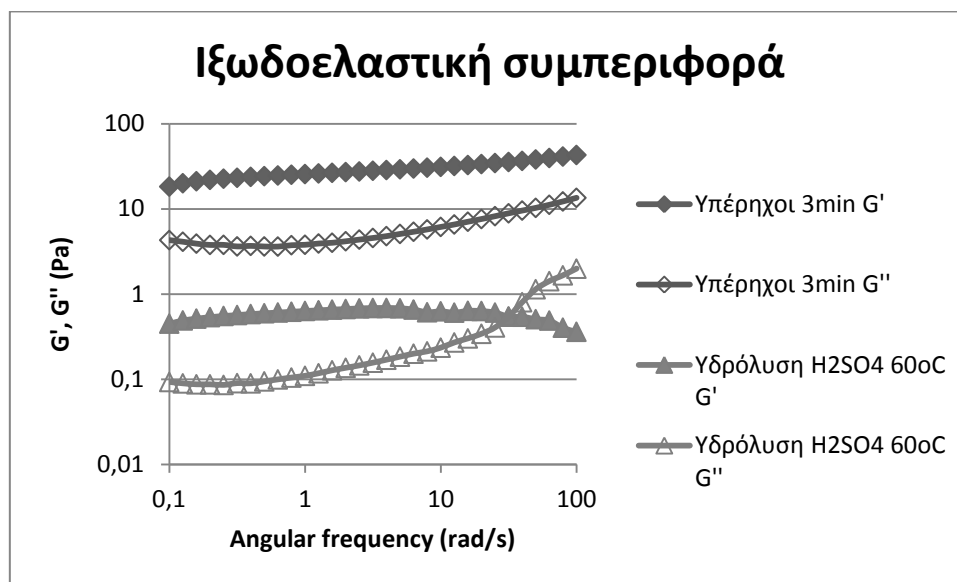


Γράφημα 19: Σύγκριση θιξοτροπικής συμπεριφοράς μεταξύ των δύο μεθόδων

3.3.4.3. Ιξωδοελαστική συμπεριφορά

Σχετικά με την επίδραση της μεθόδου στην ιξωδοελαστική συμπεριφορά των διαλυμάτων, φαίνεται ότι στην περίπτωση της επεξεργασίας με υπερήχους εμφανίζεται πολύ μικρή εξάρτηση των συντελεστών G' και G'' για γωνιακές συχνότητες πάνω από 10rad/s, δηλαδή το δείγμα έχει ασθενή συμπεριφορά gel. Ακόμα, παρατηρούμε ότι $G' > G''$, δηλαδή το δείγμα εμφανίζει περισσότερο ελαστική συμπεριφορά gel (gel-like behavior).

Αντίθετα, στην περίπτωση της υδρόλυσης παρατηρούμε ότι οι συντελεστές G' και G'' εμφανίζουν εντονότερη εξάρτηση από τη γωνιακή συχνότητα (ειδικά για συχνότητες άνω των 10rad/s), γεγονός που συνεπάγεται πιο έντονη συμπεριφορά gel. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση της όξινης υδρόλυσης, υπάρχει ένα σημείο (περίπου στα 25rad/s) όπου οι συντελεστές G' και G'' εξισώνονται. Αυτό σημαίνει ότι στο σημείο αυτό (gel point), γίνεται μετάβαση από συμπεριφορά υγρού (liquid like) σε συμπεριφορά στερεού (solid like).



Γράφημα 20: Σύγκριση ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς μεταξύ των δύο μεθόδων

3.3.5 Χρήση της επεξεργασμένης βακτηριακής κυτταρίνης σε γαλακτώματα

Η επεξεργασμένη βακτηριακή κυτταρίνη ενσωματώθηκε σε γαλακτώματα ελαιόλαδο και εξετάστηκε η επίδραση της επεξεργασίας στο μέγεθος των σταγονιδίων και στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων.

3.3.5.1 Μορφολογία σταγονιδίων γαλακτωμάτων

Στην περίπτωση της επεξεργασμένης με υπερήχους βακτηριακής κυτταρίνης, το μέγεθος των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων είναι αρκετά μικρότερο από ότι στην περίπτωση της όξινης υδρόλυσης.

Η μικρότερη διάμετρος σταγονιδίων, σημαίνει ότι δεν υπάρχει μεγάλη τάση συσσωμάτωσης μεταξύ των σταγονιδίων του γαλακτώματος και άρα το γαλάκτωμα αυτό, εμφανίζει μικρότερο διαχωρισμό φάσεων.

3.3.5.2 Διαχωρισμός φάσεων γαλακτωμάτων

Γαλακτώματα που περιείχαν επεξεργασμένη με υπερήχους βακτηριακή κυτταρίνη σε συγκέντρωση 1% επιδεικνύουν ελαφρώς μεγαλύτερη σταθερότητα (διαχωρισμός φάσεων 20%) από ότι τα γαλακτώματα με αντίστοιχη περιεκτικότητα όξινα υδρολυμένης κυτταρίνης (διαχωρισμός φάσεων 27%). Τα σταγονίδια των γαλακτωμάτων αυτών δηλαδή, έχουν την τάση να συνενώνονται, λόγω διαφοράς στην πυκνότητα των σταγονιδίων και αυτής της υδατικής φάσης, παρουσιάζεται το φαινόμενο της κορύφωσης.

Σχετικά με την ενσωμάτωση πολυσακχαριτών σε γαλακτώματα, είναι σημαντικό οι πολυσακχαρίτες αυτοί να δρουν ως σταθεροποιητές, μειώνοντας το ποσοστό διαχωρισμού φάσεων των γαλακτωμάτων. Στην παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι η **βακτηριακή κυτταρίνη που έχει υποστεί επεξεργασία με υπερήχους έχει καλύτερη σταθεροποιητική δράση σε σχέση με την υδρολυμένη βακτηριακή κυτταρίνη.**

IV. Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε μελέτη της επίδρασης δύο μεθόδων επεξεργασίας (υπερήχοι και όξινη υδρόλυση) στις φυσικές ιδιότητες διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης .

- **Ομογενοποίηση με υπερήχους**

Συγκεκριμένα, σε υδατικά διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων βακτηριακής κυτταρίνης (0.1-1% κ.β.) έγινε **ομογενοποίηση με υπερήχους** και στη συνέχεια μετρήθηκαν φυσικές ιδιότητες, όπως το μέγεθος των ινιδίων, η ικανότητα συγκράτησης νερού, το ζ-δυναμικό, ο διαχωρισμός φάσεων και η ρεολογική συμπεριφορά. Τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης εμφάνισαν σημαντική μείωση του μεγέθους για μικρό χρόνο επεξεργασίας με υπερήχους (1 λεπτό), ενώ περισσότερη επεξεργασία φάνηκε να αυξάνει και πάλι το μέγεθός τους, λόγω της επίδρασης που έχουν οι υπερήχοι στη δομή της βακτηριακής κυτταρίνης. Όλα τα δείγματα διαθέτουν αρνητικό φορτίο, ενώ τα δείγματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1%) και το μεγαλύτερο χρόνο επεξεργασίας (5 λεπτά) έχουν τις μικρότερες τιμές ζ-δυναμικού. Σχετικά με την ικανότητα συγκράτησης νερού, φάνηκε ότι σύντομη επεξεργασία με υπερήχους (1 λεπτό) προκαλεί αύξηση στην ικανότητα συγκράτησης νερού, ενώ περαιτέρω επεξεργασία (3-5 λεπτά) οδηγεί σε μείωση της. Ακόμα, σχετικά με τη σταθερότητα των διαλυμάτων, φάνηκε ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης και μεγαλύτερος χρόνος επεξεργασίας με υπερήχους, οδηγούν σε διαλύματα με μικρότερο ποσοστό διαχωρισμού φάσεων και άρα μεγαλύτερη σταθερότητα. Σε ότι αφορά το ιξώδες, σε όλες τις περιπτώσεις, τα υδατικά διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, επιδεικνύουν τρεις περιοχές (ψευδοπλαστική-νευτώνεια-ψευδοπλαστική). Η συμπεριφορά αυτή είναι τυπική για τα διαλύματα που περιέχουν κυτταρίνη και οφείλεται στις αλλαγές στο μέγεθος των δεσμών ινιδίων και της τοποθέτησής τους στο χώρο. Επίσης, επεξεργασία με υπερήχους για 3 λεπτά, οδηγεί σε μείωση της τιμής του ιξώδους των διαλυμάτων ανεξαρτήτως συγκέντρωσης βακτηριακής κυτταρίνης. Όλα τα διαλύματα εμφανίζουν τυπική θιζοτροπική συμπεριφορά με μικρή υστέρηση (κυρίως στην περίπτωση επεξεργασίας για 3 λεπτά διαλύματος συγκέντρωσης 1%). Τέλος, όλα τα διαλύματα εμφανίζουν ισχυρή συμπεριφορά gel.

Στη συνέχεια, έγινε ενσωμάτωση διαφόρων συγκεντρώσεων (0,1 έως 1%) βακτηριακής κυτταρίνης, επεξεργασμένης με υπερήχους για 3 λεπτά, σε γαλακτώματα με ελαιόλαδο. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι για συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης από 0,5% και άνω, παρατηρείται σημαντική μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων του γαλακτώματος, με μικρότερο μέγεθος να μετράται για συγκέντρωση κυτταρίνης 1%. Στην ίδια συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης, μετρήθηκε και το χαμηλότερο ποσοστό διαχωρισμού φάσεων στο γαλακτώμα, δηλαδή φάνηκε η ύπαρξη μεγαλύτερης σταθερότητας.

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι η επεξεργασία με υπερήχους επηρεάζει σημαντικά τις φυσικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, φαίνεται ότι **σχετικά μικρός χρόνος επεξεργασίας (1-3λεπτά) έχει τη βέλτιστη επίδραση στις ιδιότητες** της βακτηριακής κυτταρίνης. Τέλος, αναφορικά με τη χρήση της βακτηριακής κυτταρίνης ως σταθεροποιητή **σε γαλακτώματα, φαίνεται ότι οι βέλτιστες ιδιότητες παρουσιάζονται για συγκέντρωση 1% βακτηριακή κυτταρίνη επεξεργασμένης με υπερήχους για 3 λεπτά.**

- **Όξινη υδρόλυση**

Εξετάστηκε η επίδραση του οξέος (θειικό και υδροχλωρικό) αλλά και των συνθηκών όξινης υδρόλυσης (θερμοκρασία και χρόνος) σε φυσικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης, όπως το μέγεθος των ινιδίων, το ζ-δυναμικό, ο διαχωρισμός φάσεων και η ρεολογική συμπεριφορά.

Τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης εμφάνισαν σημαντική μείωση μεγέθους σε έντονες συνθήκες υδρόλυσης (60°C για 72ώρες) ανεξάρτητα από τον τύπο του οξέος, ενώ σε ηπιότερες συνθήκες υδρόλυσης η μείωση μεγέθους ήταν πολύ μικρότερη. Όλα τα δείγματα και σε αυτή την περίπτωση είχαν αρνητικό φορτίο. Το χαμηλότερο ζ-δυναμικό μετρήθηκε στην περίπτωση υδρόλυσης με θειικό οξύ για 72 ώρες στους 60°C. Σχετικά με τη σταθερότητα των διαλυμάτων, φαίνεται ότι μεγαλύτερο χρονικό διάστημα υδρόλυσης οδηγεί σε μεγαλύτερη σταθερότητα γαλακτωμάτων, ενώ και μεγαλύτερη θερμοκρασία υδρόλυσης έχει επίσης ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη σταθερότητα. Ωστόσο, το μικρότερο ποσοστό διαχωρισμού φάσεων μετρήθηκε για όξινη υδρόλυση με θειικό οξύ για 72 ώρες στους 60°C, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη αρνητικά φορτισμένων θειικών ομάδων στην επιφάνεια των ινιδίων, που δεν επιτρέπουν στα ινίδια να έρθουν σε επαφή και να σχηματίσουν συσσωματώματα. Σε ότι αφορά το ιξώδες, και πάλι σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζονται τρεις περιοχές (ψευδοπλαστική-νευτώνεια-ψευδοπλαστική), ωστόσο αυτή η συμπεριφορά δεν είναι τόσο έντονη όσο στην περίπτωση της επεξεργασίας με υπερήχους. Μικρότερη τιμή ιξώδους μετρήθηκε για υδρόλυση με θειικό οξύ για 72 ώρες στους 60°C. Όλα τα διαλύματα εμφανίζουν τυπική θιξοτροπική συμπεριφορά με μικρή υστέρηση (μικρότερη για υδρόλυση με θειικό οξύ για 72 ώρες στους 60°C). Τέλος, τα περισσότερα διαλύματα εμφανίζουν τυπική συμπεριφορά gel, με εξαίρεση την περίπτωση του θειικού οξέος στους 60°C για 72 ώρες, όπου από μια τιμή γωνιακής συχνότητας και άνω, παρουσιάζεται αλλαγή συμπεριφοράς (από ελαστική συμπεριφορά σε ιξώδη συμπεριφορά). Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι **υδρόλυση της βακτηριακής κυτταρίνης με θειικό οξύ για 72 ώρες σε θερμοκρασία 60°C, έχει το βέλτιστο αποτέλεσμα** στις φυσικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης.

Στη συνέχεια, έγινε ενσωμάτωση διαφόρων συγκεντρώσεων (0,1 έως 1%) βακτηριακής κυτταρίνης, υδρολυμένης με θειικό οξύ για 72 ώρες σε θερμοκρασία 60 °C, σε γαλακτώματα με ελαιόλαδο. Σε ότι αφορά το μέγεθος των σταγονιδίων του γαλακτώματος, η μικρότερη διάμετρος εμφανίστηκε για συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 1%. Ακόμα, στην ίδια συγκέντρωση μετρήθηκε το χαμηλότερο ποσοστό διαχωρισμού φάσεων (27%).

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι η όξινη υδρόλυση επηρεάζει σημαντικά τις φυσικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, φαίνεται ότι **έντονες συνθήκες υδρόλυσης (θειικό οξύ, 72 ώρες, 60°C) έχουν τη βέλτιστη επίδραση στις ιδιότητες** της βακτηριακής κυτταρίνης. Τέλος, αναφορικά με τη χρήση της

βακτηριακή κυτταρίνης ως σταθεροποιητή *σε γαλακτώματα, φαίνεται ότι οι βέλτιστες ιδιότητες παρουσιάζονται για συγκέντρωση 1% βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης στις παραπάνω συνθήκες.*

- **Σύγκριση των μεθόδων**

Από τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται ότι επεξεργασία με θειικό οξύ σε έντονες συνθήκες οδηγεί σε ινίδια βακτηριακής κυτταρίνης με μικρότερο μέγεθος και μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο. Σε ότι αφορά τα υδατικά διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, βλέπουμε ότι διαλύματα που περιέχουν βακτηριακή κυτταρίνη επεξεργασμένη με υπερήχους εμφανίζουν μικρότερο διαχωρισμό φάσεων, αλλά μεγαλύτερο ιξώδες. Σχετικά με τις ρεολογικές ιδιότητες των διαλυμάτων, παρατηρούμε ότι τα υδατικά διαλύματα υδρολυμένης με θειικό οξύ βακτηριακής κυτταρίνης έχουν σημαντικά μικρότερο ιξώδες, ενώ εμφανίζουν τυπική θιξοτροπική συμπεριφορά με μεγαλύτερη υστέρηση. Ακόμα, σε ότι αφορά την ιξωδοελαστική τους συμπεριφορά, τα διαλύματα της υδρολυμένης με θειικό οξύ βακτηριακής κυτταρίνης για 72 ώρες παρουσιάζουν σημείο ζελατινοποίησης ($G' = G''$).

Τέλος, σχετικά με τη χρήση της βακτηριακής κυτταρίνης ως σταθεροποιητή, βλέπουμε ότι η επεξεργασία με υπερήχους οδηγεί σε γαλακτώματα με μικρότερη διάμετρο σταγονιδίων και σημαντικά μεγαλύτερη σταθερότητα.

Από τα παραπάνω, συνοψίζοντας φαίνεται ότι η επεξεργασία της βακτηριακής κυτταρίνης με υπερήχους οδηγεί σε γαλακτώματα με βέλτιστες ιδιότητες.

V.Συστάσεις-Μελλοντική έρευνα

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα βιοπολυμερές που μπορεί έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, η χρήση της ως σταθεροποιητή σε τρόφιμα είναι μια σχετικά νέα εφαρμογή και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να καθοριστεί η απόδοτικότητα παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης για μεγάλης κλίμακας διεργασίες αλλά και οι πιθανές μέθοδοι επεξεργασίας που δίνουν στη βακτηριακή κυτταρίνη τις επιθυμητές ιδιότητες.

Η επεξεργασία με υπερήχους φαίνεται αποδοτική μέθοδος ομογενοποίησης γαλακτωμάτων στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, προς το παρόν θεωρείται εργαστηριακή μέθοδος και δεν εφαρμόζεται σε μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές διεργασίες παραγωγής. Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να βελτιωθεί η αποδοτικότητα των συσκευών υπερήχων ώστε να γίνει μεγάλης κλίμακας και οικονομικά αποδοτική διεργασία για την παραγωγή νανογαλακτωμάτων. Ακόμα, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τους παράγοντες που επηρεάζουν τα φαινόμενα σπηλαίωσης και για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασής τους στην ποιότητα των τελικών προϊόντων.

Η υδρόλυση της βακτηριακής κυτταρίνης με θειικό ή με υδροχλωρικό οξύ είναι μια επεξεργασία η οποία έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Ωστόσο, θα μπορούσαν να γίνουν περισσότερες μελέτες για την επίδραση και άλλων ισχυρών οξέων στις φυσικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης, αλλά και για τους μηχανισμούς επίδρασης της θερμοκρασίας υδρόλυσης στις ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

Σχετικά με τις ιδιότητες που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πρέπει να σημειωθεί ότι οι μηχανισμοί αποσταθεροποίησης των διαφόρων τροφίμων είναι πολύπλοκοι και πολλές φορές παρατηρούνται συνδιασμοί δύο ή και περισσότερων μηχανισμών. Συνεπώς,

θα ήταν χρήσιμο να γίνει περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών αυτών ώστε να βρεθεί ένα ενιαίο πλαίσιο κατανόησής τους. Σε ότι αφορά το μέγεθος και τη μορφολογία των ινιδίων και των σωματιδίων, πρέπει να σημειωθεί ότι μέσω των μικροσκοπίων αναλύονται μόνο κάποιες μικρές περιοχές του δείγματος, γεγονός που σημαίνει ότι τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν απλώς εκτιμήσεις του μεγέθους των ινιδίων και χρησιμεύουν για τη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων. Συνεπώς, για μελλοντική έρευνα προτείνεται μέτρηση του μεγέθους τους με όργανα μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας.

Συνοψίζοντας, η χρήση βακτηριακής κυτταρίνης ως σταθεροποιητή γαλακτωμάτων, είναι μια μέθοδος με πολλές δυνατότητες. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω μελέτη των διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας της και του πως αυτές οι μέθοδοι επηρεάζουν το τελικό προϊόν.

VI. Βιβλιογραφία

- Abbas S., Hayat K., Karangwa E., Bashari M., Zhang X (2013) An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions, *Food Engineering Review*
- Abismaïl, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., & Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 6(1–2), 75-83.
- Angellier H, Putaux JL, Molina-Boisseau S, Dupeyre D, Dufresne A (2005) Starch nanocrystal fillers in a acrylic polymer matrix. *Macromol Symp* 221 p. 95–104
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S., & Okano, T. (1998). Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 142(1), 75-82.
- Azizi Samir A., Alloin F., Dufresne A. (2005) Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field, *Biomacromolecules* 6(2),p. 612-626
- Barbosa-Cánovas G., Feng H., Weiss J., (2011) *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Springer Editions
- Barnes, H. A. (1997). Thixotropy—a review. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 70(1–2), 1-33.
- Baxter, S., Zivanovic, S., & Weiss, J. (2005). Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 821-830.
- Bhatt N., Prasad K.R., Singh K., Panpalia M.G., (2010) Stability study of O/W emulsions using zeta potential, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(1), p. 512-527)
- Bielecki S., Krystynowicz A., Turkiewicz M., Kalinowska H.: *Bacterial Cellulose*
- Bondeson D, Mathew A, Oksman K (2006) Optimization of the isolation of nanocrystal from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. *Cellulose* 13:171–180
- Chanamai R., McClements D.J., 2000, Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 172, p.79–86
- Chandrapala J., Oliver C., Kentish S., Ashokkumar M., (2012) *Ultrasonics in food processing*, *Ultrasonics Sonochemistry* 19, p. 975–983
- Chawla P.R., Bajaj I. B., Survase S. A., Singhal R.S.: (2009) Fermentative Production of Microbial Cellulose, *Food Technology and Biotechnology* 47 (2) 107–124
- Claesson M.P., Blomberg E., Poptoshev E, (2010) *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*, Chapter 13: Surface Forces and Emulsion Stability, CRC Press

Dickinson E. (2010) Food emulsions and foams: Stabilization by particles, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 15, p. 40-49

Dickinson E., (2010), Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81, p. 130–140

Dickinson E., (2012), Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions, *Trends in Food Science & Technology* 24 ,p. 4-12

Dontula P., Macosko W., Scriven L.E. (2005) Origins of concentric cylinders viscometry

Elazzouzi-Hafraoui E., Nishiyama Y., Putaux J.L, Heux L., Dubreuil F., Rochas C, (2008) The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose, *Biomacromolecules*, 9 (1), pp 57–65

Fennema O, (1996) Food chemistry, Third edition

Formulaction France, (www.formulaction.com)

Garti N., Aserin A.,(2013) Double emulsions, *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*, p. 303-337

Gray D (2011) Liquid crystalline and gelling properties of cellulose nanocrystal suspensions, international Liquid Crystal Elastomer Conference, Lisbon, September 2011

Gunasekaran S., Ak M., (2000)Dynamic oscillatory shear testing of foods –selected applications, *Trends in Food Science & Technology* 11 ,p. 115-127

Habibi Y., Lucia A.L., Rojas J.O., (2010) Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications, *Chemical Reviews* 110, p. 3479–3500

Hermansson A.M, (1986) Water and Fat holding, in *Functional properties of food macromolecules*, Elsevier applied science

Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemistry Journal*, 58(2),p. 345-352.

Hunter, R.J. (1988) *Zeta Potential In Colloid Science: Principles And Applications*, Academic Press, UK.

Kaltsa, O., Michon, C., Yanniotis, S., & Mandala, I. (2013). Ultrasonic energy input influence on the production of sub-micron o/w emulsions containing whey protein and common stabilizers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 881-891.

Kalashnikova I., Bizot H., Cathala B., & Capron I. (2011). New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. *Langmuir*, 27, 7471-7479.

Karppinen A., Saarinen T., Salmela J., Laukkanen A., Nuopponen M., & Seppala J.,(2012) Flocculation of microfibrillated cellulose in shear flow, *Cellulose* 19, p.1807-1819.

Keshk S. (2014) Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications, *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 4:2

Lavoine N, Desloges I., Dufresne A., Bras J. (2012) Microfibrillated cellulose - its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review, *Carbohydr Polym*, Oct 2012, 90(2), p.735-764

Lee K.Y., Quero F., Blaker J., Hill A.S., Eichhorn S., Bismarck A, (2011) Surface only modification of bacterial cellulose nanofibres with organic acids, *Cellulose* 18, p.595–605

Leong T., Wooster T, Kentish S., Ashokkumar M. (2009) Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem* 16, p. 721–727

Liese A, Hilterhaus L., (2013) Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications , *Chemical Society Reviews* 42, p. 6236-6249

Lin, D., Li, R., Lopez-Sanchez, P., & Li, Z. (2014) Physical properties of bacterial cellulose aqueous suspensions treated by high pressure homogenizer. *Food Hydrocolloids*(0).

Iotti, M., Gregersen, O. W., Moe, S., & Lenes, M. (2011). Rheological Studies of Microfibrillar Cellulose Water Dispersions. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(1), 137-145.

Malvern Instruments , Zetasizer Nano series technical note, Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes (www.malvern.com)

Martinez- Sanz M., Lopez- Rubio A., Lagaron M.J., (2011) Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers, *Carbohydrate Polymers* 85, p. 228–236

McClements D.J., (2005) *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*, Second Edition, CRC Press

McClements D.J., (2007) Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47:7, 611-649

McClements D.J., (2011), Edible nanoemulsions: fabrication, properties and functional performance, *Soft Matter* 7, p. 2297-2316

Moon J.R.,Martini A., Nairn J., Simonsen J., Youngblood J.,(2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites, *Chemical Society Reviews* 40, p. 3941–3994

Moschakis T., Murray B.S., & Dickinson E. (2005). Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilized by sodium caseinate and xanthan gum. *Journal of Colloid and Interface Science*, 284 (2), 714-728.

Munizaga G., Barbosa-Ca'novas G., (2005) Rheology for the food industry, *Journal of Food Engineering* 67, p. 147–156

Murphy D. (2001) Fundamentals of light microscopy and electronic imaging, John Wiley & Sons

Nechyporchuk O., Belgacem M., Pignon F., (2014) Rheological properties of micro-/nanofibrillated cellulose suspensions: Wall-slip and shear banding phenomena, *Carbohydrate Polymers* 112 , p.432–439

Okiyama A., Motoki M., Yamanaka S., (1993), Bacterial cellulose III. Development of a new form of cellulose, *Food Hydrocolloids* Vol.6 no.6 pp .493-501

Okiyama A., Motoki M., Yamanaka S., (1993), Bacterial cellulose IV. Application to processed foods, *Food Hydrocolloids* Vol.6 no.6 pp .503-511

Olsson T. R., Kraemer R., Lopez-Rubio A., Torres-Giner S., Ocio J.M., Lagaron J.M. (2010) Extraction of Microfibrils from Bacterial Cellulose Networks for Electrospinning of Anisotropic Biohybrid Fiber Yarns, *Macromolecules* 43, p. 4201–4209

Paakko M., Ankerfors M., Kosonen H., Nykänen A., Ahola S., Osterberg, M. Ruokolainen J., Laine J., Larsson P. T., Ikkala O., Lindström T, (2007) Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels, *Biomacromolecules* 8, p. 1934-1941

Paximada, P., Tsouko, E., Kopsahelis, N., Koutinas, A.A., Mandala, I., Bacterial Cellulose as stabilizer of o/w emulsions, *Food Hydrocolloids* (2015)

Piorkowski T. D., McClements J.D., (2014) Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production and applications, *Food Hydrocolloids* 42, p. 5-41

Price, G. (1990). The use of ultrasound for the controlled degradation of polymer solutions, *Advances in sonochemistry*, p.231–287

Rao M.A. , Rizvi S. H., Datta K.A., (2005) Engineering Properties Of Foods, CRC Press, 3rd Edition, Chapter 2

Revol F., Bradford H., Giasson J., Marchessault R.H., Gray D.G., (1992) Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 14

Roman M., Winter W. (2004) Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose, *Biomacromolecules* 5, p. 1671-1677

Santos M, Carbajo J. M., Quintana E., Ibarra D., Gomez N., Ladero M., Eugenio E., Villar J. C. (2015) Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration, *Carbohydrate Polymers* 116, p. 173–181

Scholten E., Moschakis T., Biliaderis C., (2014) Biopolymer composites for engineering food structures to control product functionality, *Food Structure* 1, p. 39 –54

Shezad, O., Khan, S., Khan, T., & Park, J. K. (2010). Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static

conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 173-180.

Shibazaki H, Kuga S, Onabe F (1995) Acid hydrolysis behaviour of microbial cellulose II, *Polymer* Vol. 36 No. 26, pp. 4971-4916.

Steffe J.,(1996), *Rheological Methods in Food Process Engineering*, Second Edition, Chapter 5, p.317

Schwartzberg G, Hartel R., (1992) *Physical Chemistry of Foods*, IFT, basic symposium series

Tadros Tharwat (2013) *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*, Springer

Tingaut P, Zimmermann T, Sebe G. (2012) Cellulose nanocrystals and microfibrillated cellulose as building blocks for the design of hierarchical functional materials<, *Materials Chemistry* 22

Tischer Faria P.C., Westfahl H.J., Tischer C.S., Sierakowski M.R. (2010), Nanostructural reorganization of bacterial cellulose by ultrasonic treatment, *Biomacromolecules*, 11, 1217-1224

TA Instruments (2014) *Standard Operating Procedure for the Discovery Hybrid Rheometer HR-3*

Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., Kiosseoglou, V., & Biliaderis, C. G. (2011). Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1521-1529

Ul-Islam M., Khan T., Park K.J. (2012) Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification, *Carbohydrate Polymers* 88, p. 596–603

Virangkumar N. L., Murthy Z., (2013): Alteration of Interfacial Stability of Oil-in-Water Emulsions Using Bio-Derived Additives, *Journal of Dispersion Science and Technology* 34:1,p. 78-83

Whelan T., (1994) *Polymer technology dictionary*, Chapman and Hall

Williams B.D., Carter C. B. (2009)*Transmission Electron Microscopy A Textbook for Materials Science*, Springer

Winter, H. 2003. Gel Point. *Encyclopedia Of Polymer Science and Technology*.

Winuprasith T.,Suphantharika M. (2013) Microfibrillated cellulose from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind: Preparation, characterization, and evaluation as an emulsion stabilizer, *Food Hydrocolloids* 32, p. 383-394

Zayas J., (1997) *Functionality of proteins in food*, Springer

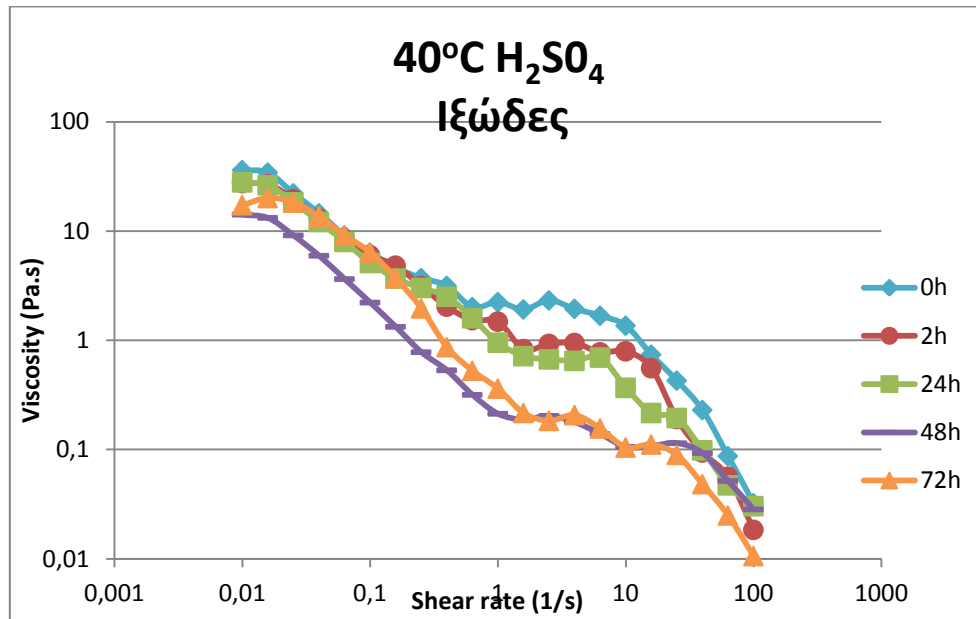
Zhou C., Wu Q. (2012) Recent development in applications of cellulose nanocrystals for advances polymer based nanocomposites by novel fabrication strategies, *Nanocrystals - Synthesis, Characterization and Applications*, Chapter 6

Zinoviadou K.G., Scholten E, Moschakis T, & Biliaderis C.G. (2012). Properties of emulsions stabilized by sodium caseinate- chitosan complexes. *International Dairy Journal*, 26 (1), 94-101.

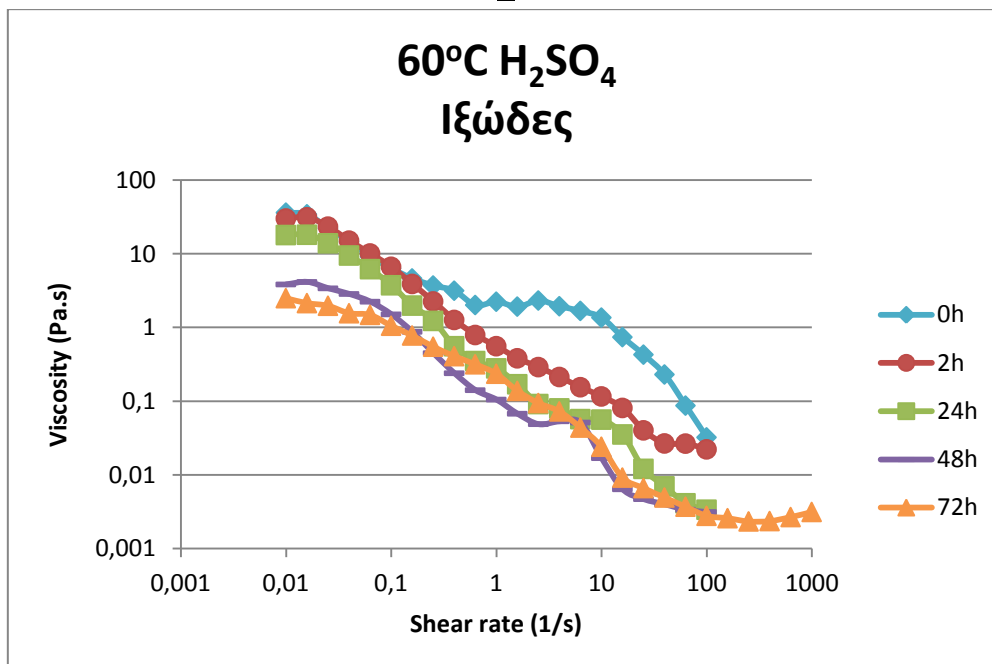
Παπαϊωάννου Θ.Α., *Μηχανική των Ρευστών*, Β' Έκδοση, Αθήνα 2002, Τόμος 2

Παράρτημα Α- Γραφήματα υδρόλυσης

Στα γραφήματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ρεολογικής συμπεριφοράς διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης για 0,2,24,48 και 72 ώρες:

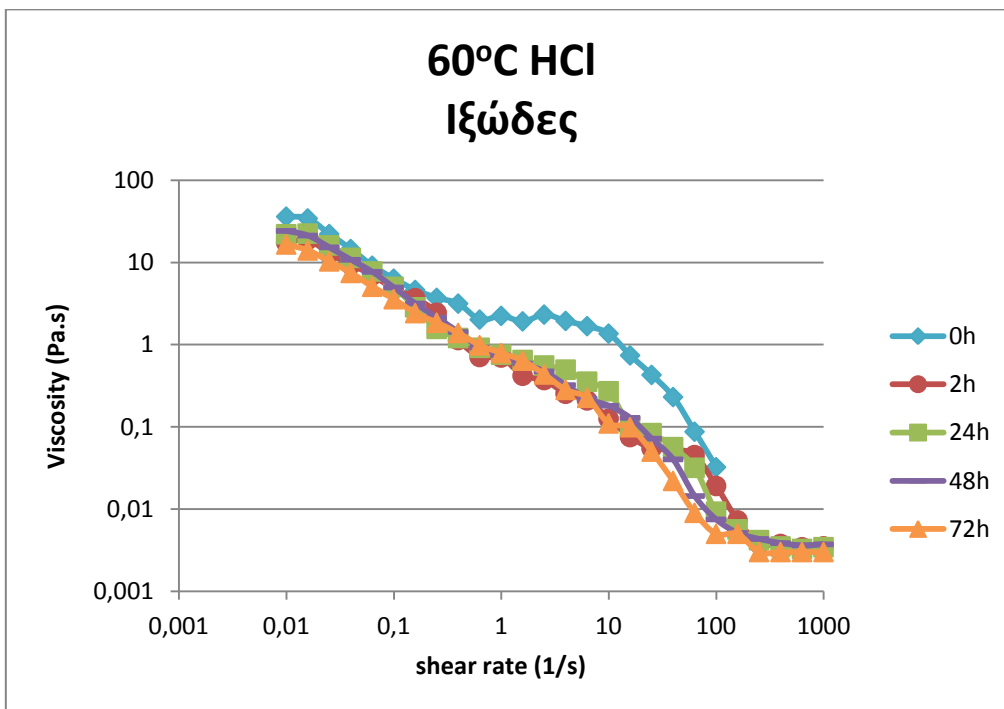
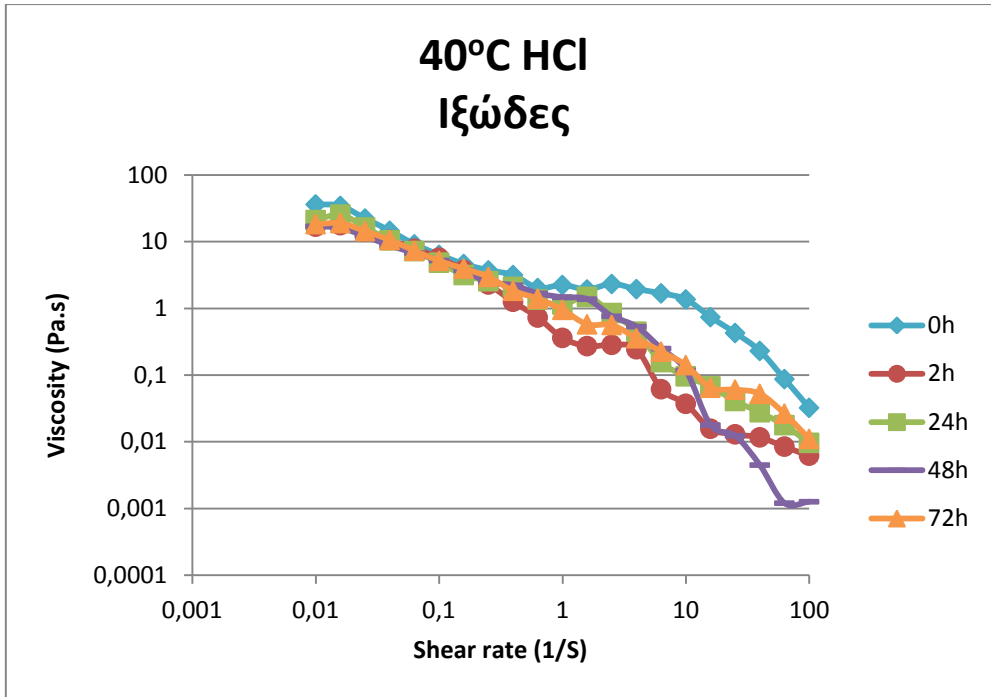


A

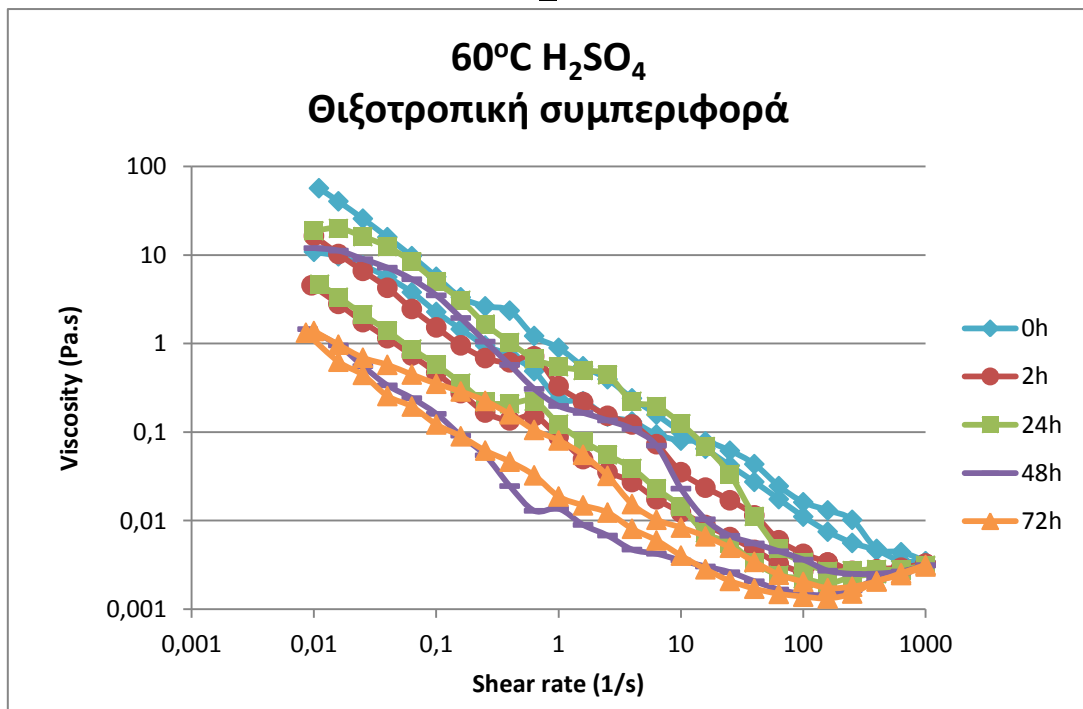
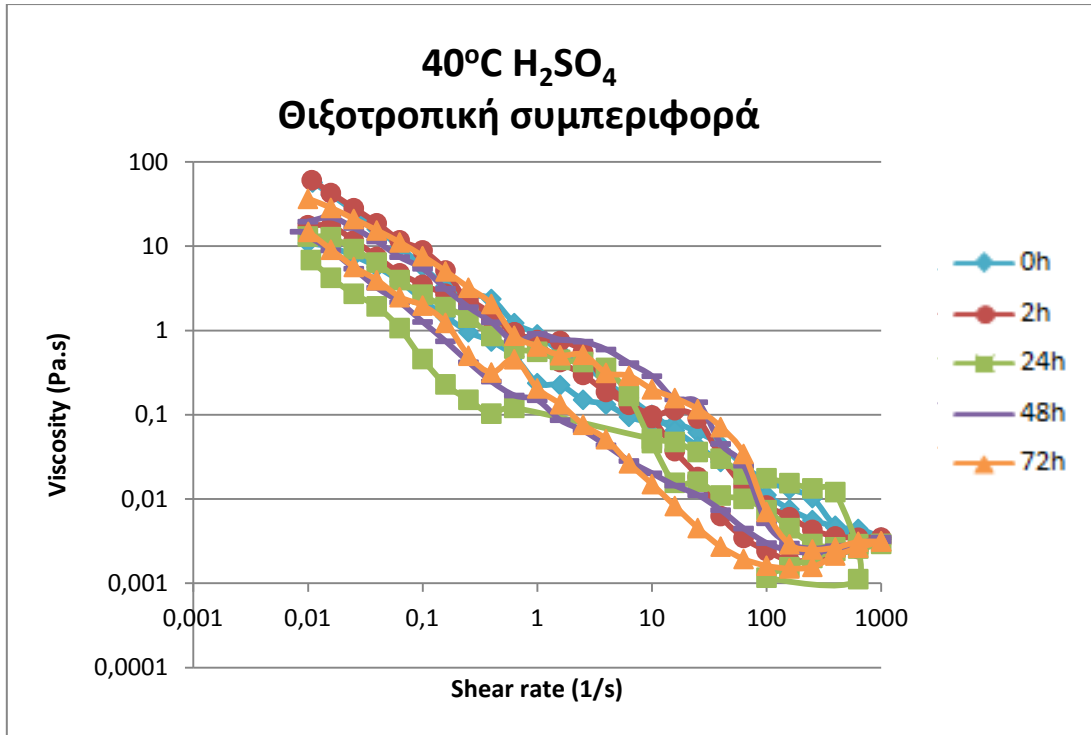


B

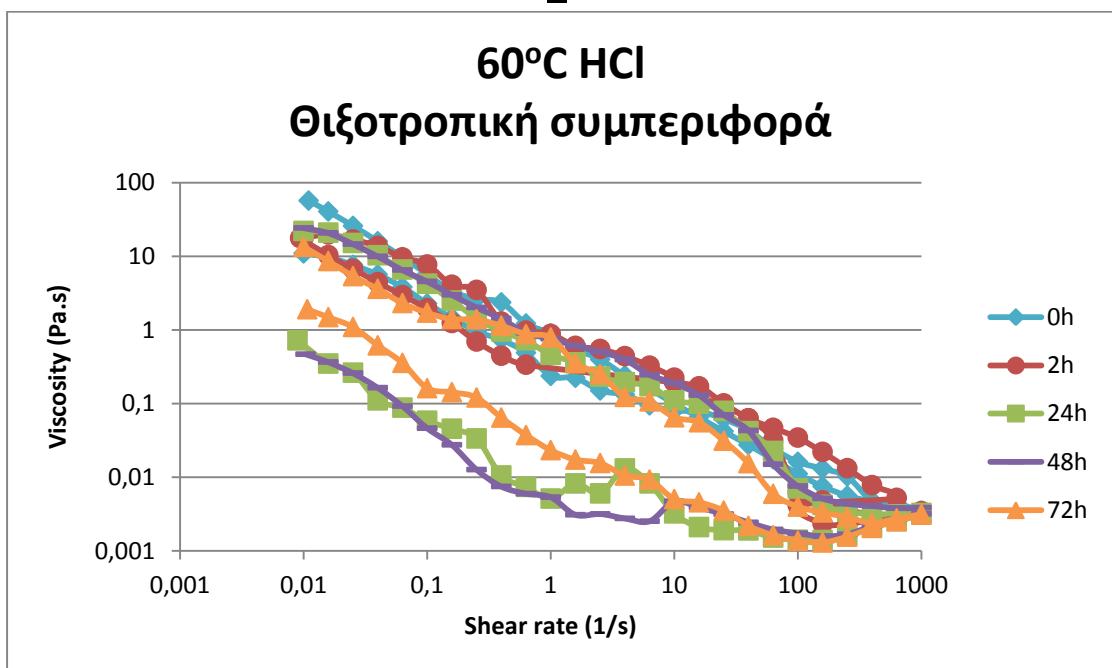
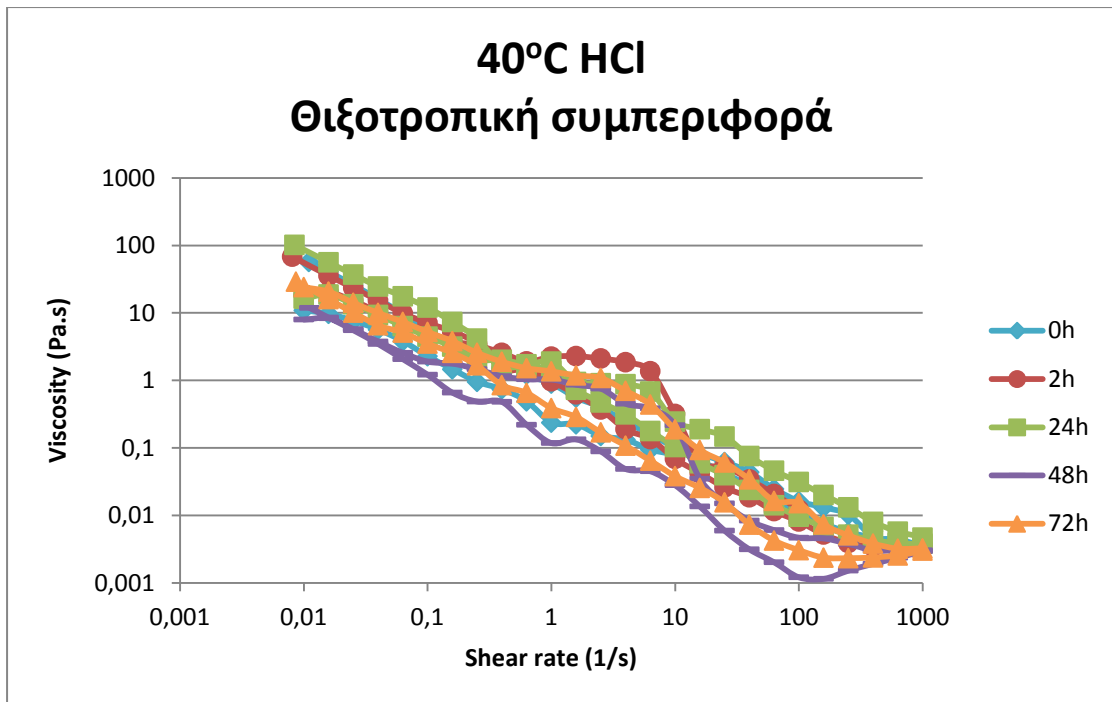
Γράφημα Π1 : Εξάρτηση ιξώδους από τη διατμητική τάση για διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, υδρολυμένης με H₂SO₄ για 2,24, 48 και 72 ώρες σε θερμοκρασίες 40°C (A) και 60°C (B).



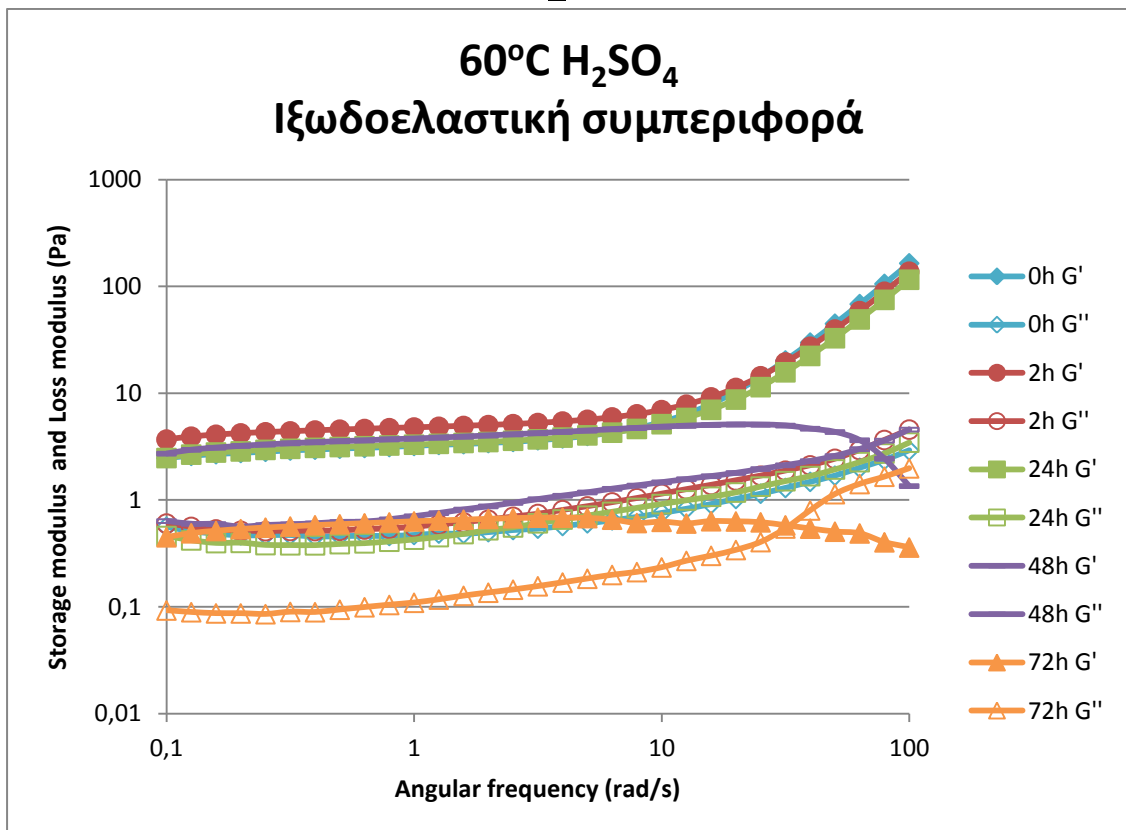
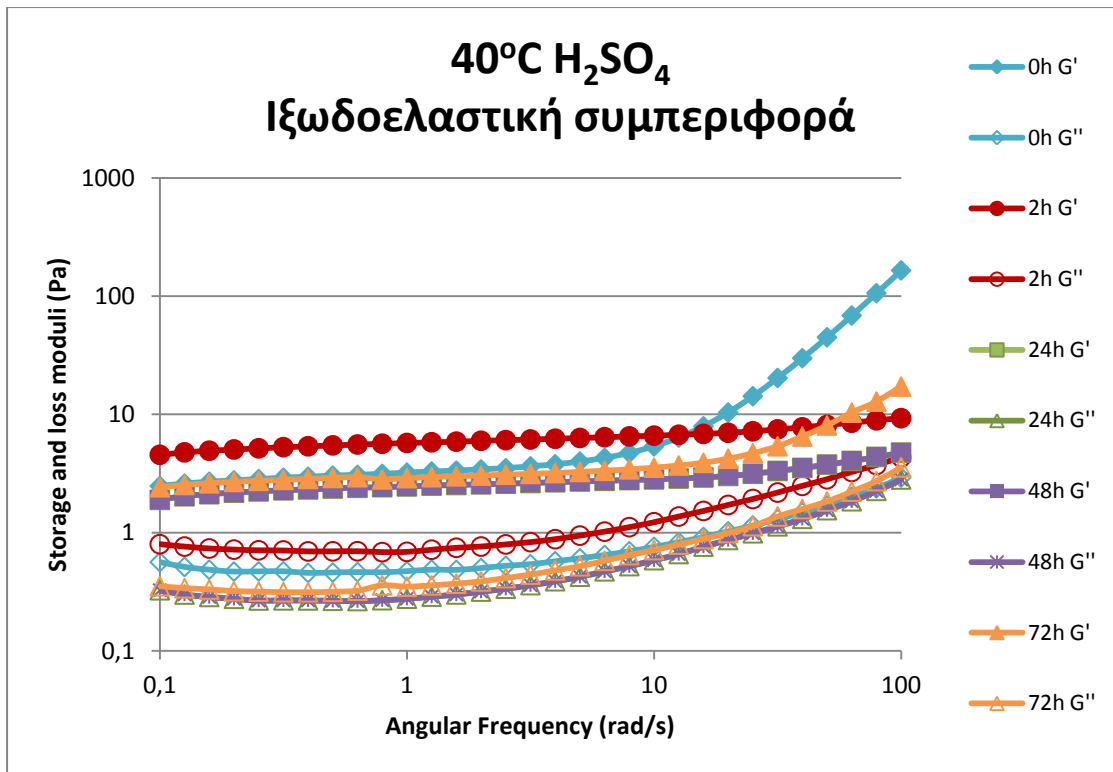
Γράφημα Π2: Εξάρτηση ιξώδους από τη διατμητική τάση για διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, υδρολυμένης με HCl για 2,24,48 και 72 ώρες σε θερμοκρασίες 40°C (A) και 60°C (B).



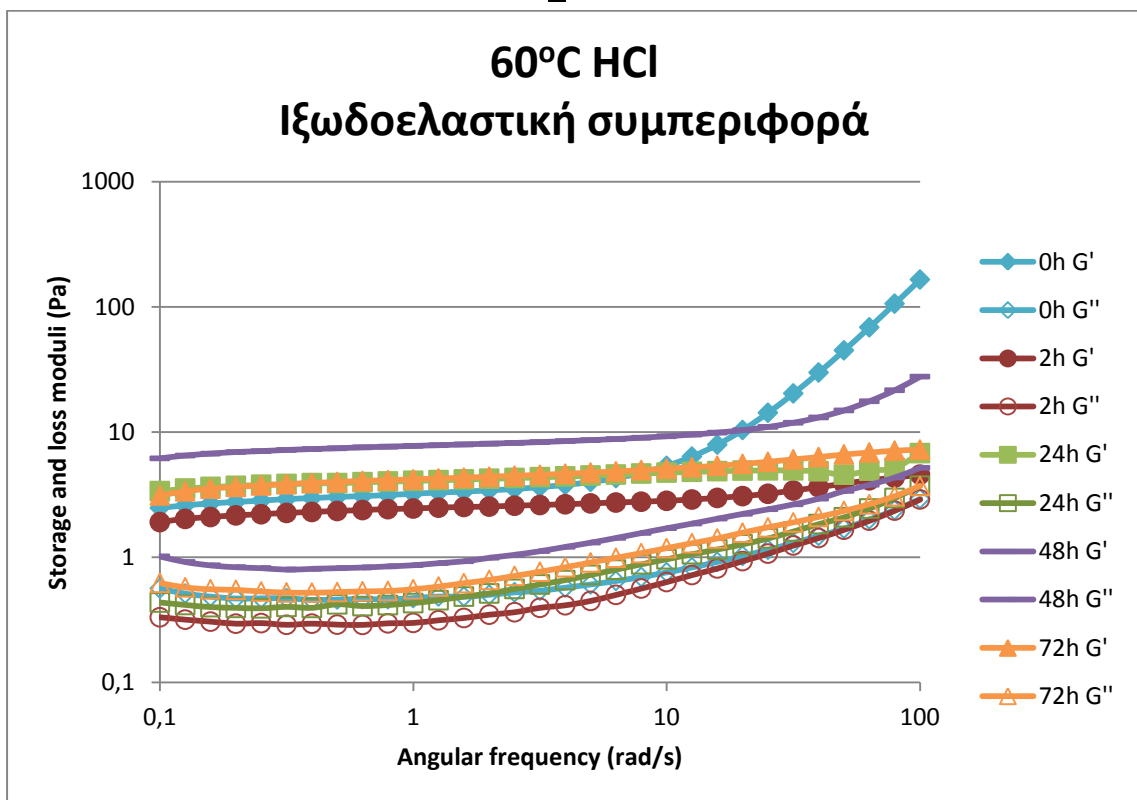
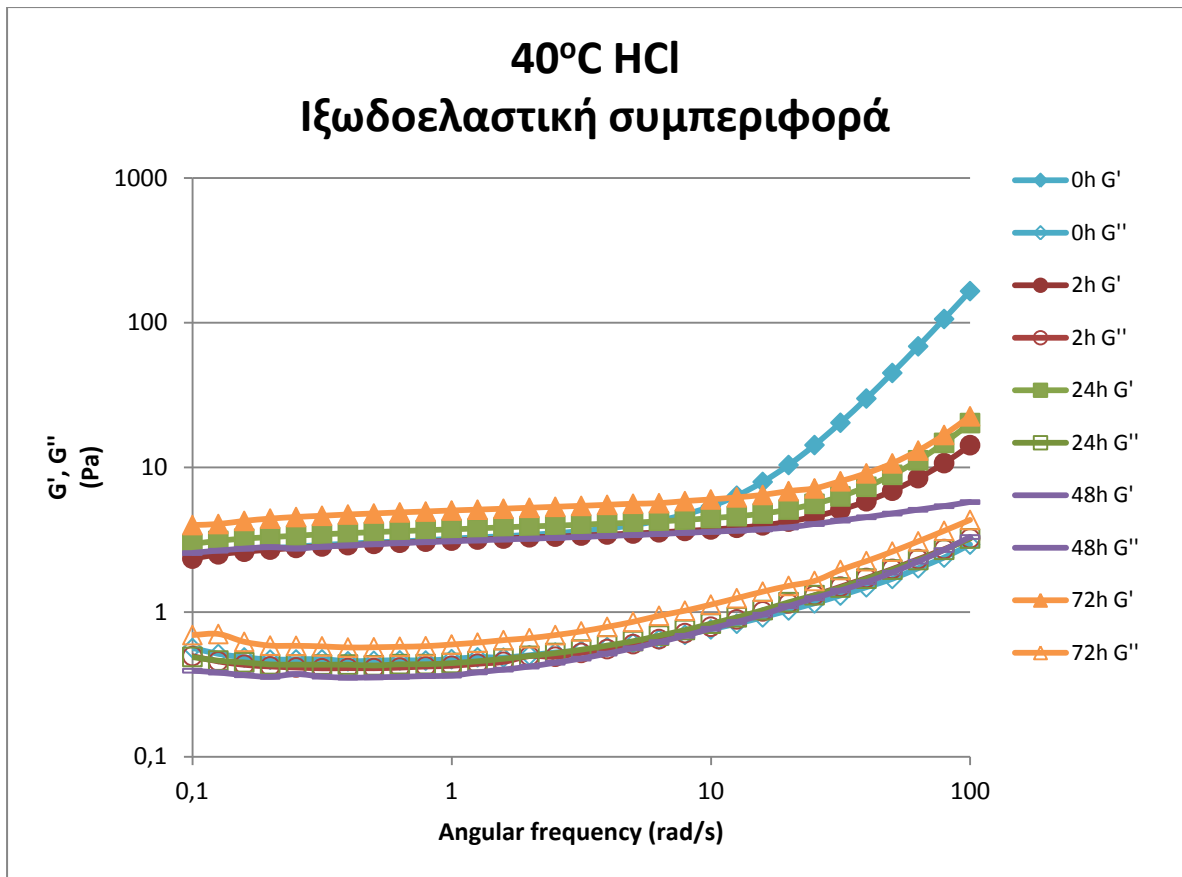
Γράφημα Π3: Θιξοτροπική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση με H₂SO₄ για 2,24,48 και 72 ώρες σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)



Γράφημα Π4: Θιξοτροπική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση με HCl για 2,24,48 και 72 ώρες σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)



Γράφημα Π5: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0,2, 24, 48 και 72 ώρες με H₂SO₄ σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)



Γράφημα Π6: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0, 2, 24, 48 και 72 ώρες με HCl σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B)

Παράρτημα Β- Συγκεντρωτικός πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Βακτηριακή κυτταρίνη όπως παραλαμβάνεται μετά την καλλιέργεια (Keshk, 2014)	8
Εικόνα 2: Διαφορά στη δομή μεταξύ βακτηριακής (α) και φυτικής κυτταρίνης (β) όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο SEM (Chawla et al, 2009)	8
Εικόνα 3: Επαναλαμβανόμενες μονάδες (μονομερή) της κυτταρίνης.....	9
Εικόνα 4: κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές των δεσμών ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης (Zhou & Wu, 2012)	9
Εικόνα 5: Ρεολογικά διαγράμματα νευτώνειων ρευστών.....	10
Εικόνα 6: Καμπύλη ροής και εξάρτηση του φαινομένου ιξώδους ψευδοπλαστικού ρευστού από το ρυθμό διάτμησής του (http://www.sju.edu/)	12
Εικόνα 7: Καμπύλες ροής διαφόρων κατηγοριών ρευστών (Rao et al, 2005)	13
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της θιξοτροπικής συμπεριφοράς (Barnes,1997).....	14
Εικόνα 9: ζ- δυναμικό (Liese et al, 2013)	15
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των αλλαγών που επιφέρει στη μορφολογία της κυτταρίνης η όξινη υδρόλυση (Gray,2011).....	18
Εικόνα 11: Διαφορές στη μορφολογία ινιδίων κυτταρίνης μετά την όξινη υδρόλυση (Winter, 2007).....	18
Εικόνα 12: Διαφορές τυπικών γαλακτωμάτων, νανο-γαλακτωμάτων και μικρο-γαλακτωμάτων	22
Εικόνα 13: Αποσταθεροποίηση γαλακτωμάτων (McClements, 2011)	24
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού κροκίδωσης γεφύρωσης (bridging flocculation).....	26
Εικόνα 15: Μηχανισμός οσμωτικής κροκίδωσης (McClements, 2005).....	26
Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της συγχώνευσης σωματιδίων γαλακτωμάτων τύπου O/W (McClements, 2007).....	27
Εικόνα 17: Ωρίμανση Ostwald (Ostwald Ripening) (McClements, 2005)	27
Εικόνα 18: Πρωτογενής και δευτερογενής ομογενοποίηση γαλακτωμάτων (McClements,2005)	28
Εικόνα 19: Συσκευή υπερήχων Sonopuls 3200, Bandelin GmbH & Co, Berlin, Germany.....	33
Εικόνα 20: Φυγοκεντρος Econospin (Sorvall Instruments).....	34
Εικόνα 21: Τα χαρακτηριστικά μέρη ενός οπτικού μικροσκοπίου (Murphy D., 2001)	35
Εικόνα 22: Μέρη του μικροσκοπίου TEM.....	36
Εικόνα 23: Η συσκευή ZetasizerNano	36
Εικόνα 24: Η συσκευή Turbiscan Classic MA 2000	37
Εικόνα 25: Αρχή λειτουργίας της συσκευής Turbiscan MA 2000 (www.formulaction.com) .	38
Εικόνα 26: Ρεολογικά τεστ που χρησιμοποιούνται στην μελέτη ιδιοτήτων τροφίμων (Munizaga, 2004).....	39
Εικόνα 27: Γεωμετρία ρεομέτρου ομόκεντρων κυλίνδρων (Rao et al, 2005)	40
Εικόνα 28: Το ρεόμετρο DHR-3 (TA Instruments).....	41
Εικόνα 29: Απεικόνιση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο TEM (κλίμακα 200nm): A: Μη επεξεργασμένο δείγμα (untreated), B: Επεξεργασία με υπερήχους για 1 λεπτό, C: Επεξεργασία με υπερήχους για 3 λεπτά, D: επεξεργασία με υπερήχους για 5 λεπτά.....	43
Εικόνα 30: Διαχωρισμός φάσεων διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από 20 ημέρες.	50

Εικόνα 31: Απεικόνιση σταγονιδίων γαλακτωμάτων που περιέχουν 20% ελαιόλαδο και διάφορες συγκεντρώσεις κυτταρίνης επεξεργασμένης με υπερήχους για 3 λεπτά	59
Εικόνα 32: Δίκτυο ινιδίων στο μη επεξεργασμένο δείγμα	61
Εικόνα 33: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με H_2SO_4 στους $40^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα 1 μm).....	62
Εικόνα 34: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με H_2SO_4 στους $60^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα 2 μm).....	62
Εικόνα 35: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με HCl στους $40^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα 1 μm).....	62
Εικόνα 36: Μορφολογία ινιδίων μετά από υδρόλυση με HCl στους $60^\circ C$ για 2 και 72 ώρες (κλίμακα 2 μm και 1 μm αντίστοιχα)	62
Εικόνα 37: Εμφάνιση διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με 65% H_2SO_4 για 2 και 72 ώρες στους $40^\circ C$	67
Εικόνα 38: Εμφάνιση διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με 65% H_2SO_4 για 2 και 72 ώρες στους $60^\circ C$	67
Εικόνα 39: Εμφάνιση διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με HCl για 2 και 72 ώρες στους $40^\circ C$	69
Εικόνα 40: διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης υδρολυμένης με HCl για 2 και 72 ώρες στους $60^\circ C$	69
Εικόνα 41: απεικόνιση σε οπτικό μικροσκόπιο (ανάλυση 40x) των σωματιδίων γαλακτωμάτων με υδρολυμένη βακτηριακή κυτταρίνη συγκέντρωσης 0,1% (Α), 0,3% (Β), 0,5% (C), 0.7% (D) και 1% (Ε) και 20% ελαιόλαδο	81

Παράρτημα Γ- Συγκεντρωτικός πίνακας πινάκων

Πίνακας 1: Παραδείγματα τροφίμων- νευτώνειων ρευστών (Rao et al, 2005)	11
Πίνακας 2: Παραδείγματα τροφίμων- ψευδοπλαστικών ρευστών (Rao et al, 2005)	11
Πίνακας 3: δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς και κατηγορίες ρευστών (Rao et al, 2005) ..	12
Πίνακας 4: Κατηγοριοποίηση γαλακτωμάτων	21
Πίνακας 5: Βασικοί τύποι ομογενοποιητών και χαρακτηριστικά τους (με βάση το McClements,2005)	29
Πίνακας 6: Σύσταση θρεπτικού μέσου (Hestrin & Schramm,1954).....	32
Πίνακας 7: Πλάτος ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μετά την επεξεργασία με υπερήχους (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση, ενώ τα γράμματα a και b συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές, $p < 0.05$).....	44
Πίνακας 8: Επίδραση της συγκέντρωσης κυτταρίνης επεξεργασμένης με υπερήχους στη διάμετρο σταγονιδίων των γαλακτωμάτων (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση και οι δείκτες a,b,c αντιστοιχούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές, για $p < 0.05$).....	59
Πίνακας 9: Διαφορές στο μέγεθος των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης μετά την όξινη υδρόλυση (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση, ενώ τα γράμματα a,b,c,d,e,f δείχνουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)	63
Πίνακας 10: Επίδραση της συγκέντρωσης υδρολυμένης κυτταρίνης στη διάμετρο σταγονιδίων των γαλακτωμάτων (σε παρένθεση δίνεται η τυπική απόκλιση και οι δείκτες a,b,c αντιστοιχούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές, για $p < 0.05$)	82
Πίνακας 11: Σύγκριση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων (σε παρένθεση δίνονται οι τυπικές αποκλίσεις).....	83

Παράρτημα Δ- Συγκεντρωτικός πίνακας γραφημάτων

Γράφημα 1: Επίδραση χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους στο ζ-δυναμικό διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων βακτηριακής κυτταρίνης	45
Γράφημα 2: Επίδραση του χρόνου επεξεργασίας με υπερήχους και της συγκέντρωσης βακτηριακής κυτταρίνης στην ικανότητα συγκράτησης νερού.....	46
Γράφημα 3: Διαχωρισμός φάσεων των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από 20 ημέρες	48
Γράφημα 4: Ιξώδες των διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης.....	52
Γράφημα 5: Επίδραση χρόνου επεξεργασίας στη θιξοτροπική συμπεριφορά διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης συγκέντρωσης 0,1 % (A), 0,5 %(B) και 1% κ.β. (C).....	54
Γράφημα 6: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων με διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας.....	57
Γράφημα 7: Διαχωρισμός φάσεων γαλακτωμάτων με βακτηριακή κυτταρίνη επεξεργασμένη με υπερήχους	60
Γράφημα 8: ζ- δυναμικό των ινιδίων βακτηριακής κυτταρίνης συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης για υδρόλυση με διαφορετικά οξέα και σε διαφορετικές θερμοκρασίες	65
Γράφημα 9: Διαχωρισμός φάσεων διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση με H ₂ SO ₄ τους 40°C (A) και 60°C (B)	66
Γράφημα 10: Διαχωρισμός φάσεων διαλυμάτων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση με HCl σ τους 40°C (A) και 60°C (B).....	68
Γράφημα 11: Εξάρτηση ιξώδους από τη διατμητική τάση για διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, υδρολυμένης με H ₂ SO ₄ για 2 και 72 ώρες σε θερμοκρασίες 40°C (A) και 60°C (B).	71
Γράφημα 12: Εξάρτηση ιξώδους από τη διατμητική τάση για διαλύματα βακτηριακής κυτταρίνης, υδρολυμένης με HCl για 2 και 72 ώρες σε θερμοκρασίες 40°C (A) και 60°C (B).	73
Γράφημα 13: Θιξοτροπική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0 και 72 ώρες με H ₂ SO ₄ σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B).....	75
Γράφημα 14: Θιξοτροπική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0 και 72 ώρες με HCl σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B).....	76
Γράφημα 15: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0,2 και 72 ώρες με H ₂ SO ₄ σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B).....	78
Γράφημα 16: Ιξωδοελαστική συμπεριφορά βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση για 0, 2 και 72 ώρες με HCl σε θερμοκρασία 40°C (A) και 60°C (B).....	79
Γράφημα 17: Διαχωρισμός φάσεων γαλακτωμάτων με υδρολυμένη βακτηριακή κυτταρίνη επεξεργασμένη.....	82
Γράφημα 18: Σύγκριση ιξώδους μεταξύ των δύο μεθόδων.....	85
Γράφημα 19: Σύγκριση θιξοτροπικής συμπεριφοράς μεταξύ των δύο μεθόδων.....	85
Γράφημα 20: Σύγκριση ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς μεταξύ των δύο μεθόδων	86