



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΡΕΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ ΚΕΦΙΡΑΝΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εξαρχόπουλος Στυλιανός

Τεχνολόγος Τροφίμων, M.Sc.

Υποβλήθηκε στο
Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα, 2018

« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:735^Α/06-03-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

1. Κοντομηνάς Μιχαήλ, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη:

2. Ραφαηλίδης Στυλιανός, Καθηγητής, , Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙΘ

3. Θωμάρεϊς Απόστολος, Καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙΘ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24-11-2017

Θέμα: «ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΡΕΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ ΚΕΦΙΡΑΝΗ »

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:
976^Α/27-04-2018

1. Κοντομηνάς Μιχαήλ, Καθηγητής, Επιβλέπων, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

2. Ραφαηλίδης Στυλιανός, Καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙΘ, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

3. Θωμάρεϊς Απόστολος, Καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙΘ, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

4. Καραθάνος Βάϊος, Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

5. Χατζηαράπογλου Λάζαρος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

6. Μπαδέκα Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

7. Παπαγεωργίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 31-05-2018

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Μαρία – Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ξανθή Τουτουνζόγλου

*«Στη σύζυγο μου Γεωργία και
στην κόρη μου Τζούλια»*

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Μιχαήλ Κοντομηνά για τη γενική εποπτεία και την υποστήριξή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Θερμότερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή κ Στυλιανό Ραφαηλίδη για την πολύτιμη επιστημονική του βοήθεια και τη συμβολή του στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθώς και για τη μετάδοση των γνώσεων και των εμπειριών του όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητή κ. Απόστολο Θωμάρεϊ, για την ενθάρρυνση και τη συμπαράστασή του σε όλα τα στάδια της διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αθανάσιο Γούλα για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε, την αρωγή του στο πειραματικό και επιστημονικό μέρος. Τον ευχαριστώ για την ανιδιοτελή προσφορά του, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση αυτής της διατριβής καθώς και για τις συμβουλές και την υποστήριξή του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή, κ. Zhenmiao Xu για την πολύτιμη βοήθειά του. Ακόμη ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κα Κλειώ Αντωνίου για την αμέριστη συμπαράστασή της και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε τα προηγούμενα έτη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγο μου Επίκουρη Καθηγήτρια κα Γεωργία Δημητρέλη, για όλα όσα μου προσέφερε τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	vii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xxxi
ABSTRACT	xxxiii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	4
1.1. Κεφίρανη	4
1.1.1. Κεφίρ	5
1.1.2. Κόκκοι κεφίρ	6
1.1.2.1. Μικροχλωρίδα κόκκων κεφίρ	9
1.1.2.2. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ	10
1.1.2.3. Διατήρηση κόκκων κεφίρ	12
1.1.3. Μηχανισμός ζύμωσης	13
1.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κεφίρανης	14
1.1.5. Απομόνωση κεφίρανης	18
1.1.5.1. Τεχνικές απομόνωσης	19
1.1.5.2. Απόδοση του πολυσακχαρίτη κατά την παραγωγή και ανάκτησή του	21
1.1.6. Ιδιότητες κεφίρανης	21
1.1.6.1. Χημική σύσταση	21
1.1.6.2. Τεχνολογική σημασία-Εφαρμογές κεφίρανης	23
1.1.6.3. Βιολογική-θεραπευτική δράση κεφίρανης	27
1.2. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός πολυσακχαριτών	27
1.2.1. Μοριακή διαμόρφωση πολυσακχαριτών σε διαλύματα	27
1.2.2. Προσδιορισμός μοριακού βάρους πολυσακχαριτών με υδροδυναμικές μετρήσεις	31
1.2.3. Υδροδυναμικές παράμετροι συστημάτων διασποράς	34
1.2.4. Προσδιορισμός μοριακών παραμέτρων πολυσακχαριτών σε κατάσταση διαλύματος με την τεχνική της στατικής σκέδασης του φωτός (static light scattering)	34
1.2.5. Προσδιορισμός μοριακών παραμέτρων πολυσακχαριτών σε κατάσταση διαλύματος με την τεχνική της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography)	35
1.3. Ρεολογικές τεχνικές μελέτης πηκτών, ψευδοπηκτών και κολλοειδών συστημάτων	37
1.3.1. Ρεολογία-Βασικές έννοιες	37
1.3.2. Ιξώδες	40
1.3.2.1. Νευτώνεια ρευστά	40
1.3.2.2. Μη-νευτώνεια ρευστά	41
1.3.3. Δοκιμές μικρής παραμόρφωσης	45
1.3.3.1. Δυναμική δοκιμή	45
1.3.3.2. Δοκιμή ερπυσμού	52
1.3.4. Εφαρμογή της λιπαινόμενης συμπιεστής ροής	54

1.4. Κολλοειδή συστήματα, ψευδο-πηκτές και πηκτές στα τρόφιμα	59
1.5. Σχηματισμός κρυοπηκτών μακρομορίων	61
1.6. Πολυσακχαρίτες στην επιστήμη των τροφίμων	63
1.6.1. Εφαρμογές των πολυσακχαριτών στα τρόφιμα	63
1.6.2. Παραγωγή πολυσακχαριτών από οξυγαλακτικά βακτήρια.	65
1.6.3. Επίδραση πολυσακχαριτών στις ρεολογικές ιδιότητες των όξινων γαλακτοκομικών προϊόντων	65
1.7. Αλληλεπιδράσεις πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών	66
1.8. Συστήματα βιοπολυμερών στα προϊόντα γάλακτος	68
1.8.1. Πρωτεΐνες	68
1.8.1.1. Καζεΐνες	68
1.8.1.2. Σύμπλοκα καζεϊνών-Μικκύλια	69
1.8.1.3. Πρωτεΐνες ορού	71
1.8.2. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας	72
1.8.3. Μέθοδοι οξίνισης του γάλακτος	74
1.8.4. Μηχανισμός σχηματισμού των όξινων πηκτών γάλακτος	74
1.8.5. Θεωρητικό μοντέλο συσσώματωσης μορφοκλασματικών συνόλων (fractal aggregation)	77
1.8.6. Αποβολή ορού - Ανακατανομή της δομής	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	83
3.1. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ	83
3.1.1. Ανακαλλιέργειες κόκκων κεφίρ	83
3.1.2. Επιλογή βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού των κόκκων	84
3.1.3. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ σε εργαστηριακή κλίμακα	85
3.1.4. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ σε πιλοτική κλίμακα	86
3.2. Απομόνωση του πολυσακχαρίτη κεφιράνης	86
3.3. Παρασκευή διαλυμάτων, όξινων πηκτών και κρυοπηκτών κεφιράνης και συστημάτων κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος	87
3.3.1. Παρασκευή υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης	88
3.3.2. Παρασκευή διαλυμάτων κεφιράνης σε διάφορους διαλύτες	88
3.3.3. Παρασκευή διαλυμάτων κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος	89
3.3.4. Παρασκευή όξινων πηκτών	90
3.3.5. Παρασκευή κρυοπηκτών	91
3.4. Χαρακτηρισμός της κεφιράνης	91
3.4.1. Προσδιορισμός υγρασίας	91
3.4.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών	92
3.4.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός ολικών σακχάρων με τη μέθοδο φαινόλης- θεικού οξέος	94
3.4.4. Προσδιορισμός αναλογίας μονομερών του πολυσακχαρίτη με τη χρήση αέριου χρωματογράφου με ανίχνευση φασματογράφου μάζας GC-MS/MS	95
3.4.5. Ρεολογικός χαρακτηρισμός κεφιράνης	96

3.4.6. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης	98
3.4.7. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με ανιχνευτή σκέδασης laser υπό πολλαπλές γωνίες (Multi Angle Laser Light Scattering-MALLS).	98
3.4.8. Στατική σκέδαση (SLS-MALLS)	98
3.4.9. Δυναμική σκέδαση (DLS) και μέτρηση ζ-δυναμικού	99
3.5. Μελέτη ρεολογικής συμπεριφοράς διαλυμάτων, όξινων πηκτών και κρυοπηκτών κεφίρανης και συστημάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος	100
3.5.1. Εφαρμογή δοκιμών μικρής παραμόρφωσης	100
3.5.1.1. Δυναμική δοκιμή ή δοκιμή ταλάντωσης	101
3.5.1.2. Δοκιμή ερπυσμού	101
3.5.2. Προσδιορισμός ιξώδους	101
3.5.3. Μελέτη της πορείας δημιουργίας πηκτής με το ρεόμετρο υοειδούς σωλήνα	102
3.5.3.1. Περιγραφή οργάνου	102
3.5.3.2. Αρχή λειτουργίας ρεομέτρου	104
3.5.3.3. Μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των δειγμάτων κατά τη διάρκεια σχηματισμού πηκτής	104
3.5.4 Λιπαινόμενη συμπιεστή ροή	105
3.5.4.1. Περιγραφή του Texture Analyser TA.XT.plus	105
3.5.4.2. Δοκιμή μονοαξονικής συμπίεσης με σταθερό ρυθμό παραμόρφωσης	105
3.6. Μελέτη της μορφολογίας της δομής	106
3.7. Περίθλαση ακτίνων X (X-ray diffraction)	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	108
4.1. Παραγωγή και απομόνωση του πολυσακχαρίτη κεφίρανη	108
4.1.1. Επιλογή βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού των κόκκων	108
4.1.2. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα	112
4.1.3. Πειράματα ζυμώσεων με τη χρήση του ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L	118
4.1.4. Πειράματα ζυμώσεων με τη χρήση του ζυμωτήρα χωρητικότητας 428 L	119
4.1.5. Ανάπτυξη μεθοδολογίας απομόνωσης της κεφίρανης σε πιλοτική κλίμακα	120
4.2. Μοριακή διαμόρφωση και χαρακτηρισμός του πολυσακχαρίτη κεφίρανη	128
4.2.1. Χημική σύσταση κεφίρανης	128
4.2.2. Δομικός χαρακτηρισμός της κεφίρανης σε στερεά κατάσταση	129
4.2.3. Υδροδυναμικές μετρήσεις για το χαρακτηρισμό του μορίου της κεφίρανης	129
4.2.4. Μεταβολές στη διαμόρφωση του μορίου της κεφίρανης σε διαφορετικά υδατικά περιβάλλοντα	141
4.2.4.1. Επίδραση του pH	141
4.2.4.2. Επίδραση των αλάτων	142
4.2.4.3. Επίδραση των οξέων	146
4.2.4.4. Επίδραση του καυστικού καλίου	152
4.2.4.5. Επίδραση της ουρίας	155
4.2.4.6. Επίδραση της αιθανόλης	156
4.2.4.7. Επίδραση των σακχάρων	159
4.2.4.8. Επίδραση των καζεϊνών	163

4.2.4.9. Επίδραση των πρωτεϊνών ορού	165
4.3. Μελέτη ρεολογικής συμπεριφοράς του πολυσακχαρίτη κεφίρανης	168
4.3.1. Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων κεφίρανης	168
4.3.2. Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων κεφίρανης που υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης– απόψυξης	180
4.3.3. Λιπαινόμενη συμπιεστή ροή	185
4.3.4. Δυναμικές δοκιμές	191
4.3.4.1. Μελέτη του ιξωδοελαστικού χαρακτήρα διαλυμάτων και δειγμάτων κεφίρανης που υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης	191
4.3.4.2. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασιακής σάρωσης στα ρεολογικά χαρακτηριστικά δειγμάτων κεφίρανης που υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης	196
4.3.5. Δοκιμές ερπυσμού	202
4.4. Μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων συστημάτων καζεϊνικών αλάτων, πρωτεϊνών ορού γάλακτος και κεφίρανης	209
4.4.1. Μελέτη της πορείας σχηματισμού πηκτής συστημάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος ή καζεϊνικών αλάτων παρουσία κεφίρανης	209
4.4.2. Δυναμικές δοκιμές συστημάτων πρωτεϊνών γάλακτος και κεφίρανης	215
4.4.2.1. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης	215
4.4.2.2. Συστήματα πρωτεϊνών ορού γάλακτος – κεφίρανης	222
4.4.2.3. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης	227
4.4.3. Δοκιμές ερπυσμού συστημάτων πρωτεϊνών γάλακτος και κεφίρανης	234
4.4.3.1. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης	234
4.4.3.2. Συστήματα πρωτεϊνών ορού γάλακτος – κεφίρανης	240
4.4.3.3. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης	244
4.5. Μελέτη της δομής κρυοπηκτών, όξινων πηκτών και όξινων κρυοπηκτών συστημάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος	249
4.5.1. Κρυοπηκτές κεφίρανης	249
4.5.2. Κρυοπηκτές κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος	251
4.5.3. Όξινη πηκτές και όξινη κρυοπηκτές κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος	254
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΘΕΜΑΤΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	257
5.1. Συμπεράσματα	257
5.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	258
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	259
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ	270

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1. Σύσταση των συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού (WP) και των καζεϊνικών αλάτων (SC).	89
Πίνακας 4.1. Ποσοστό αύξησης (%) της μάζας των κόκκων κεφίρ που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες επώασης (θερμοκρασία επώασης και ποσοστό εμβολιασμού κόκκων).	109
Πίνακας 4.2. Αποτελέσματα ζυμώσεων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L.	119
Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα ζυμώσεων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 428 L.	120
Πίνακας 4.4. Συνοπτικός πίνακας τιμών μοριακών χαρακτηριστικών υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης που ελήφθησαν με χρήση διαφόρων φυσικοχημικών τεχνικών.	140
Πίνακας 4.5. Τιμές του εσωτερικού ιξώδους διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικούς διαλύτες σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer .	167
Πίνακας 4.6. Τιμές του δείκτη ρεολογικής συμπεριφοράς (n) υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες μέτρησης.	179
Πίνακας 4.7. Τιμές του δείκτη ρεολογικής συμπεριφοράς (n) καταψυγμένων/ αποψυγμένων διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες μέτρησης.	185
Πίνακας 4.8. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού κρυοπηκτών (1 ^{ου} και 2 ^{ου} κύκλου κατάψυξης-απόψυξης) κεφिरάνης συγκεντρώσεων 0,55%, 1%, 2% και 4% παρασκευασμένες από υδατικά διαλύματα σε pH 7,0 και 4,5. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C. Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν 0,05 Pa.	203
Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφिरάνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C (Cryo) και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, καθώς επίσης και δειγμάτων με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης με (GDL Cryo) και χωρίς (GDL) την εφαρμογή ενός κύκλου κατάψυξης-	236

απόψυξης και με την εφαρμογή (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C. Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν 0,05 Pa.	
Πίνακας 4.10. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού δειγμάτων πρωτεϊνών ορού–κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C (Cryo) και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, καθώς επίσης και δειγμάτων με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης και την εφαρμογή ενός κύκλου κατάψυξης-απόψυξης (GDL Cryo) και με την εφαρμογή (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C. Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν 0,05 Pa.	241
Πίνακας 4.11. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C (Cryo) και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, καθώς επίσης και δειγμάτων με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης με (GDL Cryo) και χωρίς (GDL) την εφαρμογή ενός κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και με την εφαρμογή (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C. Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν 0,05 Pa.	245

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Κόκκοι κεφίρ.	7
Σχήμα 1.2. Κυριαρχία των ραβδόμορφων βακτηρίων στα περιφερειακά στρώματα των κόκκων κεφίρ ($\times 3040$) (Bottazzi & Bianchi, 1980).	8
Σχήμα 1.3. Ραβδόμορφα βακτήρια και ζύμες στα ενδιάμεσα στρώματα των κόκκων κεφίρ ($\times 3040$) (Bottazzi & Bianchi, 1980).	8
Σχήμα 1.4. Κυριαρχία ζυμών στα κεντρικά στρώματα των κόκκων κεφίρ ($\times 3040$) (Bottazzi & Bianchi, 1980).	9
Σχήμα 1.5. Γαλακτικά βακτήρια στη μάζα των κόκκων κεφίρ περιβαλλόμενα από εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (Toba et al., 1990).	9
Σχήμα 1.6. Η δομή του μορίου της κεφिरάνης σύμφωνα με τους Kooiman (1968) και Micheli et al. (1999).	23
Σχήμα 1.7. Διαμόρφωση μορίου πολυσακχαρίτη αποτελούμενο από 250 μονομερή. Όπου r είναι η απόσταση των δύο άκρων της αλυσίδας (end to end distance) (Walstra, 2003).	28
Σχήμα 1.8. Μόρια πολυμερών τυχαίας αναδίπλωσης σε διάφορους διαλύτες (καλός διαλύτης: αριστερά; κακός διαλύτης: δεξιά; Θ διαλύτης: κέντρο) (Gedde, 1995).	30
Σχήμα 1.9. Σχηματική απεικόνιση μεγαλομορίων σε καθεστώς αραιού διαλύματος (αριστερά), πυκνού διαλύματος (δεξιά) και διαλύματος ενδιάμεσης συγκέντρωσης (semi-dilute) στο κέντρο (de Gennes, 1979; van Vliet, 2014).	30
Σχήμα 1.10. Μεταβολή του ειδικού ιξώδους συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλυμάτων πολυσακχαριτών για την εύρεση της κρίσιμης συγκέντρωσης (C^*) (Tadros, 2010).	32
Σχήμα 1.11. Διάγραμμα Zimm (Gedde, 1995).	35
Σχήμα 1.12. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Teraoka, 2002).	36

Σχήμα 1.13. Μεταφορά των μορίων των πολυμερών διαφορετικού μοριακού βάρους εντός της στήλης μοριακού αποκλεισμού (Teraoka, 2002).	36
Σχήμα 1.14. Εφαρμογή κανονικής κάθετης, (normal), τάσης (F/A) συμπίεσης (αριστερά) ή εφελκυσμού (δεξιά). Το δοκίμιο συμπιέζεται κατά δl από το αρχικό του ύψος l (αριστερά) ή επιμηκύνεται κατά ΔL από το αρχικό του μήκος L_0 (δεξιά).	38
Σχήμα 1.15. Εφαρμογή διατμητικής τάσης (F/A) σε στερεό (αριστερά) και ρευστό (δεξιά) υλικό. Το δοκίμιο παραμορφώνεται κατά δl από το αρχικό του ύψος l (αριστερά), ενώ τα στρώματα των μορίων που αποτελούν ένα ρευστό υλικό και απέχουν απόσταση μεταξύ τους dy κινούνται με ταχύτητα dv και παραμορφώνονται κατά $\gamma = dv \cdot t$ (δεξιά).	38
Σχήμα 1.16. Μεταβολή της τάσης συναρτήσει της ταχύτητας διάτμησης για τις διάφορες κατηγορίες ρευστών (Steffe, 1996).	42
Σχήμα 1.17. Μεταβολή του φαινομενικού ιξώδους συναρτήσει της ταχύτητας διάτμησης για τις διάφορες κατηγορίες ρευστών (Steffe, 1996).	43
Σχήμα 1.18. Μεταβολή της τάσης συναρτήσει της ταχύτητας διάτμησης στα χρονικά εξαρτώμενα και στα νευτώνεια ρευστά.	44
Σχήμα 1.19. Εφαρμογή δυναμικής δοκιμής μεταξύ δύο παράλληλων πλακών (Steffe, 1996).	46
Σχήμα 1.20. Διανυσματική ανάλυση των συντελεστών ιξώδους και ελαστικότητας σε ημιτονοειδή διάτμηση (Ferry, 1980).	48
Σχήμα 1.21. Καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης ελαστικού, ιξώδους και ιξωδοελαστικού υλικού κατά την εφαρμογή της δυναμικής δοκιμής (Rao, 1992).	49
Σχήμα 1.22. Μεταβολή των συντελεστών ελαστικότητας (storage modulus) και ιξώδους (loss modulus) συναρτήσει της παραμόρφωσης ή της τάσης, για τον καθορισμό της γραμμικής ελαστικής περιοχής κατά τη δυναμική δοκιμή (Steffe, 1996).	50
Σχήμα 1.23. Μηχανικό φάσμα σάρωσης συχνοτήτων αραιού διαλύματος (Steffe, 1996).	51

Σχήμα 1.24. Μηχανικό φάσμα σάρωσης συχνοτήτων πυκνού διαλύματος (Steffe, 1996).	51
Σχήμα 1.25. Μηχανικό φάσμα σάρωσης συχνοτήτων πηκτής (Steffe, 1996).	52
Σχήμα 1.26. Τυπικές καμπύλες ερπυσμού και επανάκαμψης για ένα ιδανικό ελαστικό, ιδανικό ιξώδες και ιξωδοελαστικό υλικό (Steffe, 1996).	53
Σχήμα 1.27. Καμπύλη έρπυσης και επανάκαμψης (Steffe, 1996).	54
Σχήμα 1.28. Συμπίεση σε συνθήκες λιπαινόμενης διαξονικής ροής. (Engmann et al., 2005)	55
Σχήμα 1.29. Σύστημα συντεταγμένων και βασικές διαστάσεις για τη λιπαινόμενη συμπιεστή ροή (Engmann et al, 2005).	55
Σχήμα 1.30. Εμβολική ροή (Engmann et al., 2005).	57
Σχήμα 1.31. Διανυσματικά μεγέθη της ταχύτητας για συμπιεζόμενη ροή με τέλεια και καθόλου ολίσθηση (Engmann et al., 2005)	58
Σχήμα 1.32. Πιθανές δομές πηκτών πολυσακχαριτών. Αριστερά: Σταυροειδείς δεσμοί διασύνδεσης κυριαρχούν στο τρισδιάστατο πλέγμα; Δεξιά: Το πλέγμα αποτελείται από entanglements (Grosberg & Khokhlov, 2011).	61
Σχήμα 1.33. Στάδια σχηματισμού μίας κρυσταλλικής: α) διάλυμα μονομερών ή πολυμερών με δυνατότητα να σχηματίσουν σταυροειδείς δεσμούς διασύνδεσης, β) κατάψυξη, γ) διατήρηση σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός, δ) απόψυξη και ε) σχηματισμός κρυσταλλικής με μακροπόρους (macropores) (Gun'ko et al., 2013).	62
Σχήμα 1.34. Η κύρια διαδικασία σχηματισμού κρυσταλλικής πολυμερούς: 1. Μακρομόρια σε διάλυμα; 2. Διαλύτης; 3. Μικρού μοριακού βάρους διαλυμένες ουσίες; 4. Κρύσταλλοι του κατεψυγμένου διαλύτη; 5. Μη-κατεψυγμένη υγρή μικροφάση; 6. Πλέγμα πολυμερούς κρυσταλλικής; 7. Μακροπόροι; 8. Διαλύτης (Lozinsky et al., 2003).	63
Σχήμα 1.35. Δομή γιαούρτης, η οποία παρασκευάστηκε με στελέχη του <i>S.thermophilus</i> και του <i>L. subsp. bulgaricus</i> που παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (Tamime & Robinson, 2007).	66

Σχήμα 1.36. Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών (de Kruif & Tuinier, 2001).	67
Σχήμα 1.37. Σχηματική απεικόνιση της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων, τα οποία αποτελούνται από υπομικκύλια (submicelle). Η επιφάνεια των μικκυλίων καλύπτεται από το υδρόφιλο τμήμα της κ-καζεΐνης, που προεξέχει υπό μορφή τρίχας (protruding peptide chain), ενώ τα μονομερή των καζεϊνών ενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου (nanocluster) (Walstra et al., 2006).	71
Σχήμα 1.38. Σχηματική απεικόνιση της μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού με την επίδραση της θέρμανσης (ξηδίπλωμα μορίου) και σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ της β-γαλακτογλοβουλίνης και της κ-καζεΐνης (όχι υπό κλίμακα, δεδομένου ότι το μέγεθος της β-γαλακτογλοβουλίνης είναι 2 nm και το μέσο μέγεθος των καζεϊνικών μικκυλίων είναι περίπου 100 nm) (Robinson et al., 2006).	73
Σχήμα 1.39. Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών που υφίστανται τα καζεϊνικά μικκύλια (στο θερμικά και μη-θερμικά επεξεργασμένο γάλα) κατά την οξίνιση του γάλακτος (Robinson et al., 2006).	76
Σχήμα 1.40. Σχηματική απεικόνιση της δομής μίας όξινης πηκτής ομογενοποιημένου γάλακτος, στην οποία διακρίνονται τα λιποσφαίρια να είναι ενσωματωμένα στο πρωτεϊνικό πλέγμα (Robinson et al., 2006).	77
Σχήμα 1.41. Σχηματική απεικόνιση «συσσωματώματος μορφοκλασματικών συνόλων» (fractal aggregation) αποτελούμενη από 1000 σωματίδια. Η διάσταση του μορφοκλασματικού συσσωματώματος (fractal dimensionality) ισούται με 1,8 (Walstra et al., 2006).	78
Σχήμα 1.42. Οι τέσσερις τύποι ανακατανομής της δομής που διακρίνονται στις πηκτές καζεϊνών σε διάφορα επίπεδα: α) ένωση σε μοριακό επίπεδο ή επίπεδο υπο-σωματιδίων, β) ανακατανομή σε επίπεδο σωματιδίων, γ) ανακατανομή μεταξύ συμπλεγμάτων σωματιδίων και δ) σε μακροσκοπικό επίπεδο όπου είναι ορατή η συναίρεση και αποβολή ορού (Mellema et al., 2002).	80
Σχήμα 3.1. Διάταξη ζυμωτήρων χωρητικότητας 1 L.	84

Σχήμα 3.2. Μέθοδος απομόνωσης κεφίρανης	87
Σχήμα 3.3. Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματογράφο μάζας GC-MS/MS.	96
Σχήμα 3.4. Ανιχνευτής προσδιορισμού μοριακού βάρους πολυμερών	99
Σχήμα 3.5. Διάταξη μέτρησης ιξώδους	102
Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση του δυναμικού ρεομέτρου υοειδούς σωλήνα, (1 & 9) διατάξεις νεκρού όγκου, (2) μονάδα ανάπτυξης πίεσης του αέρα, (3) μεταλλάκτης πίεσης αριστερής πλευράς, (4) μονάδα υοειδούς σωλήνα (δειγματοφορέας), (5) αισθητήρας μέτρησης θερμοκρασίας, (6) μονάδα θερμοστάτισης δειγματοφορέα, (7) μεταλλάκτης πίεσης δεξιάς πλευράς, (8) μονάδα κυλίνδρου εμβόλου με παλινδρομική κίνηση, (10 & 11) ηλεκτροβάνες (12) βάνα εκτόνωσης αέρα στο περιβάλλον (Xu & Raphaelides, 2005).	103
Σχήμα 3.7. Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser	106
Σχήμα 4.1. Επίδραση του ποσοστού εμβολιασμού των κόκκων κεφίρ και της θερμοκρασίας επώασης στην αύξηση (%) της μάζας των κόκκων.	110
Σχήμα 4.2. Παραγωγή κόκκων κεφίρ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (αριστερά) και μετά τη στράγγιση (δεξιά).	113
Σχήμα 4.3. Ζυμωτήρας 12 L.	114
Σχήμα 4.4. Ζυμωτήρας 428 L.	115
Σχήμα 4.5. Σχεδιάγραμμα λειτουργίας ζυμωτήρα 428 L.	116
Σχήμα 4.6. Αποστειρωτήρας Korimat.	117
Σχήμα 4.7. Διπλότοιχη ανοξείδωτη δεξαμενή με μηχανικό αναδευτήρα που χρησιμοποιήθηκε για τη θέρμανση και τη διάσπαση των κόκκων κεφίρ.	121
Σχήμα 4.8. Φυγοκεντρικός διαχωριστής δίσκων συνεχούς λειτουργίας (διανυστής).	122
Σχήμα 4.9. Συσκευή υπερδιήθησης τύπου Plate & Frame.	123

Σχήμα 4.10. Διβάθμιος συμπτυκνωτής κατερχόμενης στοιβάδας.	124
Σχήμα 4.11. Καταβύθιση κεφιράνης με αιθανόλη σε τρία στάδια.	125
Σχήμα 4.12. Ξηραντήρας δίσκων για την εξάτμιση της αιθανόλης σε ρεύμα αέρα.	126
Σχήμα 4.13. Λυοφιλωτής για την ξήρανση της κεφιράνης.	126
Σχήμα 4.14. Διάγραμμα ροής για την παραγωγή κεφιράνης σε πιλοτική κλίμακα.	127
Σχήμα 4.15. Χρωματογράφημα θραυσμάτων της υδρολυμένης κεφιράνης (επάνω) και το αντίστοιχο φάσμα μαζών (κάτω).	128
Σχήμα 4.16. Φάσμα περίθλασης ακτίνων Χ κεφιράνης σε στερεά κατάσταση	129
Σχήμα 4.17. Η μεταβολή του ειδικού ιξώδους υδατικών αραιών και πυκνών διαλυμάτων κεφιράνης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκφρασμένη σε g/dL. Όπου C* η κρίσιμη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	130
Σχήμα 4.18. Προσδιορισμός εσωτερικού ιξώδους σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer.	131
Σχήμα 4.19. Χρωματογράφημα υδατικού διαλύματος κεφιράνης χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Με μπλε χρώμα είναι το χρωματογράφημα του ανιχνευτή σκέδασης φωτός, με κόκκινο του ανιχνευτή δείκτη διάθλασης και με ιώδες του ανιχνευτή υπεριώδους.	133
Σχήμα 4.20. Χρωματογράφημα υδατικού διαλύματος κεφιράνης χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού του ανιχνευτή σκέδασης φωτός και για τις επτά γωνίες σκέδασης.	134
Σχήμα 4.21. Κατανομή της γυροσκοπικής ακτίνας υδατικού διαλύματος κεφιράνης συναρτήσει της κατανομής του μοριακού βάρους, όπως προκύπτει από τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.	135
Σχήμα 4.22. Καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων προτύπων δεξτρανών.	136
Σχήμα 4.23. Χρωματογραφήματα HPSEC διαλυμάτων προτύπων δεξτρανών.	136

Σχήμα 4.24. Χρωματογράφημα HPSEC υδατικού διαλύματος κεφिरάνης.	137
Σχήμα 4.25. Μεταβολή της μετρούμενης τάσης διαφορικού διαθλασίμετρου σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης.	138
Σχήμα 4.26. Μεταβολή του Δn σε σχέση με τη συγκέντρωση υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης.	138
Σχήμα 4.27. Διάγραμμα Zimm υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης.	139
Σχήμα 4.28. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφिरάνης, καθώς και διαλυμάτων του πολυσακχαρίτη σε διαφορετικές τιμές pH.	141
Σχήμα 4.29. Μεταβολή ειδικού ιξώδους υδατικών αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης σε περιβάλλοντα διαφορετικής ιονικής ισχύος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη (●, μάρτυρας, ○, χλωριούχο νάτριο, ▼, χλωριούχο ασβέστιο, Δ, χλωριούχο αργίλιο).	142
Σχήμα 4.30. Επίδραση της συγκέντρωσης και του είδους των αλάτων (NaCl, CaCl ₂ και AlCl ₃) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης.	144
Σχήμα 4.31. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφिरάνης, καθώς και διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικά άλατα (NaCl, CaCl ₂ και AlCl ₃) συγκεντρώσεως 1% w/v.	144
Σχήμα 4.32. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφिरάνης και διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικά άλατα (NaCl, CaCl ₂ και AlCl ₃) συγκεντρώσεως 1% w/v.	145
Σχήμα 4.33. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφिरάνης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικά οξέα (○, γαλακτικό, ▼, τρυγικό και Δ, κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 0,1% w/v σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	146

Σχήμα 4.34. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε διαφορετικά οξέα (○, γαλακτικό, ▼, τρυγικό και Δ, κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 1% w/v σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	147
Σχήμα 4.35. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε κιτρικό οξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 0,1% και ▼, 1% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	147
Σχήμα 4.36. Επίδραση της συγκέντρωσης και του είδους των οξέων (γαλακτικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφίρανης.	148
Σχήμα 4.37. Τιμές ζ – δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφίρανης, καθώς και διαλυμάτων του πολυσακχαρίτη σε κιτρικό οξύ συγκεντρώσεων 0,1% και 1% (w/v).	149
Σχήμα 4.38. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων κεφίρανης σε κιτρικό οξύ συγκεντρώσεων 0,1% και 1% (w/v).	150
Σχήμα 4.39. Τιμές ζ–δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφίρανης, καθώς και διαλυμάτων κεφίρανης σε διαφορετικά οξέα (γαλακτικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 1% w/v.	151
Σχήμα 4.40. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων κεφίρανης σε διαφορετικά οξέα (γαλακτικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 1% w/v.	151
Σχήμα 4.41. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε καυστικό κάλιο (KOH) διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 0,001, ▼, 0,01 και Δ, 0,1 N) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	152
Σχήμα 4.42. Επίδραση της συγκέντρωσης του καυστικού καλίου (KOH) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφίρανης.	153

Σχήμα 4.43. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφίρανης, καθώς και διαλυμάτων κεφίρανης σε καυστικό κάλιο (KOH) διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,001, 0,01 και 0,1 N).	153
Σχήμα 4.44. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων κεφίρανης σε καυστικό κάλιο (KOH) διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,001 και 0,1 N).	154
Σχήμα 4.45. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε ουρία διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 2 M και ▼, 6 M) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	155
Σχήμα 4.46. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων κεφίρανης σε ουρία συγκεντρώσεων 2 M και 6 M.	156
Σχήμα 4.47. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε αιθανόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 1% και ▼, 3% v/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	157
Σχήμα 4.48. Επίδραση της συγκέντρωσης της ουρίας, του pH και της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφίρανης.	158
Σχήμα 4.49. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων κεφίρανης σε αιθανόλη συγκεντρώσεων 1%, 3% και 10% (v/v).	159
Σχήμα 4.50. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε λακτόζη διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 1,5%, ▼, 4% και Δ, 12% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	160
Σχήμα 4.51. Επίδραση της συγκέντρωσης και του είδους των σακχάρων (γλυκόζη και λακτόζη) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφίρανης.	160

Σχήμα 4.52. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε γλυκόζη διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 1,5%, ▼, 4% και Δ, 12% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	161
Σχήμα 4.53. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφίρανης, καθώς και διαλύματος κεφίρανης σε γλυκόζη συγκεντρώσεως 2% w/v.	162
Σχήμα 4.54. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλύματος κεφίρανης σε γλυκόζη συγκεντρώσεως 2% w/v.	162
Σχήμα 4.55. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε καζεϊνικά άλατα διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 0,5%, ▼, 1%, Δ, 2% και ■, 3% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	163
Σχήμα 4.56. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης, διαλύματος καζεϊνικών αλάτων 1% (w/v) και διαλύματος κεφίρανης σε καζεϊνικά άλατα συγκεντρώσεως 1% (w/v).	164
Σχήμα 4.57. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης, διαλύματος καζεϊνικών αλάτων 3% (w/v) και διαλύματος κεφίρανης σε καζεϊνικά άλατα συγκεντρώσεως 3% (w/v).	165
Σχήμα 4.58. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε μετουσιωμένες (Δ, 0,5% w/v) ή μη πρωτεΐνες ορού (○, 0,5% και ▼, 3% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.	166
Σχήμα 4.59. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C.	169
Σχήμα 4.60. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C.	169

Σχήμα 4.61. Ακίνητα μόρια κεφिरάνης σε πολύ χαμηλές τιμές ρυθμού διάτμησης (α). Μόρια κεφिरάνης που προσανατολίζονται σε ευθύγραμμες τροχιές με την αύξηση της ταχύτητας διάτμησης (β).	171
Σχήμα 4.62. Παραμόρφωση των μορίων της κεφिरάνης σε ωοειδές σχήμα σε υψηλές τιμές της ταχύτητας διάτμησης.	171
Σχήμα 4.63. Μηχανική αλληλεπίδραση των μορίων κεφिरάνης, τα οποία να επιχειρούν να παρεισφρήσουν το ένα στο χώρο που καταλαμβάνει το άλλο σε πολύ υψηλές τιμές της ταχύτητας διάτμησης.	171
Σχήμα 4.64. Διατμητική τάση ως συνάρτηση του ρυθμού διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C.	172
Σχήμα 4.65. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C.	172
Σχήμα 4.66. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.	173
Σχήμα 4.67. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.	173
Σχήμα 4.68. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.	174

Σχήμα 4.69. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.	174
Σχήμα 4.70. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.	175
Σχήμα 4.71. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.	175
Σχήμα 4.72. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.	176
Σχήμα 4.73. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.	176
Σχήμα 4.74. Διατμητικό ιξώδες υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας διάτμησης στους 4°C.	177
Σχήμα 4.75. Διατμητικό ιξώδες υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας διάτμησης στους 25°C.	177
Σχήμα 4.76. Διατμητικό ιξώδες υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας διάτμησης στους 40°C.	178
Σχήμα 4.77. Διακυμάνσεις του συντελεστή συνεκτικότητας, υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων 1, 2 και 4% ως συνάρτηση της θερμοκρασίας.	180
Σχήμα 4.78. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν	181

στους 4°C, συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 4°C.	
Σχήμα 4.79. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 4°C.	181
Σχήμα 4.80. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 25°C.	182
Σχήμα 4.81. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 25°C.	182
Σχήμα 4.82. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 40°C.	183
Σχήμα 4.83. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 40°C.	183
Σχήμα 4.84. Καμπύλες δύναμης μονοαξονικής συμπίεσης – απόστασης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).	186
Σχήμα 4.85. Καμπύλες ροής εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφίρανης (4%) μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση διαφορετικών ρυθμών διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).	186
Σχήμα 4.86. Καμπύλες δύναμης μονοαξονικής συμπίεσης – απόστασης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 7% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).	187

Σχήμα 4.87. Καμπύλες ροής εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφίρανης (7%) μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση διαφορετικών ρυθμών διαζονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).	187
Σχήμα 4.88. Καμπύλες δύναμης μονοαζονικής συμπίεσης – απόστασης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 10% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαζονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).	188
Σχήμα 4.89. Καμπύλες ροής εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφίρανης (10%) μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση διαφορετικών ρυθμών διαζονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).	188
Σχήμα 4.90. Καμπύλες εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφίρανης συγκεντρώσεων 4, 7 και 10% μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση του ρυθμού διαζονικής παραμόρφωσης.	190
Σχήμα 4.91. Μηχανικά φάσματα συντελεστή G' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης: O, 0,25%, □, 0,55%, Δ, 1,0%, +, 2,0%, N, 4% σε pH 7,0 μετά από κατάψυξη στους -18°C , απόψυξη και μέτρηση στους 4°C .	192
Σχήμα 4.92. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% σε pH 7,0 και μέτρηση στους 4°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, □, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ, μετά από 2 ^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.	193
Σχήμα 4.93. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% σε pH 7,0 και μέτρηση στους 25°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, □, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ, μετά από 2 ^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.	194
Σχήμα 4.94. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% σε pH 4,5 και μέτρηση στους 4°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, □, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ, μετά από 2 ^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.	195

Σχήμα 4.95. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφίράνης συγκέντρωσης 4% σε pH 4,5 και μέτρηση στους 25°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, □, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ, μετά από 2 ^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.	195
Σχήμα 4.96. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 0,25%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	196
Σχήμα 4.97. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 0,25%, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	197
Σχήμα 4.98. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 0,55%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	198
Σχήμα 4.99. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 0,55%, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	198
Σχήμα 4.100. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 1,0%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	199
Σχήμα 4.101. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 1,0%, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	199

Σχήμα 4.102. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφιράνης 2,0%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: Ο, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	200
Σχήμα 4.103. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφιράνης 2,0 %, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: Ο, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	200
Σχήμα 4.104. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφιράνης 4,0%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: Ο, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	201
Σχήμα 4.105. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφιράνης 4,0%, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: Ο, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.	201
Σχήμα 4.106. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων κεφιράνης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της τιμής pH.	204
Σχήμα 4.107. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων κεφιράνης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της τιμής pH.	205
Σχήμα 4.108. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων κεφιράνης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της τιμής pH.	206

Σχήμα 4.109. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων κεφίρανης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της τιμής pH.	207
Σχήμα 4.110. Μεταβολή του συντελεστή ελαστικότητας (G) σε συνάρτηση με το χρόνο δειγμάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης. Κωδικοί: WP, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.	210
Σχήμα 4.111. Μεταβολή του pH σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής συστημάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης. Κωδικοί: WP, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.	211
Σχήμα 4.112. Μεταβολή του συντελεστή ελαστικότητας (G) σε συνάρτηση με το χρόνο δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης. Κωδικοί: SC, καζεϊνικό νάτριο, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.	212
Σχήμα 4.113. Μεταβολή του pH σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής συστημάτων καζεϊνικού νατρίου με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης. Κωδικοί: SC, καζεϊνικό νάτριο, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.	212
Σχήμα 4.114. Μεταβολή του συντελεστή ελαστικότητας (G) σε συνάρτηση με το χρόνο συστημάτων καζεϊνικού νατρίου - πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης (σε αναλογία 1:1 και τελική συγκέντρωση 2% και 4%). Κωδικοί: S, καζεϊνικό νάτριο, W, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, K, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.	213
Σχήμα 4.115. Μεταβολή του pH σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής συστημάτων καζεϊνικού νατρίου-πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης (σε αναλογία 1:1 και τελική συγκέντρωση 2% και 4%). Κωδικοί: S, καζεϊνικό νάτριο,	214

W, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, K, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.	
Σχήμα 4.116. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% στους 4°C. Σύμβολα: O, καζεϊνικό νάτριο θερμασμένο στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 7,0), +, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4).	215
Σχήμα 4.117. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% στους 25°C. Σύμβολα: O, καζεϊνικό νάτριο θερμασμένο στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 7,0), +, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4).	217
Σχήμα 4.118. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων θερμασμένου καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ, στους 4°C, +, στους 25°C.	218
Σχήμα 4.119. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων μη θερμασμένου καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.	219
Σχήμα 4.120. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 4,4. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.	220
Σχήμα 4.121. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C. Σύμβολα:	221

θερμασμένο δείγμα, O, σε pH 7,0, □, , σε pH 4,4, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, σε pH 7,0, +, σε pH 4,4.	
Σχήμα 4.122. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν-αποψύχθηκαν σε δύο επαναληπτικούς κύκλους. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μη θερμασμένο δείγμα, □.	221
Σχήμα 4.123. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος πρωτεϊνών ορού γάλακτος 2% - κεφιράνης 2% στους 4°C. Σύμβολα: O, πρωτεΐνες θερμασμένες στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 7,0), +, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4).	222
Σχήμα 4.124. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος πρωτεϊνών ορού γάλακτος 2% - κεφιράνης 2% στους 25°C. Σύμβολα: O, πρωτεΐνες θερμασμένες στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 7,0), +, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4).	223
Σχήμα 4.125. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων θερμασμένων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ, στους 4°C, +, στους 25°C.	224
Σχήμα 4.126. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων μη θερμασμένων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ, στους 4°C, +, στους 25°C.	224
Σχήμα 4.127. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 4,4. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.	225

Σχήμα 4.128. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, σε pH 7,0, □, σε pH 4,4, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, σε pH 7,0, +, σε pH 4,4.	226
Σχήμα 4.129. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν-αποψύχθηκαν σε δύο επαναληπτικούς κύκλους. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μη θερμασμένο δείγμα, □.	227
Σχήμα 4.130. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% σε pH 7,0. Σύμβολα: δείγμα θερμανθέν στους 85°C για 15 min, O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.	228
Σχήμα 4.131. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφιράνης 2% στους 4°C. Σύμβολα: πρωτεϊνικά συστατικά θερμασμένα στους 85°C για 15 min, O, (pH 7,0), □, (pH 4,4), μη θερμασμένα συστατικά, Δ, (pH 7,0), +, (pH 4,4).	229
Σχήμα 4.132. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφιράνης 2% στους 25°C. Σύμβολα: πρωτεϊνικά συστατικά θερμασμένα στους 85°C για 15 min, O, (pH 7,0), □, (pH 4,4), μη θερμασμένα συστατικά, Δ, (pH 7,0), +, (pH 4,4).	229
Σχήμα 4.133. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ, στους 4°C, +, στους 25°C. Τα πρωτεϊνικά συστατικά θερμάνθηκαν στους 85°C για 15 min.	230
Σχήμα 4.134. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων μη θερμασμένων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% -κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 7,0.	231

Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.	
Σχήμα 4.135. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφίρανης 2%, τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 4,4. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.	232
Σχήμα 4.136. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού 1% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, σε pH 7,0, □, σε pH 4,4, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, σε pH 7,0, +, σε pH 4,4.	233
Σχήμα 4.137. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.	237
Σχήμα 4.138. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης με την προσθήκη γλυκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.	237
Σχήμα 4.139. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλυκονο-δ-λακτόνης.	238
Σχήμα 4.140. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση	239

της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.	
Σχήμα 4.141. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφιράνης με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.	239
Σχήμα 4.142. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφιράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.	240
Σχήμα 4.143. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφιράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.	242
Σχήμα 4.144. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφιράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.	242
Σχήμα 4.145. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφιράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.	243
Σχήμα 4.146. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφιράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της	243

εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.	
Σχήμα 4.147. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.	246
Σχήμα 4.148. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.	246
Σχήμα 4.149. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.	247
Σχήμα 4.150. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.	247
Σχήμα 4.151. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.	248

Σχήμα 4.152. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.	248
Σχήμα 4.153. Δομή κρυοπηκτών κεφίρανης (1ος και 2ος κύκλος κατάψυξης-απόψυξης) συγκεντρώσεων 0,25%, 0,5%, 1%, 2% και 4% σε pH 7.	250
Σχήμα 4.154. Δομή κρυοπηκτών κεφίρανης (1ος κύκλος κατάψυξης-απόψυξης) συγκεντρώσεων 0,25% και 4% σε pH 7 και 4,5.	251
Σχήμα 4.155. Δομή κρυοπηκτών καζεϊνικών αλάτων-κεφίρανης κατά τον 1ο και 2ο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.	252
Σχήμα 4.156. Δομή κρυοπηκτών μίγματος πρωτεϊνών γάλακτος (καζεϊνικών αλάτων και συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας)-κεφίρανης κατά τον 1ο και 2ο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.	252
Σχήμα 4.157. Δομή κρυοπηκτών συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού (με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας)-κεφίρανης κατά τον 1ο και 2ο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.	253
Σχήμα 4.158. Δομή όξινων πηκτών καζεϊνικών αλάτων, καθώς επίσης όξινων πηκτών και όξινων-κρυοπηκτών καζεϊνικών αλάτων-κεφίρανης.	254
Σχήμα 4.159. Δομή όξινων πηκτών μίγματος πρωτεϊνών γάλακτος (καζεϊνικών αλάτων και συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας), καθώς επίσης όξινων πηκτών και όξινων-κρυοπηκτών μίγματος πρωτεϊνών γάλακτος-κεφίρανης.	255
Σχήμα 4.160. Δομή όξινων πηκτών συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού (με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας), καθώς επίσης όξινων πηκτών και όξινων-κρυοπηκτών συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού -κεφίρανης.	256

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παραγωγή, χαρακτηρισμός και ρεολογικές ιδιότητες του πολυσακχαρίτη κεφιράνη.

Η κεφιράνη, ένας εξωκυτταρικός ετεροπολυσακχαρίτης, παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ως καλλιέργεια εκκίνησης κόκκους κεφίρ οικιακής προέλευσης, οι οποίοι επώαστηκαν σε αγελαδινό αποβουτυρωμένο γάλα μακράς διάρκειας (Ultra High Temperature Treated Milk). Ο πολλαπλασιασμός των κόκκων πραγματοποιήθηκε σε τρεις κύκλους επώασης, ξεκινώντας από εργαστηριακή κλίμακα και ολοκληρώνοντας την παραγωγή τους σε πιλοτική κλίμακα. Στον πρώτο κύκλο επώασης, προκειμένου να μελετηθούν και οι βέλτιστες συνθήκες πολλαπλασιασμού, οι κόκκοι κεφίρ επώαστηκαν σε ζυμωτήρες χωρητικότητας 1 L. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν το ποσοστό εμβολιασμού των κόκκων και η θερμοκρασία επώασης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Στο δεύτερο κύκλο η επώαση των κόκκων πραγματοποιήθηκε σε ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L, ώστε να παραχθεί επαρκής ποσότητα αυτών και να συνεχιστούν τα πειράματα ζυμώσεων σε μεγαλύτερης χωρητικότητας ζυμωτήρα. Συγκεκριμένα, στον τρίτο κύκλο επώασης για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων χρησιμοποιήθηκε ζυμωτήρας χωρητικότητας 428 L. Συνολικά παρήχθησαν 30 kg κόκκων ξεκινώντας από αρχική ποσότητα 80 g.

Για την απομόνωση της κεφιράνης και την παραλαβή της με υψηλό βαθμό καθαρότητας, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη μεθοδολογία, η οποία περιλάμβανε τα εξής στάδια: θέρμανση στους 80°C και ανάδευση υδατικού αιωρήματος κόκκων κεφίρ, κατεργασία του αιωρήματος με υπερχλωρικό οξύ και φυγοκέντρωση για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, επαναλαμβανόμενες καταβυθίσεις με περίσσεια αιθανόλης ακολουθούμενες από φυγοκέντρωση και τέλος λυοφιλίωση του ιζήματος για την παραλαβή του πολυσακχαρίτη σε μορφή σκόνης.

Για τη μελέτη της διαμόρφωσης του μορίου της κεφιράνης χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές όπως η τριχοειδής ιξωδομετρία, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών με σκέδαση πολλαπλών γωνιών, η στατική σκέδαση φωτός, η δυναμική σκέδαση φωτός και μετρήσεις ζ-δυναμικού, από όπου προέκυψε ότι τα μόρια του πολυσακχαρίτη σε υδατικό περιβάλλον φέρουν τη μορφή του περιδινούμενου κουβαριού (random coil) και το μέσο μοριακό τους βάρος είναι περίπου 7×10^5 . Το νερό βρέθηκε να είναι «καλός» διαλύτης για την κεφιράνη, τα μόρια της οποίας

φέρουν ελαφρώς αρνητικό φορτίο όταν βρίσκονται σε αυτό. Σύμφωνα με υδροδυναμικές μελέτες, η διαμόρφωση του μορίου της κεφिरάνης επηρεάζεται ποικιλοτρόπως όταν βρίσκεται σε υδατικά περιβάλλοντα διαφορετικής ιονικής ισχύος, διαφορετικών τιμών pH, παρουσία οργανικών οξέων, σακχάρων, ουρίας και αιθανόλης. Σε αντίθεση, η παρουσία καζεϊνικών αλάτων και πρωτεϊνών ορού σε υδατικά διαλύματα της κεφिरάνης δεν επηρέασε σημαντικά τη διαμόρφωση του μορίου της.

Η μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης έδειξε ότι ο πολυσακχαρίτης παρουσιάζει ψευδοπλαστική συμπεριφορά εμφανίζοντας σημείο διαρροής σε πολύ χαμηλές τιμές ταχύτητας διάτμησης, π.χ. κάτω από $1,0 \text{ s}^{-1}$, όταν βρίσκεται σε συγκεντρώσεις από 0,25% έως 4%. Δείγματα κεφिरάνης συγκεντρώσεων από 1% έως 4%, στα οποία εφαρμόστηκε η διεργασία κατάψυξης-απόψυξης, παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές ιξώδους, αυξημένες τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους, σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που δεν υπέστησαν την ίδια διαδικασία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της λιπαινόμενης συμπιεστής ροής σε συστήματα κεφिरάνης όπου εφαρμόστηκε η διεργασία κατάψυξης-απόψυξης, το εκτατό ιξώδες επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη όταν αυτή κυμαινόταν από 4% έως 7%, ενώ το δείγμα συγκέντρωσης 10% εμφάνισε τη συμπεριφορά μίας πραγματικής πηκτής.

Από τη ρεολογική μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων συστημάτων κεφिरάνης, τα οποία περιείχαν καζεϊνικά άλατα ή πρωτεΐνες ορού ή και τα δύο είδη πρωτεϊνών, προέκυψε ότι η παρουσία του πολυσακχαρίτη δεν επηρέασε τις ιδιότητες του συστήματος. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν τα συστήματα υποβλήθηκαν σε ένα ή δύο στάδια κατάψυξης-απόψυξης. Η εξέταση με τη συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser επιβεβαίωσε ότι η δομή αυτών των συστημάτων επηρεαζόταν κυρίως από την παρουσία των πρωτεϊνών και σε μικρότερο βαθμό από την παρουσία του πολυσακχαρίτη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα συστήματα τροφίμων που περιέχουν κεφिरάνη, και στα οποία έχει εφαρμοστεί η διεργασία κατάψυξης-απόψυξης, παρουσιάζουν πολύ σταθερή και συνεκτική δομή. Η κεφिरάνη θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα τα οποία υπόκεινται σε διεργασίες κατάψυξης-απόψυξης, ως ενισχυτικό-βελτιωτικό υφής προσδίδοντας αποδεκτά προς τους καταναλωτές χαρακτηριστικά.

ABSTRACT

Production, physicochemical characterization and rheological properties of the polysaccharide kefiran.

Kefiran, an exocellular heteropolysaccharide was produced using kefir grains of household origin as a starter culture and Ultra High Temperature Treated skimmed bovine milk as the substrate. The multiplication of kefir grains was carried out in three production stages for scaling up purposes. At the first stage, the kefir grains were produced in 1 L capacity fermenters, testing various fermentation conditions such as percentage of grain inoculum and incubation temperature to establish the optimum process conditions. At the second stage the fermentation was carried out in a 12 L capacity fermenter to collect a quantity of grains sufficient for utilization as starter culture material in a larger fermenter. At the third stage, the production of kefir grains was carried out in a 428 L capacity fermenter achieving the total production of 30 kg grains out of an initial quantity of starter culture of 80 g employed at the first stage.

Kefiran isolation from kefir grains and the subsequent purification process involved the following steps; heating at 80°C of the aqueous suspension of kefir grains followed by homogenization. Then the mixture was treated using perchloric acid followed by centrifugation to separate kefiran from proteins, repeated washings with surplus of ethanol, followed by centrifugation and freeze drying of the precipitate to obtain kefiran in powder form.

Conformational studies using techniques such as capillary viscometry, size exclusion chromatography, multi angle laser light scattering, static light scattering, dynamic light scattering and zeta potential revealed that kefiran molecule in aqueous solutions behaved as a random coil having a weight average molecular weight of approximately 7×10^5 . Water was found to be a good solvent for kefiran whose molecule was slightly negative charged. Hydrodynamic studies employing various aqueous environments of different ionic strengths, pH values, presence of organic acids,

sugars, urea and ethanol affected the conformation of kefiran molecule in various degrees. Besides, the presence of caseinates or whey protein concentrates in aqueous solutions of kefiran did not significantly affect the conformation of its molecule.

Rheological studies of kefiran aqueous solutions with concentrations ranging from 0.25 to 4% indicated that kefiran in solution was a pseudoplastic material exhibiting a yield stress value at very low shear rates i.e. below 1.0 s^{-1} . Samples of 1 to 4% kefiran concentration which were frozen and then thawed exhibited higher viscosity values, by at least an order of magnitude, than their counterparts which did not undergo the freeze-thaw cycle. Squeeze flow experiments of kefiran systems which underwent the freeze-thaw cycle, revealed that the elongation viscosity exhibited, was concentration dependent, at the range of 4 to 7% concentration, whereas, the sample with 10% kefiran concentration exhibited the behavior of a true gel.

Rheological studies of kefiran systems containing either caseinates or whey protein concentrates or both, revealed that the influence of the kefiran's presence on mechanical properties of the systems was almost negligible. Similar results were obtained when the systems underwent the freeze-thaw process either in one or two cycles. Confocal laser scanning microscopy confirmed that the structure of these kefiran systems was dominated by the presence of milk proteins and to a lesser extent by the presence of kefiran.

The findings of the present study indicated that kefiran containing food systems subjected to freeze-thaw treatment, will acquire a very stable, cohesive structure ideal for various food applications as far as consumer acceptance is concerned.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κεφίράνη είναι ένας εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης, ο οποίος υπάρχει στο κεφίρ (όξινο γαλακτοκομικό προϊόν με προβιοτική δράση, υψηλή θρεπτική αξία και ιδιαίτερες οργανοληπτικές ιδιότητες), αλλά και στην καλλιέργεια που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του, τους κόκκους κεφίρ. Οι κόκκοι κεφίρ, μία καλλιέργεια εκκίνησης με ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά, αποτελούνται από ένα πλέγμα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών, στο οποίο υπάρχουν διάφοροι μικροοργανισμοί (Koroleva, 1988a). Σύμφωνα με τους Rimada & Abraham (2003), ο κύριος πολυσακχαρίτης που βρίσκεται στους κόκκους κεφίρ είναι η κεφίράνη.

Υπεύθυνα για την παραγωγή της κεφίράνης είναι διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), τα οποία βρίσκονται στους κόκκους κεφίρ σε σχέση συμβίωσης με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς (Farnworth, 2005). Κατά τον εμβολιασμό τους στο γάλα, οι κόκκοι κεφίρ αυξάνουν τη μάζα τους με την εναπόθεση καινούργιων μικροοργανισμών και νέας ποσότητας πρωτεϊνών και κεφίράνης, και διαιρούνται σε μικρότερου μεγέθους κόκκους (Garrote et al., 2001). Οι καινούργιοι κόκκοι περιέχουν και αυτοί κεφίράνη και μάλιστα σε μεγαλύτερη ποσότητα από αυτήν που υπάρχει στο τελικό προϊόν (υγρό κεφίρ). Ο πολλαπλασιασμός των κόκκων κεφίρ επομένως παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής του πολυσακχαρίτη κεφίράνη.

Οι πολυσακχαρίτες γενικά, αλλά και η κεφίράνη ειδικά, παρουσιάζουν σπουδαίο τεχνολογικό ενδιαφέρον γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων αυξάνοντας το ιξώδες-συνεκτικότητά τους, βελτιώνοντας την υφή και γενικά τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, αυξάνοντας την ικανότητα συγκράτησης νερού του σχηματιζόμενου πλέγματος, κ.α. (Duboc & Mollet, 2001; Farnworth, 2005; Rimada & Abraham, 2006). Στα τρόφιμα προστίθενται είτε άμεσα μετά την παραγωγή και απομόνωση τους, είτε έμμεσα με την προσθήκη των μικροοργανισμών που τους παράγουν.

Το μεγαλύτερο μέρος των πολυσακχαριτών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είναι μικροβιακής προελεύσεως (από μη παθογόνους και κάποιους παθογόνους μικροοργανισμούς). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια σπουδαίο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρησιμοποίηση πολυσακχαριτών, οι οποίοι προέρχονται από LAB, τα οποία είναι «αναγνωρισμένα ως ασφαλή» (GRAS-Generally Recognised As Safe) (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005). Ένας τέτοιος

πολυσακχαρίτης είναι και η κεφιράνη, στην οποία εκτός της δράσης της ως τροποποιητή υφής έχουν αποδοθεί και άλλα χαρακτηριστικά όπως θεραπευτικές ιδιότητες σε ασθενείς με άσθμα (Kwon et al, 2008).

Η συμπεριφορά ενός πολυσακχαρίτη, όσον αφορά τις λειτουργικές του ιδιότητες, και επομένως η καταλληλότητά του για συγκεκριμένες εφαρμογές μπορεί να αξιολογηθεί μέσω της μελέτης της δομής του και των μορφολογικών χαρακτηριστικών του (Girard & Schaffer-Lequart, 2007). Συγκεκριμένα, πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, το φορτίο και τη διαμόρφωση του μορίου της κεφιράνης μπορούν να συλλεγούν από το φυσικοχημικό και ρεολογικό χαρακτηρισμό της. Αυτές οι ιδιότητες επηρεάζουν τη συμπεριφορά του πολυσακχαρίτη σε διαφορετικά περιβάλλοντα και τις αλληλεπιδράσεις του με τις πρωτεΐνες και τα άλλα συστατικά που υπάρχουν στο γάλα ή σε άλλα κολλοειδή συστήματα.

Μέχρι σήμερα η παραγωγή της κεφιράνης γινόταν σε εργαστηριακό επίπεδο, όπου πολύ μικρές ποσότητες αυτής παράγονταν είτε από κόκκους κεφίρ είτε από καθαρές καλλιέργειες μικροοργανισμών που υπάρχουν στους κόκκους. Δεδομένου ότι τα βακτήρια που παράγουν τον πολυσακχαρίτη χαρακτηρίζονται από μία ισχυρή σχέση συμβίωσης με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, η οποία επηρεάζει την παραγωγή του, η κεφιράνη που παραλαμβάνονταν με αυτόν τον τρόπο είχε διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά από παρτίδα σε παρτίδα και ανάλογα με τις συνθήκες ζύμωσης.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η παραγωγή της κεφιράνης σε πιλοτική κλίμακα (παραγωγή σε επαρκή ποσότητα για τον χαρακτηρισμό και ανάπτυξη μεθοδολογίας που θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία), ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της και η μελέτη των ρεολογικών ιδιοτήτων της. Για την παραγωγή της κεφιράνης χρησιμοποιήθηκαν κόκκοι κεφίρ, οι οποίοι μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης πολλαπλασιάστηκαν αρχικά σε εργαστηριακή κλίμακα και μετέπειτα σε πιλοτική κλίμακα με τη χρήση βιοαντιδραστήρα. Για την απομόνωση κεφιράνης με υψηλό βαθμό καθαρότητας χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη μεθοδολογία, η οποία περιλάμβανε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με κατεργασία με υπερχλωρικό οξύ. Για τον φυσικοχημικό και ρεολογικό χαρακτηρισμό του πολυσακχαρίτη επιλέχθηκαν διάφορες μέθοδοι όπως φυσικοχημικές αναλύσεις, ρεολογικές μετρήσεις με τη χρήση τριχοειδούς ιξωδομέτρου, χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης, καθώς επίσης και τεχνικές στατικού και δυναμικού σκεδασμού

φωτός. Από τις μετρήσεις συλλέχθηκαν στοιχεία για το μοριακό βάρος και τη διαμόρφωση του μορίου της κεφιράνης, καθώς επίσης και για τις αλληλεπιδράσεις που είναι δυνατό να συμβούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Για να μελετηθεί ο ρόλος της κεφιράνης ως τροποποιητής υφής παρασκευάστηκαν συστήματα πρωτεϊνών γάλακτος-κεφιράνης, στα οποία εφαρμόστηκαν διάφορες ρεολογικές δοκιμές (ιξωδομετρία, δυναμική δοκιμή και δοκιμή ερπυσμού) με τη χρήση δυναμικού ρεομέτρου (Bohlin CVOR), ενώ παρατηρήθηκε και η μορφολογία τους με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscope). Τα συστήματα αυτά βρίσκονταν υπό τη μορφή διαλυμάτων, όξινων πηκτών και κρυοπηκτών και μελετήθηκαν για πρώτη φορά. Όσον αφορά τις όξινες πηκτές, μελετήθηκε επιπλέον ο ρυθμός ανάπτυξης της δομής τους με τη χρήση ενός πρωτότυπου δυναμικού ρεομέτρου υοειδούς σωλήνα (U-tube).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Κεφίράνη

Η κεφίράνη είναι ένας υδατοδιαλυτός εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από σχεδόν ισομοριακές ποσότητες γλυκόζης και γαλακτόζης. Παράγεται από συγκεκριμένα γαλακτικά βακτήρια και αποτελεί περίπου το 50% της μάζας των κόκκων κεφίρ (επί ξηρού) (La Rivière et al, 1967, Abraham & De Antoni, 1999). Ανήκει στην ομάδα των ετεροπολυσακχαριτών, η σύνθεση των οποίων είναι μάλλον πολύπλοκη, αποτελούμενη από πολλά στάδια, όπου συμμετέχουν περισσότερα από ένα ένζυμα. Αυτό σημαίνει ότι η σύσταση της κεφίράνης εξαρτάται από το μεταβολισμό των βακτηρίων που τη συνθέτουν και φυσικά από τις συνθήκες της ζύμωσης (θερμοκρασία επώασης, θρεπτικό υπόστρωμα, κ.α.) (Duboc & Mollet, 2001). Εξαιτίας της πολυπλοκότητας του μηχανισμού βιοσύνθεσης των ετεροπολυσακχαριτών, η χημική τους σύσταση, η αναλογία των μονοσακχαριτών, το μοριακό τους βάρος και η διαμόρφωση του μορίου τους μπορεί να ποικίλει σημαντικά (Duboc & Mollet, 2001; Ruas-Madiedo et al., 2002).

Ο ρόλος της κεφίράνης, όπως και των άλλων εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, είναι να προστατεύει τα βακτηριακά κύτταρα έναντι δυσμενών συνθηκών του περιβάλλοντα χώρου (Farnworth, 2005). Σύμφωνα με πολλούς ερευνητές, οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων όσον αφορά τη θερμοκρασία, το pH, την παροχή οξυγόνου, την ταχύτητα ανάδευσης και το χρόνο ζύμωσης, οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα παραγωγής των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες έρευνες σύμφωνα με τις οποίες η παραγωγή των πολυσακχαριτών είναι μέγιστη στις μη βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria – LAB). Οι διαφορές μεταξύ των ευρημάτων των ερευνών οφείλονται στο διαφορετικό είδος των LAB που χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα, μεσόφιλα στελέχη βακτηρίων παράγουν μεγάλες ποσότητες πολυσακχαριτών σε δυσμενείς για αυτά συνθήκες ανάπτυξης, ενώ για τα θερμόφιλα στελέχη η μέγιστη παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις βέλτιστες συνθήκες πολλαπλασιασμού τους (Degeest et al., 2001).

Ο κύριος μικροοργανισμός υπεύθυνος για την παραγωγή της κεφίράνης είναι ο *Lactobacillus kefiranofaciens* (Frengova et al., 2002; Cheirsilp et al., 2003a Tada et al., 2007). Αν και αρχικά είχε προταθεί και ο *Lactobacillus kefir* για αυτόν το ρόλο (La

Rivière et al., 1967), στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα του στελέχους να σχηματίζει εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες χάθηκε μετά την απομόνωσή του και τη μεταφορά του σε θρεπτικό υπόστρωμα (Kandler & Kunath, 1983).

Δεδομένης της δράσης της κεφίράνης ως τροποποιητή υφής, αλλά και των θεραπευτικών ιδιοτήτων που της έχουν αποδοθεί, πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή της κεφίράνης από τον *Lactobacillus kefirifaciens* χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα (Cheirsilp et al., 2001; Maeda et al., 2004a; Dailin et al., 2016). Ωστόσο, καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ποσότητα του παραγόμενου πολυσακχαρίτη βρέθηκαν σε καλλιέργειες μικτές όπου μαζί με τον *Lactobacillus kefirifaciens* εμβολιάζονταν και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (Cheirsilp et al., 2003a; Cheirsilp et al., 2003b; Cheirsilp et al., 2007; Tada et al., 2007; Cheirsilp & Radchabut, 2011). Το γεγονός αυτό εξηγείται από τη σχέση συμβίωσης που διακρίνει τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στους κόκκους κεφίρ και η οποία οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας κεφίράνης που παράγεται. Ωστόσο, στους κόκκους κεφίρ δεν υπάρχουν μόνο οι δυο προαναφερθέντες μικροοργανισμοί αλλά πληθώρα μικροχλωρίδας το κάθε στέλεχος της οποίας συμβάλλει με το δικό του τρόπο στη σχέση συμβίωσης, προάγοντας με αυτόν τον τρόπο και την παραγωγή της κεφίράνης. Διάφοροι ερευνητές επομένως απομόνωσαν τον πολυσακχαρίτη εμβολιάζοντας τους κόκκους κεφίρ σε γάλα (Piermaria et al., 2008; Zajšek & Goršek, 2011; Zajšek et al., 2011; Zajšek et al., 2013) ή αποπρωτεϊνομένο ορό τυρογάλακτος (Rimada & Abraham, 2001; Piermaria et al., 2008; Ghasemlou et al., 2012).

1.1.1. Κεφίρ

Το κεφίρ είναι ένα όξινο γαλακτοκομικό προϊόν, αφρώδες εξαιτίας της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα, με δριμεία γεύση, στο οποίο παράγεται και μικρή ποσότητα αλκοόλης (Farnworth, 2005). Χώρες προέλευσης του κεφίρ θεωρούνται οι περιοχές γύρω από τον Καύκασο (Koroleva, 1988a). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει παγκοσμίως γνωστό με την παραγωγή και κατανάλωσή του να αυξάνεται διαρκώς, εξαιτίας τόσο των ιδιαίτερων και αρεστών χαρακτηριστικών του, όσο και των θεραπευτικών και διατροφικών ιδιοτήτων του.

Το κεφίρ θεωρείται ένα φυσικό προβιοτικό λόγω των μικροοργανισμών που περιέχει (Otles & Cagindi, 2003). Η βιολογική και θρεπτική του αξία ενισχύεται με την παρουσία διαφόρων ενώσεων που προέρχονται από τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών των κόκκων και των ενζύμων που παράγονται από αυτούς (αμινοξέα, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες) (Otles & Cagindi, 2003; Farnworth, 2005). Η παρουσία των οξικών βακτηρίων και των ζυμών ενισχύει την αντιβιοτική δράση του κεφίρ κατά μικροοργανισμών που εισέρχονται στον πεπτικό σωλήνα με τις τροφές και το νερό σε σχέση με άλλα όξινα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως η γιαούρτη. Τα οξικά βακτήρια συμβάλλουν επίσης στη διάσπαση των πρωτεϊνών και την παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων και άλλων προϊόντων διάσπασης, ενώ είναι ικανά να παράγουν βιταμίνες της ομάδας Β. Απορροφάται πιο εύκολα από τον οργανισμό εξαιτίας του διοξειδίου του άνθρακα που περιέχει και διευκολύνει την ούρηση. Λόγω της ιδιάζουσας γεύσης και των μικροοργανισμών του, προάγει την έκκριση ενζύμων από το στομάχι και το πάγκρεας κι έτσι διευκολύνει την πέψη και τις περισταλτικές κινήσεις του εντέρου και ως εκ τούτου την διέλευση των τροφών από το έντερο (Koroleva, 1988a). Επίσης, είναι κατάλληλο για άτομα που πάσχουν από δυσανεξία στη λακτόζη (οι μικροοργανισμοί που περιέχει μεταβολίζουν τη λακτόζη). Τέλος, πολλές έρευνες προσδίδουν στο κεφίρ ανοσολογική και αντικαρκινική δράση (Otles & Cagindi, 2003).

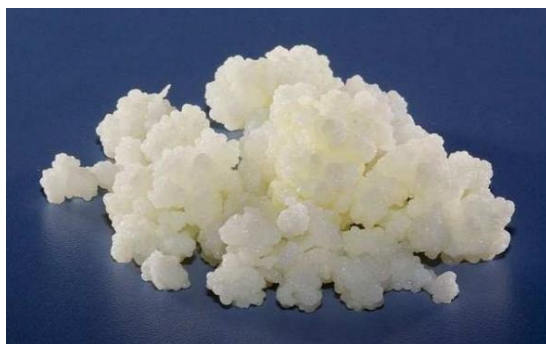
1.1.2. Κόκκοι κεφίρ

Οι κόκκοι κεφίρ (Σχήμα 1.1), οι οποίοι αποτελούν την καλλιέργεια εκκίνησης του κεφίρ, έχουν ακανόνιστο σχήμα (Koroleva, 1988b), το οποίο προσομοιάζει με κομμάτια κοραλλιού ή μικρές συμπαγείς κεφαλές κουνουπιδιού (Otles & Cagindi, 2003; Farnworth, 2005). Έχουν λευκό ή υποκίτρινο χρώμα και εμφανίζουν μεγάλη ελαστικότητα (Koroleva, 1988b). Το μέγεθος τους ποικίλει από 1-6 mm έως 2-3 cm σε διάμετρο (Koroleva, 1988b; Garrote et al., 2001). Αποτελούνται από μικροοργανισμούς ενωμένους σε ένα πλέγμα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών (κεφιράνη). Σύμφωνα με τους Abraham & De Antoni (1999) η χημική σύσταση των κόκκων είναι η εξής: 83% νερό, 9-10% πολυσακχαρίτες και 4-5% πρωτεΐνες.

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στους κόκκους κεφίρ χαρακτηρίζονται από μία σχέση συμβίωσης (ο ένας μικροοργανισμός διεγείρει την ανάπτυξη του άλλου με την παραγωγή διαφόρων ενώσεων) και αποτελούνται από γαλακτικά βακτήρια, οξικά

βακτήρια και ζύμες. Οι μικροοργανισμοί υπάρχουν σε όλη τη μάζα των κόκκων. Η σύσταση ωστόσο, των διαφορετικών στρώματων ποικίλλει. Στα επιφανειακά στρώματα των κόκκων υπάρχουν μεσόφιλοι λακτόκοκκοι, μεσόφιλοι και θερμοφιλοι λακτοβάκιλοι, οξικά βακτήρια και ζύμες που ζυμώνουν τη λακτόζη (Σχήμα 1.2 και 1.3). Οι ζύμες που δε ζυμώνουν τη λακτόζη βρίσκονται στο εσωτερικό των κόκκων (Σχήμα 1.4). Σύμφωνα με τους Stepaniak & Fetlinski (2002) ο κύριος μικροοργανισμός υπεύθυνος για την παραγωγή της κεφiranής, *Lactobacillus kefiranofaciens*, βρίσκεται τόσο στα εσωτερικά όσο και στα εξωτερικά στρώματα των κόκκων με τον πληθυσμό του όμως να υπερισχύει στο κέντρο. Στο Σχήμα 1.5 φαίνονται γαλακτικά βακτήρια στη μάζα των κόκκων κεφίρ, τα οποία περιβάλλονται από εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες.

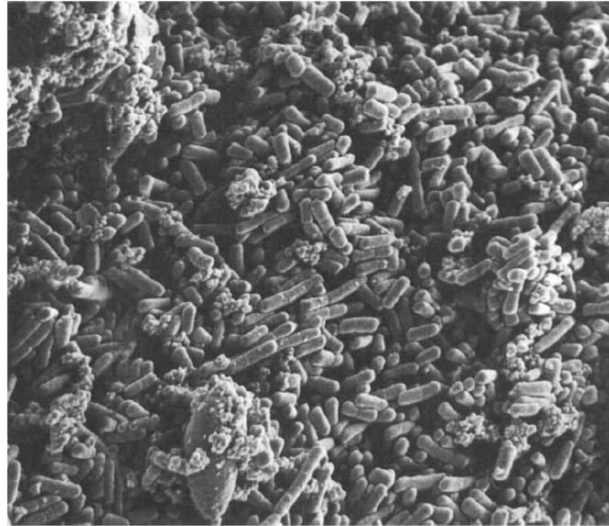
Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επιμόλυνσης παρεμποδίζεται από τους μικροοργανισμούς των κόκκων, ενώ διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι παθογόνοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν όταν εμβολιάζονται στο γάλα μαζί με τους κόκκους κεφίρ (Koroleva, 1988b).



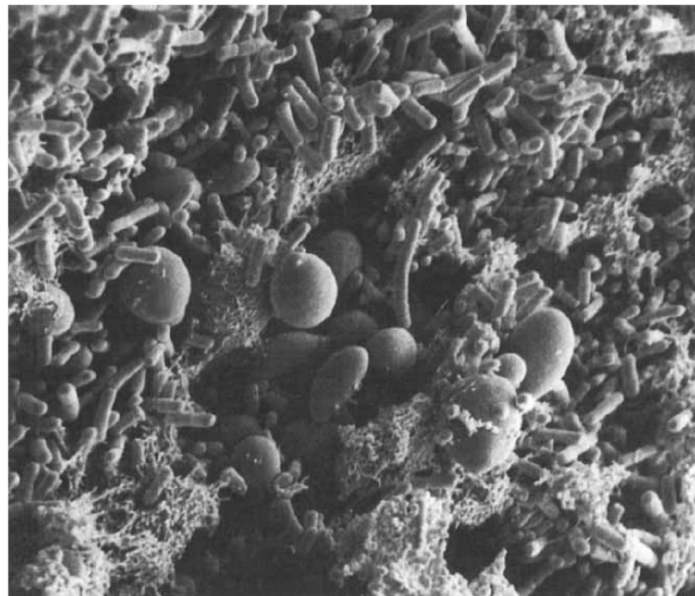
Σχήμα 1.1. Κόκκοι κεφίρ.

Ο μηχανισμός της πρώτης δημιουργίας των κόκκων είναι ακόμα άγνωστος γι' αυτό υπάρχουν διάφορες θεωρίες για την προέλευσή τους. Η πιο πιθανή φαίνεται να είναι εκείνη, σύμφωνα με την οποία το γάλα στη περιοχή του Καυκάσου φυλασσόταν σε ασκούς από κατσικίσιο δέρμα, όπου γινόταν η ζύμωση. Καθώς το ζυμούμενο γάλα καταναλώνονταν, φρέσκο γάλα το αντικαθιστούσε και η ζύμωση συνεχιζόταν για πολλές εβδομάδες. Έτσι, στα τοιχώματα του ασκού δημιουργούνταν μικρά σωματίδια

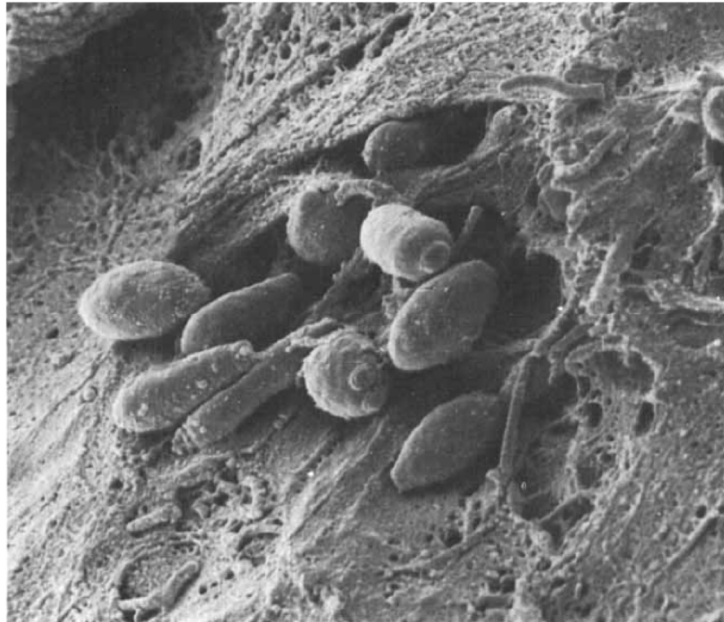
πρωτεϊνικής φύσεως, τα οποία με τον καιρό μεγάλωναν, καθώς σε αυτά προσθέτονταν νέα στρώματα πρωτεΐνης. Στα σωματίδια αυτά εγκλωβίζονταν η μικροχλωρίδα των κόκκων μαζί με τους πολυσακχαρίτες που παράγονταν από τα γαλακτικά βακτήρια (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990)



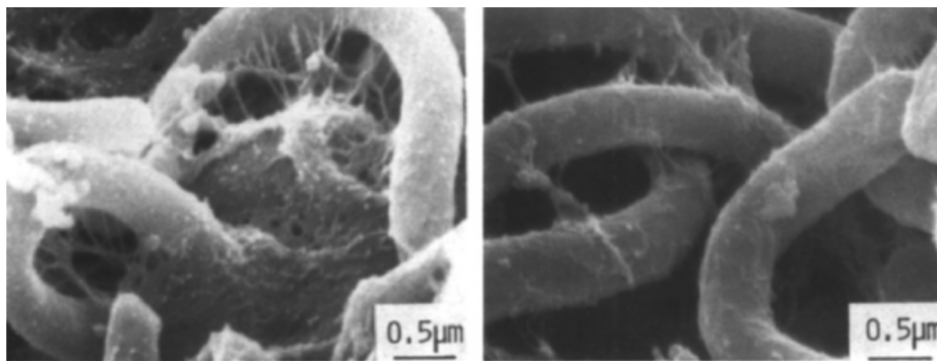
Σχήμα 1.2. Κυριαρχία των ραβδόμορφων βακτηρίων στα περιφερειακά στρώματα των κόκκων κεφίρ ($\times 3040$) (Bottazzi & Bianchi, 1980).



Σχήμα 1.3. Ραβδόμορφα βακτήρια και ζύμες στα ενδιάμεσα στρώματα των κόκκων κεφίρ ($\times 3040$) (Bottazzi & Bianchi, 1980).



Σχήμα 1.4. Κυριαρχία ζυμών στα κεντρικά στρώματα των κόκκων κεφίρ ($\times 3040$) (Bottazzi & Bianchi, 1980).



Σχήμα 1.5. Γαλακτικά βακτήρια στη μάζα των κόκκων κεφίρ περιβαλλόμενα από εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (Toba et al., 1990).

1.1.2.1. Μικροχλωρίδα κόκκων κεφίρ

Το κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα του μικροβιακού πληθυσμού των κόκκων κεφίρ είναι η σχέση συμβίωσης που τον διακρίνει. Όταν τα βακτήρια και οι ζύμες που υπάρχουν στο κεφίρ απομονωθούν και εμβολιαστούν ως μεμονωμένες καλλιέργειες,

είτε δεν αναπτύσσονται, είτε παρουσιάζουν μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα. (Farnworth, 2005).

Η μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση τους, τις συνθήκες ζύμωσης και αποθήκευσης. Γενικά, τα γαλακτικά βακτήρια είναι περισσότερα (10^8 - 10^9 cfu/g) από τις ζύμες (10^5 - 10^6 cfu/g) και τα οξικά βακτήρια (10^5 - 10^6 cfu/g). Ωστόσο, οι συνθήκες ζύμωσης μπορούν να επηρεάσουν τους μικροβιακούς πληθυσμούς (Farnworth, 2005). Τα κολοβακτηριοειδή και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί δεν υπάρχουν στα ενδιάμεσα στρώματα των κόκκων, είναι όμως δυνατόν να προσκολληθούν στην επιφάνειά τους. Για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των κόκκων ή να απομακρυνθούν οι μικροοργανισμοί επιμόλυνσης οι κόκκοι πρέπει να ξεπλένονται επανειλημμένα με αποστειρωμένο νερό (Koroleva, 1988a).

Οι πιο συνηθισμένοι μικροοργανισμοί που αποτελούν τη μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ είναι οι ακόλουθοι (Koroleva, 1988b; Garrote et al., 2001; Plessas et al., 2017):

Από τους λακτοβάκιλους κυρίως βρίσκονται οι *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* και *L. helveticus*. Ζύμες που έχουν ταυτοποιηθεί είναι οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* και *Candida kefir*. Οι λακτόκοκκοι που υπάρχουν στο κεφίρ είναι κύρια οι *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* ενώ πολλές φορές συναντάται και ο *S. Durans*. Επίσης υπάρχουν οι *Leuconostoc mesenteroides* και *L. dextranicum*. Από τα οξικά βακτήρια έχουν ταυτοποιηθεί τα *Acetobacter aceti* και *A. rascens*.

1.1.2.2. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ

Οι κόκκοι κεφίρ πολλαπλασιάζονται μετά τον εμβολιασμό και την επώασή τους σε γάλα. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της επώασης μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των βακτηρίων που παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, και πρωτεΐνες εναποτίθενται στην επιφάνεια των κόκκων. Ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα και η σύνθεση της κεφιράνης πάνω στα βακτηριακά κύτταρα αυξάνοντας περισσότερο το μέγεθος τους. Η αύξηση του μεγέθους τους οδηγεί στη διαίρεση τους και το σχηματισμό μικρότερου μεγέθους κόκκων. Με αυτόν

τον τρόπο γίνεται ο πολλαπλασιασμός και η παραγωγή των κόκκων κεφίρ. Οι κόκκοι μετά την επώαση συλλέγονται και ξαναχρησιμοποιούνται (Garrote et al., 2001; Otles & Cagindi, 2003). Παρότι έχουν γίνει πολλές προσπάθειες δεν κατέστη δυνατόν να παραχθούν κόκκοι κεφίρ από τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι υπάρχουν σε αυτούς (Koroleva, 1988b). Αυτός είναι και ο λόγος, ο οποίος καθιστά δύσκολη τη διάθεσή τους.

Σύμφωνα με τους Garrote et al. (2001) υπάρχει συγκεκριμένη ισορροπία μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών που αποτελούν τον μικροβιακό πληθυσμό των κόκκων κεφίρ, η οποία ορίζεται από τη σχέση συμβίωσης που τους διακρίνει, και είναι υπεύθυνη για την αύξηση της μάζας των κόκκων. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι κατά τη διάρκεια 5 χρόνων συνεχών ανακαλλιιεργειών των κόκκων κεφίρ υπήρχε μεγάλη διακύμανση στον πληθυσμό των ζωντανών μικροοργανισμών, ωστόσο ο λόγος μεταξύ των διαφορετικών ειδών παρέμενε σταθερός. Διατάραξη της σχέσης συμβίωσης της μικροχλωρίδας των κόκκων κεφίρ (από καταστροφή ή απουσία μικροοργανισμών) μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ή ακόμη και απουσία ανάπτυξης/πολλαπλασιασμού της βιομάζας των κόκκων. Μάλιστα η ζύμωση σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή κεφίρ με πολύ χαμηλό ιξώδες. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα συσχετίζεται με πολύ χαμηλή παραγωγή πολυσακχαρίτη.

Από την πολυπλοκότητα της μικροχλωρίδας των κόκκων κεφίρ μπορεί να καταλάβει κανείς ότι είναι δύσκολο να διατηρηθεί μία σταθερή μικροβιακή σύσταση στην παραδοσιακή καλλιέργεια εκκίνησης του κεφίρ (κόκκοι κεφίρ), η οποία θα οδηγήσει στην παραγωγή προϊόντων σταθερής ποιότητας. Οποιαδήποτε απόκλιση από τις συνήθεις συνθήκες επώασης των κόκκων οδηγεί σε αλλαγές στη μικροβιακή τους σύσταση που επηρεάζουν τη διάρκεια της ζύμωσης αλλά και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι εάν κόκκοι διαφορετικής προέλευσης επωαστούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες οι μικροβιακοί πληθυσμοί τους θα είναι σχεδόν ίδιοι. Αυτό αποδεικνύει τη μοναδική ικανότητα των κόκκων να «αυτοελέγχουν» τη μικροχλωρίδα τους, ένας παράγοντας ιδιαίτερα σημαντικός στη βιομηχανία παραγωγής κεφίρ (Koroleva, 1988b).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή σύσταση του κεφίρ και κατ' επέκταση την αύξηση της μάζας των κόκκων είναι το ποσοστό εμβολιασμού τους στο

γάλα, η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασής τους, ο αριθμός ανακινήσεών τους κατά τη διάρκεια της επώασής τους, οι εκπλύσεις μεταξύ των ανακαλλιέργειών, κ.α. (Koroleva, 1988b).

1.1.2.3. Διατήρηση κόκκων κεφίρ

Οι κόκκοι παραμένουν βιώσιμοι-ζωντανοί με την καθημερινή μεταφορά τους σε γάλα και την επώασή τους για περίπου 20 h κατά τη διάρκεια της οποίας παρατηρείται αύξηση της μάζας τους που μπορεί να φτάσει το 25%. Με αυτόν τον τρόπο οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν σε αυτούς διατηρούν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται. Εάν απαιτείται αποθήκευση των κόκκων για μεγάλο χρονικό διάστημα τότε αυτή θα πρέπει να γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (-20 έως -80°C) (Farnworth, 2005). Σύμφωνα με τους Garrote et al., (1997) τοποθέτηση των κόκκων σε γάλα και εν συνεχεία κατάψυξή τους στους -20 ή -80°C για χρονικό διάστημα 2 μηνών δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη διατήρησή τους. Συγκεκριμένα, η αύξηση της μάζας των κόκκων που συντηρήθηκαν στην κατάψυξη ήταν παρόμοια με αυτή των κόκκων που διατηρήθηκαν με συνεχείς ανακαλλιέργειες σε γάλα κάθε 48 ώρες. Επίσης, η μικροβιακή σύσταση, η ρεολογική συμπεριφορά, η οξύτητα και η περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα του υγρού κεφίρ που προέκυψε από τη ζύμωση των διατηρημένων στην κατάψυξη κόκκων ήταν ίδιες με τις αντίστοιχες των κόκκων, οι οποίοι τοποθετούνταν σε φρέσκο γάλα κάθε 48 h (ανακαλλιέργειες). Η συντήρηση στεγνωμένων με διηθητικό χαρτί κόκκων μέσα σε τρυβλία petri κλεισμένα με parafilm στους 4°C για το ίδιο χρονικό διάστημα, οι οποίοι προηγουμένως είχαν φυγοκεντρηθεί δύο φορές στα 14000 rpm για 5 min, δε δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα, όσον αφορά το ποσοστό αύξησης της μάζας των κόκκων, καθώς επίσης την οξύτητα και το ιζώδες του τελικού προϊόντος.

Οι Witthun et al. (2005) μελέτησαν την επίδραση τεσσάρων μεθόδων συντήρησης στη δραστηριότητα των κόκκων κεφίρ προσδιορίζοντας την απώλεια μάζας κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους (συνολικά 10 μήνες), καθώς επίσης την τιμή pH, την οξύτητα, την κατανάλωση λακτόζης και την περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ μετά την επώασή τους στους 25°C για 24 h. Οι μέθοδοι συντήρησης που αξιολογήθηκαν ήταν η κατάψυξη στους -18°C (χωρίς προσθήκη γάλακτος), η

συντήρηση στην ψύξη (4°C), η αποξήρανση των κόκκων σε θερμοκρασία δωματίου για 3 εβδομάδες σε ξηραντήρα και η λυοφιλίωση. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, και οι τέσσερις μέθοδοι συντήρησης οδήγησαν σε διατήρηση της ικανότητας οξίνισης για συνολικό διάστημα αποθήκευσης 10 μηνών. Η τεχνική της ξήρανσης και της λυοφιλίωσης ωστόσο, είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μία αρχική καθυστέρηση του ρυθμού μείωσης του pH. Η ξήρανση των κόκκων ως μέθοδος συντήρησης δεν συνιστάται από τους συγγραφείς εξαιτίας της σκουρόχρωμης απόχρωσης που αποκτούν και της μάλλον άσχημης οσμής που αναπτύσσουν.

Η δραστηριοποίηση των αποθηκευμένων κόκκων γίνεται με συνεχείς ανακαλλιέργειες στους 25°C για 24 h (Witthun et al., 2005).

1.1.3. Μηχανισμός ζύμωσης

Η διεργασία της ζύμωσης του γάλακτος μετά τον εμβολιασμό του με τους κόκκους κεφίρ συνήθως ολοκληρώνεται σε περίπου 24 h, ανάλογα με το ποσοστό εμβολιασμού, την κατάσταση ενεργοποίησης-δραστηριοποίησης των κόκκων, τη θερμοκρασία επώασης, την ανάδευση κατά τη διάρκεια της επώασης κ.α. Αμέσως μετά την προσθήκη των κόκκων στο γάλα λαμβάνει χώρα απελευθέρωση των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε αυτούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί πολλαπλασιάζονται εκθετικά οδηγώντας σε αύξηση του πληθυσμού τους και σταδιακή μείωση του pH. Ωστόσο, ο ρυθμός ανάπτυξής τους διαφέρει και εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος χώρου. Συγκεκριμένα, στα πρώτα στάδια της επώασης οι ομοζυμωτικοί λακτόκοκκοι αναπτύσσονται με γρήγορο ρυθμό και είναι υπεύθυνοι για την αρχική απότομη μείωση του pH του γάλακτος. Η ανάπτυξη τους ευνοείται από τη σχετικά υψηλή τιμή pH που έχει το γάλα (6,7). Η συνεχής αύξηση όμως της οξύτητας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των λακτόκοκκων, σε αντίθεση με τους λακτοβάκιλους, οι οποίοι βρίσκουν ευνοϊκές συνθήκες για να πολλαπλασιαστούν (χαμηλή τιμή pH σε συνδυασμό με παραγωγή διαφόρων ενώσεων από τους λακτόκοκκους) με γρήγορους ρυθμούς προκαλώντας περαιτέρω μείωση του pH (Garrote et al., 1998; Farnworth, 2005). Σε τιμές pH της τάξης του 6,05 και 5,84, οι λακτόκοκκοι είναι αυτοί που καταναλώνουν τη γλυκόζη με μεγαλύτερο ρυθμό

(Tamime & Robinson, 2007). Οι ζύμες, τα οξικά βακτήρια και οι μικροοργανισμοί που παράγουν προϊόντα που συμβάλλουν στο άρωμα, όπως τα *Leuconostoc*'s, έχουν βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης με αποτέλεσμα η παραγωγή του αρώματος αλλά και ο πληθυσμός των συγκεκριμένων μικροοργανισμών να αυξάνονται στα τελευταία στάδια ζύμωσης (Witthun et al., 2005).

Ο ρόλος των ζυμών στην τεχνολογία παρασκευής κεφίρ είναι επίσης σημαντικός. Διεγείρουν την ανάπτυξη των βακτηρίων μέσω της παραγωγής διαφόρων ενώσεων όπως αμινοξέα, βιταμίνες κ.α. Επίσης η παραγωγή αλκοόλης και CO₂ από τις ζύμες σε συνδυασμό με τη μείωση του pH παρεμποδίζει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών-ανταγωνιστών. Ταυτόχρονα τα προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων χρησιμοποιούνται από τις ζύμες ως πηγή ενέργειας (Viljoen, 2001).

Σύμφωνα με την Koroleva (1988b), και τα οξικά βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σχέσης συμβίωσης των μικροοργανισμών των κόκκων κεφίρ. Συγκεκριμένα, η παρουσία τους επιταχύνει το ρυθμό ανάπτυξης των λακτόκοκκων.

Ο μεταβολισμός της λακτόζης από τα ένζυμα που παράγουν οι μικροοργανισμοί των κόκκων οδηγεί στην παραγωγή γλυκόζης και γαλακτόζης. Οι μικροοργανισμοί στη συνέχεια ζυμώνουν τη γλυκόζη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση του pH του υποστρώματος (Tamime & Robinson, 2007). Την παραγόμενη γαλακτόζη χρησιμοποιούν τα γαλακτικά βακτήρια για τη βιοσύνθεση της κεφिरάνης (Zajšek et al., 2013).

1.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κεφिरάνης

Οι διάφορες ομάδες μικροοργανισμών των κόκκων μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας, διεγείρουν η μία την ανάπτυξη της άλλης. Όταν η σχέση συμβίωσης λειτουργεί άψογα και ο ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι ο μέγιστος, η πορεία της ζύμωσης είναι τέτοια, ώστε να υπάρχει παραγωγή ενώσεων που προσδίδουν άρωμα (ακεταλδεΐδη, ακετοΐνη, διακετύλιο κ.α.) αλλά και μέγιστη παραγωγή των πολυσακχαριτών. Οποιαδήποτε διατάραξη αυτής της ισορροπίας οδηγεί σε αλλαγές της μικροβιακής σύστασης κατά τη διάρκεια της επώασης, οι οποίες επηρεάζουν τη ζύμωση, το χρόνο που αυτή θα ολοκληρωθεί αλλά και την ποιότητα του τελικού

προϊόντος (χημική σύσταση, ρεολογική συμπεριφορά, μικροβιακός πληθυσμός) (Koroleva, 1988b).

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες πολλαπλασιασμού των κόκκων κεφίρ, ώστε να αυξηθεί η ποσότητα της παραγόμενης κεφिरάνης που απομονώνεται από αυτούς αναφέρουν ότι η θερμοκρασία ζύμωσης (Zajšek & Goršek, 2011; Zajšek et al., 2011; Ghasemlou et al., 2012; Zajšek et al., 2013), ο χρόνος ζύμωσης (Zajšek et al., 2011), η ταχύτητα ανάδευσης (Zajšek & Goršek, 2011; Zajšek et al., 2013), η τιμή pH του υποστρώματος (Ghasemlou et al., 2012) και η ενίσχυση του υποστρώματος με θρεπτικά για τα βακτήρια υλικά (Zajšek & Goršek, 2011; Ghasemlou et al., 2012; Zajšek et al., 2013) επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την παραγωγή του πολυσακχαρίτη.

Συγκεκριμένα, οι Zajšek & Goršek (2011) και οι Zajšek et al. (2013) αναφέρουν ως βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή του πολυσακχαρίτη τους 25°C, οι Ghasemlou et al. (2012) τους 24°C, ενώ οι Zajšek et al. (2011) τους 30°C. Οι Zajšek & Goršek (2011), Zajšek et al. (2011) και οι Zajšek et al. (2013) χρησιμοποίησαν πλήρες γάλα UHT (Ultra-High Temperature) για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων (ποσοστό προσθήκης κόκκων 4,2%), ενώ οι Ghasemlou et al. (2012) ορό τυρογάλακτος εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ζύμης (ποσοστό προσθήκης κόκκων 1,5%). Ζύμωση υπό συνεχή ανάδευση πραγματοποίησαν μόνο οι Zajšek & Goršek (2011) και οι Zajšek et al. (2013), οι οποίοι αναφέρουν ως βέλτιστη θερμοκρασία τους 25°C. Οι διαφορές ως προς τη βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής της κεφिरάνης πιθανόν να οφείλονται στην ανάδευση ή μη του υποστρώματος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και στο αρχικό ποσοστό εμβολιασμού. Ωστόσο, η διαφορετική προέλευση των κόκκων, η οποία συνοδεύεται από διαφορές ως προς τη σύσταση της μικροχλωρίδας τους, διαδραματίζει το σημαντικότερο ρόλο.

Σύμφωνα με τους Zajšek & Goršek (2011) και Zajšek et al. (2013) η ανάδευση του υποστρώματος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξασφαλίζει την ομοιόμορφη κατανομή των θρεπτικών συστατικών και βοηθάει στην εξισορρόπηση της θερμοκρασίας. Μάλιστα αναφέρουν ότι όταν η ταχύτητα ανάδευσης ήταν 80 rpm, επιτεύχθηκε η μέγιστη παραγωγή της κεφिरάνης.

Όσον αφορά τη βέλτιστη τιμή pH του υποστρώματος (ορός τυρογάλακτος εμπλουτισμένος με εκχύλισμα ζύμης) για την παραγωγή του πολυσακχαρίτη, οι

Ghasemlou et al. (2012) αναφέρουν την τιμή 5,5. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγγραφείς δεν περιγράφουν εάν η ρύθμιση του pH έγινε από την έναρξη της ζύμωσης ή στην πορεία αυτής.

Σύμφωνα με τους Zajšek et al. (2011), κατά τη διάρκεια των πρώτων 40 h ζύμωσης, οι οποίες περιλαμβάνουν την επωαστική, εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών, η ποσότητα της παραγόμενης κεφिरάνης παραμένει σταθερή. Από τις 40 έως τις 60 h, όπου ο αριθμός των μικροοργανισμών αρχίζει να μειώνεται, η παραγωγή του πολυσακχαρίτη αυξάνεται. Αυτό πιθανόν να μπορεί να αποδοθεί στο μηχανισμό προστασίας των βακτηριακών κυττάρων. Μετά το πέρας των 60 h όμως, η συγκέντρωση της κεφिरάνης που απομονώνεται από τους κόκκους μειώνεται, πιθανόν λόγω διάσπασής της από διάφορα ένζυμα.

Η ενίσχυση του υποστρώματος με λακτόζη (Zajšek & Goršek, 2011; Ghasemlou et al., 2012; Zajšek et al., 2013), θειαμίνη (Zajšek & Goršek, 2011; Zajšek et al., 2013) και χλωριούχο σίδηρο (Zajšek et al., 2013) οδηγεί επίσης σε αύξηση της παραγόμενης ποσότητας κεφिरάνης. Τα θρεπτικά συστατικά που προστίθενται στο υπόστρωμα ενισχύουν το μεταβολισμό των μικροοργανισμών των κόκκων με αποτέλεσμα να προάγεται η σχέση συμβίωσης και φυσικά η παραγωγή του πολυσακχαρίτη σε αυξημένες ποσότητες.

Εκτός από τη χρήση κόκκων κεφίρ ως υπόστρωμα για την παραγωγή κεφिरάνης πολλοί ερευνητές χρησιμοποίησαν τον κύριο μικροοργανισμό που παράγει τον πολυσακχαρίτη, τον *Lactobacillus kefiranoformans*, είτε μόνο του (Cheirsilp et al., 2001; Maeda et al., 2004a; Dailin et al., 2016) είτε σε μικτή καλλιέργεια με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (Cheirsilp et al., 2003a; Cheirsilp et al., 2003b; Cheirsilp et al., 2007; Tada et al., 2007; Cheirsilp & Radchabut, 2011), η οποία δρα συνεργιστικά με τον λακτοβάκιλο για την παραγωγή της κεφिरάνης.

Σύμφωνα με τους Cheirsilp et al. (2001), το άριστο pH για την παραγωγή της κεφिरάνης από τον *Lactobacillus kefiranoformans* είναι 4,5, σε θερμοκρασία ζύμωσης 30°C και κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Σε αντίθεση, οι Maeda et al. (2004a) αναφέρουν ως άριστο pH το 5,0 σε θερμοκρασία ζύμωσης 33°C. Οι διαφορές στις βέλτιστες συνθήκες, όσον αφορά το pH, πιθανόν να μπορούν να αποδοθούν στη χρήση διαφορετικών θρεπτικών υλικών για την ανάπτυξη του λακτοβάκιλου.

Οι Dailin et al. (2016), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της προσθήκης θρεπτικών υλικών στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού του *Lactobacillus kefiranofaciens* αναφέρουν ότι η προσθήκη σακχαρόζης, εκχυλίσματος ζύμης και όξινου φωσφορικού καλίου αυξάνει την παραγωγή κεφιλάνης. Τα πειράματα των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκαν χωρίς ρύθμιση της τιμής pH.

Οι Cheirsilp & Radchabut (2011) αναφέρουν ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή κεφιλάνης από μικτή καλλιέργεια του *Lactobacillus kefiranofaciens* και της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* ήταν η χρησιμοποίηση υποστρώματος, το οποίο περιείχε ορό τυρογάλακτος και εκχύλισμα ζύμης, με αρχική τιμή pH 5,5, και παροχή οξυγόνου 5%. Σύμφωνα με τους Tada et al. (2007), Cheirsilp et al. (2003a) και Cheirsilp et al. (2003b) η κατανάλωση του γαλακτικού οξέος που παράγει ο λακτοβάκιλος από τη ζύμη, είναι υψίστης σημασίας για την αύξηση της παραγωγής της κεφιλάνης σε μικτή καλλιέργεια των δυο μικροοργανισμών. Η αύξηση της συγκέντρωσης σε γαλακτικό οξύ δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη του λακτοβάκιλου. Επίσης, εκτός από τη μείωση της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος, η παρουσία της ζύμης διεγείρει την ανάπτυξη του λακτοβακίλου και φυσικά την παραγωγή κεφιλάνης. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Cheirsilp et al. (2003a) τα καλύτερα αποτελέσματα από τη συμβίωση των δύο μικροοργανισμών επιτυγχάνονται όταν η ζύμωση γίνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες.

Από τα παραπάνω μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής του πολυσακχαρίτη εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες με κύριο το εάν η απομόνωση γίνεται από κόκκους κεφίρ ή από μεμονωμένες καλλιέργειες που παράγουν την κεφιλάνη. Δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στους κόκκους χαρακτηρίζονται από μία ισχυρή σχέση συμβίωσης, η παρουσία όλων των ομάδων των μικροοργανισμών επιδρά θετικά στην παραγωγή του πολυσακχαρίτη. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιούνται οι κόκκοι ως υπόστρωμα δεν απαιτείται η απομόνωση ενός ή περισσότερων μικροοργανισμών και η χρησιμοποίηση εκλεκτικών υποστρωμάτων τις περισσότερες φορές εμπλουτισμένων με θρεπτικά υλικά.

1.1.5. Απομόνωση κεφιράνης

Για να θεωρηθεί μία τεχνική απομόνωσης του πολυσακχαρίτη επιτυχής θα πρέπει να πληροί δύο βασικές προϋποθέσεις. Η παραλαβή του παρασκευάσματος να εξασφαλίζει σημαντικό βαθμό ανάκτησής του και ταυτόχρονα να λαμβάνεται με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Για να εξασφαλιστεί μεγάλος βαθμός ανάκτησης θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε να μη χάνεται ποσότητα αυτού στα διάφορα στάδια επεξεργασίας. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά οι μέθοδοι επεξεργασίας αλλά και να υλοποιούνται με το σωστό τρόπο.

Όσον αφορά το βαθμό καθαρότητας, θα πρέπει να γίνει η απομάκρυνση των βακτηριακών κυττάρων, των πρωτεϊνών και των μικρού μοριακού βάρους ενώσεων (όπως μονοσακχαρίτες, άλατα, κ.τ.λ.). Η κεφιράνη είναι ένας εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης, που βρίσκεται συνδεδεμένος με τα βακτηριακά κύτταρα που την παράγουν. Εάν δεν απομακρυνθεί από αυτά θα απορριφθεί μαζί τους κατά τη διεργασία της φυγοκέντρωσης που συμπεριλαμβάνεται στη μεθοδολογία παραλαβής. Επιπλέον τόσο οι κόκκοι κεφίρ, οι οποίοι συνήθως χρησιμοποιούνται ως καλλιέργεια εκκίνησης, όσο και το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού τους (γάλα) περιέχουν πρωτεΐνες. Μάλιστα ο πολυσακχαρίτης μέσω των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει με τις πρωτεΐνες, μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί μαζί τους κατά τη φυγοκέντρωση. Τέλος, το υπόστρωμα περιέχει μονο- και δισακχαρίτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς για τον πολλαπλασιασμό τους και τη σύνθεση του πολυσακχαρίτη. Τα σάκχαρα αυτά μαζί με άλλες μικρού μοριακού βάρους ενώσεις που μπορεί να υπάρχουν (π.χ. άλατα) εάν δεν απομακρυνθούν μειώνουν σημαντικά την καθαρότητα του πολυσακχαρίτη που απομονώνεται.

Σύμφωνα με τους Ruas-Mediedo & de los Reyes-Gavilan (2005), η τεχνική απομόνωσης του πολυσακχαρίτη που θα επιλεγεί εξαρτάται από το είδος και τη σύσταση του υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται από διάφορους ερευνητές είναι το γάλα και ο (αποπρωτεϊνωμένος) ορός τυρογάλακτος για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων και διάφορα εκλεκτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με θρεπτικά συστατικά όταν για την παραγωγή της κεφιράνης χρησιμοποιούνται μεμονωμένες (καθαρές ή μικτές) καλλιέργειες των μικροοργανισμών που την παράγουν. Εμπλουτισμός με διάφορα θρεπτικά υλικά μπορεί να γίνει και στο γάλα ή στο τυρόγαλα.

1.1.5.1. Τεχνικές απομόνωσης

Οι Rimada & Abraham (2003) σύγκριναν συνδυασμούς διαφόρων σταδίων επεξεργασίας του πολυσακχαρίτη με σκοπό την παραλαβή του τόσο από γάλα όσο και από αποπρωτεϊνωμένο ορό τυρογάλακτος, στα οποία προηγουμένως είχαν επώασει κόκκους κεφίρ.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η θερμική επεξεργασία του υποστρώματος ως πρώτο στάδιο επεξεργασίας είναι βασική προϋπόθεση για την πλήρη ανάκτηση του πολυσακχαρίτη. Η διεργασία αυτή είναι πολύ σημαντική, καθώς προκαλεί το διαχωρισμό και την αποκόλληση-απομάκρυνση του πολυσακχαρίτη από τα βακτηριακά κύτταρα και τις πρωτεΐνες. Εάν δεν γίνει αυτό στα πρώτα στάδια επεξεργασίας υπάρχει περίπτωση η κεφιράνη να απομακρυνθεί μαζί με τα βακτήρια ή τις πρωτεΐνες κατά τη φυγοκέντρωση που ακολουθεί. Αυτός είναι και ο λόγος όπου στην περίπτωση που δεν εφαρμόστηκε θερμική επεξεργασία η ποσότητα κεφιράνης που παραλήφθηκε ήταν πολύ μικρή. Με τη θερμική επεξεργασία επίσης αδρανοποιούνται τα ένζυμα, τα οποία είναι πιθανόν ικανά να διασπάσουν τον πολυσακχαρίτη.

Σύμφωνα με τους συγγραφείς Rimada & Abraham (2003), η καταβύθιση του πολυσακχαρίτη με τη χρήση διπλάσιου όγκου ψυχρής αιθανόλης είναι αποτελεσματική (μεγάλος βαθμός ανάκτησης) για την απομάκρυνση των μικρού μοριακού βάρους ενώσεων (λακτόζης), μόνο όταν πραγματοποιηθεί σε δύο στάδια. Όταν η καταβύθιση με ψυχρή αιθανόλη πραγματοποιηθεί μία φορά, ποσότητα λακτόζης παραμένει μαζί με τον πολυσακχαρίτη μειώνοντας την καθαρότητά του. Στα πειράματα τους οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν αιθανόλη σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, -20°C και 4°C , οι οποίες ήταν εξίσου αποτελεσματικές (δεν επηρέασαν την ανάκτηση του πολυσακχαρίτη). Από αυτό συνεπάγεται ότι η θερμοκρασία των 4°C , η οποία είναι και η συνήθης που αναφέρεται στη βιβλιογραφία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αποτελεσματικότητα για την παραλαβή της κεφιράνης.

Αντί για δυο διαδοχικές καταβυθίσεις με αιθανόλη οι ίδιοι συγγραφείς χρησιμοποίησαν επίσης, ένα βήμα καταβύθισης με ψυχρή αιθανόλη σε συνδυασμό με μεμβράνες διαπίδυσης (1000 Da MWCO) ή απευθείας μεμβράνες διαπίδυσης (1000

Da MWCO ή 6000-8000 Da MWCO). Σε όλες τις περιπτώσεις η ποσότητα του πολυσακχαρίτη που παραλήφθηκε δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Επίσης, και η καθαρότητά του ως προς την απουσία λακτόζης ήταν η ίδια. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, και οι τέσσερες μέθοδοι επεξεργασίας ήταν αποτελεσματικές για την απομόνωση της κεφιράνης. Ωστόσο, όταν έγινε χρήση μεμβρανών μεγέθους πόρων (12000-14000 Da MWCO) μέρος του πολυσακχαρίτη απομακρύνθηκε, δεδομένου ότι οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες που παράγονται από τα LAB έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 1×10^4 - 1×10^6 g/mol.

Οι Rimada & Abraham (2003) αναφέρουν επίσης, ότι η κατεργασία με τριχλωροοξικό οξύ (TCA) μειώνει την ποσότητα του πολυσακχαρίτη που παραλαμβάνεται (ποσότητα αυτού απομακρύνεται μαζί με τις πρωτεΐνες κατά τη φυγοκέντρωση που ακολουθεί) αλλά είναι υποχρεωτική όταν απαιτείται η απομόνωση του πολυσακχαρίτη με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Οι Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan (2005) επίσης αναφέρουν ότι για την παραλαβή πολυσακχαριτών από υποστρώματα υψηλής συγκέντρωσης πρωτεϊνών απαιτείται επεξεργασία με TCA όταν είναι επιθυμητή η λήψη του πολυσακχαρίτη με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Οι συγγραφείς αναφέρουν επίσης, ότι θα μπορούσε να γίνει αντί για προσθήκη TCA, πέψη με τη χρήση πρωτεασών ή συνδυασμός κατεργασίας TCA με πέψη με τη χρήση πρωτεασών.

Σύμφωνα με τους Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan (2005), η πιο κοινή διαδικασία για την απομόνωση πολυσακχαριτών από σύνθετα μέσα περιλαμβάνει κατεργασία με TCA για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση τους και κατακρήμνιση του πολυσακχαρίτη με ψυχρή αιθανόλη (τουλάχιστον 2 στάδια). Φυσικά οι συγγραφείς αναφέρουν τη σημασία της θερμικής επεξεργασίας ως πρώτο στάδιο επεξεργασίας για την πλήρη ανάκτηση του πολυσακχαρίτη.

Όταν ο στόχος δεν είναι η απομόνωση του πολυσακχαρίτη για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του, αλλά μόνο η ποσοτικοποίησή του συνήθως δεν εφαρμόζεται το στάδιο της κατεργασίας με TCA. Αυτό συμβαίνει γιατί ο προσδιορισμός υδατανθράκων με τη μέθοδο Anthrone δεν επηρεάζεται από τη παρουσία των πρωτεϊνών (Rimada & Abraham, 2003).

1.1.5.2. Απόδοση του πολυσακχαρίτη κατά την παραγωγή και ανάκτησή του

Οι έρευνες σχετικά με την παραγωγή και απομόνωση της κεφिरάνης που υπάρχουν στη βιβλιογραφία αναφέρονται σε εργαστηριακό επίπεδο ή σε ζυμωτήρες μικρής κλίμακας. Το κύριο πρόβλημα που παρεμποδίζει την παραγωγή της σε βιομηχανικό επίπεδο είναι τα μικρά ποσοστά ανάκτησης του πολυσακχαρίτη που επιτυγχάνονται.

Οι Rimada & Abraham (2001) που απομόνωσαν τον πολυσακχαρίτη από ορό τυρογάλακτος, στον οποίο εμβολίασαν κόκκους κεφίρ αναφέρουν απόδοση 0,057 g/L και 0,103 g/L μετά από 5 ημέρες επώασης με ποσοστό εμβολίου 0,1% και 1%, αντίστοιχα. Οι Zajšek & Goršek (2011), οι οποίοι απομόνωσαν την κεφिरάνη από κόκκους κεφίρ βρήκαν ότι το ποσοστό του πολυσακχαρίτη στους κόκκους ήταν 1,65%. Οι Maeda et al. (2004a), οι οποίοι απομόνωσαν τον πολυσακχαρίτη από καθαρή καλλιέργεια του *Lactobacillus kefiranoformis*, αναφέρουν μέγιστη απόδοση 2,5 g/L μετά από 7 μέρες επώασης σε pH 5,0 και στους 33°C. Οι Dailin et al. (2016) που επίσης τον απομόνωσαν από καθαρή καλλιέργεια του *Lactobacillus kefiranoformis*, αναφέρουν μέγιστη απόδοση 1,91 g/L. Σε μικτή καλλιέργεια του *Lactobacillus kefiranoformis*, με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* η μέγιστη απόδοση ήταν 2,58 g/L (Cheirsilp & Radchabut, 2011).

1.1.6. Ιδιότητες κεφिरάνης

1.1.6.1. Χημική σύσταση

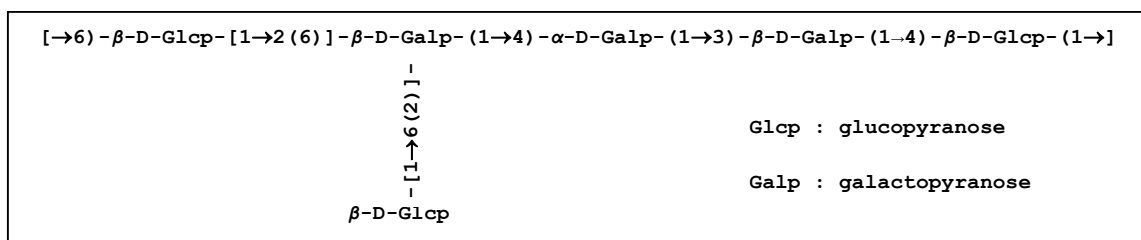
Η κεφिरάνη όπως προαναφέρθηκε, αποτελείται από σχεδόν ισομοριακές ποσότητες γλυκόζης και γαλακτόζης, ενώ οι αναφορές για το μέσο μοριακό της βάρος ποικίλουν ξεκινώντας από $7,6 \times 10^5$ έως $4,0 \times 10^6$ Da. Συγκεκριμένα, οι Yokoi et al. (1990), αναφέρουν ότι οι πολυσακχαρίτες (κεφिरάνη) που απομόνωσαν από κόκκους κεφίρ, όπως και από βακτήρια των κόκκων που πολλαπλασιάστηκαν σε εκλεκτικά υποστρώματα, περιείχαν ίσες αναλογίες γλυκόζης και γαλακτόζης και εμφάνισαν μοριακό βάρος ίσο με $1,0 \times 10^6$ και $4,0 \times 10^6$. Αναλογία μονοσακχαριτών 1:1 αναφέρουν και οι Micheli et al. (1999) που απομόνωσαν τον πολυσακχαρίτη κεφिरάνη τόσο από κόκκους κεφίρ, όσο και από στέλεχος λακτοβακίλου προερχόμενο από τους κόκκους.

Οι Ghasemlou et al. (2012), οι οποίοι απομόνωσαν την κεφιράνη από κόκκους κεφίρ, τους οποίους πολλαπλασίασαν σε ορό τυρογάλακτος εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ζύμης, βρήκαν ότι το μοριακό της βάρος ισούται με $1,35 \times 10^6$ Da και τη σύσταση μονομερών γλυκόζης προς γαλακτόζη να είναι 1,0:1,1. Οι Zajšek & Goršek (2011) και οι Zajšek et al. (2011), οι οποίοι πολλαπλασίασαν τους κόκκους κεφίρ (από τους οποίους απομόνωναν τον πολυσακχαρίτη) σε UHT γάλα αναφέρουν λόγο γλυκόζης προς γαλακτόζη 1,0:0,82 οι πρώτοι και 1,0:0,7, οι δεύτεροι.

Η κεφιράνη που παραλήφθηκε από καθαρή καλλιέργεια του *Lactobacillus kefiranofaciens* είχε μοριακό βάρος $7,6 \times 10^5$ και σύσταση μονομερών γλυκόζης προς γαλακτόζη 1,00:1,05 (Maeda et al., 2004a). Από μικτή καλλιέργεια του *Lactobacillus bulgaricus* με τους *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* και τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* απομονώθηκε ο πολυσακχαρίτης με λόγο γλυκόζης προς γαλακτόζη 1,0:0,94 (Frengova et al., 2002).

Οι διαφορές τόσο ως προς το ποσοστό των δύο μονομερών, όσο και ως προς το μοριακό βάρος της κεφιράνης πιθανόν να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες επώασης των κόκκων και των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωσή της (υπόστρωμα, θερμοκρασία επώασης, προέλευση κόκκων, κτλ).

Στη δομή της κεφιράνης παρατηρείται μια επαναλαμβανόμενη μονάδα πεντόζης, η οποία έχει σε τυχαίες θέσεις μία ή δύο μονοσακχαριτικές διακλαδώσεις (Σχήμα 1.6) (Kooiman, 1968; Micheli et al., 1999). Εξαιτίας των πολύπλοκων μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ενός ετεροπολυσακχαρίτη, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να παρουσιάσουν μεγάλη ποικιλία ως προς τη χημική σύσταση του πολυσακχαρίτη, το λόγο των μονομερών που συνυπάρχουν, τη δομή της επαναλαμβανόμενης μονάδας και φυσικά το μοριακό τους βάρος (Duboc & Mollet, 2001; Ruas-Madiedo et al., 2002). Η ποικιλομορφία της δομής των ετεροπολυσακχαριτών αυξάνει την ακαμψία των αλυσίδων τους, με αποτέλεσμα να γίνονται λιγότερο ευάλωτοι στην υδρόλυση από βιοκαταλύτες. (Kooiman, 1968; Ruas-Madiedo et al, 2002).



Σχήμα 1.6. Η δομή του μορίου της κεφिरάνης σύμφωνα με τους Kooiman (1968) και Micheli et al. (1999).

1.1.6.2. Τεχνολογική σημασία-Εφαρμογές κεφिरάνης

Χρήση ως ενισχυτικό της υφής

Η κεφिरάνη, όπως και άλλοι πολυσακχαρίτες που προέρχονται από LAB μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τροποποιητής υφής. Οι πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν τη συνεκτικότητα, το ιξώδες, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη σταθερότητα των προϊόντων, στα οποία προστίθενται (Duboc & Mollet, 2001).

Οι Rimada & Abraham (2006) αναφέρουν ότι η προσθήκη κεφिरάνης σε συγκέντρωση μέχρι 300 mg/L επηρεάζει τη ρεολογική συμπεριφορά των όξινων πηκτών γάλακτος, οι οποίες παρασκευάστηκαν με τη χρήση GDL (γλύκονο-δ-λακτόνης). Συγκεκριμένα, η προσθήκη του πολυσακχαρίτη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους, της θιξοτροπικής συμπεριφοράς και του ελαστικού χαρακτήρα των δειγμάτων, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που αναπτύχθηκαν μεταξύ κεφिरάνης και πρωτεϊνών γάλακτος. Ωστόσο, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της κεφिरάνης δεν επέφερε επιπλέον βελτίωση των ρεολογικών ιδιοτήτων των δειγμάτων. Οι Rimada & Abraham (2006) αναφέρουν επίσης, ότι η προσθήκη της κεφिरάνης δεν επηρέασε την κινητική της διεργασίας της πήξης, αλλά το χρόνο που πραγματοποιήθηκε. Συγκεκριμένα, στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη 300 mg/L κεφिरάνης η έναρξη σχηματισμού της πηκτής πραγματοποιήθηκε σε χρόνο 60 min και σε υψηλότερη τιμή pH (5,25), σε αντίθεση με τα δείγματα στα οποία δεν προστέθηκε ο πολυσακχαρίτης και σχημάτισαν πηκτή σε χρόνο 90 min και τιμή pH 5,0. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγγραφείς μελέτησαν την κινητική της πήξης του γάλακτος με μετρήσεις ιξώδους, όπου για να

πραγματοποιηθούν πρέπει να σπάσει η δομή του σχηματιζόμενου πλέγματος, τόσο για τη μεταφορά του δείγματος στο όργανο όσο και για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση. Η καταστροφή της δομής των πηκτών προκειμένου να μελετηθεί η κινητική της διεργασίας πήξης του γάλακτος μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια σημαντικών πληροφοριών, οι οποίες θα μπορούσαν να καταγραφούν και να μελετηθούν εάν οι ρεολογικές μετρήσεις γινόταν *in situ*, εφαρμόζοντας μία τάση στα όρια της γραμμικής ελαστικότητας, η οποία δε θα κατάστρεφε τη δομή των δειγμάτων.

Τη ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων κεφίρανης συγκεντρώσεων μέχρι και 3% μελέτησαν οι Piermaria et al. (2008) προσδιορίζοντας το φαινομενικό ιξώδες των δειγμάτων συναρτήσει της ταχύτητας διάτμησης. Σύμφωνα με τις καμπύλες ροής που προέκυψαν, τα διαλύματα κεφίρανης εκδήλωσαν νευτώνεια συμπεριφορά όταν η συγκέντρωση τους ήταν μικρότερη από 0,1%, η οποία μετατράπηκε σε ψευδοπλαστική με αύξηση της συγκέντρωσης του πολυσακχαρίτη σε τιμές πάνω από 0,1%. Οι συγγραφείς αναφέρουν επίσης, ότι σε συγκεκριμένη ταχύτητα διάτμησης παρατηρήθηκε αύξηση του φαινομενικού ιξώδους των δειγμάτων με την αύξηση της συγκέντρωσης της κεφίρανης.

Την επίδραση της προσθήκης αιθανόλης και καζεϊνών σε πηκτές κεφίρανης, οι οποίες παρασκευάστηκαν μετά την διαλυτοποίηση τους σε νερό κατά την αποθήκευση τους στους 5°C για τουλάχιστον 24 h, εξέτασαν οι Mukai et al. (1991). Η μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μετρώντας τη δύναμη διάτμησης των σχηματιζόμενων πηκτών. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, πολύ ασθενείς πηκτές κεφίρανης συγκέντρωσης 3% παρασκευάστηκαν μετά από 2 ή 3 ημέρες παραμονής στους 5°C. Ωστόσο, η προσθήκη αιθανόλης σε συγκέντρωση 8% στα διαλύματα κεφίρανης (3% συγκέντρωση) είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πηκτής αυξημένης συνεκτικότητας, η οποία μπορούσε να υποστηρίξει τη μάζα της, μέσα σε 24 h. Μάλιστα, η πηκτή αυτή εμφάνισε παρόμοια δύναμη διάτμησης με πηκτή που παρασκευάστηκε με ζελατίνη συγκέντρωσης 3% σε νερό. Οι συγγραφείς αποδίδουν την ενίσχυση της συνεκτικότητας του πλέγματος σε δεσμούς υδρογόνου που σχηματίστηκαν μεταξύ των υδροξυλομάδων της κεφίρανης και της αιθανόλης. Η προσθήκη καζεΐνης συγκέντρωσης 3% στο δείγμα που περιείχε 3% κεφίρανη και 8% αιθανόλη οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της δύναμης διάτμησης της σχηματιζόμενης πηκτής.

Οι Mukai et al. (1990) τροποποίησαν χημικά το μόριο της κεφिरάνης, ώστε να παρασκευάσουν καρβόξυ-μέθυλο-κεφिरάνη, η οποία σύμφωνα με τους συγγραφείς εμφάνισε έως και 14 φορές μεγαλύτερο ιξώδες από τα υδατικά διαλύματα κεφिरάνης. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν μέχρι 3%. Η προσθήκη ωστόσο, αιθανόλης συγκέντρωσης 3% σε διάλυμα καρβόξυ-μέθυλο-κεφिरάνης δεν οδήγησε στο σχηματισμό πηκτής εξαιτίας της δέσμευσης των ελεύθερων υδροξυλομάδων από τις καρβοξυ-μεθυλομάδες (Mukai et al., 1991).

Χρήση της κεφिरάνης για την παρασκευή εδώδινων και βιοδιασπώμενων μεμβρανών (films)

Οι βιομηχανίες παραγωγής και συσκευασίας τροφίμων, προκειμένου να βελτιώσουν την ποιότητα των τροφίμων, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους σε υλικά συσκευασίας τα οποία όχι μόνο προστατεύουν τα τρόφιμα από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και από τη μηχανική καταπόνηση, αλλά ταυτόχρονα δεν είναι επιβλαβή για το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, οι έρευνες έχουν στραφεί προς τη χρησιμοποίηση διαφόρων βιοπολυμερών όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και λιπίδια ως υλικά συσκευασίας, τα οποία είναι εδώδιμα ή βιοδιασπώμενα και επομένως φιλικά προς το περιβάλλον (Sorrentino et al., 2007; Siracusa et al., 2008). Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες για την ανεύρεση βιοπολυμερών κατάλληλων για τη δημιουργία μεμβρανών έχουν στραφεί και προς τον πολυσακχαρίτη που υπάρχει στους κόκκους κεφίρ, την κεφिरάνη.

Σύμφωνα με τους Piermaria et al. (2008), η κεφिरάνη μπορεί να σχηματίσει μεμβράνες σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5-10 g/Kg, οι οποίες όμως είναι εύθραυστες και άκαμπτες. Η προσθήκη ωστόσο, γλυκερόλης μπορεί να αυξήσει την ευκαμψία των μεμβρανών κεφिरάνης προσδίδοντας τους ιδιότητες συγκρίσιμες με αυτές των συνθετικών πολυμερών. Παρόμοια αποτελέσματα για τη δράση της γλυκερόλης παρουσία της κεφिरάνης αναφέρουν οι Piermaria et al. (2011) και οι Ghasemlou et al. (2011a; 2011b). Μάλιστα σύμφωνα με τους Ghasemlou et al. (2011b) η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης από 15% σε 35% είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της εκτατότητας των μεμβρανών και τη μείωση της δύναμης έκτασης. Εκτός από τη γλυκερόλη ως πλαστικοποιητές χρησιμοποιήθηκαν η σορβιτόλη (Piermaria et al., 2011; Ghasemlou et al., 2011a), καθώς επίσης και διάφορα σάκχαρα όπως η

γλυκόζη, η γαλακτόζη και η σακχαρόζη (Piermaria et al., 2011). Πιστεύεται (Piermaria et al., 2011; Ghasemlou et al., 2011a) ότι ο σχηματισμός εύκαμπτων μεμβρανών οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις των μορίων της κεφिरάνης με τα μόρια των πλαστικοποιητών, που επιφέρουν μεταβολές στη διαμόρφωση των μορίων της και επηρεάζουν τη δομή της μήτρας του συστήματος.

Η κεφिरάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό και με το άμυλο για την παρασκευή εδωδιμων βιοσύνθετων υλικών συσκευασίας, αλλά μόνο παρουσία γλυκερόλης, γιατί έχει διαπιστωθεί ότι μεμβράνες που παρασκευάστηκαν με ανάμιξη διαλυμάτων αμύλου και κεφिरάνης ήταν εξαιρετικά εύθραυστες και άκαμπτες (Motedayen et al., 2013).

Τέλος, οι Ghasemlou et al. (2011c) αναφέρουν ότι η προσθήκη ελαϊκού οξέος σε φιλμ κεφिरάνης βελτιώνει την εκτατότητά τους προκαλώντας ωστόσο, μείωση της δύναμης έκτασης τους. Τα φιλμ αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υδρόφοβα υλικά συσκευασίας, δεδομένου ότι εμφανίζουν μειωμένη διαπερατότητα υδρατμών.

Χρήση της κεφिरάνης στην παρασκευή κρυοπηκτών

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ο σχηματισμός κρυοπηκτών, ο οποίος βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς επιστημονικούς τομείς (βιοτεχνολογία, ιατρική, φαρμακευτική, κοσμετολογία) (Lozinsky et al., 2003; Gunko et al., 2013). Ο σχηματισμός τους είναι το αποτέλεσμα ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αλυσίδων πολυμερών κατά την κατάψυξη υδατικών διαλυμάτων τους, ως αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης τους τοπικά, εξαιτίας του σχηματισμού κρυστάλλων πάγου. Η δομή που σχηματίζεται παραμένει και μετά την απόψυξη του συστήματος (Lozinsky et al., 2003).

Την ικανότητα της κεφिरάνης να σχηματίζει κρυοπηκτές μελέτησαν οι Piermaria et al. (2008), παρασκευάζοντας διαλύματα του πολυσακχαρίτη συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0,594% έως 1,493% και εφαρμόζοντας ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης (κατάψυξη στους -20°C για 24 h και μεταφορά στην ψύξη στους 4°C για 24 h πριν από τις μετρήσεις). Η ρεολογική συμπεριφορά των δειγμάτων μελετήθηκε σε ρεόμετρο εφοδιασμένο με δειγματοφορέα γεωμετρίας παράλληλων πλακών με οδοντωτή επιφάνεια (serrated plates) εφαρμόζοντας τη δυναμική δοκιμή. Σύμφωνα με

τα αποτελέσματά τους, η κεφιράνη μπορεί να σχηματίσει κρυοπηκτές, οι οποίες εμφανίζουν σε συγκεκριμένη συχνότητα ταλάντωσης αυξημένες τιμές του G' (συντελεστής ελαστικότητας) κατά 35 φορές σε σχέση με τα υδατικά διαλύματα της ίδιας συγκέντρωσης, από τα οποία παρασκευάστηκαν. Επίσης, η αύξηση της συγκέντρωσης της κεφιράνης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ελαστικότητας των κρυοπηκτών μέχρι και συγκέντρωση 1,08%. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η μεγαλύτερη αύξηση των τιμών του G' παρατηρήθηκε με αύξηση της συγκέντρωσης από 0,874% σε 1,08%, ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης μέχρι 1,43% δεν επέφερε στατιστικά σημαντική αύξηση των τιμών του G' .

1.1.6.3. Βιολογική-θεραπευτική δράση κεφιράνης

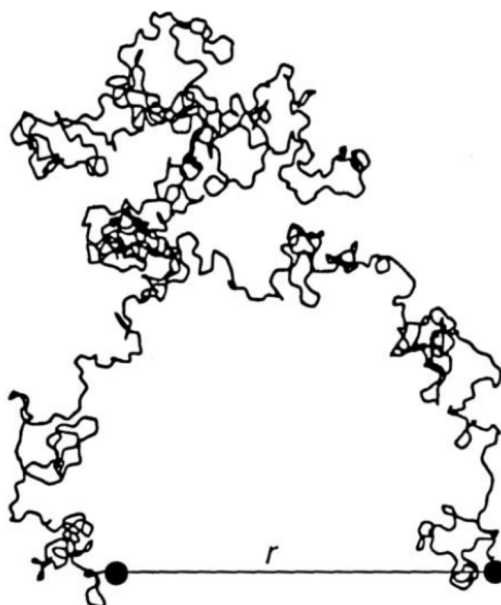
Διάφορες μελέτες, κυρίως σε πειραματόζωα, έχουν αποδώσει στην κεφιράνη ιδιότητες που προάγουν την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού, όπως ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, αντικαρκινική δράση (Farnworth, 2005; Rodrigues et al., 2005), καθώς επίσης αντιβακτηριδιακή και αντιμυκητιακή δράση (Rodrigues et al., 2005). Συγκεκριμένα, η κεφιράνη παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *Bacillus cereus* (Medrano et al., 2008) και στελεχών των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* (Rodrigues et al., 2005). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι βοηθάει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης, της χοληστερόλης, του σακχάρου στο αίμα (Maeda et al., 2004b; 2005) και της φλεγμονής των πνευμόνων που προκαλεί άσθμα (Kwon et al., 2008).

1.2. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός πολυσακχαριτών

1.2.1. Μοριακή διαμόρφωση πολυσακχαριτών σε διαλύματα

Στην περίπτωση των πολύ αραιών διαλυμάτων μη φορτισμένων πολυσακχαριτών, η συμπεριφορά τους δεν επηρεάζεται από την παρουσία άλλων μορίων πολυσακχαριτών αλλά μόνο από τον διαλύτη. Το πιο απλό μοντέλο ιδανικού μορίου πολυμερούς είναι αυτό της ευθείας αλυσίδας, η οποία αποτελείται από n μονομερή, με το κάθε ένα να έχει μήκος L και να μπορεί να προσανατολιστεί ελεύθερα ως προς τα γειτονικά του μονομερή. Η διαμόρφωση του μορίου μπορεί να

χαρακτηριστεί ως τυχαία στον χώρο (random-coil), όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.7, όπου r είναι η απόσταση των δύο άκρων της αλυσίδας, η οποία κατά μέσο όρο παίρνει τιμές μηδενικές δεδομένου ότι θεωρείται διάνυσμα τυχαίου προσανατολισμού (Walstra, 2003).



Σχήμα 1.7. Διαμόρφωση μορίου πολυσακχαρίτη αποτελούμενο από 250 μονομερή. Όπου r είναι η απόσταση των δύο άκρων της αλυσίδας (end to end distance) (Walstra, 2003).

Ως γυροσκοπική ακτίνα (radius of gyration R_g) ορίζεται ως η μέση τετραγωνική ρίζα της απόστασης όλων των μονομερών. Ο όγκος που καταλαμβάνει ένα μόριο πολυμερούς τυχαίας διαμόρφωσης, συμπεριλαμβανομένου και του διαλύτη, είναι πάντα ανάλογο της R_g^3 . Και επειδή η R_g είναι ανάλογη του μοριακού βάρους, ο όγκος που καταλαμβάνει ένα μόριο πολυσακχαρίτη αυξάνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους (Walstra, 2003).

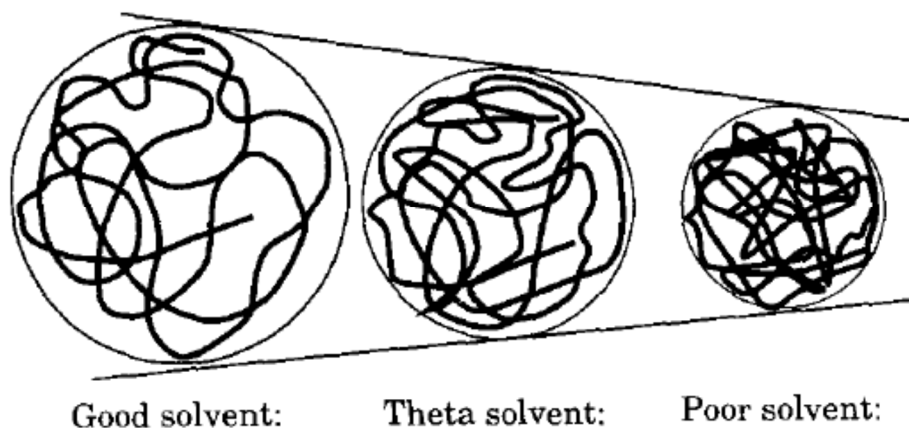
Η διαμόρφωση της τυχαίας αναδίπλωσης του ιδανικού μορίου πολυμερούς στην πράξη αλλάζει και μάλιστα επηρεάζεται από την ακαμψία της αλυσίδας και από το γεγονός ότι τα τμήματα της αλυσίδας των μορίων των πολυμερών καταλαμβάνουν συγκεκριμένο όγκο, τον οποίο δεν μπορεί να καταλάβει άλλο τμήμα ταυτόχρονα

(excluded volume). Αυτό σημαίνει ότι τα άκρα μίας αλυσίδας πολυμερούς εν διαλύσει βρίσκονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο (Walstra, 2003; van Vliet, 2014). Ωστόσο, στην πράξη τα μονομερή μίας αλυσίδας μπορεί να αλληλεπιδράσουν (είτε με ελκτικές είτε με απωστικές δυνάμεις) και αυτό εξαρτάται από τον διαλύτη στον οποίο βρίσκονται. Συγκεκριμένα, όταν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μονομερών της ίδιας αλυσίδας και του διαλύτη υπερσχύουν από αυτές των μονομερών μεταξύ τους, τα μόρια διογκώνονται και ο διαλύτης χαρακτηρίζεται ως καλός (good solvent), ενώ ο excluded volume, στην περίπτωση αυτή, είναι μεγαλύτερος από το μηδέν, το ίδιο ισχύει και για το δεύτερο δυναμικό συντελεστή, που συμβολίζεται ως B ή A₂ (second virial coefficient), ο οποίος δίνεται από την ακόλουθη σχέση (Koyama, 1959):

$$\frac{\Pi}{RTC} = \frac{1}{M} + A_2C + A_3C^2 + \dots \quad 1.1$$

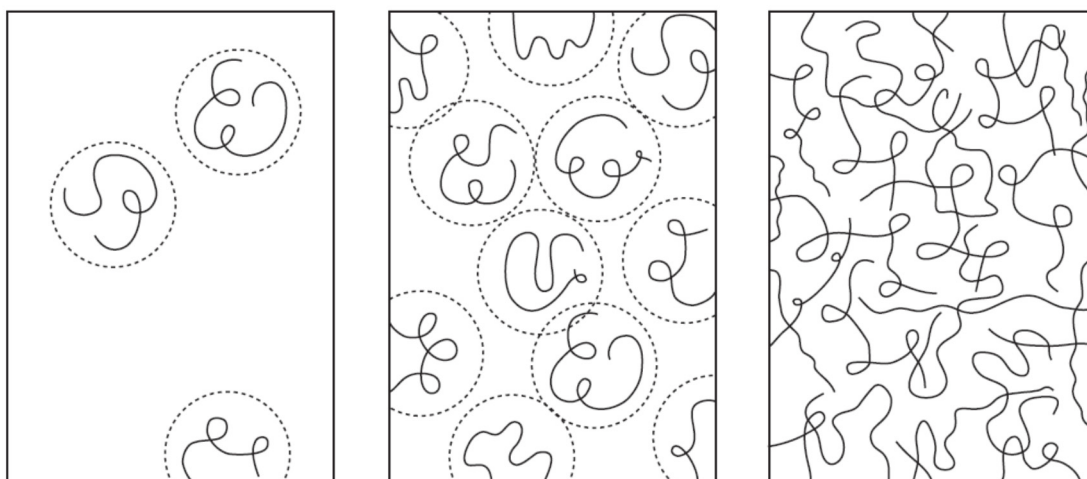
όπου Π είναι η ωσμωτική πίεση, R η σταθερά των αερίων, T η απόλυτη θερμοκρασία, C η συγκέντρωση κατά βάρος του πολυμερούς και M το μοριακό βάρος του πολυμερούς.

Στην περίπτωση όπου οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μονομερών της ίδιας αλυσίδας υπερσχύουν αυτών μεταξύ των μονομερών και του διαλύτη, τα μόρια των πολυμερών συστέλλονται και ο διαλύτης χαρακτηρίζεται ως κακός (poor solvent), ενώ ο excluded volume και ο δεύτερος δυναμικός συντελεστής είναι μικρότερος του μηδενός. Ο διαλύτης χαρακτηρίζεται ως Θ (theta solvent) όταν δεν υπερσχύει κάποιο είδος αλληλεπίδρασης και ο excluded volume και ο δεύτερος δυναμικός συντελεστής είναι ίσος με το μηδέν (Σχήμα 1.8) (Rubinstein & Colby, 2003; Grosberg & Khokhlov 2011).



Σχήμα 1.8. Μόρια πολυμερών τυχαίας αναδίπλωσης σε διάφορους διαλύτες (καλός διαλύτης: αριστερά; κακός διαλύτης: δεξιά; Θ διαλύτης: κέντρο) (Gedde, 1995).

Τα μόρια των περισσότερων πολυσακχαριτών σε κατάσταση διαλύματος όπως προαναφέρθηκε προσλαμβάνουν μορφή τυχαίας διαμόρφωσης στο χώρο (random-coil) και κινούνται με την κίνηση Brown. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις τα μακρομόρια βρίσκονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο και μπορούν και μετακινούνται ανεξάρτητα με τη μορφή της περιδινούμενης σπείρας (random-coil). Με την αύξηση της συγκέντρωσης, ωστόσο, επέρχεται μία κατάσταση όπου τα μακρομόρια έρχονται σε επαφή το ένα με το άλλο και για να μετακινηθούν πρέπει να επικαλύψουν (coil overlap) και να διαπεράσουν το ένα το άλλο (Σχήμα 1.9).



Σχήμα 1.9. Σχηματική απεικόνιση μεγαλομορίων σε καθεστώς αραιού διαλύματος (αριστερά), πυκνού διαλύματος (δεξιά) και διαλύματος ενδιάμεσης συγκέντρωσης (semi-dilute) στο κέντρο (de Gennes 1979; van Vliet, 2014).

Οι μεμονωμένες αλυσίδες των πολυμερών μπορούν να μετακινηθούν μόνο διασχίζοντας το διαπλεκόμενο δίκτυο (entangled network) των γειτονικών αλυσίδων. Η έναρξη της αλληλεπικάλυψης (coil overlap) των μορίων καθορίζεται από δύο παράγοντες: τον αριθμό των αλυσίδων του πολυσακχαρίτη, ο οποίος είναι ανάλογος της συγκέντρωσης, και από τον όγκο που καταλαμβάνει η κάθε μία (Tadros, 2010; van Vliet, 2014).

1.2.2. Προσδιορισμός μοριακού βάρους πολυσακχαριτών με υδροδυναμικές μετρήσεις

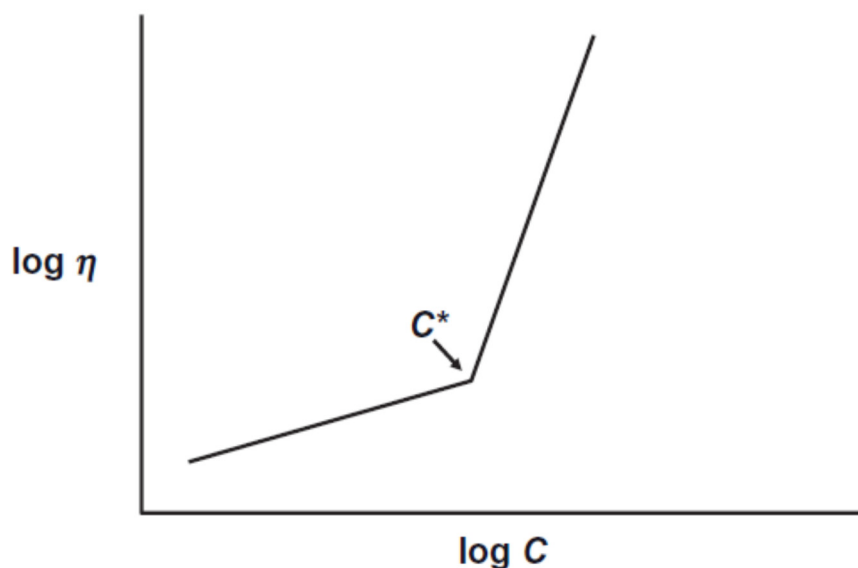
Μια πολύ σημαντική παράμετρος, η οποία χαρακτηρίζει τη μετάβαση από αραιά διαλύματα σε πυκνά είναι η κρίσιμη συγκέντρωση (C^*), η οποία μπορεί να υπολογιστεί μέσω του προσδιορισμού του σχετικού (relative, η_{rel}) και του ειδικού ιξώδους (specific, η_{sp}), διαλυμάτων πολυσακχαριτών διαφόρων συγκεντρώσεων, που δίδονται από τις σχέσεις:

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_s} \quad 1.2$$

και

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{t - t_s}{t_s} \quad 1.3$$

όπου t και t_s είναι οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων του πολυσακχαρίτη σε διάφορες συγκεντρώσεις και του διαλύτη, αντίστοιχα, οι οποίοι προσδιορίζονται με τη χρήση τριχοειδούς ιξωδομέτρου π.χ. τύπου Ubbelohde. Συγκεκριμένα, η C^* προσδιορίζεται από τη γραφική παράσταση σε διπλή λογαριθμική κλίμακα του ειδικού ιξώδους συναρτήσει της συγκέντρωσης των διαλυμάτων των πολυσακχαριτών. Στο σημείο όπου αντιστοιχεί το C^* , η κλίση της ευθείας γραμμής μεταβάλλεται, οπότε στο διάγραμμα εμφανίζονται δύο διακριτές περιοχές αναφορικά με την κλίση της ευθείας (Σχήμα 1.10) (Morris et al, 1981; Tadros, 2010; van Vliet, 2014).



Σχήμα 1.10. Μεταβολή του ειδικού ιξώδους συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλυμάτων πολυσακχαριτών για την εύρεση της κρίσιμης συγκέντρωσης (C^*) (Tadros, 2010).

Μία χρήσιμη παράμετρος που χαρακτηρίζει τον υδροδυναμικό όγκο των αλυσίδων των πολυσακχαριτών είναι το εσωτερικό (intrinsic) ιξώδες $[\eta]$ (εκφράζει την αύξηση του ιξώδους ανά μεμονωμένη αλυσίδα πολυσακχαριτών). Σε αραιά διαλύματα τα μόρια του πολυσακχαρίτη βρίσκονται το ένα απομακρυσμένο από τα άλλα και το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$ του πολυσακχαρίτη εξαρτάται μόνο από τις διαστάσεις των μορίων του (υδροδυναμικός όγκος). Δεδομένου ότι το εσωτερικό ιξώδες ενός πολυσακχαρίτη συσχετίζεται με το μοριακό βάρος και την γυροσκοπική ακτίνα, αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό του μορίου του. Για να προσδιοριστεί το εσωτερικό ιξώδες θα πρέπει η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη να είναι τέτοια, ώστε το σχετικό ιξώδες (t/t_s) των διαλυμάτων να έχει τιμή περίπου 1,2 με 2,0. Το εσωτερικό ιξώδες προσδιορίζεται σε αραιά διαλύματα του πολυσακχαρίτη από την τεταγμένη επί την αρχή (ordinate) του διαγράμματος με συντεταγμένες τον αριθμό ιξώδους (viscosity number, η_{sp}/C) και την συγκέντρωση C . Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο εξισώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό του εσωτερικού ιξώδους, αυτή του Huggins (εξίσωση 1.4) και αυτή του Kraemer (εξίσωση 1.5) (Rao, 1999; Wang & Cui 2005).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C \quad 1.4$$

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C \quad 1.5$$

Όπου C είναι η συγκέντρωση των αραιών διαλυμάτων πολυσακχαριτών, ενώ k' και k'' είναι οι σταθερές των Huggins και Kraemer, αντίστοιχα.

Οι εξισώσεις των Huggins και Kraemer δίνουν ευθείες γραμμές που τέμνουν τους άξονες η_{sp}/C και $\ln \eta_{rel}/C$, αντίστοιχα. Η εύρεση του εσωτερικού ιξώδους γίνεται για τιμές σχετικού ιξώδους μεταξύ 1,2 και 2,0 και ειδικού ιξώδους 0,2 και 1,0. Η σταθερά k' εκφράζει τις αλληλεπιδράσεις των μορίων του πολυσακχαρίτη, ενώ οι τιμές του κυμαίνονται στο 0,3 για καλούς διαλύτες, στο 1,0 για τους Θ διαλύτες, ενώ μεγαλύτερες τιμές υποδηλώνουν ότι τα μόρια του πολυσακχαρίτη αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Οι δύο συντελεστές συνδέονται μεταξύ τους με τη σχέση (Rao, 1999):

$$k' = k'' + 0,5 \quad 1.6$$

Για κάθε πολυσακχαρίτη, που ως γνωστό, είναι συστήματα πολυδιασποράς (polydisperse), το εσωτερικό ιξώδες εξαρτάται από το μέσο μοριακό βάρος κατά ιξώδες (viscosity average molecular weight) $\overline{M}_v$, σύμφωνα με την εξίσωση των Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K \overline{M}_v^a \quad 1.7$$

Οι τιμές των σταθερών K και a ποικίλουν από σύστημα σε σύστημα (δηλ. για τον ίδιο πολυσακχαρίτη σε ποιο διαλύτη και σε τι συγκέντρωση ή κανονικότητα του διαλύτη είναι διαλυμένος ο πολυσακχαρίτης) και μπορούν να προσδιοριστούν υπολογιστικά μετά τον προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί με διάφορες μεθόδους όπως αυτή της στατικής σκέδασης φωτός και της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού που προσδιορίζει το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος (weight average molecular weight) $\overline{M}_w$, της οσμομετρίας μεμβράνης που προσδιορίζει το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό (number average molecular weight) $\overline{M}_n$ (Wang & Cui 2005).

1.2.3. Υδροδυναμικές παράμετροι συστημάτων διασποράς

Η ρεολογική συμπεριφορά των συστημάτων διασποράς εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ τριών δυνάμεων: της κίνησης Brown, των υδροδυναμικών αλληλεπιδράσεων και των δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ των σωματιδίων. Οι δυνάμεις αυτές καθορίζονται από τρεις παραμέτρους: α) το κλάσμα όγκου (ϕ) (συνολικός όγκος των σωματιδίων διαιρούμενος δια τον όγκο του συστήματος διασποράς), β) το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων και γ) από την καθαρή ενέργεια αλληλεπιδράσεων (net energy of interaction) G_T , η οποία εκφράζει την ισορροπία μεταξύ των ελκτικών και απωστικών δυνάμεων. Η θεωρία που περιγράφει τη σχέση μεταξύ του σχετικού ιξώδους και του κλάσματος όγκου εκφράζεται με την εξίσωση του Einstein, η οποία βρίσκει εφαρμογή για $\phi \leq 0,01$ (Tadros, 2010).

Συγκεκριμένα, ο Einstein υπέθεσε ότι τα σωματίδια συμπεριφέρονται ως άκαμπτες σφαίρες (hard spheres) χωρίς να εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις. Επομένως, σε καθεστώς ροής η συνεχής φάση πρέπει να κινηθεί γύρω από τα αιωρούμενα σωματίδια. Για τιμές $\phi \leq 0,01$ η ανατάραξη που προκαλείται γύρω από ένα σωματίδιο δεν προκαλεί αλληλεπιδράσεις με την ανατάραξη γύρω από άλλο σωματίδιο. Το σχετικό ιξώδες συσχετίζεται με το ϕ σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση Einstein (Tadros, 2010):

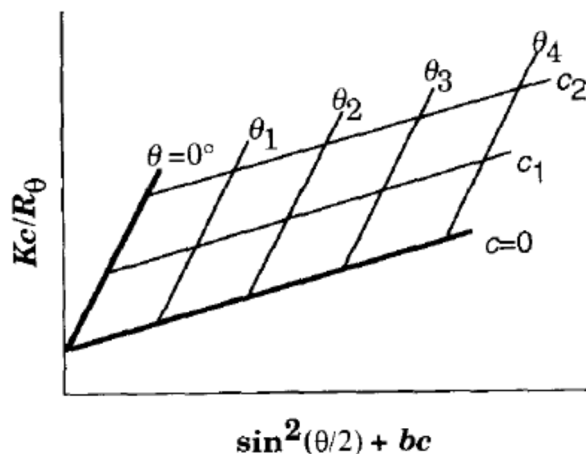
$$\eta_{rel} = 1 + [\eta]\phi = 1 + 2,5\phi \quad 1.8$$

Το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$ στην εξίσωση έχει τιμή που ισούται με 2,5. Συστήματα πολύ αραιών συγκεντρώσεων, όπου τα σωματίδια συμπεριφέρονται ως σφαίρες, εκδηλώνουν νευτώνεια συμπεριφορά (Tadros, 2010).

1.2.4. Προσδιορισμός μοριακών παραμέτρων πολυσακχαριτών σε κατάσταση διαλύματος με την τεχνική της στατικής σκέδασης του φωτός (static light scattering)

Μία από τις μεθόδους προσδιορισμού μοριακού βάρους είναι η στατική σκέδαση φωτός μέσω της κατασκευής του διαγράμματος Zimm. Συγκεκριμένα, από τη σκέδαση αραιών διαλυμάτων πολυσακχαριτών σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης κατασκευάζεται το διάγραμμα Zimm του Σχήματος 1.11., από τα σημεία του οποίου σχεδιάζονται οι προεκτάσεις για συγκέντρωση $C=0$ και $\Theta=0$. Από την κλίση της

προέκτασης $C=0$ προσδιορίζεται η γυροσκοπική ακτίνα (R_g), ενώ από την κλίση της προέκτασης $\Theta=0$ υπολογίζεται ο δεύτερος δυναμικός συντελεστής (B ή A_2 , second virial coefficient). Από το σημείο τομής των δύο προεκτάσεων στον άξονα y προσδιορίζεται το $1/M_w$ (Gedde, 1995; Wang & Cui 2005).

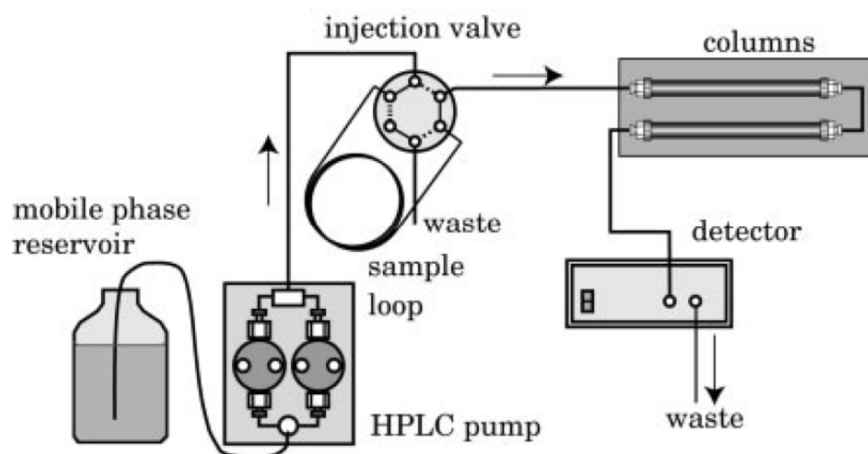


Σχήμα 1.11. Διάγραμμα Zimm (Gedde, 1995).

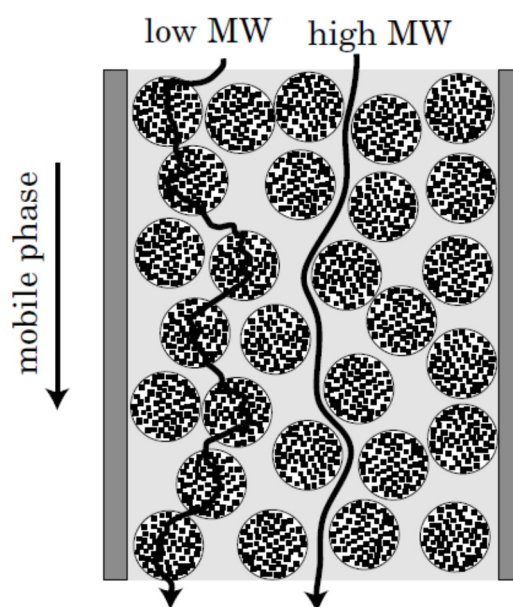
1.2.5. Προσδιορισμός μοριακών παραμέτρων πολυσακχαριτών σε κατάσταση διαλύματος με την τεχνική της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography)

Η τεχνική της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον προσδιορισμό της κατανομής του μοριακού βάρους των πολυμερών. Ένα τυπικό σύστημα διαχωρισμού φαίνεται στο Σχήμα 1.12. Μία αντλία υψηλής πίεσης μεταφέρει το διαλύτη, ο οποίος ονομάζεται κινητή φάση, στη στήλη ή σε μια σειρά από στήλες διαχωρισμού με μία σταθερή παροχή. Μικρή ποσότητα δείγματος πολυμερούς, που είναι διαλυμένο στον ίδιο διαλύτη με αυτόν της κινητής φάσης, εισέρχεται στο σύστημα μέσω ειδικού συστήματος έγχυσης και οδηγείται προς τη στήλη. Στη στήλη διαχωρισμού εκλούνται πρώτα τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια, δεδομένου ότι τα μικρότερου μεγέθους μόρια ακολουθούν διαφορετική διαδρομή μέσω των πόρων της στατικής φάσης με αποτέλεσμα να εκλούνται αργότερα (Σχήμα 1.13). Η ανίχνευση πραγματοποιείται μετά την έξοδο από

τη στήλη με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης, όπου ο προσδιορισμός του μέσου μοριακού βάρους γίνεται με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς προτύπων πολυμερών. Επίσης τα τελευταία χρόνια υπάρχει η δυνατότητα σύνδεσης ανιχνευτών σκέδασης φωτός με πολλαπλές γωνίες σκέδασης που δίνουν τη δυνατότητα να προσδιοριστούν και άλλες παράμετροι εκτός από το μοριακό βάρος, όπως η γυροσκοπική ακτίνα (Teraoka, 2002; Wang & Cui, 2005).



Σχήμα 1.12. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Teraoka, 2002).



Σχήμα 1.13. Μεταφορά των μορίων των πολυμερών διαφορετικού μοριακού βάρους εντός της στήλης μοριακού αποκλεισμού (Teraoka, 2002).

1.3. Ρεολογικές τεχνικές μελέτης πηκτών, ψευδοπηκτών και κολλοειδών συστημάτων

1.3.1. Ρεολογία-Βασικές έννοιες

Με τη μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών ασχολείται η ρεολογία, η επιστήμη της ροής και της παραμόρφωσης των υλικών. Η μελέτη των ρεολογικών/μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών είναι πολύ σημαντική, καθώς αυτές επηρεάζουν τη δομή των τελικών προϊόντων και καθορίζουν την επιλογή του μηχανολογικού εξοπλισμού στα εργοστάσια παραγωγής και επεξεργασίας τους.

Προκειμένου να μελετηθεί η ρεολογική συμπεριφορά των υλικών, εφαρμόζεται σε αυτά μία δύναμη (F), η οποία εκφράζεται πάντα ανά μονάδα επιφανείας και ονομάζεται τάση (σ) (Steffe, 1996).

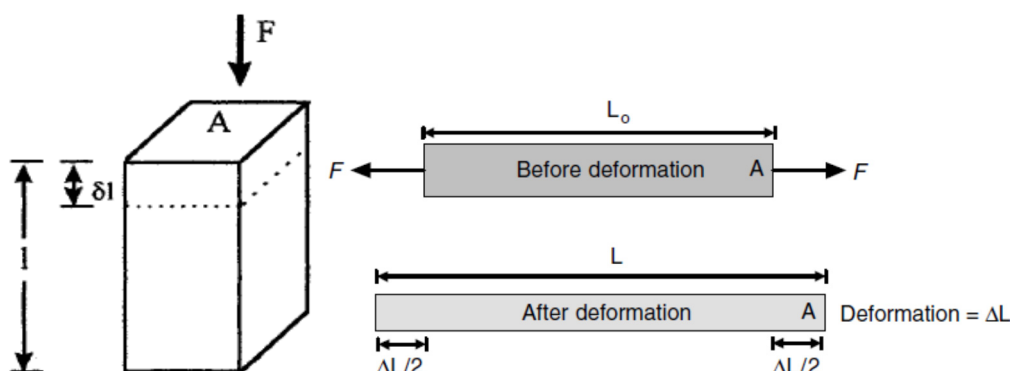
$$(\sigma) = \left(\frac{F}{A} \right) \quad 1.9$$

Στην περίπτωση ενός στερεού υλικού, αποτέλεσμα της εφαρμογής της τάσης είναι η μεταβολή των διαστάσεων του (παραμόρφωση). Ο βαθμός παραμόρφωσης που υφίσταται το υλικό είναι ανάλογος του μεγέθους της τάσης που ασκείται σε αυτό. Στα στερεά η παραμόρφωση εκφράζεται ως μεταβολή της αρχικής τους διάστασης (dl/l). Στην περίπτωση των ρευστών, η επιβολή τάσης προκαλεί τη ροή του υλικού που εκφράζεται από το ρυθμό διάτμησης $\left(\dot{\gamma} \right)$ που ορίζεται ως (Steffe, 1996):

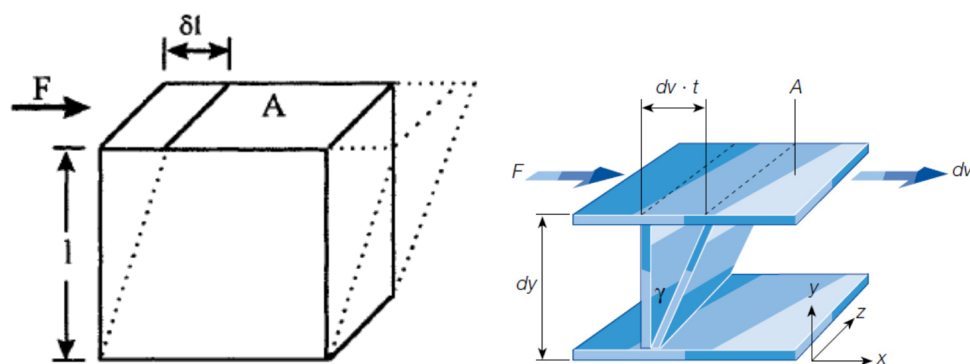
$$\left(\dot{\gamma} \right) = \frac{dv}{dy} \quad 1.10$$

Όπου dv είναι η μεταβολή της ταχύτητας με την οποία κινούνται οι στιβάδες των μορίων ενός ρευστού το οποίο βρίσκεται σε καθεστώς στρωτής ροής, η μία σε σχέση με την άλλη και dy είναι η απόσταση που έχουν οι στιβάδες μεταξύ τους.

Η δύναμη παραμόρφωσης μπορεί να εφαρμοστεί είτε κάθετα (Σχήμα 1.14) είτε εφαπτομενικά (παράλληλα) (Σχήμα 1.15) στην επιφάνεια εφαρμογής. Όταν ασκείται εφαπτομενικά ονομάζεται διατμητική, ενώ στην περίπτωση που εφαρμόζονται κάθετα ονομάζεται κανονική και διακρίνεται σε δύναμη συμπίεσης ή εφελκυσμού (Steffe, 1996) (Σχήμα 1.14).



Σχήμα 1.14. Εφαρμογή κανονικής κάθετης, (normal), τάσης (F/A) συμπίεσης (αριστερά) ή εφελκυσμού (δεξιά). Το δοκίμιο συμπιέζεται κατά δl από το αρχικό του ύψος l (αριστερά) ή επιμηκύνεται κατά ΔL από το αρχικό του μήκος L_0 (δεξιά).



Σχήμα 1.15. Εφαρμογή διατμητικής τάσης (F/A) σε στερεό (αριστερά) και ρευστό (δεξιά) υλικό. Το δοκίμιο παραμορφώνεται κατά δl από το αρχικό του ύψος l (αριστερά), ενώ τα στρώματα των μορίων που αποτελούν ένα ρευστό υλικό απέχουν απόσταση μεταξύ τους dy και κινούνται με ταχύτητα dv (δεξιά).

Ανάλογα με τη συμπεριφορά των υλικών (στερεών και ρευστών) κατά την εφαρμογή της τάσης διακρίνονται τρία είδη παραμόρφωσης η ιδανική ελαστική, η ιδανική πλαστική και η ιδανική ιξώδης παραμόρφωση. Τα δυο πρώτα είδη παραμόρφωσης αναφέρονται σε στερεά σώματα και το τρίτο σε ρευστά. Κατά την ιδανική ελαστική συμπεριφορά, η παραμόρφωση αρχίζει αμέσως μετά την άρση εφαρμογής της τάσης και εξαφανίζεται στιγμιαία και εντελώς μετά την άρση εφαρμογής της. Επίσης, η τάση είναι ανάλογη της παραμόρφωσης. Σε αυτήν την περίπτωση ισχύει ο νόμος του Hooke (Hookean στερεά). Στην ιδανική πλαστική συμπεριφορά η παραμόρφωση αρχίζει μόνο όταν η τάση φτάσει μία ελάχιστη τιμή (τάση διαρροής), ενώ η παραμόρφωση είναι μόνιμη και δεν εξαφανίζεται όταν η τάση παύει να ασκείται. Στα ιδανικά ρευστά η παραμόρφωση, η οποία είναι ανάλογη της ταχύτητας διάτμησης, αρχίζει αμέσως μετά την εφαρμογή της τάσης και παραμένει μετά την άρση εφαρμογής της. Τα ιδανικά ρευστά ακολουθούν το νόμο του Νεύτωνα (Νευτώνεια ρευστά) (Whorlow, 1992; Steffe, 1996).

Οι παραπάνω περιπτώσεις αφορούν τη συμπεριφορά ιδανικών υλικών (στερεών ή ρευστών). Στην πραγματικότητα όμως δεν υπάρχουν τέλεια στερεά και τέλεια ρευστά. Τα περισσότερα υλικά εκδηλώνουν μία ενδιάμεση συμπεριφορά και συμπεριφέρονται ως ιξωδοελαστικά σώματα. Δηλαδή συμπεριφέρονται συγχρόνως ως στερεά (ελαστικά) και ως ρευστά (ιξώδη). Συγκεκριμένα, υπό την επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης παρουσιάζουν συνεχή παραμόρφωση, ενώ με την άρση εφαρμογής της τάσης επανέρχονται μερικώς στην αρχική τους κατάσταση (Whorlow, 1992; Steffe, 1996).

Προκειμένου να μελετηθεί η ρεολογική συμπεριφορά των υλικών έχουν αναπτυχθεί διάφορες ρεολογικές δοκιμές, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη τη φύση των υλικών (στερεά, ρευστά, πηκτές, ψευδοπηκτές, κ.τ.λ.), καθώς επίσης και τις ιδιότητες που χρειάζεται να μελετηθούν (δομή, φύση δεσμών, κ.τ.λ.). Βάσει του μεγέθους της παραμόρφωσης που ασκείται στο υλικό οι ρεολογικές δοκιμές διακρίνονται σε μικρής και μεγάλης παραμόρφωσης.

Στις δοκιμές μικρής παραμόρφωσης η τάση εφαρμόζεται εντός των ορίων της γραμμικής ελαστικότητας. Αυτό σημαίνει ότι η παραμόρφωση που υφίσταται το δοκίμιο είναι μικρή και δεν καταστρέφει, ανεπανόρθωτα, τη δομή του. Μάλιστα μετά

την άρση εφαρμογής της τάσης το δείγμα επανέρχεται μερικώς ή πλήρως στην αρχική του κατάσταση ανάλογα με το χρόνο που μεσολαβεί από την άρση εφαρμογής της τάσης και την ρεολογική «μνήμη» του υλικού, όπως καθορίζεται από τον αριθμό της Δεββώρα (Deborah number) που ισχύει για το υλικό. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή της τάσης μπορεί να προκαλέσει τη θραύση των ασθενών δευτερευόντων δεσμών του υλικού, κάποιοι από τους οποίους ή όλοι ξαναδημιουργούνται μετά την άρση εφαρμογής της τάσης. Οι δοκιμές μικρής παραμόρφωσης μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη φύση των υλικών και συγκεκριμένα για τον ιξωδοελαστικό τους χαρακτήρα. Δηλαδή για το κατά πόσο συμπεριφέρονται σαν στερεά ή ρευστά.

Η τάση που εφαρμόζεται στις δοκιμές μεγάλης παραμόρφωσης είναι εκτός των ορίων γραμμικής ελαστικότητας προκαλώντας την κατάρρευση της δομής ενός υλικού. Σε αυτήν την περίπτωση και ανάλογα με το βαθμό παραμόρφωσης καταστρέφεται μεγάλος αριθμός ισχυρών πρωτευόντων και δευτερευόντων δεσμών προκαλώντας μόνιμη παραμόρφωση στο δοκίμιο. Με τις δοκιμές μεγάλης παραμόρφωσης μπορούν, επίσης να ληφθούν πληροφορίες για τη δομή των υλικών.

1.3.2. Ιξώδες

Μία από τις πιο σημαντικές ρεολογικές ιδιότητες των υγρών είναι το ιξώδες (που συμβολίζεται ως μ είτε ως η), το οποίο εκφράζει την αντίσταση ενός ρευστού στη ροή και αποτελεί μέτρο της εσωτερικής του τριβής. Όπως προαναφέρθηκε, η παραμόρφωση που υφίστανται τα ρευστά υλικά, ως αποτέλεσμα της εφαρμογής τάσης, εκφράζεται ως ρυθμός παραμόρφωσης ή ταχύτητα παραμόρφωσης, ή ταχύτητα διάτμησης (Steffe, 1996).

1.3.2.1. Νευτώνεια ρευστά

Στην περίπτωση των ιδανικών ρευστών ισχύει η εξίσωση του Νεύτωνα (Steffe, 1996):

$$\sigma = \mu \times \dot{\gamma} \quad 1.11$$

Όπου: μ = ιξώδες, $\dot{\gamma}$ = ρυθμός διάτμησης και σ = τάση

σύμφωνα με την οποία το ιξώδες είναι ανεξάρτητο της εφαρμοζόμενης τάσης. Τα ρευστά που υπακούουν σε αυτήν τη σχέση χαρακτηρίζονται ως νευτώνεια, έχουν σταθερή τιμή ιξώδους, ανεξάρτητη από την ταχύτητα διάτμησης, ενώ το ιξώδες τους καλείται πραγματικό. Η νευτώνεια συμπεριφορά είναι χαρακτηριστική ορισμένων μόνο ρευστών όπως ελαίων, ζαχαροδιαλυμάτων και γλυκερόλης. Τα περισσότερα ρευστά αποκλίνουν από αυτήν τη συμπεριφορά και χαρακτηρίζονται ως μη νευτώνεια.

1.3.2.2. Μη-νευτώνεια ρευστά

Ρευστά με μη-χρονικά εξαρτώμενη ροή

Υπάρχουν διάφοροι τύποι μοντέλων (εξίσωση εκθετικού νόμου, εξίσωση Bingham, εξίσωση Herschel-Bulkley) που χαρακτηρίζουν τη ρεολογία των μη-νευτώνειων ρευστών, των οποίων η συμπεριφορά δεν επηρεάζεται από το χρόνο. Σύμφωνα με την εξίσωση του εκθετικού νόμου (Power law) η τάση που εφαρμόζεται ισούται με (Steffe, 1996):

$$\sigma = k \times \dot{\gamma}^n \quad 1.12$$

όπου k είναι ο συντελεστής συνεκτικότητας και n ο δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς. Ο συντελεστής συνεκτικότητας εκφράζει το ιξώδες ενός ρευστού, ενώ ο δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς αποτελεί μέτρο της νευτώνειας συμπεριφοράς του. Όταν $n < 1$ τότε τα ρευστά ονομάζονται ψευδοπλαστικά. Στα ψευδοπλαστικά ρευστά το ιξώδες μειώνεται καθώς αυξάνεται η ταχύτητα διάτμησης. Στην περίπτωση όπου $n > 1$ τα ρευστά ονομάζονται διασταλτικά. Σε αυτήν την κατηγορία ρευστών το ιξώδες αυξάνεται με την αύξηση της ταχύτητας διάτμησης. Παραδείγματα ρευστών που υπακούουν στον εκθετικό νόμο αποτελούν τα διαλύματα πολυμερών.

Η εξίσωση του Bingham περιγράφεται από την ακόλουθη σχέση:

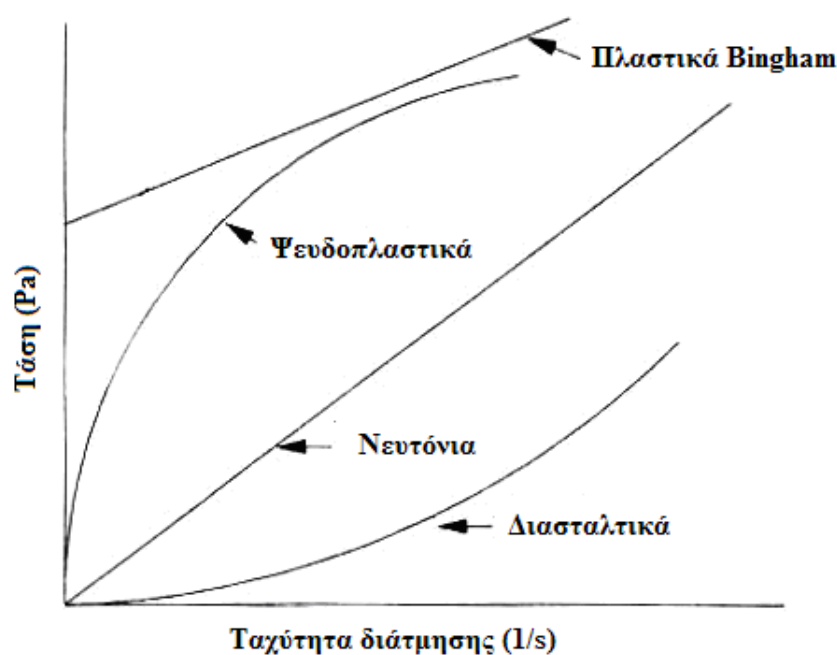
$$\sigma = \sigma_y + \left(\eta \times \dot{\gamma} \right) \quad 1.13$$

όπου σ_y είναι η οριακή τάση ή τάση διαρροής (yield stress), η οποία απαιτείται να εφαρμοστεί για να αρχίσει η ροή του ρευστού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ρευστού Bingham αποτελεί το κέτσαπ τομάτας.

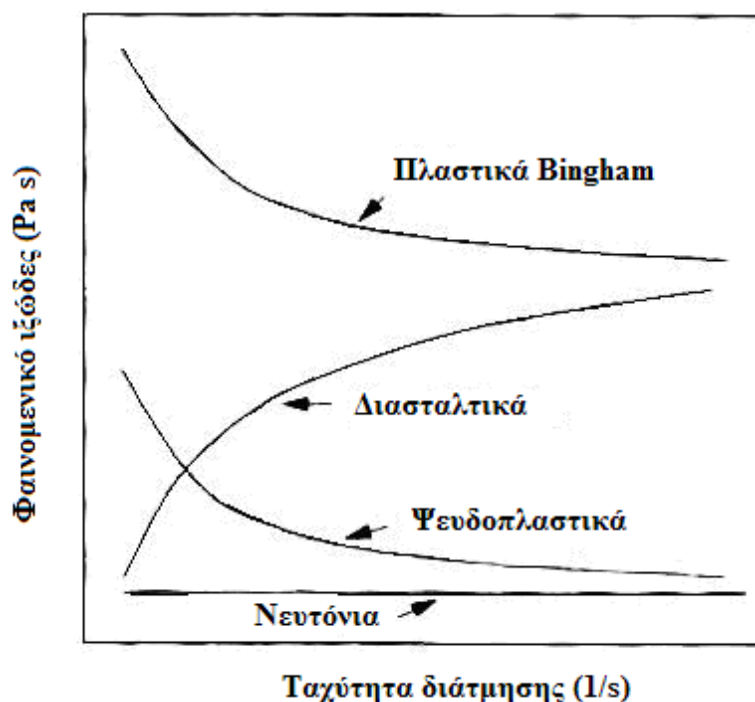
Η εξίσωση Herschel-Bulkley:

$$\sigma = \sigma_y + \left(k \times \dot{\gamma}^n \right) \quad 1.14$$

αναφέρεται σε ρευστά όπου για να ξεκινήσει η ροή τους απαιτείται η εφαρμογή τάσης διαρροής και το ιξώδες τους επηρεάζεται από την ταχύτητα διάτμησης. Στα Σχήματα 1.16 και 1.17 φαίνεται η μεταβολή της τάσης και του φαινομενικού ιξώδους, αντίστοιχα, σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης για τις διάφορες κατηγορίες ρευστών (Steffe, 1996).



Σχήμα 1.16. Μεταβολή της τάσης συναρτήσει της ταχύτητας διάτμησης για τις διάφορες κατηγορίες ρευστών (Steffe, 1996).



Σχήμα 1.17. Μεταβολή του φαινομενικού ιξώδους συναρτήσει της ταχύτητας διάτμησης για τις διάφορες κατηγορίες ρευστών (Steffe, 1996).

Η ψευδοπλαστική συμπεριφορά υποδηλώνει κατάρρευση ή αναδιάταξη της δομής, η οποία έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη αντίσταση στη ροή. Αντίθετα, η διασταλτική συμπεριφορά αποτελεί ένδειξη ανάπτυξης ή αναδιάταξης της δομής, η οποία οδηγεί σε αυξημένη αντίσταση στην εφαρμοζόμενη δύναμη.

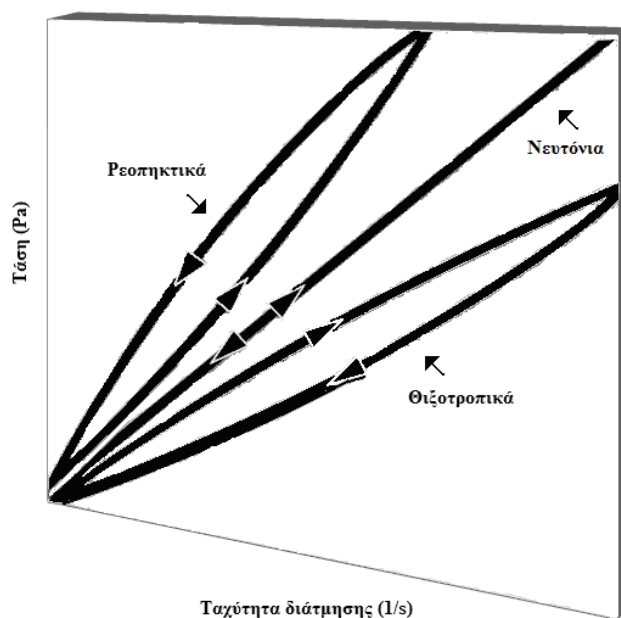
Τα μόρια των ψευδοπλαστικών ρευστών έχουν υψηλό μοριακό βάρος, φέρουν φορτισμένες ομάδες, βρίσκονται σε επαρκή συγκέντρωση, είναι ευέλικτα, ενώ το μέγεθος και το σχήμα τους επιτρέπει να εμφανίζουν αυξημένο υδροδυναμικό όγκο. Τα ανωτέρω συντελούν στη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ γειτονικών μορίων, οι οποίες όμως δεν είναι ισχυρές. Έτσι, ενώ σε μικρές ταχύτητες διάτμησης τα μόρια φέρουν αντίσταση στη ροή, με την εφαρμογή υψηλών τιμών ταχύτητας διάτμησης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων μειώνονται και τα μόρια προσανατολίζονται εύκολα προς την φορά της ροής.

Οι παράγοντες, οι οποίοι συντελούν στην ψευδοπλαστικότητα, επηρεάζουν και τη διασταλτική συμπεριφορά. Ωστόσο, η συγκέντρωση (σε υψηλές τιμές), το μέγεθος και το σχήμα των μορίων παίζουν πιο σημαντικό ρόλο στα διασταλτικά ρευστά. Τα

μόρια σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να λεχθεί ότι είναι πολύ κοντά το ένα στο άλλο και έρχονται σε επαφή, με αποτέλεσμα η αντίσταση που προβάλλουν να αυξάνεται με την αύξηση της δύναμης παραμόρφωσης, αφού γίνεται δύσκολος ο προσανατολισμός τους προς τη φορά της ροής.

Ρευστά με χρονικά εξαρτώμενη ροή

Η συμπεριφορά των ρευστών που περιγράφηκε πιο πάνω δεν είναι χρονικά εξαρτώμενη. Ωστόσο υπάρχει μία κατηγορία ρευστών, των οποίων η συμπεριφορά εξαρτάται από το χρόνο και διακρίνονται περαιτέρω σε θιξοτροπικά και ρεοπηκτικά ρευστά. Στα θιξοτροπικά ρευστά για μία συγκεκριμένη ταχύτητα διάτμησης το ιξώδες μειώνεται με το χρόνο, ενώ στα ρεοπηκτικά αυξάνεται (Σχήμα 1.18). Δηλαδή η θιξοτροπική συμπεριφορά μπορεί να λεχθεί ότι είναι χρονικά εξαρτώμενη ψευδοπλαστική συμπεριφορά, ενώ η ρεοπηκτική, χρονικά εξαρτώμενη διασταλτική συμπεριφορά. Το ιξώδες των χρονικά εξαρτώμενων ρευστών επίσης ονομάζεται φαινομενικό (Steffe, 1996).



Σχήμα 1.18. Μεταβολή της τάσης συναρτήσει της ταχύτητας διάτμησης στα χρονικά εξαρτώμενα και στα νευτώνεια ρευστά.

Η θιξοτροπία υποδηλώνει μία συνεχή κατάρρευση ή αναδιάταξη της δομής, η οποία εκφράζεται με μειωμένη αντίσταση στη ροή κατά την εφαρμογή τάσης. Κατά την περίοδο άρσης εφαρμογής της ταχύτητας διάτμησης ένα υλικό μπορεί να ανακτήσει πλήρως, ή μερικώς την αρχική του δομή. Η ρεοπηκτική συμπεριφορά αποτελεί ένδειξη συνεχούς δημιουργίας ή αναδιάταξης της δομής με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αυξημένη αντίσταση στη ροή.

1.3.3. Δοκιμές μικρής παραμόρφωσης

Από τις δοκιμές μικρής παραμόρφωσης θα περιγραφούν η δυναμική δοκιμή και η δοκιμή ερπυσμού. Και οι δύο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των πηκτών, των ψευδο-πηκτών και των κολλοειδών συστημάτων.

1.3.3.1. Δυναμική δοκιμή

Κατά τη δυναμική δοκιμή ή δοκιμή ταλάντωσης στο δοκίμιο εφαρμόζεται μία αρμονική δύναμη, μία ταλάντωση είτε κάθετα είτε παράλληλα προς την επιφάνεια εφαρμογής του υλικού και η οποία βρίσκεται εντός των ορίων της γραμμικής ελαστικότητας (Ferry, 1980; Steffe, 1996). Το δείγμα βρίσκεται, συνήθως, μεταξύ δύο παράλληλων πλακών εκ των οποίων η κάτω παραμένει ακίνητη ενώ η επάνω κινείται παλινδρομικά και στην περίπτωση της διάτμησης κινείται σε οριζόντια διεύθυνση πάντα σε επαφή με το δείγμα (Σχήμα 1.19). Αν υποθεθεί ότι εφαρμόζεται απλή ημιτονοειδής διάτμηση τότε η παραμόρφωση γ σε συνάρτηση με το χρόνο t δίνεται από τη σχέση (Steffe, 1996):

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad 1.15$$

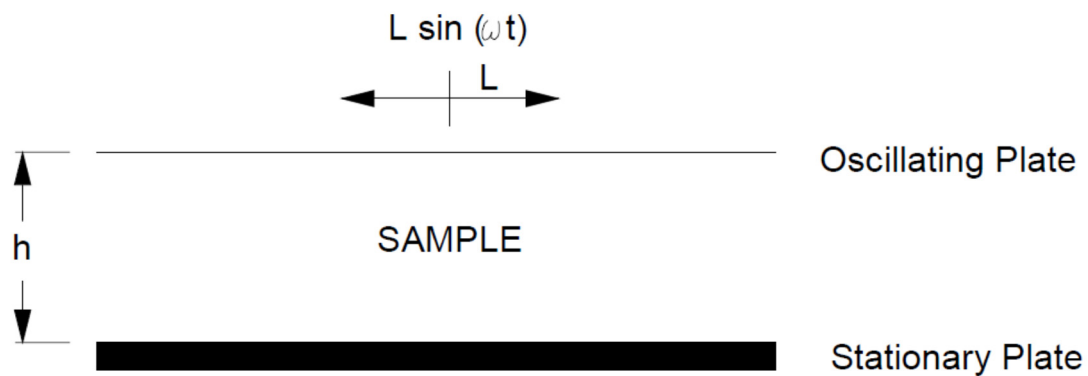
όπου γ_0 είναι το πλάτος της παραμόρφωσης και ισούται με L/h όταν η επάνω πλάκα κινείται με $L \sin(\omega t)$ (Σχήμα 1.19), ενώ ω είναι η συχνότητα ταλάντωσης.

Στην περίπτωση αυτή ο περιοδικός ρυθμός διάτμησης προκύπτει από τη σχέση 1.15 ως παράγωγος της παραμόρφωσης γ :

$$\frac{d\gamma}{dt} = \dot{\gamma} = \frac{d(\gamma_0 \sin(\omega t))}{dt} \quad 1.16$$

η οποία μπορεί να γραφεί ως:

$$\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega \cos(\omega t) \quad 1.17$$



Σχήμα 1.19. Εφαρμογή δυναμικής δοκιμής μεταξύ δύο παράλληλων πλακών (Steffe, 1996).

Για παραμορφώσεις εντός των ορίων της γραμμικής ελαστικότητας, η διατμητική τάση σ κατά την προαναφερθείσα παραμόρφωση δίνεται από τη σχέση:

$$\sigma = \sigma_o \sin(\omega t + \delta) \quad 1.18$$

όπου σ_o είναι το πλάτος της διατμητικής τάσης και δ είναι η καθυστέρηση φάσης ή μετατόπιση φάσης. Αν και οι δύο όροι της εξίσωσης διαιρεθούν με γ_o προκύπτει:

$$\frac{\sigma}{\gamma_o} = \left[\frac{\sigma_o}{\gamma_o} \right] \sin(\omega t + \delta) \quad 1.19$$

Η διατμητική τάση που προκύπτει από μια ημιτονοειδή παραμόρφωση μπορεί να γραφεί και ως:

$$\sigma = G' \gamma + (G''/\omega) \dot{\gamma} \quad 1.20$$

όπου G' είναι ο συντελεστής ελαστικότητας (elastic ή storage modulus) και G'' ο συντελεστής ιξώδους (viscous ή loss modulus). Και οι δύο είναι συναρτήσεις της συχνότητας και μπορούν να εκφραστούν ως λόγος πλάτους και μετατόπισης φάσης:

$$G' = \left[\frac{\sigma_o}{\gamma_o} \right] \cos(\delta) \quad 1.21$$

και

$$G'' = \left[\frac{\sigma_o}{\gamma_o} \right] \sin(\delta) \quad 1.22$$

Το G' γ_o μπορεί να ερμηνευθεί ως το μέρος της τάσης σε φάση με τη παραμόρφωση και το G'' γ_o το μέρος της τάσης που είναι κατά 90° εκτός φάσης με τη παραμόρφωση. Άλλες παράμετροι που μπορούν να υπολογιστούν είναι ο μιγαδικός συντελεστής G^* (complex modulus):

$$G^* = \left[\frac{\sigma_o}{\gamma_o} \right] = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad 1.23$$

και το μιγαδικό ιξώδες η^* (complex viscosity):

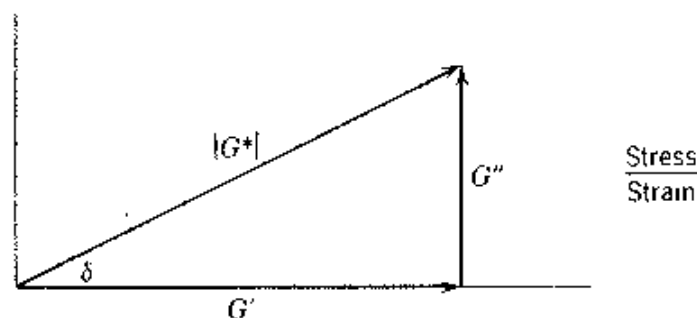
$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} = \sqrt{(\eta')^2 + (\eta'')^2} \quad 1.24$$

όπου, η' είναι το δυναμικό ιξώδες και η'' είναι το εκτός φάσης μέρος του η^* .

Μια άλλη παράμετρος που συχνά χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ιξωδοελαστική συμπεριφορά των υλικών είναι η εφαπτομένη της γωνίας δ , η οποία είναι επίσης συνάρτηση της συχνότητας:

$$\tan \delta = G''/G' \quad 1.25$$

Η $\tan \delta$ εκφράζει το λόγο της απώλειας ενέργειας προς την ενέργεια που αποθηκεύεται, ανά κύκλο ταλάντωσης (Σχήμα 1.20).



Σχήμα 1.20. Διανυσματική ανάλυση των συντελεστών ιξώδους και ελαστικότητας σε ημιτονοειδή διάτμηση (Ferry, 1980).

Κατά τη δοκιμή ταλάντωσης υπό καθεστώς διάτμησης οι ρεολογικές παράμετροι που συνήθως μετρούνται είναι ο G' , ο G'' και η $\tan\delta$.

Για την κατανόηση της φυσικής σημασίας των παραμέτρων αυτών θα αναφερθεί η συμπεριφορά των ιδανικών στερεών υλικών (Hookean solids) και των ιδανικών υγρών υλικών (Newtonian liquids) κατά την εφαρμογή της δυναμικής δοκιμής. Η ρεολογική συμπεριφορά των ιδανικών στερεών χαρακτηρίζεται από το ότι η τάση με την παραμόρφωση είναι σε φάση και η γωνία δ έχει τιμή μηδέν. Οπότε G'' και η' είναι μηδέν γιατί δεν υπάρχει καμιά απώλεια ενέργειας λόγω απουσίας του ιξώδους και το G' είναι σταθερό και ίσο με το συντελεστή διάτμησης G . Εάν ένα υλικό συμπεριφέρεται ως ιδανικό ρευστό, τότε η τάση με την παραμόρφωση είναι εκτός φάσης κατά 90° . Σε αυτή την περίπτωση το G' και το η'' είναι μηδέν γιατί το υλικό δεν έχει την ιδιότητα να αποθηκεύει ενέργεια. Οπότε, το η' είναι ίσο με το νευτώνειο ιξώδες. Σε ένα ιξωδοελαστικό υλικό η τάση και η παραμόρφωση είναι εκτός φάσης και η γωνία δ παίρνει τιμές μικρότερες από 90° (Steffe, 1996) (Σχήμα 1.21).

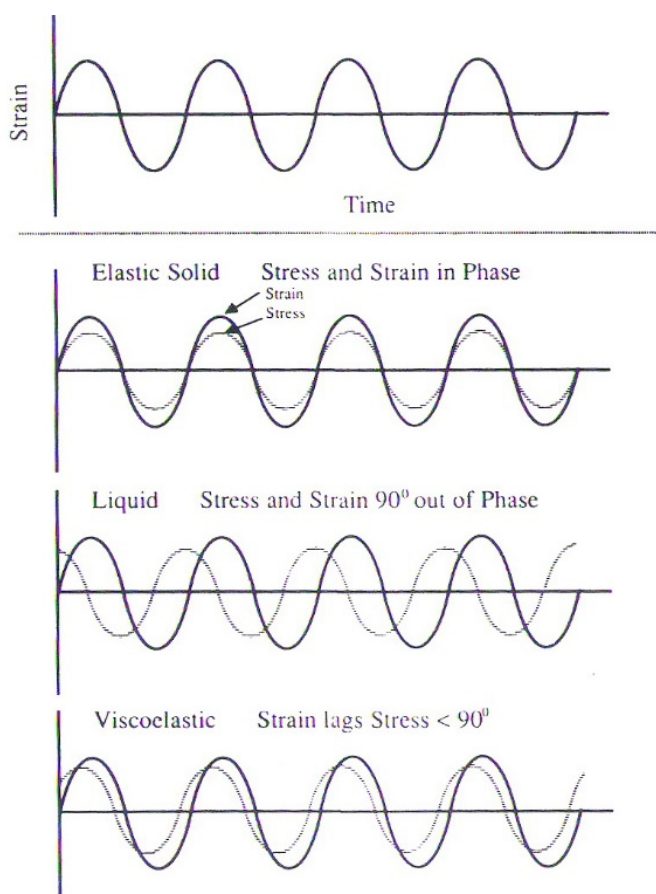
Για να προσδιοριστούν τα όρια της γραμμικής ελαστικότητας πραγματοποιείται η δοκιμή σάρωσης τιμών τάσης ή παραμόρφωσης (amplitude test), όπου το πλάτος της ταλάντωσης μεταβάλλεται, και οι συντελεστές G' και G'' καταγράφονται συναρτήσει της τάσης ή της παραμόρφωσης. Στη γραμμική περιοχή οι τιμές των δύο συντελεστών δεν επηρεάζονται από την εφαρμοζόμενη τάση ή παραμόρφωση (Σχήμα 1.22) (Steffe, 1996).

Η δυναμική δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί είτε ως σάρωση συχνοτήτων είτε ως σάρωση σε σχέση με το χρόνο αλλά σε συγκεκριμένη συχνότητα. Στην πρώτη περίπτωση μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για τον ιξωδοελαστικό χαρακτήρα ενός

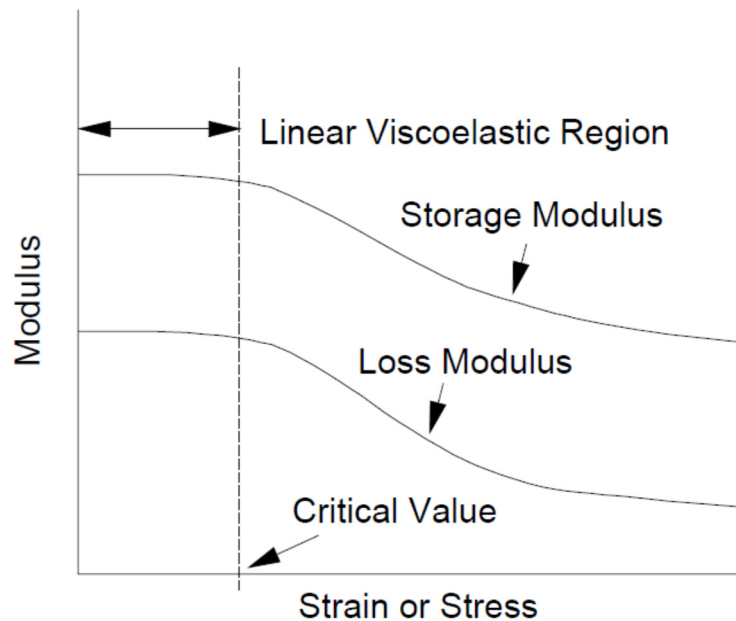
υλικού, ενώ στη δεύτερη περίπτωση μπορεί να μελετηθεί ο σχηματισμός της δομής μιας πηκτής ή ψευδο-πηκτής.

Όταν η δυναμική δοκιμή εφαρμόζεται σε σχέση με το χρόνο, τότε οι δύο συντελεστές έχουν σχεδόν μηδενική τιμή μέχρι να αρχίσει ο σχηματισμός της πηκτής (έναρξη σχηματισμού αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων). Στο σημείο όπου παρατηρείται έναρξη του σχηματισμού της δομής, οι δύο συντελεστές αρχίζουν να αυξάνονται με ρυθμό ανάλογο του ρυθμού συνένωσης των μορίων. Τη μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάζει ο G' , του οποίου οι τιμές υπερσχύουν καθόλη τη διάρκεια σχηματισμού της πηκτής.

Η δυναμική δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί είτε με σταθερή τάση είτε με σταθερή παραμόρφωση. Προτιμάται η εφαρμογή σταθερής παραμόρφωσης γιατί διασφαλίζει ότι η τάση που εφαρμόζεται είναι σίγουρα μέσα στα όρια της γραμμικής ελαστικότητας.

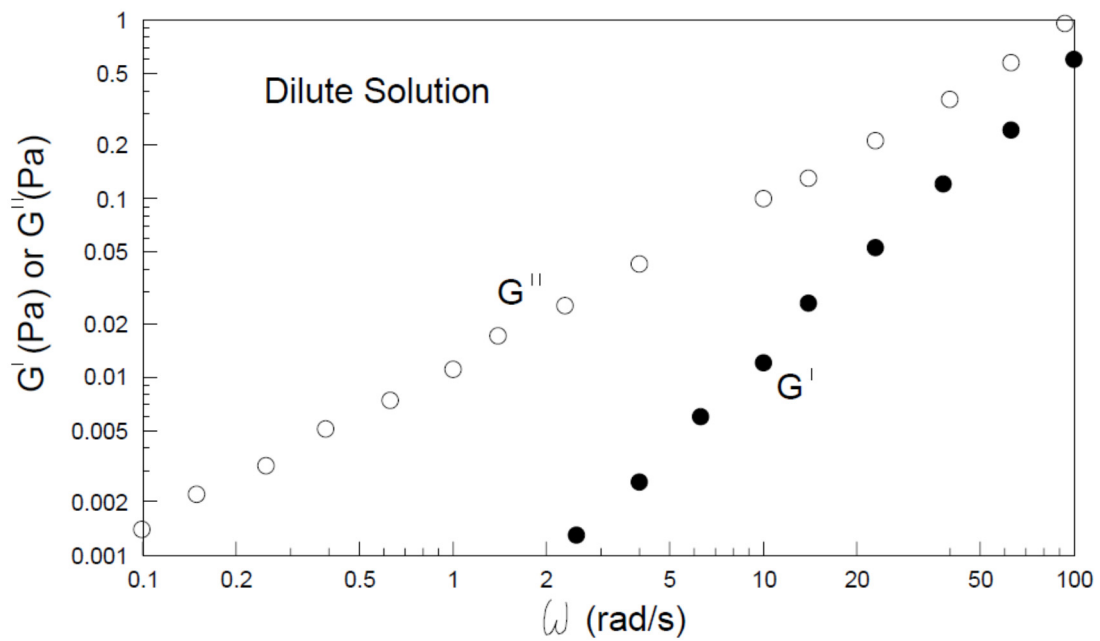


Σχήμα 1.21. Καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης ελαστικού, ιξώδους και ιξωδοελαστικού υλικού κατά την εφαρμογή της δυναμικής δοκιμής (Rao, 1992).

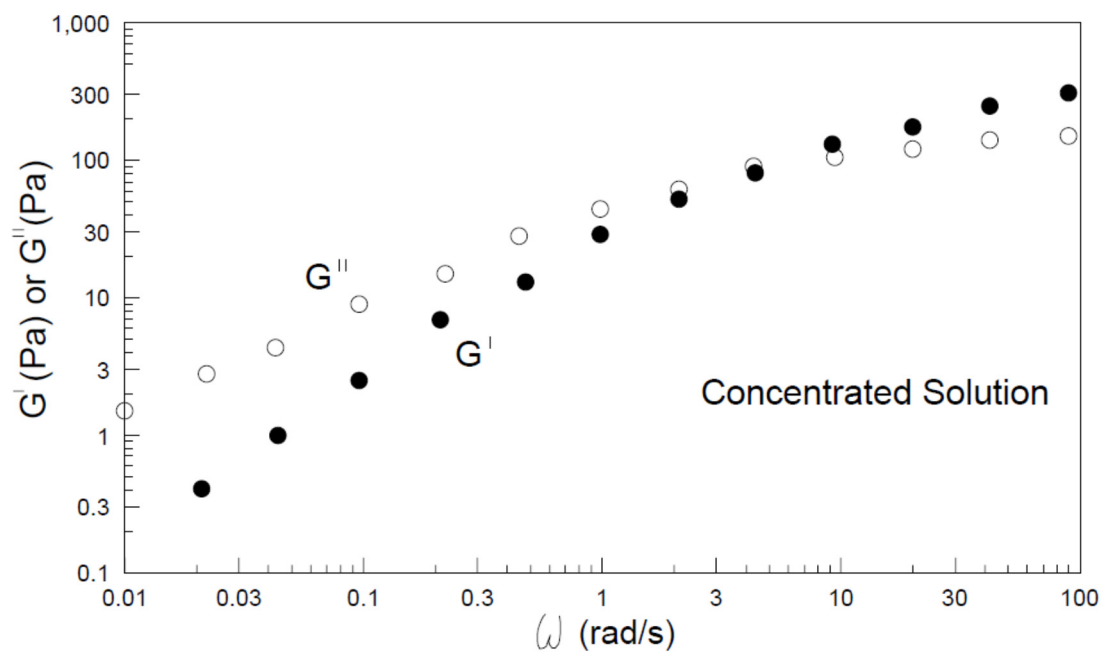


Σχήμα 1.22. Μεταβολή των συντελεστών ελαστικότητας (storage modulus) και ιξώδους (loss modulus) συναρτήσει της παραμόρφωσης ή της τάσης, για τον καθορισμό της γραμμικής ελαστικής περιοχής κατά τη δυναμική δοκιμή (Steffe, 1996).

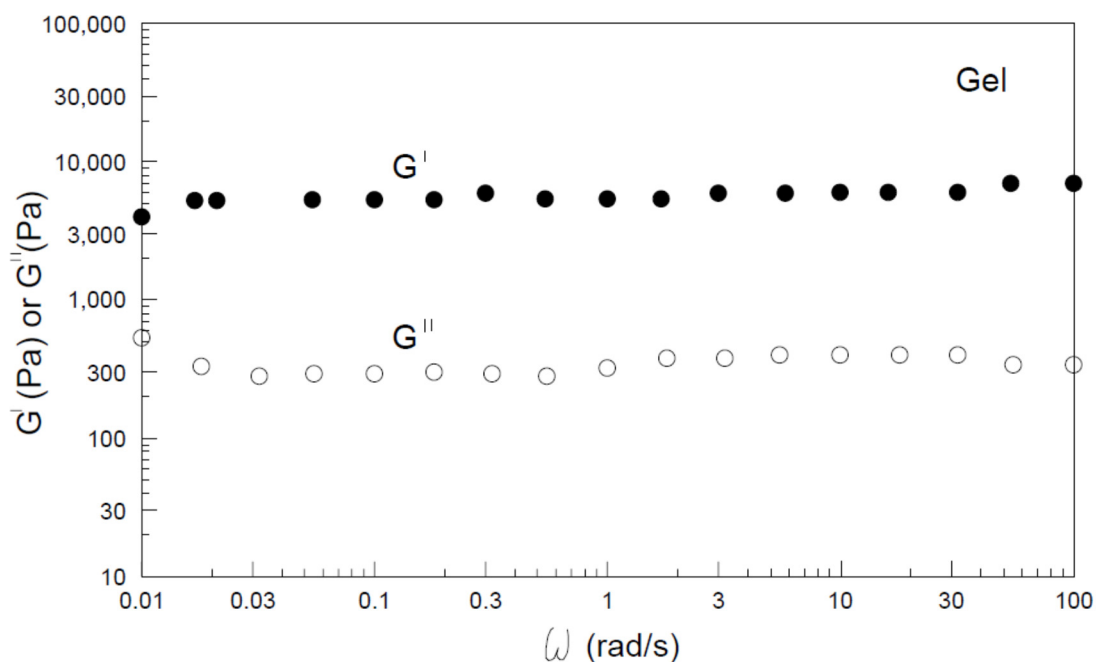
Στα Σχήματα 1.23 έως 1.25 φαίνονται τα διαγράμματα της σάρωσης συχνοτήτων για ένα αραιό διάλυμα, για ένα πυκνό διάλυμα και για μία πηκτή αντίστοιχα. Σε ένα πολύ αραιό διάλυμα ο G'' θα είναι μεγαλύτερος από τον G' σε όλο το εύρος των συχνοτήτων μέτρησης. Αυτό σημαίνει ότι ο ιξώδης χαρακτήρας υπερισχύει του ελαστικού. Στην περίπτωση ενός διαλύματος μεγαλύτερης συγκέντρωσης, ενώ αρχικά ο G'' υπερισχύει του G' (σε χαμηλές συχνότητες) στη συνέχεια ο G' αποκτά τιμές μεγαλύτερες από αυτές του G'' (μεγαλύτερες συχνότητες). Το σημείο όπου ο G' τέμνει τον G'' ονομάζεται «cross over» και είναι χαρακτηριστικό των ιξωδοελαστικών υλικών. Όσο μικρότερη είναι η συχνότητα μέτρησης που λαμβάνει χώρα το «cross over» τόσο περισσότερο υπερισχύει ο ελαστικός χαρακτήρας στο υλικό (μεγαλύτερη η συγκέντρωση του διαλύματος). Σε μία πηκτή (ένα καθαρά ελαστικό υλικό), οι συντελεστές G' και G'' δεν θα επηρεάζονται από τη συχνότητα μέτρησης, ενώ ο G' θα είναι μεγαλύτερος από τον G'' , σε όλο το εύρος των συχνοτήτων. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.25 οι δύο συντελεστές είναι παράλληλοι προς τον άξονα της συχνότητας.



Σχήμα 1.23. Μηχανικό φάσμα σάρωσης συχνοτήτων αραιού διαλύματος (Steffe, 1996).



Σχήμα 1.24. Μηχανικό φάσμα σάρωσης συχνοτήτων πυκνού διαλύματος (Steffe, 1996).

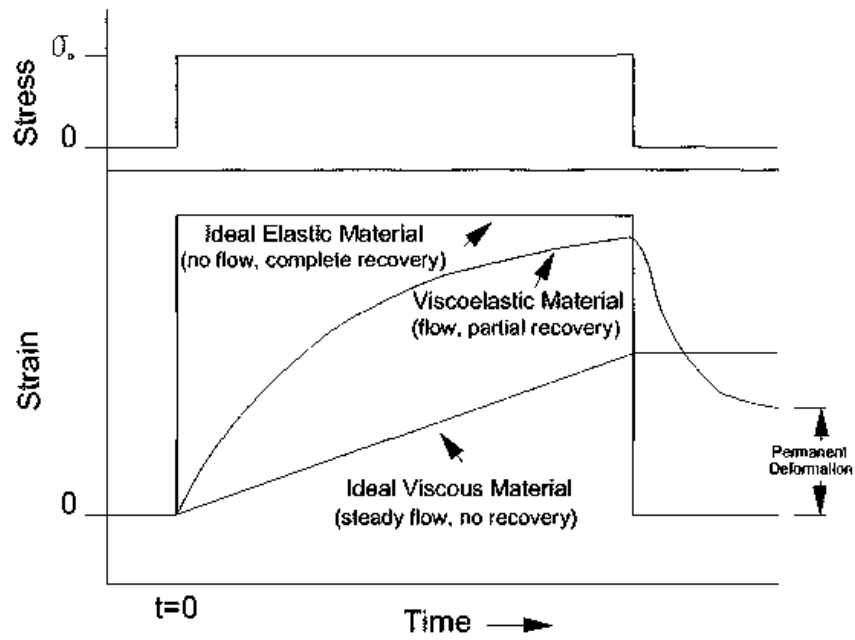


Σχήμα 1.25. Μηχανικό φάσμα σάρωσης συχνοτήτων πηκτής (Steffe, 1996).

1.3.3.2. Δοκιμή ερπυσμού

Η δοκιμή αυτή συνεισφέρει στη μελέτη της φύσης των δευτερευόντων δεσμών συνοχής ενός υλικού. Μπορεί να εφαρμοστεί είτε υπό καθεστώς διάτμησης είτε υπό καθεστώς συμπίεσης. Από τη δοκιμή ερπυσμού μπορούν να υπολογιστούν η στιγμιαία έρπυση-ελαστικότητα, η καθυστερούμενη έρπυση-ελαστικότητα και το νευτώνειο ιξώδες σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης.

Συγκεκριμένα, στο δείγμα όπου βρίσκεται μεταξύ δύο πλακών εφαρμόζεται ακαριαία καθορισμένη τάση, η οποία βρίσκεται εντός των ορίων της γραμμικής ελαστικότητας. Η τάση ασκείται για ορισμένο χρονικό διάστημα κατά το οποίο το δείγμα έρπει ανάλογα με τον τύπο του δηλαδή αν είναι ιδανικό ελαστικό, ιδανικό ιξώδες ή ιξωδοελαστικό, και κατόπιν η τάση παύει να ασκείται και το δείγμα επανακάμπτει δομικά στη προηγούμενη κατάσταση του είτε ολοκληρωτικά, αν πρόκειται για ελαστικό, είτε εν μέρει, αν πρόκειται για ιξωδοελαστικό, είτε καθόλου αν πρόκειται για ιξώδες (Steffe, 1996) (Σχήμα 1.26).



Σχήμα 1.26. Τυπικές καμπύλες ερπυσμού και επανάκαμψης για ένα ιδανικό ελαστικό, ιδανικό ιξώδες και ιξωδοελαστικό υλικό (Steffe, 1996).

Τα πειραματικά δεδομένα από τη δοκιμή ερπυσμού μπορούν να περιγραφούν από την ακόλουθη συνάρτηση (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = \gamma / \sigma_{\text{const}} \quad 1.26$$

όπου J , είναι η έρπυση του δείγματος (creep compliance), γ , είναι η παραμόρφωση του δείγματος και σ , είναι η εφαρμοζόμενη τάση διάτμησης για χρόνο t .

Όταν το υλικό είναι τέλεια ελαστικό τότε:

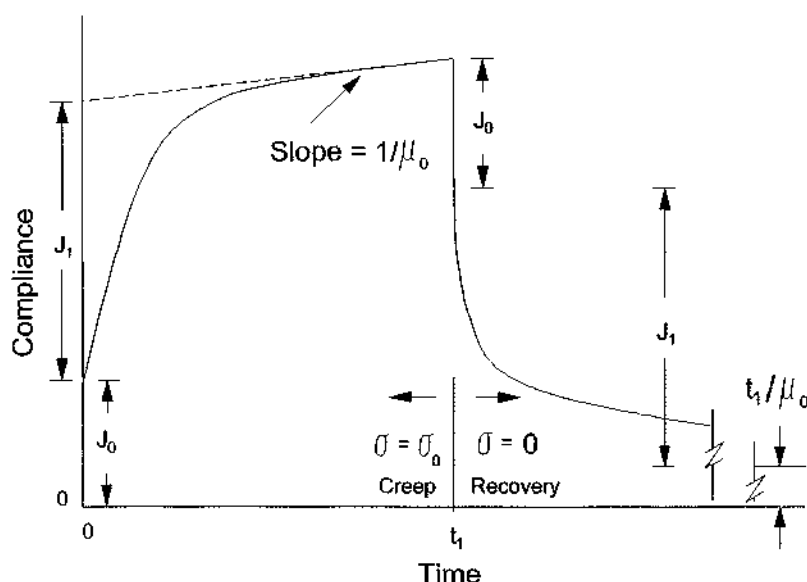
$$J = 1/G \quad 1.27$$

δηλαδή η έρπυση ισούται με το αντίστροφο του συντελεστή ελαστικότητας.

Για ένα ιξωδοελαστικό υλικό η γενική σχέση που περιγράφει τη δοκιμή του ερπυσμού είναι:

$$J(t) = J_o + \sum_{r=1}^m [J_r [(1 - \exp(\frac{-t}{\lambda_{ret}}))] + \frac{t}{\mu_o} \quad 1.28$$

όπου J_0 είναι η στιγμιαία έρπυση (instantaneous compliance), J_r είναι η επιβραδυνόμενη έρπυση (retarded compliance), λ_{ret} είναι ο χρόνος επιβράδυνσης και μ_0 το νευτώνειο ιξώδες σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης (zero shear viscosity). Η παραπάνω σχέση γραφικά παριστάνεται στο Σχήμα 1.27.



Σχήμα 1.27. Καμπύλη έρπυσης και επανάκαμψης (Steffe, 1996).

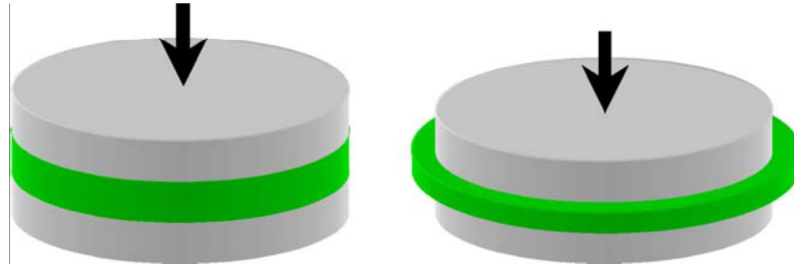
Εναλλακτικά η σχέση αυτή μπορεί να παρουσιασθεί με τους συντελεστές ελαστικότητας αντί για τους συντελεστές έρπυσης δηλαδή:

$$\frac{\gamma}{\sigma_0} = f(t) = \frac{1}{G_0} + \sum_{r=1}^m \left[\frac{1}{G_r} \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right] \right] + \frac{t}{\mu_0} \quad 1.29$$

1.3.4. Ιξωδομετρία λιπαινόμενης συμπιεστής ροής

Η δοκιμή της λιπαινόμενης συμπιεστής ροής, η οποία ανήκει στις δοκιμές μεγάλης παραμόρφωσης, είναι εξαιρετικά απλή και δίνει πληροφόρηση για τον τύπο της δομής ενός υλικού. Στο δείγμα εφαρμόζεται μονοαξονική συμπίεση (uniaxial compression) υπό καθεστώς λιπαινόμενης διαξονικής ροής (lubricated squeeze flow) (Σχήμα 1.28). Στη δοκιμή αυτή το υλικό συμπιέζεται σε μεγάλο βαθμό παραμόρφωσης οπότε είτε υπόκειται σε μόνιμη παραμόρφωση είτε η δομή του καταρρέει γιατί έχει

θραυσθεί πολύ μεγάλος αριθμός πρωτευνόντων και δευτερευόντων δεσμών και μάλιστα από τους πλέον ισχυρούς.



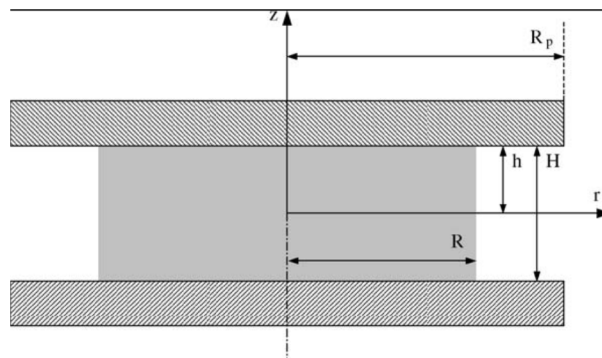
Σχήμα 1.28. Συμπίεση σε συνθήκες λιπαινόμενης διαξονικής ροής (Engmann et al., 2005).

Το θεωρητικό υπόβαθρο στο οποίο στηρίζεται η λιπαινόμενη συμπιεστή ροή είναι το ακόλουθο:

Για ένα ασυμπίεστο Νευτώνειο ρευστό που ρέει σε συνθήκες ροής απαλλαγμένης από τριβές, η στιγμιαία δύναμη που επενεργεί σ' αυτό, $F(t)$, δίνεται από τη σχέση:

$$F(t) = -\frac{3\pi\eta R^2(t)}{H(t)} \frac{dH(t)}{dt} \quad 1.30$$

όπου, η είναι το νευτώνειο ιξώδες, $R(t)$ είναι η στιγμιαία ακτίνα και $H(t)$ το στιγμιαίο ύψος του υπό συμπίεση δείγματος (Lee & Peleg, 1990) (Σχήμα 1.29).



Σχήμα 1.29. Σύστημα συντεταγμένων και βασικές διαστάσεις για τη λιπαινόμενη συμπιεστή ροή (Engmann et al, 2005).

Αν η επιφάνεια παραμένει σταθερή και η συμπίεση γίνεται με σταθερό ρυθμό V , τότε η σχέση 1.30 μεταπίπτει στην:

$$F(t) = \frac{3\pi\eta R^2 V}{H(t)} \quad 1.31$$

Σε περίπτωση που υπάρχει τριβή, τότε η συμπεριφορά του ρευστού διέπεται από τη σχέση γνωστή ως εξίσωση Stefan, δηλαδή:

$$F(t) = -\frac{3\pi\eta R^4(t)}{2H^3(t)} \frac{dH(t)}{dt} \quad 1.32$$

η οποία για σταθερή επιφάνεια και ρυθμό συμπίεσης μεταπίπτει στην:

$$F(t) = \frac{3\pi\eta R^4 V}{2H^3(t)} \quad 1.33$$

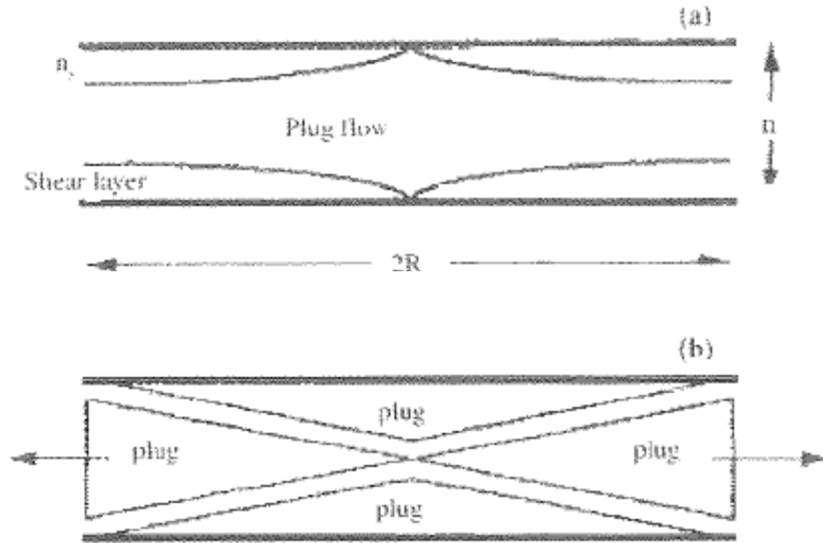
Όταν το ρευστό είναι μη νευτώνιο (ψευδοπλαστικό) τότε για κατάσταση που υπάρχει τριβή, η σχέση γίνεται:

$$F(t) = \frac{2\pi K R^{n+3}}{n+3} \left[\frac{2n+1}{n} \right]^n \left[-\frac{dH}{dt} \right]^n \frac{1}{H^{2n+1}} \quad 1.34$$

Η σχέση αυτή ονομάζεται εξίσωση του Scott (Lee & Peleg, 1990), όπου, K είναι ο συντελεστής συνεκτικότητας και ο n είναι ο δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς. Στην περίπτωση απουσίας τριβής (λιπαινόμενη ροή), η επίδραση της διατμητικής τάσης εξαφανίζεται και η εξίσωση γίνεται:

$$F(t) = 3^{\frac{n+1}{2}} \pi K R^2 \left[-\frac{dH}{dt} \right]^n \frac{1}{H^n} \quad 1.35$$

Με βάση τις παραπάνω εξισώσεις, μπορεί να υπολογιστεί το εκτατό ιξώδες (elongational viscosity), με την προϋπόθεση η παραμόρφωση να είναι ομογενής δηλαδή να υπάρχει πλήρης ολίσθηση του δείγματος που σημαίνει να λαμβάνει χώρα εμβολική ροή (plug flow) στην περιφέρεια του δείγματος όπως στο Σχήμα 1.30.



Σχήμα 1.30. Εμβολική ροή (Engmann et al., 2005).

Οι εξισώσεις που ισχύουν στο πεδίο της ταχύτητας της εκτατής ροής είναι οι ακόλουθες (Chatraei et al., 1981; Campanella & Peleg, 1987):

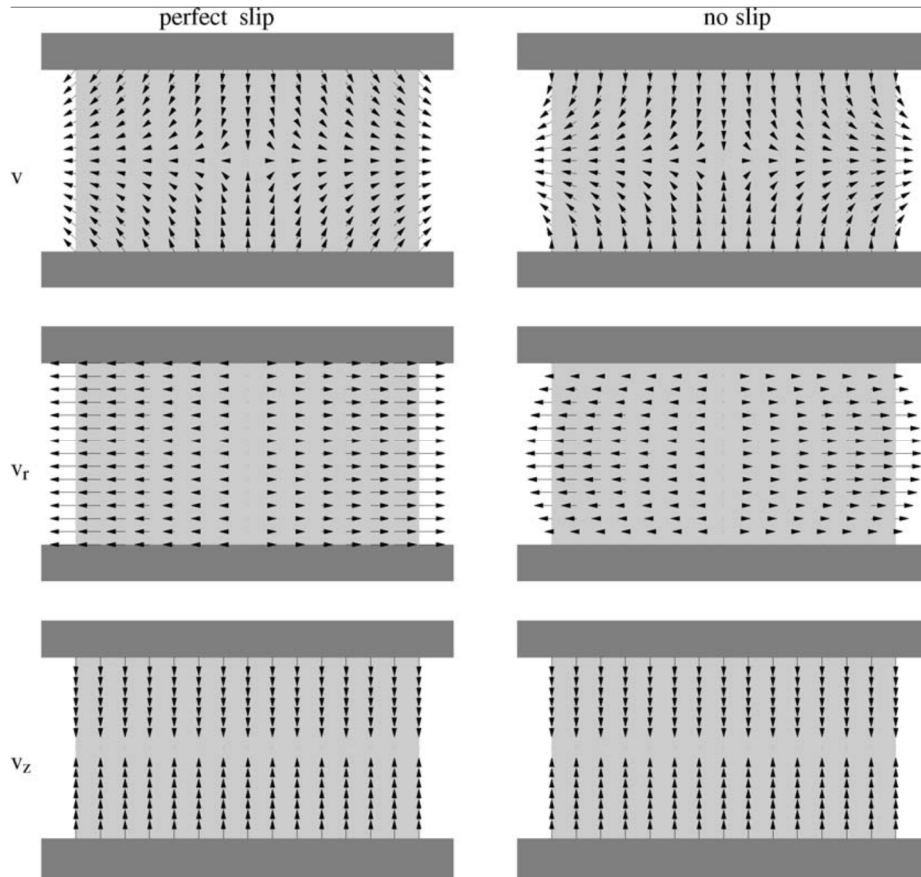
$$V_z = \dot{\epsilon}_T H(t) \quad 1.36$$

$$V_r = -\dot{\epsilon}_T \frac{r}{2} \quad 1.37$$

$$V_\omega = 0 \quad 1.38$$

Όπου V_z , V_r και V_ω είναι τα διανυσματικά μεγέθη της ταχύτητας κάθετη, ακτινική και γωνιακή ταχύτητα αντίστοιχα, $H(t)$ είναι το στιγμιαίο ύψος του δείγματος σε χρόνο t και r είναι η ακτινική απόσταση (Σχήμα 1.31). Ο στιγμιαίος ρυθμός παραμόρφωσης $\dot{\epsilon}_T$ ορίζεται ως:

$$\dot{\epsilon}_T = \left[-\frac{dH_{(t)}}{dt} \right] \frac{1}{H_{(t)}} \quad 1.39$$



Σχήμα 1.31. Διανυσματικά μεγέθη της ταχύτητας για συμπιεζόμενη ροή με τέλεια και καθόλου ολίσθηση (Engmann et al., 2005).

Η μέση διαφορά κάθετης (normal) τάσης $\sigma = T_{rr} - T_{zz}$ μπορεί να υπολογιστεί ως η στιγμιαία δύναμη συμπίεσης $F(t)$ που ασκείται στο επίπεδο της επιφάνειας του δείγματος δηλαδή:

$$\sigma = \frac{F(t)}{\pi R^2} \quad 1.40$$

Ο διαξονικός ρυθμός παραμόρφωσης $\dot{\epsilon}_b$ ορίζεται ως (Chatraei et al., 1981):

$$\dot{\epsilon}_b = \frac{1}{2} \dot{\epsilon}_T \quad 1.41$$

Από τις προηγούμενες εξισώσεις 1.40 και 1.41 μπορεί να προσδιορισθεί (Dealy, 1984) ο συντελεστής ανάπτυξης τάσης (stress growth coefficient) $\eta_B^+(t, \dot{\epsilon}_b)$:

$$\eta_B^+(t, \dot{\epsilon}_b) = \sigma / \dot{\epsilon}_b \quad 1.42$$

Η εξίσωση 1.42 χρησιμοποιείται όταν υπάρχει ασταθής κατάσταση ροής δηλαδή είτε η τάση είτε η παραμόρφωση είτε αμφότερες είναι συναρτήσεις του χρόνου (Shukla et al., 1995).

Στην περίπτωση που έχει επιτευχθεί σταθερή ροή δηλαδή η τάση και η παραμόρφωση έχουν προσεγγίσει σταθερές τιμές τότε το εκτατό ιξώδες $\eta_B(\dot{\epsilon}_b)$ προκύπτει από την εξίσωση 1.42 (Dealy, 1984):

$$\eta_B(\dot{\epsilon}_b) = \lim_{t \rightarrow \infty} [\eta_B^+(t, \dot{\epsilon}_b)] \quad 1.43$$

1.4. Κολλοειδή συστήματα, ψευδο-πηκτές και πηκτές στα τρόφιμα

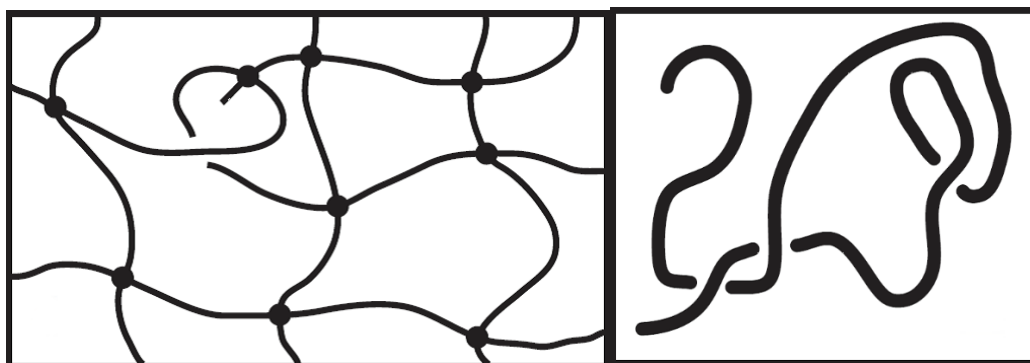
Πολλά τρόφιμα βρίσκονται σε ρευστή ή ημίρρευστη κατάσταση. Αποτελούνται συνήθως από μεγαλομόρια, τα οποία βρίσκονται σε διασπορά στην εξωτερική (διασπείρουσα) φάση (υδατική ή ελαιώδης) και ονομάζονται κολλοειδή συστήματα. Ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη φύση της διασπαρμένης φάσης μπορούν να διαχωριστούν σε κολλοειδή διαλύματα ή κολλοειδή αιωρήματα. Κολλοειδές διάλυμα ή αιώρημα ονομάζεται η κατάσταση της ύλης που βρίσκεται ενδιάμεσα στο πραγματικό διάλυμα (π.χ. ζάχαρη σε νερό) και το αιώρημα (φυσικό άμυλο σε νερό). Χαρακτηριστικά γνωρίσματα της κολλοειδούς κατάστασης είναι ότι τα σωματίδια έχουν μικρό μέγεθος (1-1000 nm), φέρουν ηλεκτρικό φορτίο και αποτελούνται από υδρόφιλα τμήματα. Όσον αφορά τη διαφορά μεταξύ του κολλοειδούς αιωρήματος και διαλύματος, αυτή έγκειται στο ότι τα σωματίδια στο κολλοειδές αιώρημα έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα σωματίδια του κολλοειδούς διαλύματος και φέρουν στο μόριο τους εκτός από υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές.

Ένας μεγάλος αριθμός τροφίμων ανήκει στην κατηγορία των πηκτών, δηλαδή των συστημάτων στα οποία μεγάλη ποσότητα νερού ακινητοποιείται λόγω δέσμευσης των μορίων του από υδρόφιλα κολλοειδή σωματίδια του υλικού. Οι πηκτές ανάλογα με τη μακροσκοπική τους συμπεριφορά διακρίνονται σε αληθινές πηκτές και ψευδό-πηκτές. Οι αληθινές πηκτές είναι το αποτέλεσμα του σχηματισμού ενός τρισδιάστατου ισχυρού πλέγματος το οποίο αν σπάσει δεν επανέρχεται στη πρότερη του κατάσταση,

ενώ οι ψευδό-πηκτές χαρακτηρίζονται από ένα ασθενές πλέγμα, το οποίο σπάει πολύ εύκολα όταν υπόκειται σε μια τάση αρκετά υψηλή και είναι δυνατό να επαναδημιουργηθεί (Lopes da Silva & Rao, 1999).

Συγκεκριμένα, η πηκτή προκύπτει όταν σε ένα υγρό σύστημα που αποτελείται από μεγαλομόρια, κάτω από κατάλληλες συνθήκες δημιουργηθούν δεσμοί διασύνδεσης μεταξύ των μεγαλομορίων, με αποτέλεσμα η μάζα του υλικού να αυτοϋποστηρίζεται. Τα μεγαλομόρια είναι ισχυρά υδρόφιλα και συγκρατούν ακινητοποιημένα τα μόρια του νερού μέσα στο τρισδιάστατο πλέγμα που σχηματίζουν. Το σχηματιζόμενο πλέγμα είναι αρκετά ισχυρό και η αναδιάταξη της δομής σε μοριακό επίπεδο είναι αρκετά περιορισμένη. Δομικά οι πηκτές αποτελούνται από ένα συνεχόμενο κολλοειδές τρισδιάστατο πλέγμα, στο οποίο βρίσκεται παγιδευμένη η υδατική φάση. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών μακρομορίων που αποτελούν το πλέγμα και το ιξώδες της συνεχούς φάσης καθορίζουν τις ρεολογικές ιδιότητες και τη σταθερότητα του συστήματος (Lopes da Silva & Rao, 1999).

Ανάλογα με το είδος των διασυνδέσεων των μεγαλομορίων που κυριαρχούν στο πλέγμα, οι πηκτές των πολυσακχαριτών χαρακτηρίζονται από σταυροειδείς δεσμούς διασύνδεσης (cross links) ή από περιπλοκή μεγαλομορίων (entanglements) (Σχήμα 1.32). Τα entanglements των μεγαλομορίων σχηματίζονται τοπολογικά από αλληλεπιδράσεις των πολυμερικών αλυσίδων, χωρίς να δημιουργούν δεσμούς σταυροειδούς τύπου που είναι μόνιμοι. Τα entanglements είναι πρόσκαιρες διασυνδέσεις (temporary links ή junction zones) οι οποίες πολύ εύκολα υπό την επίδραση μικρού μεγέθους τάσης μπορούν να μετακινηθούν ή να παύσουν να υφίστανται. Για καλύτερη κατανόηση το σύστημα μιας ψευδοπηκτής ή ενός πυκνού διαλύματος πολυσακχαρίτη σχηματίζει τέτοιου είδους πρόσκαιρων διασυνδέσεων όταν η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη είναι μεγαλύτερη από μία κρίσιμη συγκέντρωση, την C^* (παράγραφος 1.2.2). Στις πηκτές προκειμένου να μετακινηθούν ή να παύσουν να υφίστανται οι μόνιμοι δεσμοί απαιτείται η εφαρμογή μεγαλύτερου μεγέθους τάσης. Οι αλληλεπιδράσεις που κυριαρχούν στις πηκτές των πολυσακχαριτών αφορούν κυρίως δεσμούς Coulomb, δεσμούς van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμούς δίπολων και δεσμούς υδρογόνου (Ross-Murphy, 1995).

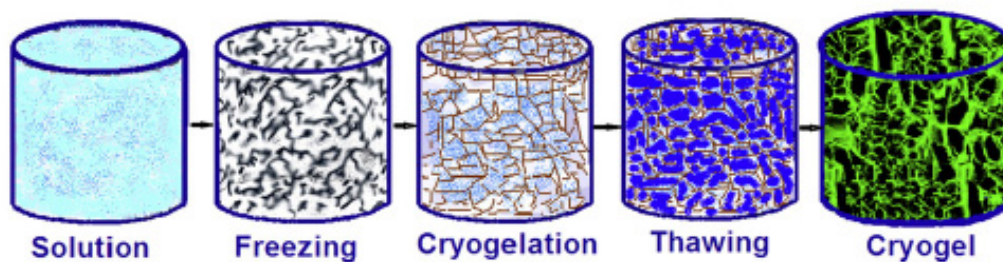


Σχήμα 1.32. Πιθανές δομές πηκτών πολυσακχαριτών. Αριστερά: Σταυροειδείς δεσμοί διασύνδεσης κυριαρχούν στο τρισδιάστατο πλέγμα; Δεξιά: Το πλέγμα αποτελείται από entanglements (Grosberg & Khokhlov, 2011).

Σε αντίθεση με την πηκτή, στην ψευδό-πηκτή ο αριθμός των μεγαλομορίων είναι μικρότερος ανά μονάδα χώρου και στη μάζα του δείγματος κυριαρχούν τα μικρού μοριακού βάρους μόρια (νερού, λιπαρών υλών, κ.τ.λ.). Η μάζα του υλικού αυτού υποστηρίζεται, ωστόσο το σχηματιζόμενο πλέγμα είναι αρκετά ασθενές και μπορεί εύκολα να καταρρεύσει. Τα μικρού μοριακού βάρους μόρια μπορούν εύκολα να μετακινηθούν από το πλέγμα, δημιουργώντας πολλές φορές φαινόμενα ολίσθησης κατά τη διάρκεια ρεολογικών μετρήσεων.

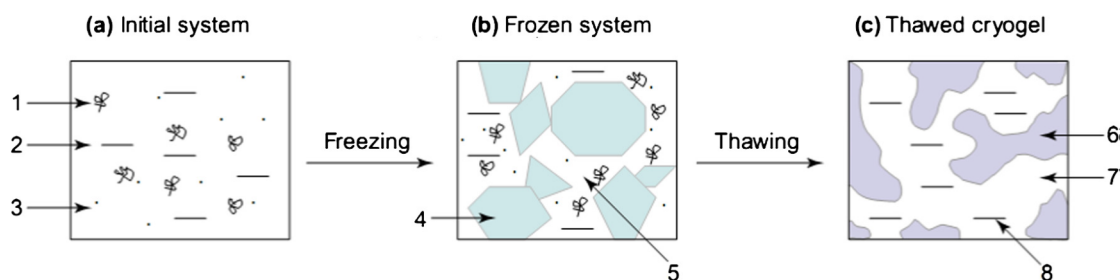
1.5. Σχηματισμός κρυοπηκτών μακρομορίων

Οι κρυοπηκτές αποτελούν ένα νέο είδος πηκτών που σχηματίζουν τα πολυμερή με δυνατότητα ποικίλων εφαρμογών (Lozinsky et al., 2003). Η πήξη που προκαλείται είναι το αποτέλεσμα της κατάψυξης ενός αρχικού συστήματος αποτελούμενου από χαμηλού ή υψηλού μοριακού βάρους ενώσεων, καθώς επίσης και κολλοειδών συστημάτων ικανών να σχηματίσουν πηκτές. Μετά την κατάψυξη του το σύστημα αποθηκεύεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια αποψύχεται οπότε και προκύπτει η κρυοπηκτή (Σχήμα 1.33) (Lozinsky et al., 2003; Gun'ko et al., 2013; Zhang et al., 2013; Lozinsky & Okay, 2014).



Σχήμα 1.33. Στάδια σχηματισμού μίας κρυοπηκτής: α) διάλυμα μονομερών ή πολυμερών με δυνατότητα να σχηματίσουν σταυροειδείς δεσμούς διασύνδεσης, β) κατάψυξη, γ) διατήρηση σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός, δ) απόψυξη και ε) σχηματισμός κρυοπηκτής με μακροπόρους (macropores) (Gun'ko et al., 2013).

Στο Σχήμα 1.34 φαίνονται τα κύρια χαρακτηριστικά της διαδικασίας του σχηματισμού των κρυοπηκτών. Το σύστημα, το οποίο περιέχει τις μεγαλομοριακές ενώσεις, καταψύχεται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από το σημείο πήξης του διαλύτη. Το καταψυγμένο σύστημα είναι ετερογενές και αποτελείται από τους κρυστάλλους του διαλύτη και την μη κατεψυγμένη υγρή μικροφάση. Καθώς σχηματίζονται οι κρύσταλλοι του διαλύτη, η συγκέντρωση των μορίων των μεγαλομοριακών ενώσεων αυξάνεται δραματικά (κρυο-συμπύκνωση) προκαλώντας την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (Lozinsky et al., 2003). Η αύξηση της συγκέντρωσης των μορίων των πολυμερών έχει ως αποτέλεσμα την εξαναγκασμένη ευθυγράμμιση των πολυμερικών αλυσίδων, η οποία προκαλεί την ανάπτυξη δεσμών μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων που διατηρούνται και κατά την απόψυξη (Zhang et al., 2013). Οι κρύσταλλοι του διαλύτη είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό μακροπόρων, οι οποίοι σχηματίζονται μετά την απόψυξη και είναι γεμάτοι με τον διαλύτη. Οι πόροι αυτοί συνδέονται μεταξύ τους αφού κατά την κατάψυξη οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν μέχρι να συναντήσουν τις πλευρές άλλων κρυστάλλων. Αυτό σημαίνει ότι οι μακροπόροι μετά την απόψυξη συνδέονται μεταξύ τους. Το μέγεθος και το σχήμα των κρυστάλλων που σχηματίζονται εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι πιο σημαντικοί από τους οποίους είναι η συγκέντρωση των μεγαλομοριακών ενώσεων και οι συνθήκες κατάψυξης (π.χ ρυθμός κατάψυξης). Μικροπόροι σχηματίζονται μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό της δομής της κρυοπηκτής (Lozinsky et al., 2003).



Σχήμα 1.34. Η κύρια διαδικασία σχηματισμού κρυοπηκτής πολυμερούς: 1. Μακρομόρια σε διάλυμα; 2. Διαλύτης; 3. Μικρού μοριακού βάρους διαλυμένες ουσίες; 4. Κρύσταλλοι του κατεψυγμένου διαλύτη; 5. Μη-κατεψυγμένη υγρή μικροφάση; 6. Πλέγμα πολυμερούς κρυοπηκτής; 7. Μακροπόροι; 8. Διαλύτης (Lozinsky et al., 2003).

Η δομή των κρυοπηκτών όπως προαναφέρθηκε εξαρτάται τόσο από την ποσότητα του διαλύτη όσο και από το ρυθμό κατάψυξης. Συγκεκριμένα, όσο πιο αργός είναι ο ρυθμός κατάψυξης τόσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των κρυστάλλων που σχηματίζονται. Σε αυτήν την περίπτωση οι κρύσταλλοι μπορούν εύκολα να καταστρέψουν τους πόρους της κρυοπηκτής και φυσικά τη δομή της (Gun'ko et al., 2013). Ο διαλύτης, ο οποίος παραμένει στο πλέγμα που δημιουργούν τα πολυμερή, παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο καθώς παρεμποδίζει το σύστημα από την κατάρρευση και ταυτόχρονα διασφαλίζει τη διάχυση των διαλυτών ουσιών από την υγρή φάση στην πηκτή και τανάπαλι (Lozinsky, 2002).

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τόσο τη σταθερότητα όσο και τις μηχανικές ιδιότητες των κρυοπηκτών είναι το pH, η θερμοκρασία κατάψυξης, ο χρόνος παραμονής στην κατάψυξη και οι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης (Zhang et al., 2013; Lozinsky & Okay, 2014).

1.6. Πολυσακχαρίτες στην επιστήμη των τροφίμων

1.6.1. Εφαρμογές των πολυσακχαριτών στα τρόφιμα

Βασικό ποιοτικό χαρακτηριστικό των τροφίμων είναι η υφή, η οποία προσδιορίζεται από τις ρεολογικές ιδιότητες, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη δομή τους. Η ικανότητα συγκράτησης νερού, η συνεκτικότητα, το ιξώδες, η κρεμώδης (smoothy) υφή είναι ορισμένες βασικές ιδιότητες που καθορίζουν την υφή των

τροφίμων (Sodini et al., 2004). Η βελτίωση των ανωτέρω ιδιοτήτων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, όπως αύξηση της συγκέντρωσης των στερεών (πρωτεϊνών, λίπους) και προσθήκη σακχάρων (σακχαρόζη, φρουκτόζη), γαλακτωματοποιητών, σταθεροποιητών, ενισχυτικών υφής, κ.τ.λ (Duboc & Mollet, 2001; Sodini et al., 2004). Πολλές φορές μάλιστα η τεχνολογία παρασκευής ενός προϊόντος κάνει επιτακτική την προσθήκη τέτοιων συστατικών (Duboc & Mollet, 2001). Για παράδειγμα στην τεχνολογία παρασκευής της αναμιγμένης (stirred) γιαούρτης, το πήγμα μετά την ολοκλήρωση της πήξης σπάει και ακολουθεί η ανάδευση του πριν τη συσκευασία του. Η μηχανική καταπόνηση που δέχεται το προϊόν ευνοεί την αποβολή ορού και φυσικά τη δημιουργία μίας ανομοιογενούς υφής, δεδομένου ότι το σχηματιζόμενο πρωτεϊνικό πλέγμα καταστρέφεται. Σε αυτήν την περίπτωση για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα απαιτείται η προσθήκη σταθεροποιητών όπως πηκτίνης, αμύλου, ζελατίνης, αλγινικών αλάτων κ.α., όταν φυσικά η νομοθεσία το επιτρέπει. Ωστόσο, οι απαιτήσεις των καταναλωτών για τρόφιμα μειωμένης λιποπεριεκτικότητας, χαμηλής συγκέντρωσης σε ζάχαρη, με χαμηλό κόστος και τα οποία δεν περιέχουν πρόσθετα, στρέφει το ερευνητικό ενδιαφέρον στη χρησιμοποίηση φυσικών προσθέτων, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια (Duboc & Mollet, 2001). Οι πολυσακχαρίτες που προέρχονται από γαλακτικά βακτήρια, εκτός από την ικανότητα τους να επηρεάζουν τη συνεκτικότητα-ιξώδες των τροφίμων, δρουν και σαν υδροκολλοειδή συγκρατώντας μεγάλη ποσότητα νερού. Σύμφωνα με τους Duboc & Mollet (2001) η καταλληλότητα ενός πολυσακχαρίτη για χρήση του ως τροποποιητή της υφής καθορίζεται από την ικανότητα του να δεσμεύει το νερό, να αλληλεπιδρά πιθανώς με τις πρωτεΐνες και να αυξάνει το ιξώδες της συνεχούς φάσης.

Οι πολυσακχαρίτες μπορούν είτε να παραχθούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τις καλλιέργειες που τους παράγουν (πχ. αναμεμιγμένη γιαούρτη), είτε να προστεθούν σε καθαρή μορφή, αφού απομονωθούν από τους μικροοργανισμούς που τους συνθέτουν. Οι Duboc & Mollet (2001) αναφέρουν ότι πολλές φορές οι ιδιότητες των πολυσακχαριτών μετά την απομόνωση τους από τους μικροοργανισμούς που τους παράγουν δεν είναι οι ίδιες με αυτές που έχουν όταν παράγονται «in situ» από τα βακτήρια.

1.6.2. Παραγωγή πολυσακχαριτών από οξυγαλακτικά βακτήρια.

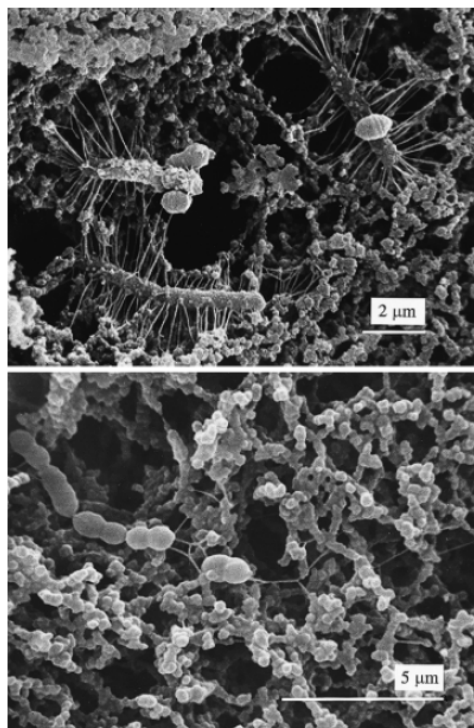
Πολλά είδη γαλακτικών βακτηρίων παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι είτε είναι προσκολλημένοι στα βακτηριακά κύτταρα (capsular polysaccharides) είτε δεν είναι ενωμένοι με αυτά (slime polysaccharides). Κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν μόνο το ένα είδος πολυσακχαριτών και κάποια άλλα και τα δύο είδη μαζί. Ανεξάρτητα από το εάν οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες είναι ενωμένοι ή όχι με τα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να έχουν ινώδη (ropy) ή μη- (non-ropy) μορφή. (Degeest et al., 2001).

1.6.3. Επίδραση πολυσακχαριτών στις ρεολογικές ιδιότητες των όξινων γαλακτοκομικών προϊόντων

Οι πολυσακχαρίτες δεν επηρεάζουν με τον ίδιο τρόπο τις ρεολογικές ιδιότητες των προϊόντων στα οποία παράγονται ή προστίθενται. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα τους είναι το μέγεθός τους, το φορτίο τους, ο βαθμός ακαμψίας των μορίων τους, αν προέρχονται από ινώδους μορφής «ropy» ή μη «non-ropy» στελέχη και φυσικά εάν αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του γάλακτος (κυρίως πρωτεΐνες) (Duboc & Mollet, 2001).

Όταν οι μικροοργανισμοί της οξυγαλακτικής καλλιέργειας παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες η συνεκτικότητα του σχηματιζόμενου πλέγματος επηρεάζεται σημαντικά, κυρίως στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται «ropy» στελέχη. Οι πολυσακχαρίτες που παράγονται από τα βακτήρια σχηματίζουν ινώδεις μορφές, οι οποίες προσκολλώνται τόσο στα κύτταρα όσο και στις πρωτεΐνες του σχηματιζόμενου πλέγματος επηρεάζοντας τη ρεολογία του (Σχήμα 1.35) (Laws & Marshall, 2001).

Οι Duboc & Mollet (2001) αναφέρουν ότι οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες ανάλογα με το εάν φέρουν φορτίο ή όχι μπορούν να επηρεάσουν με διαφορετικό τρόπο το ιξώδες και την ελαστικότητα των όξινων γαλακτοκομικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες που δε φέρουν φορτίο μπορούν να αυξήσουν το ιξώδες των προϊόντων χωρίς να επηρεάσουν την ελαστικότητα του πρωτεϊνικού πλέγματος.



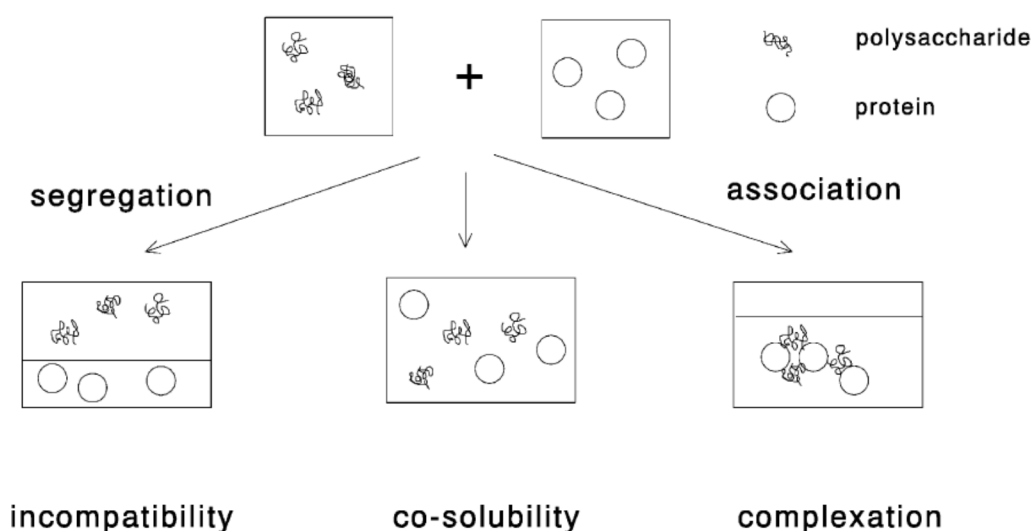
Σχήμα 1.35. Δομή γιαούρτης, η οποία παρασκευάστηκε με στελέχη του *S.thermophilus* και του *L. subsp. bulgaricus* που παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (Tamime & Robinson, 2007).

Αυτό συμβαίνει γιατί ενώ αλληλεπιδρούν ελάχιστα με τα θετικά φορτισμένα μόρια των πρωτεϊνών διαλύονται ικανοποιητικά στην υδατική φάση αυξάνοντας το ιξώδες της. Αντίθετα, οι αρνητικά φορτισμένοι πολυσακχαρίτες σχηματίζουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες, ενισχύοντας την ελαστικότητα του πλέγματος. Ωστόσο, η διασπορά τους στην υδατική φάση δεν είναι ικανοποιητική συνεισφέροντας ελάχιστα στην αύξηση του ιξώδους.

1.7. Αλληλεπιδράσεις πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών

Οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες συνυπάρχουν σε πολλά συστήματα τροφίμων συνεισφέροντας στη δομή, υφή και σταθερότητα τους εξαιτίας της ικανότητάς τους να σχηματίζουν πηκτές και να αυξάνουν τη συνεκτικότητα-ιξώδες (Doublier et al., 2000). Κατά τη συνύπαρξή τους μπορούν να παρατηρηθούν τα

παρακάτω φαινόμενα, τα οποία παριστάνονται γραφικά στο Σχήμα 1.36. Τα δυο μακρομόρια μπορεί να παρουσιάσουν ασυμβατότητα δηλαδή να διαχωριστούν, καθώς το ένα απωθεί το άλλο ή να σχηματίσουν αλληλεπιδράσεις όταν το ένα πλησιάζει το άλλο.



Σχήμα 1.36. Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών (de Kruif & Tuinier, 2001).

Σε πολύ αραιά διαλύματα των δύο βιοπολυμερών, το σύστημα χαρακτηρίζεται ως σταθερό, καθώς η εντροπική φύση της μίξης επικρατεί και τα μόρια αμοφτέρων των ειδών βρίσκονται εν διαλύσει (co-solubility). Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των βιοπολυμερών το σύστημα γίνεται ασταθές και επικρατεί ένας από τους δύο τύπους αλληλεπιδράσεων που αναφέρθηκαν. Σαν κανόνα, τα μίγματα βιοπολυμερών έχουν την τάση να διαχωρίζονται. Μάλιστα στην περίπτωση του συστήματος πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών, όπου τα μόρια των πολυμερών διαφέρουν ως προς το σχήμα και τη δομή, ο διαχωρισμός οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης των μορίων του ενός πολυμερούς που βρίσκονται πλησίον της περιοχής της συγκέντρωσης των μορίων του άλλου. Αυτό οδηγεί σε διαχωρισμό φάσεων και συγκεκριμένα σε μία φάση πλούσια σε πολυσακχαρίτη και σε μία άλλη φάση πλούσια σε πρωτεΐνες (de Kruif & Tuinier, 2001).

Στην περίπτωση συμβατότητας δηλαδή όπου η συνύπαρξη των δύο βιοπολυμερών οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις, οι πολυσακχαρίτες προσροφώνται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών. Μάλιστα, εάν η ποσότητα του πολυσακχαρίτη δεν είναι αρκετή για να καλύψει πλήρως την πρωτεΐνη, τότε ο πολυσακχαρίτης απορροφάται στην επιφάνεια περισσότερων πρωτεϊνών, ενώνοντας με αυτόν τον τρόπο δύο ή περισσότερα μόρια πρωτεϊνών (de Kruif & Tuinier, 2001).

1.8. Συστήματα βιοπολυμερών στα προϊόντα γάλακτος

Τα βιοπολυμερή παίζουν σπουδαίο ρόλο σε διάφορα συστήματα, στα οποία υπάρχουν, καθώς οι αλληλεπιδράσεις τους προκαλούν τη δημιουργία πολύπλοκων και σημαντικών φαινομένων (de Kruif & Tuinier, 2001). Ως βιοπολυμερή στα προϊόντα γάλακτος μπορεί να αναφέρει κανείς δύο κατηγορίες μεγαλομορίων, τις πρωτεΐνες του γάλακτος και τους πολυσακχαρίτες. Οι πρωτεΐνες αποτελούν ένα από τα βασικά συστατικά του γάλακτος με σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες. Μάλιστα η παραγωγή των διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων στηρίζεται σε αυτές τις ιδιότητες και τις μεταβολές που υφίστανται οι πρωτεΐνες με την επίδραση διαφόρων φυσικών, χημικών και βιοχημικών μεθόδων.

1.8.1. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες ορού. Οι καζεΐνες αποτελούν το 75-80% των πρωτεϊνών του γάλακτος, ενώ οι πρωτεΐνες ορού το υπόλοιπο 25-20% (Walstra et al., 2006).

1.8.1.1. Καζεΐνες

Οι καζεΐνες είναι το κλάσμα των πρωτεϊνών που καθιζάνει ύστερα από οξίνιση σε pH 4,6 και σε θερμοκρασία 20°C. Με βάση τη διάταξη των αμινοξέων στο μόριο τους διακρίνονται σε α_{s1} -, α_{s2} -, β - και κ -καζεΐνες. Οι καζεΐνες, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες ορού, περιέχουν φώσφορο στο μόριο τους, γεγονός που τις κάνει ευαίσθητες

παρουσία ιόντων ασβεστίου, τα οποία υπάρχουν φυσιολογικά στο γάλα. Η α_{s2} -καζεΐνη περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα φωσφόρου, ενώ η κ-καζεΐνη τη μικρότερη παίζοντας προστατευτικό ρόλο έναντι των υπολοίπων καζεϊνών. Οι φωσφορικές ομάδες δεσμεύουν πολυσθενή κατιόντα, όπως ιόντα ασβεστίου, προκαλώντας εξουδετέρωση των φορτίων των πρωτεϊνών και κατακρήμνιση τους. Μόνο η κ-καζεΐνη, η οποία περιέχει μόνο 1 mol PO_4 /mol δεν κατακρημνίζεται παρουσία ιόντων ασβεστίου, ενώ το μόριο της περιέχει σχεδόν πάντοτε υδατάνθρακες (γλυκοπρωτεΐνη), προσδίδοντάς της έντονο υδρόφιλο χαρακτήρα. Η β-καζεΐνη είναι η περισσότερο υδρόφοβη καζεΐνη (Walstra et al., 2006). Γενικά τα μόρια των καζεϊνών έχουν υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα, τα οποία επηρεάζουν τις λειτουργικές τους ιδιότητες (διαλυτοποίηση, γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες, κ.α) (Horne, 2009).

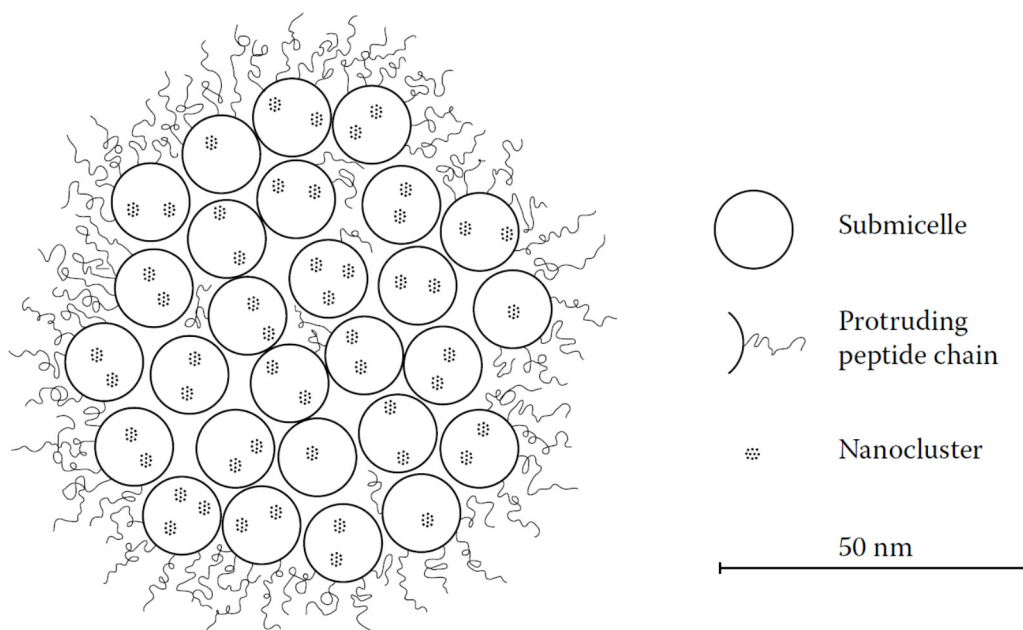
Οι καζεΐνες έχουν χαμηλά επίπεδα δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής, γεγονός που τις κάνει σταθερές έναντι παραγόντων που προκαλούν μετουσίωση (θέρμανση), ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στην ύπαρξη μίας πιο ενεργής επιφάνειας. Επιπλέον, η έλλειψη δευτεροταγούς δομής προσδίδει στα μόρια της καζεΐνης ευκαμψία (Walstra et al., 2006).

1.8.1.2. Σύμπλοκα καζεϊνών-Μικκύλια

Παρόλο το γεγονός ότι οι α_{s1} -, α_{s2} - και β-καζεΐνες διαθέτουν πολλές φωσφορικές ομάδες στο μόριο τους δεν κατακρημνίζονται παρουσία ιόντων ασβεστίου. Αυτό επιτυγχάνεται με το σχηματισμό μίας τεταρτοταγούς δομής που αναφέρεται ως καζεϊνικό μικκύλιο και στην οποία σημαντικό ρόλο παίζει η κ-καζεΐνη, εξαιτίας τόσο της μικρής περιεκτικότητας της σε φώσφορο όσο και του υδρόφιλου χαρακτήρα της (Walstra et al., 2006).

Τα μικκύλια βρίσκονται σε κολλοειδή διασπορά στην υδατική φάση και αποτελούνται κατά 93% από καζεΐνες και κατά το υπόλοιπο από ανόργανη ύλη. Κύριο συστατικό της ανόργανης ύλης αποτελούν ο φώσφορος και το ασβέστιο, τα οποία βρίσκονται υπό τη μορφή κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου (colloidal calcium phosphate, CCP) και συμβάλλουν στο σχηματισμό και τη διατήρηση του σχήματος των μικκυλίων. Μέσα στο γάλα τα μικκύλια είναι ισχυρώς ενυδατωμένα (2 g H_2O /g πρωτεΐνης) (Walstra et al., 2006).

Ο τρόπος με τον οποίο συμπλέκονται τα μονομερή των καζεϊνών προκειμένου να σχηματίσουν μικκύλια δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Πολλές θεωρίες έχουν διατυπωθεί και προτείνουν τρόπους με τους οποίους οι διάφορες καζεΐνες συμπλέκονται. Η θεωρία, η οποία είναι πλέον αποδεκτή είναι αυτή του Schmidt (1982) γιατί λαμβάνει υπόψη τη διαπιστωμένη ύπαρξη των υπομικκυλίων. Σύμφωνα με τη θεωρία του τα μικκύλια αποτελούνται από υπομικκύλια, ο πυρήνας των οποίων είναι υδρόφοβος και αποτελείται από α_{s1} -, α_{s2} - και β -καζεΐνες, μαζί με μικρά ποσά κ-καζεΐνης. Στην επιφάνεια των υπομικκυλίων υπάρχουν πολύ μικρά ποσά β -καζεΐνης, και περισσότερα α_{s1} -, α_{s2} - και κυρίως κ-καζεΐνης. Τα υπομικκύλια που περιέχουν μικρά ποσά κ-καζεΐνης τοποθετούνται στο κέντρο των μικκυλίων, ενώ τα υπομικκύλια πλούσια σε κ-καζεΐνη στην επιφάνεια. Η σταθεροποίηση του σχήματος των μικκυλίων επιτυγχάνεται λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της κ-καζεΐνης. Το υδρόφοβο άμινο-τερματικό άκρο της κ-καζεΐνης ενώνεται με τις α_s - και β καζεΐνες, ενώ το υδρόφιλο καρβόξυλο-τερματικό άκρο είναι προσανατολισμένο προς την επιφάνεια των μικκυλίων, δίνοντας τους μια τριχωτή (hairy) μορφή. Τα υπομικκύλια συνενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια ομάδων κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου (Σχήμα 1.37), με τη μορφή $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Οι φωσφορικές ρίζες είναι εστεροποιημένες στα καζεϊνικά μόρια ως μονοεστέρες της σερίνης, οπότε η σύνδεση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου γίνεται με τις φωσφορικές ομάδες της σερίνης διαφορετικών υπομικκυλίων. Η αύξηση του μεγέθους ενός μικκυλίου τερματίζεται όταν όλη η επιφάνεια του αποτελείται από κ-καζεΐνες. Οι δυνάμεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα των μικκυλίων είναι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων των καζεϊνών, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδικών αλυσίδων και του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου και πιθανόν ιονικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πλευρικών ομάδων (Walstra et al., 2006).



Σχήμα 1.37. Σχηματική απεικόνιση της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων, τα οποία αποτελούνται από υπομικκύλια (submicelle). Η επιφάνεια των μικκυλίων καλύπτεται από το υδρόφιλο τμήμα της κ-καζεΐνης, που προεξέχει υπό μορφή τρίχας (protruding peptide chain), ενώ τα μονομερή των καζεϊνών ενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου (nanocluster) (Walstra et al., 2006).

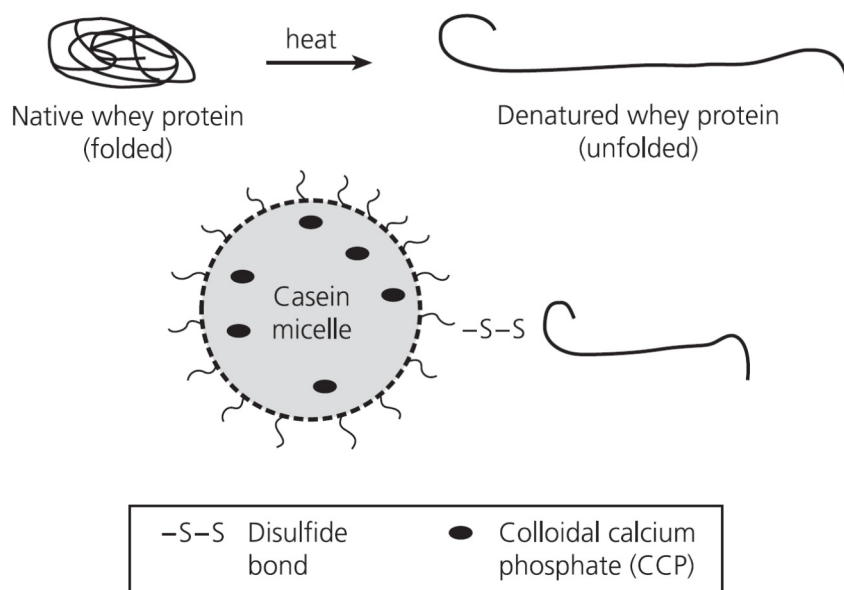
1.8.1.3. Πρωτεΐνες ορού

Οι κυριότερες πρωτεΐνες ορού είναι η οροαλβουμίνη, η α-γαλακταλβουμίνη, η β-γαλακτογλοβουλίνη και οι ανοσοσφαιρίνες. Οι πρωτεΐνες ορού σε αντίθεση με τις καζεΐνες έχουν υψηλά επίπεδα δευτεροταγούς, τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής. Είναι τυπικές σφαιρικές πρωτεΐνες και μετουσιώνονται με την επίδραση της θέρμανσης. Δεν περιέχουν φώσφορο στο μόριο τους και δεν είναι ευαίσθητες στην παρουσία ιόντων ασβεστίου. Περιέχουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι σταθεροποιούν τη δομή τους. Οι πρωτεΐνες ορού, σε αντίθεση με τις καζεΐνες, βρίσκονται στο γάλα εν διαλύσει στην υδατική φάση, είναι λιγότερο επιφανειακά ενεργές όταν δεν είναι μετουσιωμένες και σχηματίζουν στο εσωτερικό του μορίου τους πολλές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Walstra et al., 2006).

1.8.2. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας

Από τις πρωτεΐνες του γάλακτος εκείνες που επηρεάζονται με την επίδραση της θέρμανσης είναι οι πρωτεΐνες ορού. Όταν θερμανθούν πάνω από τους 70°C αλλοδομούνται – μετουσιώνονται. Ο βαθμός μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού εξαρτάται από τη θερμοκρασία που εφαρμόζεται και από το χρόνο θέρμανσης. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού περιλαμβάνει μεταβολές στη διάταξη των πρωτεϊνικών μορίων (ξεδίπλωμα των μορίων), έκθεση σουλφυδριλικών ομάδων και δημιουργία συμπλόκων και συσσωματωμάτων. Οι σουλφυδριλικές ομάδες, οι οποίες στα φυσικά μόρια των πρωτεϊνών βρίσκονται παγιδευμένες στο εσωτερικό τους, με το ξεδίπλωμα τους είναι πλέον προσιτές να αντιδράσουν ευκολότερα, σχηματίζοντας γέφυρες θείου με γειτονικά μόρια. Συγκεκριμένα, η β-γαλακτογλοβουλίνη σχηματίζει σύμπλοκο με την κ-καζεΐνη (Σχήμα 1.38). Το σύμπλοκο αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού βελτιώνει την υφή και μειώνει την τάση αποβολής ορού κατά την παρασκευή των όξινων γαλακτοκομικών προϊόντων. Γέφυρες θείου σχηματίζονται επίσης μεταξύ πρωτεϊνών ορού αλλά και μεταξύ πρωτεϊνών ορού και πρωτεϊνών που βρίσκονται στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων του ομογενοποιημένου γάλακτος (Robinson et al., 2006; Walstra et al., 2006). Στο μη-ομογενοποιημένο γάλα στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων υπάρχουν κυρίως γλυκοπρωτεΐνες (Walstra et al., 2006), οι οποίες όμως δεν αλληλεπιδρούν με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (Cho et al., 1999). Μετά την ομογενοποίηση και την αύξηση της επιφάνειας του λίπους, καζεΐνες κυρίως και ένα μέρος από τις πρωτεΐνες ορού καλύπτουν τις επιπλέον ανάγκες για μεμβράνη, οι οποίες και σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στην υδατική φάση (Cho et al., 1999; Lucey, 2004a).

Οι καζεΐνες είναι ανθεκτικές στη θέρμανση, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες ορού, οι οποίες μετουσιώνονται. Θερμοκρασίες που προκαλούν αλλοδομή στις πρωτεΐνες ορού δεν επηρεάζουν τις καζεΐνες. Για να αποσταθεροποιηθεί η καζεΐνη πρέπει η θερμική επεξεργασία που θα δεχτεί να είναι πολύ έντονη. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται απόσπαση από το μόριο της φωσφορικών ομάδων, πεπτιδίων ή αμινοξέων. Ωστόσο, η ευαισθησία των καζεϊνών στη θέρμανση εξαρτάται από τη σταθερότητα τους. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των καζεϊνών είναι το pH, η ισορροπία των αλάτων και η αναλογία των πρωτεϊνών ορού (Walstra et al., 2006).



Σχήμα 1.38. Σχηματική απεικόνιση της μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού με την επίδραση της θέρμανσης (ξεδίπλωμα μορίου) και σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ της β-γαλακτογλοβουλίνης και της κ-καζεΐνης (όχι υπό κλίμακα, δεδομένου ότι το μέγεθος της β-γαλακτογλοβουλίνης είναι 2 nm και το μέσο μέγεθος των καζεϊνικών μικκυλίων είναι περίπου 100 nm) (Robinson et al., 2006).

Μείωση του pH προς το ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αστάθειάς τους, αφενός γιατί μειώνεται η διαλυτότητα τους και αφετέρου γιατί διαλυτοποιείται περισσότερη ποσότητα φωσφόρου και ασβεστίου από τα μικκύλια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι καζεΐνες να γίνονται πιο ευαίσθητες στην επίδραση της θέρμανσης. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση όπου παρατηρείται ανισορροπία στα άλατα. Η άριστη σταθερότητα της καζεΐνης επιτυγχάνεται με μία ορισμένη σχέση μεταξύ ασβεστίου και μαγνησίου προς τα φωσφορικά και κιτρικά ιόντα. Όταν αυτή διαταράσσεται μειώνεται η σταθερότητα του γάλακτος στη θέρμανση. Τέλος, η αυξημένη αναλογία πρωτεϊνών ορού προκαλεί επίσης αστάθεια στα καζεϊνικά μικκύλια, εξαιτίας της υπερβολικής αύξησης του μεγέθους τους από τη δημιουργία συμπλόκων με τις πρωτεΐνες ορού.

1.8.3. Μέθοδοι οξίνισης του γάλακτος

Η οξίνιση του γάλακτος μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους, με τη χρησιμοποίηση οξυγαλακτικών καλλιεργείων, την προσθήκη οξέων (όπως υδροχλωρικού οξέος) και με τη χρήση γλυκονο-δ-λακτόνης (GDL). Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες ζυμώνουν τη λακτόζη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο το pH του γάλακτος. Το GDL, το οποίο είναι ένας εστέρας, διασπάται σε γλυκονικό οξύ με ρυθμό ανάλογο των συνθηκών πήξης (θερμοκρασία και ποσοστό προσθήκης) προκαλώντας επίσης την οξίνιση του γάλακτος. Πολλές έρευνες σχετικά με τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στο σχηματισμό και τις ρεολογικές ιδιότητες των όξινων πηκτών γάλακτος έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση GDL (Lucey & Singh, 1998). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν διαφορές τόσο κατά τη διάρκεια σχηματισμού των όξινων πηκτών όσο και στο τελικό προϊόν μεταξύ των δύο διαφορετικών τρόπων οξίνισης. Όταν χρησιμοποιείται GDL ο ρυθμός μείωσης του pH είναι γρήγορος (κυρίως σε υψηλές θερμοκρασίες) και η τελική τιμή pH που επιτυγχάνεται είναι συνάρτηση της ποσότητας του εστέρα που έχει προστεθεί αρχικά. Αντίθετα, οι καλλιέργειες εκκίνησης στα πρώτα στάδια της ζύμωσης δεν προκαλούν έντονη μείωση του pH, ενώ στη συνέχεια το pH μειώνεται σταθερά σε τιμές μικρότερες από το 4,0, όπου τα βακτήρια δεν μπορούν πλέον να πολλαπλασιαστούν (αναστολή της δράσης τους) (Lucey & Singh, 1998; Lucey et al., 1998a). Όσον αφορά τις ρεολογικές ιδιότητες των όξινων πηκτών με τη χρήση GDL, οι Lucey et al. (1998a) αναφέρουν ότι εμφάνισαν μεγαλύτερη ελαστικότητα και αποβολή ορού σε σχέση με τις αντίστοιχες που παρασκευάστηκαν με καλλιέργειες εκκίνησης. Με τη χρησιμοποίηση του GDL ως μέσο οξίνισης του γάλακτος ωστόσο, αποφεύγονται πολλές δυσκολίες που σχετίζονται με τη χρήση καλλιεργείων εκκίνησης (ασηπτικές συνθήκες κατά τον εμβολιασμό, επιμολύνσεις, ποικιλομορφία στελεχών, κ.α.), ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες θερμοκρασίες πήξης (συνήθως 30°C) σε σχέση με αυτές που εφαρμόζονται για παράδειγμα κατά την παρασκευή της γιαούρτης (Lucey et al., 1998a).

1.8.4. Μηχανισμός σχηματισμού των όξινων πηκτών γάλακτος

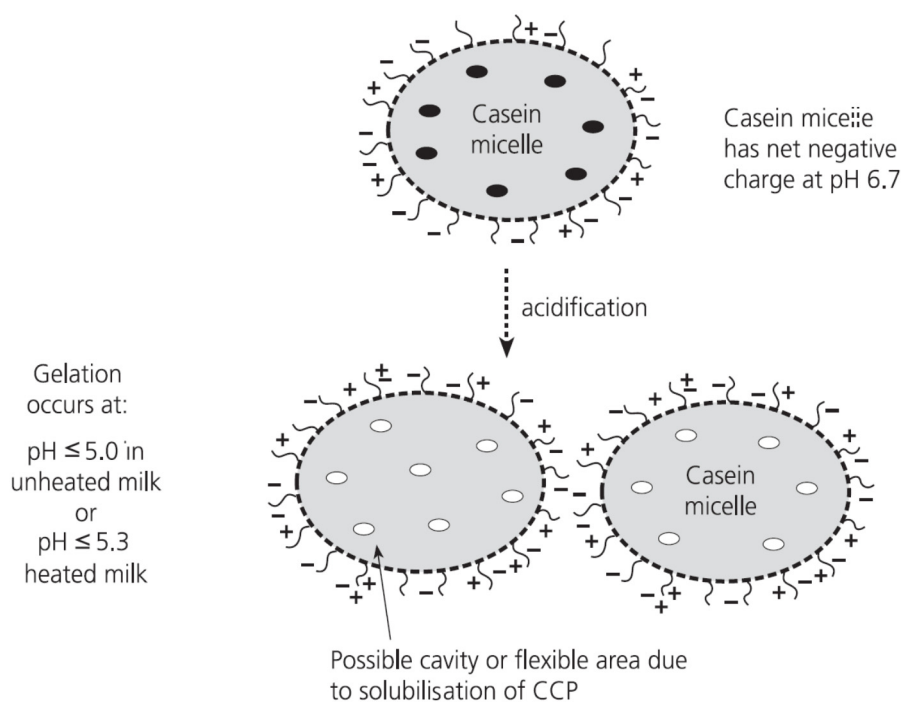
Στη φυσιολογική τιμή pH του γάλακτος (6,7), οι καζεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες προκαλώντας ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των μορίων τους, τα

οποία είναι ισχυρώς ενυδατωμένα. Με τη μείωση του pH του μη-θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος από το 6,7 προς το 6,0 το καθαρό αρνητικό φορτίο των καζεϊνικών μικκυλίων μειώνεται, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απώσεις των μορίων αλλά και η ενυδάτωση τους. Το μέγεθος των καζεϊνικών μικκυλίων συνήθως δε μεταβάλλεται, επειδή μέχρι την τιμή pH 6,0 μόνο μια μικρή ποσότητα κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου που υπάρχει στα μικκύλια διαλυτοποιείται. Με περαιτέρω μείωση του pH προς το 5,0 το καθαρό αρνητικό φορτίο των καζεϊνών συνεχίζει να μειώνεται, όπως και οι απώσεις μεταξύ των μορίων τους, ενώ σχεδόν όλη η ποσότητα του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου απομακρύνεται από τα μικκύλια, προκαλώντας τη μείωση του μεγέθους τους. Καθώς το pH φτάνει στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών (4,6), το καθαρό αρνητικό φορτίο τους εξουδετερώνεται, επιτρέποντας σε ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις να κυριαρχήσουν. Αυτό προκαλεί τη συσσωμάτωσή τους και το σχηματισμό αλυσίδων και συμπλεγμάτων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους ως ένα τρισδιάστατο πρωτεϊνικό πλέγμα (Lucey, 2004b). Στην περίπτωση του θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος η αποσταθεροποίηση των καζεϊνών πραγματοποιείται σε υψηλότερες τιμές pH, πιο κοντά προς το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών ορού (5,2 το ισοηλεκτρικό σημείο της β-γαλακτογλοβουλίνης, η οποία αποτελεί την κυριότερη πρωτεΐνη ορού), οι οποίες βρίσκονται συμπλοκοποιημένες στην επιφάνεια των καζεϊνικών μικκυλίων και φυσικά συμμετέχουν στη δομή του σχηματιζόμενου πρωτεϊνικού πλέγματος αυξάνοντας τη συνεκτικότητά του (Robinson et al., 2006).

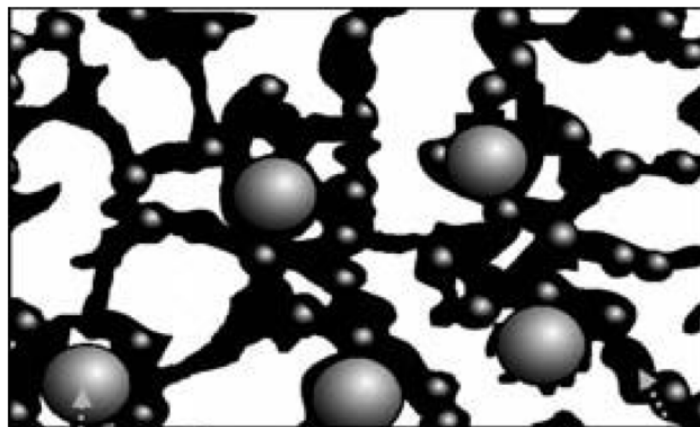
Το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο είναι βασικό δομικό στοιχείο των μικκυλίων εξουδετερώνοντας τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες της σερίνης. Καθώς διαλυτοποιείται με τη μείωση του pH σε τιμές κάτω από 6,0, λαμβάνει χώρα αύξηση των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των φωσφορικών ομάδων της σερίνης. Στο θερμικά επεξεργασμένο γάλα, όπου η έναρξη σχηματισμού της πηκτής λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερες τιμές pH, η διαλυτοποίηση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου συνεχίζει να λαμβάνει χώρα και μετά το σχηματισμό του πρωτεϊνικού πλέγματος, με αποτέλεσμα το χαλάρωμα της εσωτερικής δομής και της ακεραιότητας των καζεϊνικών μικκυλίων (Σχήμα 1.39). Οι παράγοντες, οι οποίοι ευνοούν αυτό το φαινόμενο είναι η υψηλή θερμοκρασία πήξης και ο αργός ρυθμός μείωσης του pH (Lucey, 2004a; Robinson et al., 2006). Σε αυτήν την περίπτωση η σχηματιζόμενη πηκτή εμφανίζεται ασθενέστερη (Robinson et al., 2006), ενώ λαμβάνει χώρα και η εμφάνιση ορού.

Αντίθετα, στην περίπτωση του μη-θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος, όπου ο σχηματισμός της πηκτής ξεκινάει σε χαμηλότερες τιμές pH, όλη η ποσότητα του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου έχει απομακρυνθεί από τα μικκύλια πριν το σχηματισμό του πρωτεϊνικού πλέγματος με αποτέλεσμα η δομή της πηκτής να μην εμφανίζει το χαλάρωμα που προαναφέρθηκε (Lucey, 2004a; Robinson et al., 2006).

Στην περίπτωση του ομογενοποιημένου γάλακτος, όπου καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού καλύπτουν την επιφάνεια των λιποσφαιρίων, με τη μείωση του pH του γάλακτος σχηματίζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών των λιποσφαιρίων και αυτών που υπάρχουν στη συνεχή φάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργή συμμετοχή των λιποσφαιρίων στη δομή του σχηματιζόμενου πλέγματος (Σχήμα 1.40) και την αύξηση της συνεκτικότητάς του (Lucey et al., 1998b). Σε αυτή την περίπτωση το λίπος προάγει το σχηματισμό του πλέγματος και δεν δρα σαν υλικό πλήρωσης, γεγονός το οποίο συμβαίνει όταν το γάλα δεν είναι ομογενοποιημένο (Cho et al., 1999).



Σχήμα 1.39. Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών που υφίστανται τα καζεϊνικά μικκύλια (στο θερμικά και μη-θερμικά επεξεργασμένο γάλα) κατά την οξίνιση του γάλακτος (Robinson et al., 2006).



Σχήμα 1.40. Σχηματική απεικόνιση της δομής μίας όξινης πηκτής ομογενοποιημένου γάλακτος, στην οποία διακρίνονται τα λιποσφαίρια να είναι ενσωματωμένα στο πρωτεϊνικό πλέγμα (Robinson et al., 2006).

1.8.5. Θεωρητικό μοντέλο συσσωμάτωσης μορφοκλασματικών συνόλων (fractal aggregation)

Το θεωρητικό μοντέλο που έχει προταθεί για τον τρόπο με τον οποίο τα καζεϊνικά μικκύλια ενώνονται για το σχηματισμό των όξινων πηκτών γάλακτος είναι αυτό της «συσσωμάτωσης μορφοκλασμάτων» (fractal aggregation). Οι πηκτές αυτές αποτελούνται από σφαιρικά σωματίδια, τα οποία κινούνται με την κίνηση «Brown» και όταν το ένα συναντά το άλλο μπορούν να συνενωθούν σχηματίζοντας συσσωματώματα ή σύμπλεγμα συσσωματωμάτων. Τα συμπλέγματα αυτά αποτελούν τις δομικές μονάδες της σχηματιζόμενης πηκτής (Lucey & Singh, 1998).

Η συνένωση των δομικών μονάδων οδηγεί στο σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων, τα οποία έχουν ανοιχτή δομή, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.41. Σε αυτήν την περίπτωση ισχύει η σχέση (Walstra et al., 2006):

$$N_p = (R/\alpha)^D \quad 1.44$$

Όπου N_p είναι ο αριθμός των σωματιδίων που αποτελούν το συσσωμάτωμα, R είναι η ακτίνα του συσσωματώματος, α η ακτίνα των σωματιδίων που αποτελούν το συσσωμάτωμα και D η διάσταση του μορφοκλασματικού συσσωματώματος (fractal dimensionality). Οι τιμές που παίρνει το D είναι πάντα μικρότερες του 3 και συνήθως

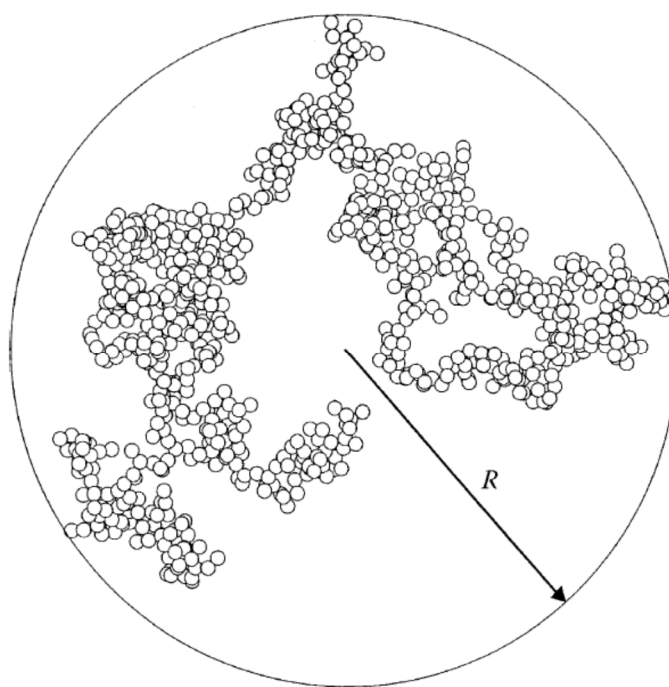
μεταξύ του 1,7 και του 2,5. Αυτό σημαίνει ότι ένα μεγάλο συσσωμάτωμα θα έχει πιο ανοιχτή δομή (αραιή) (Σχήμα 1.41) σε σχέση με ένα μικρότερο. Ο μέγιστος αριθμός σωματιδίων (N_m), τα οποία μπορούν να συνυπάρξουν σε μία σφαίρα ακτίνας R δίνονται από τη σχέση:

$$N_m = (R/\alpha)^3 \quad 1.45$$

Για το κλάσμα όγκου των σωματιδίων σε ένα συσσωμάτωμα (ϕ_A) προκύπτει η εξίσωση:

$$\phi_A = N_p/N_m = (R/\alpha)^{D-3} \quad 1.46$$

Επειδή ο εκθέτης έχει αρνητική τιμή, μία μεγάλη ακτίνα συσσωματώματος (R) σημαίνει μικρότερο κλάσμα όγκου των σωματιδίων που το αποτελούν, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας πιο ανοιχτής δομής συσσωματώματος.



Σχήμα 1.41. Σχηματική απεικόνιση «συσσωμάτωσης μορφοκλασματικών συνόλων» (fractal aggregation) αποτελούμενη από 1000 σωματίδια. Η διάσταση του μορφοκλασματικού συσσωματώματος (fractal dimensionality) ισούται με 1,8 (Walstra et al., 2006).

Κατά το σχηματισμό της δομής μίας πηκτής ο συνολικός όγκος των συσσωματωμάτων αυξάνεται (ενώ ο αριθμός τους μειώνεται) μέχρι να γεμίσουν όλο το σύστημα και να σχηματίσουν ένα πλέγμα στο χώρο. Αυτό θα συμβεί όταν το ϕ γίνει ίσο με το αρχικό κλάσμα όγκου των σωματιδίων στο σύστημα (ϕ). Η ακτίνα του συσσωματώματος τη στιγμή που σχηματίζεται η πηκτή (R_g) δίνεται από τη σχέση (Walstra et al., 2006):

$$R_g = \alpha \phi^{1/(D-3)} \quad 1.47$$

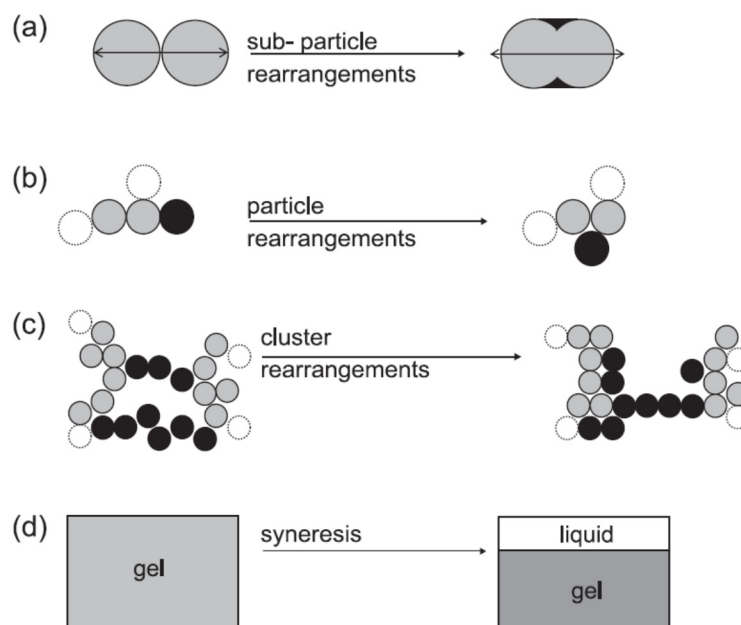
Οι van Vliet et al. (2004) αναφέρουν ότι μία πηκτή σχηματίζεται τη στιγμή που τα μορφοκλασματικά συσσωματώματα αρχίζουν να επικαλύπτουν το ένα το άλλο, σχηματίζοντας μία ομοιογενή δομή.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δομή των μορφοκλασματικών συσσωματωμάτων υφίσταται αλλαγές και συγκεκριμένα ανακατανομή της δομής τους. Όταν γίνεται σε περιορισμένο βαθμό κατά τη διάρκεια σχηματισμού μίας πηκτής οδηγεί στο σχηματισμό μιας πιο συνεκτικής δομής με αποτέλεσμα το R_g να γίνεται πιο μεγάλο. Μεγάλης έκτασης ανακατανομή της δομής, η οποία λαμβάνει χώρα μετά το σχηματισμό της πηκτής, μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή ορού (Walstra et al., 2006).

1.8.6. Αποβολή ορού - Ανακατανομή της δομής

Αποβολή ορού ή συναίρεση σε μία πηκτή μπορεί να παρατηρηθεί εάν υπάρξει μηχανική καταπόνηση (εφαρμογή εξωγενών παραγόντων) ή εάν λάβει χώρα ανακατανομή της δομής. Ως συναίρεση ορίζεται η συρρίκνωση μίας πηκτής, η οποία συνοδεύεται με ταυτόχρονη αποβολή ορού. Όταν δεν προκαλείται από την εφαρμογή κάποιας εξωτερικής δύναμης, η συναίρεση οφείλεται στη σύσπαση της πηκτής, εξαιτίας της απώλειας της ικανότητας να ενσωματωθεί όλη η ποσότητα της υδατικής φάσης. Οι παράγοντες, οι οποίοι ευνοούν την αποβολή ορού είναι ο γρήγορος ρυθμός οξίνισης, οι υψηλές θερμοκρασίες πήξης, η χαμηλή συγκέντρωση στερεών, η μικρή παραγωγή οξέος, κ.α. (Lucey & Singh, 1998).

Στο Σχήμα 1.42 φαίνονται οι τέσσερεις τύποι ανακατανομής της δομής που διακρίνονται στις πηκτές καζεϊνών σε διάφορα επίπεδα.



Σχήμα 1.42. Οι τέσσερις τύποι ανακατανομής της δομής που διακρίνονται στις πηκτές καζεϊνών σε διάφορα επίπεδα: α) ένωση σε μοριακό επίπεδο ή επίπεδο υποσωματιδίων, β) ανακατανομή σε επίπεδο σωματιδίων, γ) ανακατανομή μεταξύ συμπλεγμάτων σωματιδίων και δ) σε μακροσκοπικό επίπεδο όπου είναι ορατή η συναίρεση και αποβολή ορού (Mellema et al., 2002).

Συγκεκριμένα, υπάρχουν: α) η ενδοσωματιδιακή ανακατανομή που πραγματοποιείται με τη συνένωση δύο σωματιδίων, όταν αυτά έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός δεσμών. Λαμβάνει χώρα κυρίως μετά τον σχηματισμό μίας πηκτής: β) η ανακατανομή σε επίπεδο σωματιδίων-αναδιοργάνωση, η οποία συμβαίνει κυρίως κατά το σχηματισμό μιας πηκτής. Τα σωματίδια αλλάζουν συνεχώς θέση με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός των δεσμών μεταξύ τους οδηγώντας τελικά σε αύξηση της πυκνότητας των συσσωματωμάτων: γ) η ανακατανομή μεταξύ συμπλεγμάτων σωματιδίων που λαμβάνει χώρα κυρίως μετά τον σχηματισμό μίας πηκτής και οδηγεί στο σχηματισμό πυκνών συσσωματωμάτων με αρκετά μεγάλους πόρους. Αυτό προκαλεί τη δημιουργία τάσης μεταξύ των δεσμών, οι οποίοι εξασθενούν κυρίως με την πάροδο του χρόνου. Η παραπάνω διαδικασία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μικρο-συναίρεση, αφού υγρό (ορός) αναγκάζεται να μετακινηθεί από τα διάφορα μέρη της πηκτής που υπάρχει πυκνή δομή προς τους πόρους. Αυτός ο τύπος ανακατανομής συχνά είναι ο πρόδρομος

του επόμενου τύπου ανακατανομής: δ) η ανακατανομή είναι πλέον ορατή σε μακροσκοπικό επίπεδο, όπου παρατηρείται συναίρεση και αποβολή ορού μέσα από το πλέγμα, εξαιτίας των συνεχών μετακινήσεων των συμπλεγμάτων των σωματιδίων, τα οποία αναγκάζουν τον ορό να διαφύγει από τη δομή της πηκτής (Mellema et al., 2002).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η απομόνωση του πολυσακχαρίτη κεφιράνη από κόκκους κεφίρ σε πιλοτική κλίμακα, ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της και η μελέτη των ρεολογικών ιδιοτήτων της. Επίσης, μελετήθηκε η ρεολογική συμπεριφορά και η δομή διαλυμάτων, όξινων πηκτών, κρυοπηκτών και όξινων κρυοπηκτών συστημάτων κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος.

Η παραλαβή της κεφιράνης πραγματοποιήθηκε σε πιλοτική κλίμακα, ώστε να αναπτυχθεί μεθοδολογία παραγωγής (ζύμωση των κόκκων κεφίρ σε βιοαντιδραστήρες) και απομόνωσης του πολυσακχαρίτη, η οποία θα μπορούσε να εφαρμοστεί στη βιομηχανία τροφίμων με σχετικά χαμηλό κόστος. Η παραγωγή του πολυσακχαρίτη πραγματοποιήθηκε μετά τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων που τη διέπουν.

Για το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό της κεφιράνης χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές προσδιορισμού του μοριακού βάρους (χρωματογραφία και στατική σκέδαση φωτός), της ρεολογικής συμπεριφοράς και της διαμόρφωσης του μορίου. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η κρίσιμη συγκέντρωση καθώς επίσης το εσωτερικό και ειδικό ιξώδες, το ζ-δυναμικό και η μέση διάμετρος του πολυσακχαρίτη σε υδατικό περιβάλλον και σε διάφορους διαλύτες.

Επίσης, μελετήθηκε η ρεολογική συμπεριφορά του πολυσακχαρίτη καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει παρουσία πρωτεϊνών γάλακτος, με τη χρήση δυναμικού ρεομέτρου. Στα δείγματα εφαρμόστηκε η δοκιμή ερπυσμού και η δυναμική δοκιμή, ενώ προσδιορίστηκε και το ιξώδες τους. Με τη χρήση ενός ρεομέτρου νοειδούς σωλήνα μελετήθηκε ο σχηματισμός της δομής όξινων πηκτών συστημάτων πρωτεϊνών γάλακτος-κεφιράνης. Επίσης προσδιορίστηκε το εκτατό ιξώδες κρυοπηκτών κεφιράνης με την εφαρμογή της λιπαινόμενης συμπιεστής ροής.

Για την ενίσχυση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων των ρεολογικών μετρήσεων παρατηρήθηκε η δομή συστημάτων κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος στο συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser (CLSM).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ

Για την παραγωγή της κεφίρανης χρησιμοποιήθηκαν 80 g κόκκοι κεφίρ από το Εργαστήριο Γάλακτος του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης οικιακής προέλευσης και αποβουτυρωμένο γάλα (0,3% λιποπεριεκτικότητα) μακράς διάρκειας (UHT - Ultra High Temperature), το οποίο προμηθεύτηκε από τη βιομηχανία γάλακτος ΜΕΒΓΑΛ Α.Ε. σε ασκούς των 20 L.

Οι κόκκοι κεφίρ συντηρούνταν μέσα σε αποβουτυρωμένο γάλα UHT στη ψύξη για περίπου 2 μήνες. Σε αυτό το χρονικό διάστημα το γάλα ανανεωνόταν κάθε 10 μέρες και αφού προηγουμένως οι κόκκοι είχαν πλυθεί με αποστειρωμένο νερό για να αποφευχθεί η δυνατότητα επιμόλυνσής τους. Στη συνέχεια για να ενεργοποιηθούν οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι αποτελούσαν τη μικροχλωρίδα των κόκκων, πραγματοποιήθηκαν συνεχείς ανακαλλιέργειες. Μετά τη δραστηριοποίηση των κόκκων, μέρος αυτών χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού τους και το υπόλοιπο διατηρήθηκε στην ψύξη με συνεχή ανανέωση του γάλακτος (όπως περιγράφηκε παραπάνω). Η αύξηση της μάζας των κόκκων, αρχικά σε εργαστηριακή και στη συνέχεια σε βιομηχανική κλίμακα, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις άριστες συνθήκες ανάπτυξης, όπως αυτές επιλέχθηκαν από τα πειράματα διερεύνησης των βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού τους.

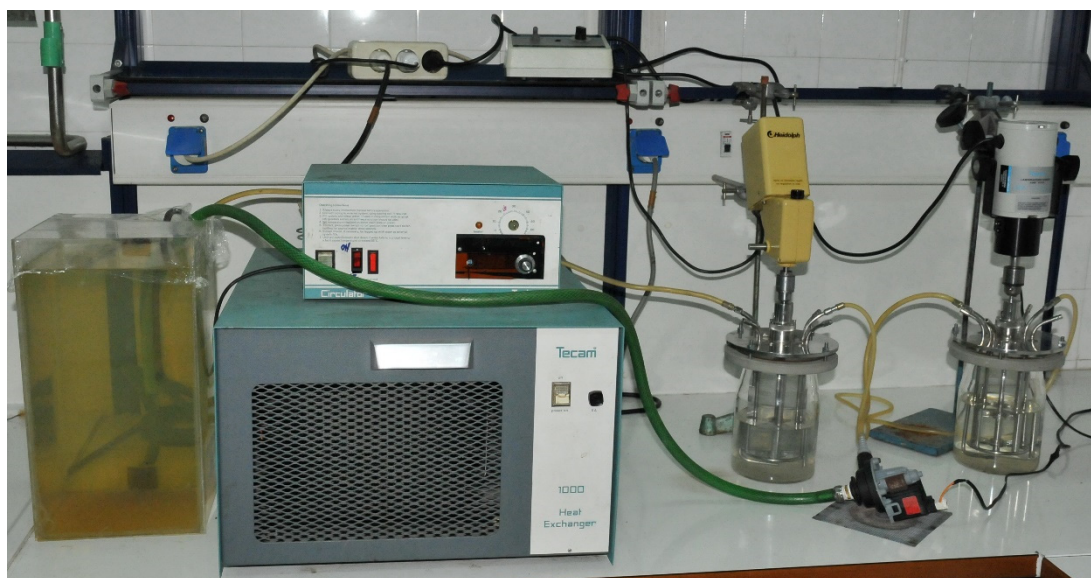
3.1.1. Ανακαλλιέργειες κόκκων κεφίρ

Για τη δραστηριοποίηση των κόκκων κεφίρ, οι οποίοι συντηρούνταν στην ψύξη, χρησιμοποιήθηκε αποβουτυρωμένο UHT γάλα. Ο ίδιος τύπος γάλακτος χρησιμοποιήθηκε και για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα. Η δραστηριοποίηση των κόκκων κεφίρ πραγματοποιήθηκε με συνεχείς ανακαλλιέργειες τους στο UHT γάλα. Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη των κόκκων στο γάλα σε ποσοστό περίπου 3% ακολουθούσε η επώαση τους στους 25°C μέχρι το pH του υποστρώματος να μειωθεί στο 4,4. Στη συνέχεια οι κόκκοι

ξεπλένονταν με αποστειρωμένο νερό για να αποφευχθούν επιμολύνσεις και προστίθεντο εκ νέου σε κατάλληλη ποσότητα γάλακτος. Οι ανακαλλιέργειες συνεχίστηκαν μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή pH σε περίπου 24 h. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τις ανακαλλιέργειες αφορούσαν τις συνήθεις συνθήκες επώασης των κόκκων κεφίρ για την παραγωγή υγρού κεφίρ.

3.1.2. Επιλογή βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού των κόκκων

Για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού των κόκκων κεφίρ πραγματοποιήθηκαν επώσεις των κόκκων στο αποβουτυρωμένο γάλα με τη χρήση 2 ζυμωτήρων χωρητικότητας 1 L (Σχήμα 3.1). Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν το ποσοστό εμβολιασμού των κόκκων και η θερμοκρασία επώασης. Συγκεκριμένα, οι κόκκοι εμβολιάστηκαν σε 4 διαφορετικά ποσοστά (1%, 3%, 5% και 7%), επώαστηκαν στους 20°C, 25°C ή 30°C, με ρύθμιση της τιμής pH του υποστρώματος στο 4,5 ενώ η επώαση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανάδευσης.



Σχήμα 3.1. Διάταξη ζυμωτήρων χωρητικότητας 1 L.

Μετά την προσθήκη των κόκκων και του γάλακτος στον ζυμωτήρα τίθετο σε εκκίνηση ο αναδευτήρας της διάταξης στα 150 rpm. Η θερμοκρασία στο εσωτερικό

του ζυμωτήρα διατηρείτο σταθερή με τη χρήση κυκλοφορητή και εναλλάκτη θερμότητας, στον οποίο κυκλοφορούσε μίγμα αιθυλενογλυκόλης-νερού σε αναλογία 1:1. Η επώαση διαρκούσε 96 h και το pH παρέμενε σταθερό στην επιθυμητή τιμή (4,5) με την προσθήκη σε αυτό διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 4 M. Μετά το τέλος της επώασης, οι κόκκοι διηθούνταν με τη χρήση ανοξείδωτου αποστειρωμένου φίλτρου, ξεπλένονταν με αποστειρωμένο νερό, πιέζονταν ελαφρά μέχρι να στραγγίσουν και ζυγίζονταν, ώστε να υπολογιστεί η αύξηση της μάζας τους. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε γάλα στην ψύξη για 48 h μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθούν. Πριν τον εμβολιασμό τους εκ νέου σε καινούργια ποσότητα γάλακτος ξεπλένονταν πάλι με αποστειρωμένο νερό και στραγγίζονταν.

3.1.3. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ σε εργαστηριακή κλίμακα

Μετά την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών, ο πολλαπλασιασμός των κόκκων πραγματοποιήθηκε αρχικά σε εργαστηριακή κλίμακα με τη χρήση ενός ζυμωτήρα 12 L (LKB Bromma, Sweden). Οι επώσεις διαρκούσαν 96 h (1 κύκλος επώασης) κατά τις οποίες η τιμή pH του εμβολιασμένου γάλακτος διατηρείτο σταθερή με την προσθήκη διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 4 M. Ο χειρισμός των κόκκων (ξέπλυμα με αποστειρωμένο νερό κ.τ.λ.) ήταν ο ίδιος όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.1.1. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 11 κύκλοι επώασης ξεκινώντας από ποσότητα κόκκων 80 g και λαμβάνοντας τελικά ποσότητα ίση με 3,75 Kg. Στους πρώτους κύκλους επώασης χρησιμοποιείτο μικρότερη ποσότητα γάλακτος από τη μέγιστη που θα μπορούσε να εμβολιαστεί, εξαιτίας της μικρότερης αρχικής ποσότητας κόκκων σε σχέση με αυτήν που θα μπορούσε να επωαστεί στο συγκεκριμένο ζυμωτήρα. Στη συνέχεια, και καθώς αυξανόταν η μάζα των κόκκων, η περίσσεια αυτών αποθηκευόταν με γάλα στην ψύξη. Το γάλα ανανεωνόταν κάθε 10 μέρες και αφού προηγουμένως οι κόκκοι είχαν πλυθεί με αποστειρωμένο νερό για να αποφευχθεί η πιθανότητα επιμόλυνσής τους.

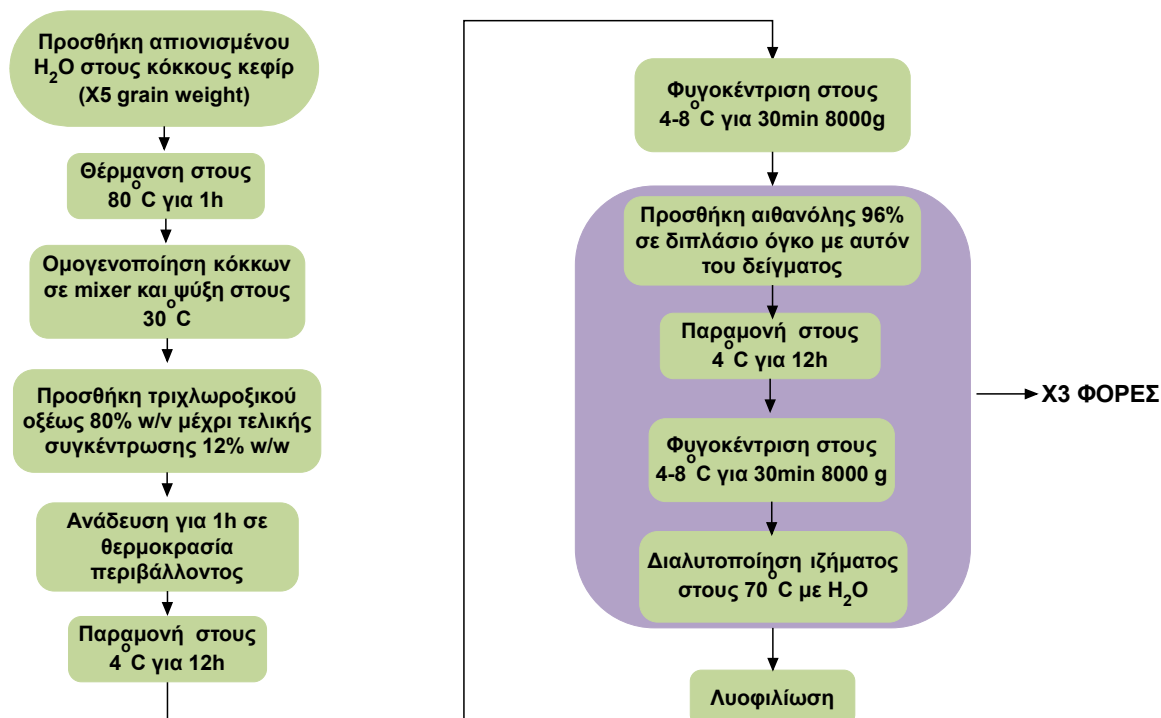
3.1.4. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ σε πιλοτική κλίμακα

Για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων σε πιλοτική κλίμακα χρησιμοποιήθηκε ζυμωτήρας χωρητικότητας 428 L (Pierre Guerin – Biolafitte, France). Το ποσοστό των κόκκων που εμβολιάστηκε στο γάλα, η χρονική διάρκεια των ζυμώσεων, ο τρόπος ρύθμισης της τιμής pH, και γενικά οι συνθήκες επώασης (θερμοκρασία, ανάδευση), καθώς επίσης και ο χειρισμός των κόκκων μετά την ολοκλήρωση της επώασης ήταν ίδια με τα αντίστοιχα του πολλαπλασιασμού των κόκκων σε εργαστηριακή κλίμακα. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 5 κύκλοι ζυμώσεων, οι οποίοι τελικά οδήγησαν στην παραγωγή 30 Kg κόκκων κεφίρ.

3.2. Απομόνωση του πολυσακχαρίτη κεφιράνη

Για την παραγωγή κεφιράνης υψηλού βαθμού καθαρότητας χρησιμοποιήθηκε μέθοδος, η οποία αποτελούνταν από συνδυασμό των σταδίων καθαρισμού και απομόνωσης πολυσακχαριτών όπως περιγράφονται από τους Rimada & Abraham (2003) και Ruas-Mediedo & de los Reyes-Gavilan (2005). Η μέθοδος, τα στάδια της οποίας φαίνονται στο Σχήμα 3.2, εφαρμόστηκε σε εργαστηριακή κλίμακα, ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητά της ως προς την απόδοση και το βαθμό καθαρότητας της παραγόμενης κεφιράνης. Η μέθοδος απομόνωσης περιλάμβανε κατεργασία με τριχλωροοξικό οξύ, για την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών μορίων, και επαναλαμβανόμενες καταβυθίσεις με αιθανόλη, για την απομάκρυνση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους.

Συγκεκριμένα, στους κόκκους κεφίρ προστέθηκε αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1:5 και ακολούθησε θέρμανση στους 80°C με ανάδευση για 1 h προκειμένου να αποσπαστεί η ποσότητα του εξωπολυσακχαρίτη από τα τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων, τα οποία παράγουν την κεφιράνη και στη συνέχεια ομογενοποίηση μέχρι οι κόκκοι του κεφίρ να διαλυτοποιηθούν πλήρως. Στο υγρό μίγμα προστέθηκε τριχλωροοξικό οξύ, αναδεύτηκε για 1 h και παρέμεινε για 12 h στους 4°C.



Σχήμα 3.2. Μέθοδος απομόνωσης κεφιράνης

Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 8000 g για 30 min στους 4°C για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Ο πολυσακχαρίτης στο υπερκείμενο υγρό καταβυθίστηκε με την προσθήκη διπλάσιου όγκου κρύας αιθανόλης και παραμονή στους 4°C για 12 h. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε 8000 g για 30 min στους 4°C. Το ίζημα της κεφιράνης διαλύθηκε σε ζεστό νερό 70°C και η διαδικασία της κατακρήμνισης επαναλήφθηκε 2 φορές. Το ίζημα τελικά διαλύθηκε σε ζεστό αποσταγμένο νερό (διάλυμα κεφιράνης) και αφυδατώθηκε με τη χρήση λυοφιλιωτή. Η μέθοδος που περιγράφηκε παραπάνω τροποποιήθηκε ανάλογα, ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε πιλοτική κλίμακα.

3.3. Παρασκευή διαλυμάτων, όξινων πηκτών και κρυοπηκτών κεφιράνης και συστημάτων κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος

Για το χαρακτηρισμό της κεφιράνης με τη χρήση διαφόρων μεθόδων, αλλά και για τη μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς και της δομής του πολυσακχαρίτη παρουσία ή απουσία πρωτεϊνών γάλακτος, ήταν απαραίτητη αρχικά η διαλυτοποίηση

της. Η διαλυτοποίηση της κεφίρανης πραγματοποιήθηκε επί το πλείστον σε αποσταγμένο νερό. Ωστόσο, για τη μελέτη της μορφολογίας του μορίου του πολυσακχαρίτη χρησιμοποιήθηκαν και άλλοι διαλύτες εκτός από το αποσταγμένο νερό. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά ο τρόπος παρασκευής των διαλυμάτων κεφίρανης σε κάθε περίπτωση, αλλά και η μετέπειτα διαδικασία που ακολουθήθηκε σε ορισμένες περιπτώσεις, ώστε να παρασκευαστούν οι όξινες πηκτές και οι κρυοπηκτές κεφίρανης και συστημάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος.

3.3.1. Παρασκευή υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης

Για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης (διαφόρων συγκεντρώσεων), η απαιτούμενη ποσότητα αυτής ζυγιζόταν σε αναλυτικό ζυγό και προσθέτονταν σε γυάλινη κωνική φιάλη χωρητικότητας 50 mL, η οποία έκλεινε ερμητικά με πλαστικό βιδωτό πώμα. Ακολουθούσε προσθήκη επαρκούς ποσότητας αποσταγμένου νερού (περίπου το 1/3 του συνολικά απαιτούμενου όγκου) και τοποθέτηση της κωνικής φιάλης σε υδατόλουτρο (Grant GLS 400, Grant Instruments Ltd, Cambridge, G.B.) στους 80°C υπό συνεχή ανάδευση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της κεφίρανης (περίπου 1 h). Μετά τη διαλυτοποίηση του πολυσακχαρίτη, το περιεχόμενο τη φιάλης ψυχόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθούσε η ποσοτική μεταφορά του σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, η οποία και συμπληρωνόταν με νερό μέχρι τη χαραγή. Τα διαλύματα χρησιμοποιούνταν αμέσως μετά την παρασκευή τους.

3.3.2. Παρασκευή διαλυμάτων κεφίρανης σε διάφορους διαλύτες

Για την παρασκευή διαλυμάτων κεφίρανης σε διάφορους διαλύτες, ποσότητα αυτών καθορισμένης συγκέντρωσης, τοποθετούνταν σε γυάλινη κωνική φιάλη χωρητικότητας 50mL μαζί με την απαιτούμενη ποσότητα κεφίρανης. Η διαλυτοποίηση του πολυσακχαρίτη πραγματοποιούνταν σε υδατόλουτρο, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.3.1. Στη συνέχεια ακολουθούσε ποσοτική μεταφορά του περιεχομένου της κωνικής φιάλης σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπλήρωση με ποσότητα διαλύτη μέχρι τη χαραγή. Τα διαλύματα χρησιμοποιούνταν αμέσως μετά την παρασκευή τους.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η διαμόρφωση του μορίου της κεφίρανης σε διάφορα περιβάλλοντα ήταν υδατικά διαλύματα οξέων με διαφορετικό αριθμό καρβοξυλίων (κιτρικό, τρυγικό και γαλακτικό οξύ), ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετική τιμή pH (sodium citrate buffer και tris-buffer), υδατικά διαλύματα αλάτων που διέφεραν μεταξύ τους ως προς το σθένος (χλωριούχο νάτριο-NaCl, χλωριούχο ασβέστιο-CaCl₂ και χλωριούχο αργίλιο-AlCl₃), καθώς επίσης και υδατικά διαλύματα άλλων ενώσεων όπως καυστικό κάλιο (KOH), αιθανόλη, λακτόζη, γλυκόζη, καζεϊνικά άλατα του νατρίου – Sodium Caseinates (SC) και συμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού – Whey Protein Concentrates (WP) και ουρία CO(NH₂)₂. Η παρασκευή των διαλυμάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος (SC και WP) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.3.3. Όλα τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάστηκαν σε δύο ή τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Για την παρασκευή διαλυμάτων κεφίρανης παρουσία οξέων σε χαμηλή συγκέντρωση, η διαλυτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε χαμηλότερη θερμοκρασία (50°C) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος υδρόλυσης των μορίων του πολυσακχαρίτη.

3.3.3. Παρασκευή διαλυμάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος

Για την παρασκευή των διαλυμάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες ορού (Hellenic Protein S.A., Athens, Greece) και καζεϊνικά άλατα (MIPRODAN 30, Arla Food Ingredients, Denmark) σε διαφορετικά ποσοστά προσθήκης. Η σύσταση των προσθέτων φαίνεται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Σύσταση των συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού (WP) και των καζεϊνικών αλάτων (SC).

Πρωτεΐνες γάλακτος	Υγρασία (%)	Πρωτεΐνες (%)	Λίπος (%)	Τέφρα (%)	Λακτόζη (%)
WP	≤ 5,0	80,0	3,5	3,0	10,0
SC	≤ 6,0	88,0-93,5	1,5	4,0	0,3

Μετά τη διαλυτοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας κεφίρανης σε αποσταγμένο νερό (όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.3.1) και την ποσοτική μεταφορά του περιεχομένου της κωνικής φιάλης σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως των 100 mL, ακολουθούσε η προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας WP και SC στους 35°C υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Μετά και την πλήρη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών γάλακτος, το περιεχόμενο από το ποτήρι ζέσεως μεταφερόταν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρωνόταν με ποσότητα αποσταγμένου νερού μέχρι τη χαραγή.

Τα διαλύματα κεφίρανης – πρωτεϊνών γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν ως έχει ή υπέστησαν θερμική επεξεργασία (85°C για 15 min) προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στις ρεολογικές ιδιότητες των συστημάτων. Τα διαλύματα χρησιμοποιούνταν αμέσως μετά την παρασκευή τους.

3.3.4. Παρασκευή όξινων πηκτών

Για την παρασκευή των όξινων πηκτών των συστημάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος χρησιμοποιήθηκε γλύκονο-δ-λακτόνη (GDL) (Alfa Aesar GmbH & CoHG, Germany). Το GDL είναι ένας εστέρας, ο οποίος μετά την προσθήκη του σε υδατικά διαλύματα ή στο γάλα διασπάται σε γλυκονικό οξύ προσομοιάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μείωση του pH που προκαλείται από τη δράση των μικροοργανισμών των διαφόρων οξυγαλακτικών καλλιιεργειών. Ο ρυθμός διάσπασης του GDL εξαρτάται από τη θερμοκρασία πήξης και από τη συγκέντρωση του, ενώ η τελική τιμή pH του συστήματος από τη συγκέντρωση του GDL. Η αύξηση της θερμοκρασίας πήξης και της συγκέντρωσης του εστέρα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού διάσπασης, ενώ η τελική τιμή pH είναι χαμηλότερη όταν χρησιμοποιούνται αυξημένες συγκεντρώσεις του εστέρα. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν τέτοιες, ώστε να προσομοιάζουν τις συνθήκες επώασης της γιαούρτης, του πιο δημοφιλούς όξινου γαλακτοκομικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, το ποσοστό προσθήκης του GDL ήταν 1% και η θερμοκρασία πήξης 30°C. Οι παραπάνω συνθήκες είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής pH του συστήματος στο 4,4. Η προσθήκη του GDL γινόταν μετά την παρασκευή των διαλυμάτων, ακολουθούσε ανάμιξη σε μαγνητικό αναδευτήρα για 2 min και μεταφορά των δειγμάτων στον κλίβανο μέχρι να μειωθεί το pH στην επιθυμητή

τιμή. Μετά την ολοκλήρωση της πήξης, τα δείγματα τοποθετούνταν στους 4°C μέχρι να εξεταστούν.

Για τη μέτρηση του pH των όξινων πηκτών χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακό πεχάμετρο (EDT Instruments GP353 ATC pH METER, Dover, UK). Το όργανο ρυθμιζόταν με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων (Buffer 4 και 7).

3.3.5. Παρασκευή κρυοπηκτών

Για την παρασκευή των κρυοπηκτών κεφिरάνης ή συστημάτων κεφिरάνης-πρωτεϊνών γάλακτος, τα δείγματα καταψύχονταν στους -18°C για 24 h. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στους 4°C για 24 h, ώστε να αποψυχθούν προτού εξεταστούν. Σε κάποια δείγματα πραγματοποιείτο και δεύτερος κύκλος κατάψυξης-απόψυξης.

3.4. Χαρακτηρισμός της κεφिरάνης

Για τον χαρακτηρισμό του πολυσακχαρίτη πραγματοποιήθηκαν: προσδιορισμός υγρασίας, πρωτεϊνών, ολικών σακχάρων, αναλογίας μονοσακχαριτών, εσωτερικού ιξώδους, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, μέτρηση ζ-δυναμικού και τεχνικές στατικής και δυναμικής σκέδασης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

3.4.1. Προσδιορισμός υγρασίας

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας της κεφिरάνης χρησιμοποιήθηκε η σταθμική μέθοδος, η οποία στηρίζεται στην ξήρανση του δείγματος στους 102±1°C μέχρι σταθερού βάρους (AOAC, 1990).

Περίπου 5 g κεφिरάνης τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένο (σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια 0,1 mg) και αποξηραμένο γυάλινο τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο στους 102±1°C για 3 h. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα για να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζυγίστηκαν. Η ξήρανση στον κλίβανο επαναλήφθηκε

μέχρις ότου η διαφορά μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων να μην ήταν μεγαλύτερη από 0,5 mg.

Η περιεκτικότητα της κεφιλάνης σε υγρασία υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Υγρασία (\%)} = \frac{\alpha_2 - \alpha_3}{\alpha_2 - \alpha_1} \times 100 \quad 3.1$$

όπου α_1 είναι το βάρος (g) του τρυβλίου, α_2 το βάρος (g) του τρυβλίου και της κεφιλάνης πριν την ξήρανση (μεικτό βάρος πριν την ξήρανση) και α_3 το βάρος (g) του τρυβλίου και της κεφιλάνης μετά την ξήρανση (μεικτό βάρος μετά την ξήρανση).

Η τιμή της υγρασίας του δείγματος είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

3.4.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού του ολικού αζώτου του δείγματος, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kjeldahl. Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών, η περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο πολλαπλασιάζεται με τον κατάλληλο συντελεστή ανά κατηγορία τροφίμων (ο οποίος εκφράζει την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτά βάσει της συγκέντρωσης του αζώτου). Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας της κεφιλάνης σε πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής 6,38 ο οποίος χρησιμοποιείται στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (AOAC, 1990).

Σύμφωνα με τη μέθοδο Kjeldahl, πραγματοποιείται θέρμανση του δείγματος με πυκνό θειικό οξύ παρουσία καταλύτη στους 400°C. Κατά τη θέρμανση γίνεται καύση των οργανικών ουσιών του δείγματος και το άζωτο μετατρέπεται σε θειικό αμμώνιο. Ακολουθεί απελευθέρωση της αμμωνίας με την προσθήκη καυστικού νατρίου, διαχωρισμός της με απόσταξη με υδρατμούς και παραλαβή της σε διάλυμα βορικού οξέος, ως βορικό αμμώνιο. Τέλος, η ποσότητα του βορικού αμμωνίου ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος.

Προσδιορισμός ολικού αζώτου

Σε σωλήνα Kjeldahl τοποθετήθηκαν δύο δισκία καταλύτη (1000 KJELTABS CX, Gerhardt GmbH & Co, Königswinter, Germany) (το κάθε δισκίο περιέχει 5 g θειικού καλίου- K_2SO_4 και 0,5 g θειικού χαλκού- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) και περίπου 3 g δείγματος (ζυγισμένο με ακρίβεια 0,1 mg σε χαρτί ελευθέρου αζώτου). Στη συνέχεια προστέθηκαν 25 mL πυκνού θειικού οξέος ($d=1,84 \text{ g/cm}^3$ στους 20°C) και το περιεχόμενο της φιάλης αναμίχθηκε.

Ακολούθησε θέρμανση σε συσκευή καύσης (Gerhardt Turbotherm, Gerhardt GmbH & Co, Königswinter, Germany), η οποία διαθέτει και σύστημα εξουδετέρωσης των ατμών καύσης (Gerhardt Scrubber Unit Turbosog, Gerhardt GmbH & Co, Königswinter, Germany). Αρχικά η θέρμανση ήταν ήπια μέχρι να σταματήσει ο αφρισμός και το περιεχόμενο γίνει υγρό. Κατόπιν η θέρμανση συνεχίστηκε έντονα, μέχρις ότου το περιεχόμενο γίνει διαυγές.

Η απόσταξη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συσκευής απόσταξης (Gerhardt Vapodest 50, Gerhardt GmbH & Co, Königswinter, Germany). Ο σωλήνας Kjeldahl τοποθετήθηκε στην υποδοχή της συσκευής και τέθηκε σε λειτουργία το πρόγραμμα που είχε κατάλληλα προσαρμοστεί στις απαιτήσεις του προσδιορισμού. Συγκεκριμένα, αρχικά προστίθετο ποσότητα νερού και στη συνέχεια ποσότητα διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 30% (w/w). Μετά από παραμονή 30 s ξεκινούσε η απόσταξη, η οποία γινόταν με διοχέτευση ατμού στο σωλήνα Kjeldahl και διαρκούσε 4 min. Οι ατμοί που παράγονταν συλλέγονταν σε διάλυμα βορικού οξέος συγκέντρωσης 4% (w/v). Στο δοχείο συλλογής ατμών ήταν βυθισμένο ηλεκτρόδιο για τη μέτρηση της τιμής pH. Η διάρκεια της απόσταξης ήταν τέτοια, ώστε να μη παρατηρείται αύξηση της τιμής του pH στο δοχείο συλλογής των ατμών της συσκευής. Η τιτλοδότηση του δείγματος με πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος κανονικότητας 0,1 N γίνονταν σε πραγματικό χρόνο και ολοκληρωνόταν όταν η τιμή pH είχε μειωθεί στην αρχική της τιμή (τιμή pH του διαλύματος βορικού οξέος περίπου 3,8).

Για την ολοκλήρωση του προσδιορισμού απαιτείτο και λευκός προσδιορισμός, ο οποίος πραγματοποιείτο με τον ίδιο τρόπο ακριβώς χωρίς την προσθήκη δείγματος.

Το ολικό άζωτο του δείγματος υπολογίστηκε από τον τύπο :

$$\text{Ολικό άζωτο \%} = \frac{(\alpha - \beta) \times N \times 1,4}{B} \quad 3.2$$

όπου α είναι τα mL υδροχλωρικού οξέος που καταναλώθηκαν κατά τον προσδιορισμό στο δείγμα, β : τα mL υδροχλωρικού οξέος που καταναλώθηκαν κατά το λευκό προσδιορισμό, N η κανονικότητα του υδροχλωρικού οξέος και B το βάρος του δείγματος σε g. Ο προσδιορισμός του ολικού αζώτου πραγματοποιήθηκε 3 φορές.

Υπολογισμός πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες % του δείγματος υπολογίζονται ως εξής:

$$\text{Πρωτεΐνες \%} = \text{Ολικό άζωτο \%} \times 6,38 \quad 3.3$$

3.4.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων με τη μέθοδο φαινόλης-θειικού οξέος

Για τον προσδιορισμό των ολικών υδατανθράκων στην κεφίρανη εφαρμόστηκε η μέθοδος AOAC 988.12 (AOAC, 1990). Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των σακχάρων με διάλυμα φαινόλης και πυκνού θειικού οξέος και την μέτρηση της απορρόφησης του χρώματος στα 485 nm.

Για την πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκαν διαλύματα γλυκόζης ως εξής:

Ζυγίστηκαν 500 mg γλυκόζης και διαλύθηκαν σε 500 mL απιονισμένου νερού (1 mg/mL). Στη συνέχεια 100 mL από αυτό το διάλυμα αραιώθηκαν σε 1 L απιονισμένου νερού (0,1 mg/mL). Κατόπιν παρασκευάστηκαν 10 διαλύματα (0,01-0,1 mg/mL) αραιώνοντας ανάλογες ποσότητες του διαλύματος σε 100 mL.

Δοκιμή – φαινόλης-θειικού οξέος

Σε σωλήνες (20×150 mm) τοποθετήθηκαν 2 mL από κάθε διάλυμα πρότυπο ή άγνωστο. Για το λευκό προσδιορισμό τοποθετήθηκαν 2 mL απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL διαλύματος φαινόλης συγκέντρωσης 5% w/v και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Κατόπιν προστέθηκαν 10 mL πυκνού διαλύματος θειικού

οξέος 98%, και ακολούθησε ανάδευση στο vortex. Αμέσως μετά οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 2 min και αφέθηκαν να κρυώσουν για 30 min. Έπειτα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 485 nm, με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου UV-Vis Helios-Alpha της εταιρείας Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA), μηδενίζοντας με το λευκό δείγμα. Από τα διαλύματα 10 συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς. Η απορρόφηση του άγνωστου δείγματος έπρεπε να είναι από 0,1-0,6. Για μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης ακολουθούσε αραίωση του δείγματος.

3.4.4. Προσδιορισμός αναλογίας μονομερών του πολυσακχαρίτη με τη χρήση αέριου χρωματογράφου με ανίχνευση φασματογράφου μάζας GC-MS/MS

Για τον προσδιορισμό των μονομερών τα δείγματα κεφιράνης καθώς και τα πρότυπα μονοσακχαριτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση, ακολούθησαν την παρακάτω διαδικασία προπαρασκευής για τη δημιουργία παραγώγων ανίχνευσης στη διάταξη GC-MS/MS (Chaplin, 1982).

Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν περίπου 0,001-0,005 g ξηρού πολυσακχαρίτη (ή προτύπου μονοσακχαρίτη) και στη συνέχεια προστέθηκαν 1 mL μεθανολικό υδροχλωρικό οξύ 0,5 M και 0,25 mL $\text{CH}_3\text{COOCH}_3$ στα φιαλίδια που περιείχαν το δείγμα. Τα φιαλίδια κλείστηκαν ερμητικά και ανακινήθηκαν έντονα και στη συνέχεια ακολούθησε η παραμονή τους σε υδατόλουτρο στους 85°C για 18 h. Μετά τις 18 h, στα φιαλίδια προστέθηκαν 0,25 mL 1,1 διμέθυλο-αιθανόλη (t-butyl- alcohol) και ανακινήθηκαν. Ακολούθησε εξάτμιση με ροή αζώτου (N_2) σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι ξηρού υπολείμματος (περίπου 105 min). Έπειτα προστέθηκαν 1,25 mL μεθανόλη, 0,125 mL οξικού ανυδρίτη και 0,125 mL πυριδίνης, ανακινήθηκαν και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Ακολούθησε εξάτμιση σε ροή αζώτου μέχρι ξηρού υπολείμματος. Στα ξηρά πλέον δείγματα, προστέθηκαν 1 mL πυριδίνης, 0,2 mL εξαμέθυλο-δισιλοξάνιο (HMDS) και 0,1 mL τριμέθυλο-χλωροσιλάνιο (TMCS) και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min. Ακολούθησε εξάτμιση των δειγμάτων μέχρι ξηρού (σε ροή N_2 , ~ 50 min) και επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL εξάνιο. Μετά από διήθηση, τα δείγματα κλείστηκαν σε γυάλινα φιαλίδια με πώμα και ήταν έτοιμα για ανάλυση στον χρωματογράφο.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν τα δείγματα των προτύπων (μονοσακχαριτών) καθώς και τα παράγωγα των πολυσακχαριτών σε αέριο χρωματογράφο Trace GC Ultra συζευγμένο με φασματογράφο μάζας παγίδας ιόντων (Ion Trap) Polaris Q της εταιρείας Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) (Σχήμα 3.3). Ο όγκος έγχυσης ήταν 1μL, η υποδοχή του δείγματος (injector) γινόταν στους 300°C με split ratio 1/50 και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου της συσκευής ήταν 140°C για 2min, και αύξηση με ρυθμό 8°C/min μέχρι τους 260°C. Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο με παροχή 2-3 mL/min, και πίεση 0,6-0,8 atm, και εύρος μαζών (MS scan range m/z) 35-750.



Σχήμα 3.3. Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματογράφο μάζας GC-MS/MS.

Από τους χρόνους κατακράτησης κάθε κορυφής των προτύπων έγινε ταυτοποίηση των κορυφών που έδωσαν τα κλάσματα των πολυσακχαριτών με τη βοήθεια του λογισμικού Xcalibur.

3.4.5. Ρεολογικός χαρακτηρισμός κεφιράνης

Ο ρεολογικός χαρακτηρισμός της κεφιράνης περιλάμβανε τον προσδιορισμό της κρίσιμης συγκέντρωσης (C^*) και του ειδικού ιξώδους (η_{sp}) με τη χρήση γυάλινου τριχοειδούς ιξωδομέτρου Ubbelohde. Για τον προσδιορισμό του C^* χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα του πολυσακχαρίτη συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0,075%

έως 1,2% (w/w). Το ειδικό ιξώδες προσδιορίστηκε σε αραιά διαλύματα της κεφίρανης (συγκέντρωσης μικρότερης από το C^*) χρησιμοποιώντας διάφορους διαλύτες.

Για την καλύτερη κατανόηση του τρόπου, με τον οποίο το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται ο πολυσακχαρίτης, δηλαδή το κεφίρ, επηρεάζει τη συμπεριφορά του και συγκεκριμένα τις ρεολογικές του ιδιότητες, δημιουργήθηκαν πρότυπα διαλύματα του σε διαφορετικές συνθήκες (pH, ιονικής ισχύος, χρήση διαφόρων οξέων και σακχάρων καθώς και αιθανόλης), καθότι το κεφίρ είναι ένα πολύπλοκο σύστημα αποτελούμενο από φορτισμένα μεγαλομόρια, οργανικά οξέα, σάκχαρα και αιθανόλη.

Οι μετρήσεις στο ιξωδόμετρο Ubbelohde στηρίζονται στη μέτρηση του χρόνου ροής του διαλύτη (125 s για το αποσταγμένο νερό) και του διαλύματος του πολυσακχαρίτη. Από τις μετρήσεις του ειδικού (specific) ιξώδους υπολογίστηκε και το εσωτερικό (intrinsic) ιξώδες του πολυσακχαρίτη σε διάφορους διαλύτες.

Το ιξωδόμετρο τοποθετείται σε λουτρό (νερού-αιθυλενογλυκόλης 50-50 v/v) σταθερής θερμοκρασίας $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$, έτσι ώστε όλο το τμήμα του που περιέχει το προς μέτρηση δείγμα να είναι πλήρως εμβαπτισμένο στο υγρό. Με πιπέτα θετικής εκτόπισης μεταφέρθηκαν 18 mL διαλύματος ή διαλύτη στο ιξωδόμετρο όπου παρέμεναν για 15 min, έτσι ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία στο εσωτερικό του ιξωδομέτρου, στους 20°C , προτού να μετρηθεί ο χρόνος που απαιτείται ώστε το υγρό να διατρήξει τον τριχοειδή σωλήνα του ιξωδομέτρου. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλα τα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Το ειδικό ιξώδες για κάθε μέτρηση προσδιορίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\eta_{sp} = [\text{Χρόνος ροής του δείγματος (s)} - \text{Χρόνος ροής του διαλύτη (s)}] / \text{Χρόνος ροής του διαλύτη (s)}$$

Από το διάγραμμα του λόγου η_{sp}/c σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές συγκεντρώσεων του πολυσακχαρίτη και από την τεταγμένη της καμπύλης που προκύπτει υπολογίζεται το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$ (intrinsic viscosity).

3.4.6. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης

Για τον προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους (κατά βάρος), της κεφίρανης χρησιμοποιήθηκε σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI Detector ERC7515A Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) και την χρήση σειράς πρότυπων δεξτρανών με εύρος από 5 KDa έως 670 KDa (Fluka Biochemika) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν συνδεδεμένες σε σειρά 2 στήλες PL aquagel-OH 8 μm 300 $\times$ 7,5 mm (Polymer Laboratories Varian Inc.) καθώς και μια προστήλη ίδιου τύπου 50 $\times$ 7,5 mm. Η θερμοκρασία στο σύστημα ήταν σταθερή στους 35°C και η ροή της κινητής φάσης (υπερκάθαρο νερό με 0,02% w/v αζίδιο του νατρίου) ήταν στα 0,8 mL/min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 1 mL. Όλα τα διαλύματα διηθούνταν με φίλτρα σύριγγας με διάμετρο πόρων 0,45 μm .

3.4.7. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με ανιχνευτή σκέδασης laser υπό πολλαπλές γωνίες (Multi Angle Laser Light Scattering-MALLS).

Διαλύματα του πολυσακχαρίτη μελετήθηκαν με υγρή χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο με τη χρήση ανιχνευτή σκέδασης Laser (660 nm) MALLS υπό πολλαπλές γωνίες (35°, 50°, 75°, 90°, 105°, 130° και 145°) (BI-MwA Brookhaven Instruments, USA), για τον προσδιορισμό της κατανομής των μοριακών βαρών M_w , της γυροσκοπικής ακτίνας R_g , και του δείκτη πολυδιασποράς $\frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}}$. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ParSEC Chromatography.

3.4.8. Στατική σκέδαση (SLS-MALLS)

Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων του μορίου της κεφίρανης χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής προσδιορισμού μοριακού βάρους (BI-MwA Brookhaven Instruments, USA) που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4.7. εκτός χρωματογραφικής διάταξης (batch-mode) (Σχήμα 3.4). Παρασκευάστηκαν (με μεγάλη ακρίβεια) αραιά διαλύματα κεφίρανης διαφορετικών συγκεντρώσεων τα οποία

διηθούνταν με φίλτρο 0,45 μm και η έγχυση με ροή 0,5 mL/min γινόταν με την χρήση αντλίας σύριγγας (Model R-E, Razel Scientific Instruments) λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου.



Σχήμα 3.4. Ανιχνευτής προσδιορισμού μοριακού βάρους πολυμερών.

Με τη χρήση του λογισμικού BI-ZPMwA Zimm Plot Software κατασκευάστηκε το διάγραμμα Zimm. Ο προσδιορισμός του διαφορικού της αύξησης του δείκτη διάθλασης με τη συγκέντρωση (dn/dC) έγινε στη συσκευή BI-DNDC Differential Refractometer (Brookhaven Instruments, USA) με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού παρασκευάζοντας με αντίστοιχο τρόπο διαλύματα του πολυσακχαρίτη, ενώ η βαθμονόμηση του έγινε με σειρά διαλυμάτων χλωριούχου καλίου (KCl).

3.4.9. Δυναμική σκέδαση (DLS) και μέτρηση ζ-δυναμικού

Για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής ακτίνας και του ζ-δυναμικού χρησιμοποιήθηκε το όργανο DelsaNano C (Beckman Coulter, Inc., Brea CA, USA). Για τη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων από το λογισμικό εφαρμόστηκε η μέθοδος CONTIN στην καταγεγραμμένη ένταση επιλέγοντας την ίδια πάντα τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (Standard Operating Procedure, SOP) σε κάθε

μέτρηση. Για τη μέτρηση του φορτίου των σωματιδίων των διαλυμάτων εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο σε ένα ειδικά σχεδιασμένο κελί όπου υπολογίστηκε η ταχύτητα των φορτισμένων σωματιδίων με την καταγραφή της σκεδαζόμενης ακτίνας laser (Electrophoretic Light Scattering).

3.5. Μελέτη ρεολογικής συμπεριφοράς διαλυμάτων, όξινων πηκτών και κρυοπηκτών κεφίρανης και συστημάτων κεφίρανης-πρωτεϊνών γάλακτος

Για τη μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο δυναμικός μηχανικός αναλυτής (Dynamic Mechanical Analyzer, DMA) Bohlin C-VOR 150 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Στα δείγματα εφαρμόστηκαν η δυναμική δοκιμή, η δοκιμή ερπυσμού και προσδιορίστηκε το ιξώδες τους.

3.5.1. Εφαρμογή δοκιμών μικρής παραμόρφωσης

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή των δοκιμών μικρής παραμόρφωσης ήταν αυτή της πλάκας-πλάκας. Η πλάκα που προσαρμόστηκε στην κεφαλή του οργάνου ήταν διαμέτρου 40 mm και είχε οδοντωτή (serrated) επιφάνεια, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα ολίσθησης. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε ειδικά κατασκευασμένους περιέκτες από αλουμίνιο διαστάσεων 40 mm διαμέτρου και 10 mm ύψους οι οποίοι αποτελούσαν και τους δειγματοφορείς μέτρησης. Η επιφάνεια των περιεκτών ήταν επίσης οδοντωτή.

Η παρασκευή των όξινων πηκτών και των κρυοπηκτών γίνονταν μέσα σε ειδικά κατασκευασμένους περιέκτες-δειγματοφορείς (*in situ*) ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή της δομής τους που θα συνέβαινε αν είχαν παρασκευασθεί σε περιέκτες άλλους από τους δειγματοφορείς και για να μετρηθούν θα έπρεπε να μετακινηθούν από τους περιέκτες παρασκευής τους και να τοποθετηθούν στην πλάκα του δειγματοφορέα μέτρησης του οργάνου, οπότε θα συνέβαινε, αναπόφευκτα, μικρής ή μεγάλης έκτασης καταστροφή της δομής του δείγματος. Συγκεκριμένα, η επώαση των δειγμάτων, αλλά και η κατάψυξη τους γινόταν μετά τη μεταφορά των διαλυμάτων στους περιέκτες.

Για τη μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των δειγμάτων οι περιέκτες στερεώνονταν στη βάση του οργάνου και η επάνω πλάκα μετακινούνταν προς το δείγμα μέχρι να έρθει σε επαφή μαζί του. Στη συνέχεια ξεκινούσε η μέτρηση.

Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C, ώστε να προσδιορισθεί εάν η ελαστικότητα των δειγμάτων είναι ενθαλπικής ή εντροπικής φύσης.

3.5.1.1. Δυναμική δοκιμή ή δοκιμή ταλάντωσης

Η δυναμική δοκιμή εφαρμόστηκε χρησιμοποιώντας συνθήκες σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης με ελεγχόμενη παραμόρφωση. Συγκεκριμένα, η συχνότητα κυμαινόταν στο εύρος 0,01-10 Hz, ενώ οι μετρήσεις έγιναν υπό καθεστώς ελεγχόμενης παραμόρφωσης (controlled strain) ώστε να διασφαλίζεται ότι οι μετρήσεις πάντοτε, θα πραγματοποιούνταν εντός της περιοχής της γραμμικής ελαστικότητας. Η παραμόρφωση των δειγμάτων κατά την εφαρμογή της δοκιμής ήταν 1×10^{-5} . Από την εφαρμογή της δοκιμής προσδιορίστηκαν ο G' και ο G'' . Επίσης κατά τη δυναμική δοκιμή εφαρμόστηκε στα δείγματα θερμοκρασιακή σάρωση στο εύρος θερμοκρασιών από 5°C έως 50°C με συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.

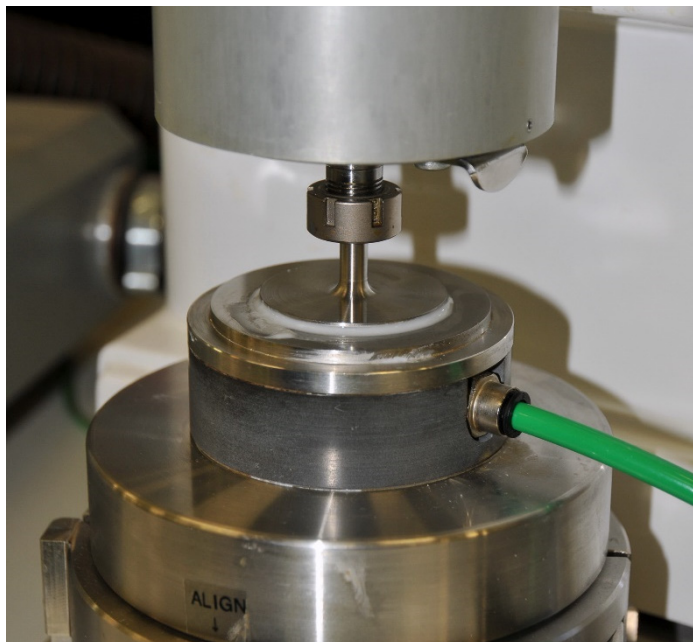
3.5.1.2. Δοκιμή ερπυσμού

Κατά τη δοκιμή ερπυσμού η διατμητική τάση ρυθμίστηκε στην τιμή 0,05 Pa (η οποία ήταν μέσα στα όρια γραμμικής ελαστικότητας), ο χρόνος εφαρμογής της ήταν 180 s και ο χρόνος ανάκαμψης 100 s. Οι τιμές της παραμόρφωσης των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων και για όλα τα δείγματα ήταν της τάξης των 10^{-4} με 10^{-6} . Από την επεξεργασία των μετρήσεων προσδιορίστηκαν ο συντελεστής ελαστικότητας (Modulus of Elasticity), η στιγμιαία ελαστικότητα G_g , οι συντελεστές επιβραδυνόμενης ελαστικότητας $G_{1,2,3,4}$, οι χρόνοι επιβράδυνσης $\tau_{1,2,3,4}$, το νευτώνειο ιξώδες (η_0 ή μ_0) σε κατάσταση μηδενικής διάτμησης (zero shear viscosity) και η παραμόρφωση (strain).

3.5.2. Προσδιορισμός ιξώδους

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ιξώδους ήταν αυτή του κώνου-πλάκας. Ποσότητα δείγματος τοποθετήθηκε στον δειγματοφορέα του οργάνου που ήταν η πλάκα (Σχήμα 3.5). Ο κώνος, ο οποίος σχημάτιζε γωνία 4° μετακινήθηκε προς το δείγμα, έτσι ώστε να σχηματιστεί διάκενο μεταξύ του κώνου και

της πλάκας 150 μm . Η περίσσεια του δείγματος αφαιρέθηκε με τη βοήθεια σπάτουλας και στη συνέχεια δόθηκε εντολή για έναρξη της μέτρησης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C, στους 25°C και στους 40°C, υπό καθεστώς controlled strain.



Σχήμα 3.5. Διάταξη μέτρησης ιξώδους.

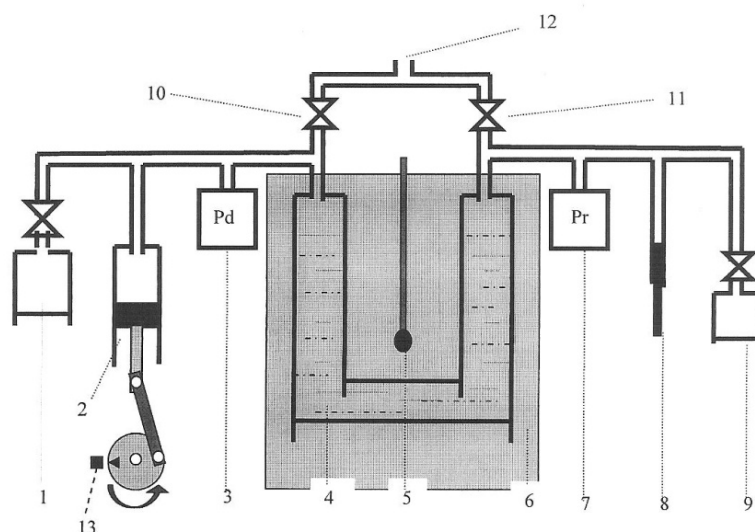
Το ιξώδες των δειγμάτων προσδιορίστηκε σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας διάτμησης (από 10^{-3} έως 10^3 s^{-1}). Από τις καμπύλες ροής των δειγμάτων υπολογίστηκε ο δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς n και ο συντελεστής συνεκτικότητας K . Επίσης υπολογίστηκε και η ενέργεια ενεργοποίησης E_a .

3.5.3. Μελέτη της πορείας δημιουργίας πηκτής με το ρεόμετρο υοειδούς σωλήνα

3.5.3.1. Περιγραφή οργάνου

Σύμφωνα με το Σχήμα 3.6 που ακολουθεί, το ρεόμετρο υοειδούς σωλήνα (ιδιοκατασκευή) αποτελείται από το δειγματοφορέα του υοειδούς σωλήνα (4) μέσα στον οποίο τοποθετείται το υπό μέτρηση δείγμα. Τα δύο σκέλη του υοειδούς σωλήνα είναι ταυτόσημα και συνδέονται με τα άλλα εξαρτήματα του ρεομέτρου. Στην αριστερή πλευρά του, ο υοειδής σωλήνας περιλαμβάνει τις βάνες (10), τον μεταλλάκτη της πίεσης (3), την μονάδα δημιουργίας της πίεσης του αέρα (2) και μία ή περισσότερες

διατάξεις νεκρού όγκου βάνας (1). Στην δεξιά πλευρά του υοειδούς σωλήνα είναι συνδεδεμένα η βάνα (11), ο μεταλλάκτης πίεσης (7), η βαθμολογημένη μικρή μονάδα εμβόλου-κυλίνδρου (8), και μία ή περισσότερες διατάξεις νεκρού όγκου-βάνας (9). Η μονάδα του υοειδούς σωλήνα εισάγεται μεταξύ των δύο μονάδων θερμοστάτισης (6) οι οποίες σε σύνδεση με τον αισθητήρα θερμοκρασίας (5) που βρίσκεται στερεωμένος στην κεντρική περιοχή της μονάδας του υοειδούς σωλήνα, παρέχουν ένα θερμοστατούμενο περιβάλλον για το δείγμα. Οι αναφερθείσες βάνες είναι κατά προτίμηση ηλεκτροβάνες που επικοινωνούν από τη μία με την ατμόσφαιρα μέσω του ανοίγματος (12). Η λειτουργία του ρεομέτρου είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και επιτελείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και επιπλέον φέρει σύστημα καταγραφής ανάκτησης και επεξεργασίας δεδομένων. (Xu & Raphaelides, 2005).



Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση του δυναμικού ρεομέτρου υοειδούς σωλήνα,: (1 & 9) διατάξεις νεκρού όγκου, (2) μονάδα ανάπτυξης πίεσης του αέρα, (3) μεταλλάκτης πίεσης αριστερής πλευράς, (4) μονάδα υοειδούς σωλήνα (δειγματοφορέας), (5) αισθητήρας μέτρησης θερμοκρασίας, (6) μονάδα θερμοστάτισης δειγματοφορέα, (7) μεταλλάκτης πίεσης δεξιάς πλευράς, (8) μονάδα κυλίνδρου εμβόλου με παλινδρομική κίνηση, (10 & 11) ηλεκτροβάνες (12) βάνα εκτόνωσης αέρα στο περιβάλλον (Xu & Raphaelides, 2005).

3.5.3.2. Αρχή λειτουργίας ρεομέτρου

Το υπό μέτρηση δείγμα αφήνεται να δημιουργήσει πηκτή στον υοειδή σωλήνα (4) σε θερμοκρασία προκαθορισμένη από τη μονάδα του θερμοστάτη (6) και με τις βάνες (10) και (11) αφημένες ανοικτές ώστε να επικοινωνούν με την ατμόσφαιρα. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων αμφότερες οι πλευρές του δείγματος απομονώνονται από το περιβάλλον με το κλείσιμο των βανών (10) και (11). Στη συνέχεια στην αριστερή πλευρά του δείγματος εφαρμόζεται πίεση αέρα που δημιουργείται από τη μονάδα δημιουργίας πίεσης (2). Η εφαρμοζόμενη πίεση αέρα καταγράφεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του μεταλλάκτη πίεσης (3). Το εύρος της εφαρμοζόμενης πίεσης μπορεί να επιλεγθεί περιλαμβάνοντας ορισμένο νεκρό όγκο του στοιχείου (1) μέσω της βάνας ελέγχου του. Ο όγκος μετατόπισης του δείγματος κάτω από την επίδραση της εφαρμοζόμενης πίεσης προκαλεί μεταβολή στην πίεση στον κλειστό χώρο στη δεξιά πλευρά του υοειδούς σωλήνα που επίσης καταγράφεται στον υπολογιστή μέσω του μεταλλάκτη πίεσης (7). Η πίεση στη δεξιά πλευρά του υοειδούς σωλήνα ονομάζεται ανάδραση, η οποία εξισορροπεί την εφαρμοζόμενη πίεση αέρα στην αριστερή πλευρά με αποτέλεσμα τη δημιουργία μειωμένης πίεσης. Το μέγεθος της ανάδρασης μπορεί να επηρεαστεί από την συμπίληψη μέρους του νεκρού όγκου του στοιχείου (9) μέσω της βάνας ελέγχου του. Η εκμετάλλευση της ανάδρασης επιτρέπει τη μέτρηση της ακαμψίας πολύ ασθενών πηκτών με ένα προβλέψιμο όριο μετατόπισης του όγκου. Το βαθμολογημένο μικρό σύστημα εμβόλου-κυλίνδρου (8), για το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια σύριγγα, παρέχει τον προσδιορισμό του νεκρού όγκου που υπάρχει στο άνω μέρος της δεξιάς πλευράς του δείγματος. Η μετατόπιση του όγκου μπορεί κατόπιν να υπολογιστεί από την ανάδραση. Ο συντελεστής ακαμψίας του δείγματος υπολογίζεται από την επενεργούσα πίεση και την προκύπτουσα μετατόπιση του όγκου. Ο υπολογισμός των παραμέτρων G' (storage modulus), G'' (loss modulus) και $\tan \delta$ βασίζεται σε θεωρητική ανάλυση ανάλογη αυτής του νόμου του Poiseuille για ροή ρευστού μέσω σωλήνα.

3.5.3.3. Μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των δειγμάτων κατά τη διάρκεια σχηματισμού πηκτής

Το δείγμα τοποθετήθηκε στον υποδοχέα του οργάνου (υοειδής σωλήνας) μέχρι καθορισμένου ύψους. Η ελεύθερη επιφάνεια του δείγματος καλύφθηκε με λεπτό

στρώμα υγρής παραφίνης, για να αποφευχθούν φαινόμενα εξάτμισης και δημιουργίας υμενίου. Στη συνέχεια το δείγμα απομονώθηκε από το περιβάλλον με το κλείσιμο των δύο βανών, αριστερά και δεξιά του σωλήνα. Επιπλέον μικρή ποσότητα του δείγματος, αφού μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και εμβαπτίστηκε σε αυτό ηλεκτρόδιο μέτρησης pH, όπως επίσης και αισθητήρας μέτρησης θερμοκρασίας τοποθετήθηκε μέσα σε θερμοστατούμενο χώρο δίπλα στο όργανο. Η θερμοκρασία σε όλη τη διάρκεια του πειράματος παρέμενε σταθερή τόσο στον περιέκτη όσο και στο θερμοστατούμενο χώρο. Η επιθυμητή θερμοκρασία πήξης ορίστηκε στους 30°C και τέθηκε σε λειτουργία το ρεόμετρο μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή. Ανά 3 min και μέχρι να σταθεροποιηθούν οι τιμές των δύο συντελεστών (G' και G'') ή να καταρρεύσει η δομή του δείγματος (μείωση των τιμών του G') καταγράφονταν οι τιμές των G' , G'' και pH σε συνάρτηση με το χρόνο.

3.5.4 Λιπαινόμενη συμπιεστή ροή

3.5.4.1. Περιγραφή του Texture Analyser TA.XT.plus

Το Texture Analyser TA.XT.plus (Stable Micro Systems, Ltd, Surry, UK) είναι ένα όργανο μελέτης της υφής των τροφίμων υποβάλλοντας τα σε συμπίεση ή εφελκυσμό. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν από το λογισμικό Texture Exponent 32, που αποτελούν τους ψηφιακούς καταγραφείς των δυνάμεων και του χρόνου κατά τη συμπίεση.

Στο Texture Analyser TA.XT.plus έγιναν μετρήσεις με τη χρήση της δοκιμής μονοαξονικής συμπίεσης με σταθερό ρυθμό παραμόρφωσης.

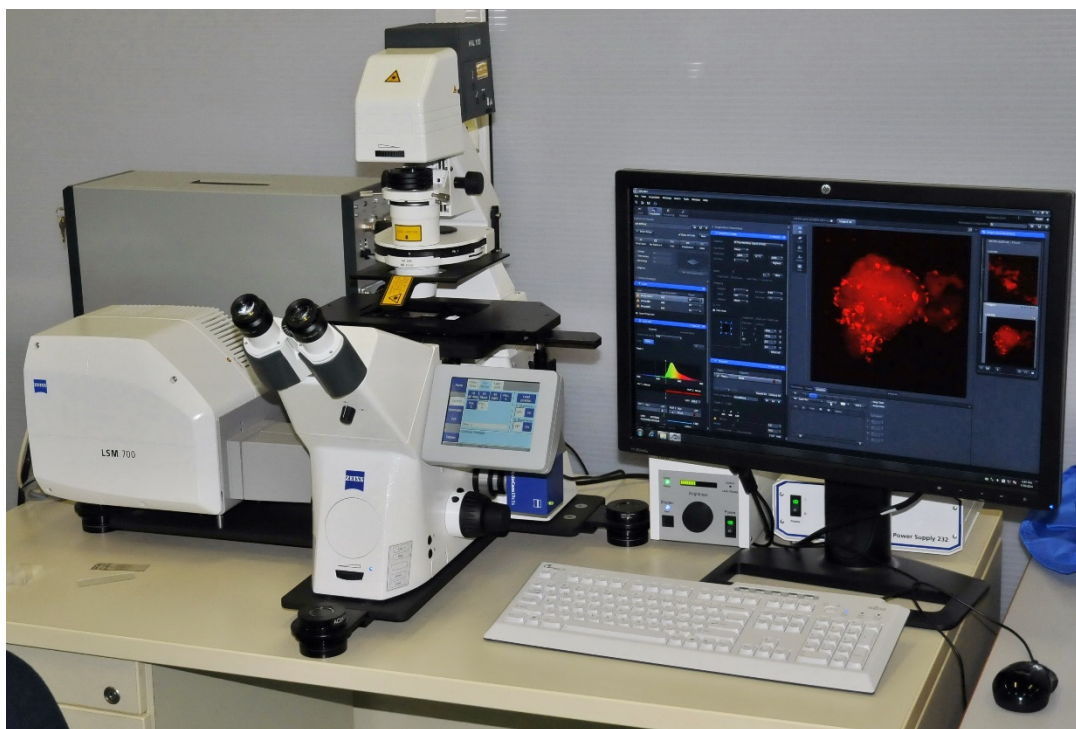
3.5.4.2. Δοκιμή μονοαξονικής συμπίεσης με σταθερό ρυθμό παραμόρφωσης

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για μορφοποίηση σε καλούπια κυλινδρικού σχήματος με διαστάσεις: διάμετρος 0,016 m και ύψος 0,0155 m. Το καλούπι ήταν τοποθετημένο επάνω σε γυάλινη πλάκα διαστάσεων 0,1x0,1 m η οποία στο σημείο έδρασης του κυλίνδρου και σ' όλο το εμβαδόν της επιφάνειας του είχε προεπιστρωθεί με μια λεπτή στιβάδα υγρής παραφίνης. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το δείγμα από το

καλούπι και καλύφθηκε η επιφάνεια του με υγρή παραφίνη, ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες λιπαινόμενης ροής. Τα δείγματα συμπίεστηκαν με εξάρτημα του οργάνου που αποτελούνταν από πλάκα συμπίεσης κυλινδρικού σχήματος διαμέτρου 0,05 m. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης ο ρυθμός παραμόρφωσης παρέμενε σταθερός και η τελική παραμόρφωση έφτανε το 50% του αρχικού ύψους του δείγματος. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε 4 διαφορετικούς ρυθμούς παραμόρφωσης (ονομαστικές τιμές 1%, 4%, 7% και 10%). Κατά τη διάρκεια της μέτρησης γινόταν καταγραφή σε πραγματικό χρόνο των δεδομένων της δύναμης και του χρόνου συμπίεσης. Η μέτρηση αυτή για κάθε δείγμα επαναλαμβανόταν 3 φορές.

3.6. Μελέτη της μορφολογίας της δομής

Η μελέτη της μορφολογίας της δομής των συστημάτων πρωτεϊνών γάλακτος-κεφίρανης έγινε με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με laser (CLSM) LSM 700, (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) (Σχήμα 3.7).



Σχήμα 3.7. Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser.

Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Acridine Orange από την οποία παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα αυτής 0,1% w/v.

Η δομή των όξινων πηκτών, των κρυοπηκτών και των όξινων κρυοπηκτών παρατηρήθηκε μετά την παρασκευή των δειγμάτων πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία είχε τοποθετηθεί καλυπτρίδα, σε συνθήκες σύμφωνα με αυτές που έγινε η μελέτη της ρεολογικής τους συμπεριφοράς. Συγκεκριμένα, μικρή ποσότητα (2 mL) από τα διαλύματα των δειγμάτων μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκε με πιπέτα μια σταγόνα διαλύματος Acridine Orange. Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή για 5 min. Στη συνέχεια μικρή ποσότητα δείγματος μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία προστέθηκε καλυπτρίδα και στη συνέχεια οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για να παρασκευαστούν οι κρυοπηκτές. Για την παρασκευή των όξινων πηκτών, μετά την προσθήκη της χρωστικής προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα GDL, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 1 min και μικρή ποσότητα αυτών μεταφέρθηκε στην αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία προστέθηκε καλυπτρίδα. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 30°C μέχρι να μειωθεί το pH στην επιθυμητή τιμή. Για την παρασκευή των όξινων κρυοπηκτών με την ολοκλήρωση της όξινης πήξης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα δείγματα τοποθετούνταν στην κατάψυξη. Μετά την παρασκευή τους, τα δείγματα μεταφέρονταν στους 4°C μέχρι να εξεταστούν.

3.7. Περίθλαση ακτίνων X (X-ray diffraction)

Η τεχνική της περίθλασης ακτίνων X χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικότητας της κεφίρανης σε στερεά κατάσταση. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το περιθλασίμετρο ακτίνων X (X' Pert PRO model MPD) της εταιρείας PANalytical (Almelo, Netherlands). Η λυχνία παραγωγής ακτίνων X περιείχε άνοδο χαλκού με μήκος κύματος των ακτίνων που παράγονταν $\lambda = 1,5405980 \text{ \AA}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Παραγωγή και απομόνωση του πολυσακχαρίτη κεφιράνη

4.1.1. Επιλογή βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού των κόκκων

Το γάλα που επιλέχθηκε, τόσο για τα πειράματα επιλογής των βέλτιστων συνθηκών πολλαπλασιασμού των κόκκων κεφίρ όσο και για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα, είχε υποβληθεί σε έντονη θερμική επεξεργασία (αποστείρωση), προκειμένου να αποτραπεί η παρουσία ανταγωνιστών μικροοργανισμών, οι οποίοι θα παρεμπόδιζαν την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας των κόκκων. Η χρησιμοποίηση αποβουτυρωμένου γάλακτος αποσκοπούσε στη δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων κεφίρ. Σύμφωνα με τους Schoevers & Britz (2003), μεγαλύτερη αύξηση της μάζας των κόκκων κεφίρ παρατηρήθηκε σε γάλα χαμηλής λιποπεριεκτικότητας σε σχέση με το πλήρες. Αυτό πιθανόν μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία των λιποσφαιρίων, τα οποία έχουν αυξημένο υδροδυναμικό όγκο και παρεμποδίζουν την πρόσβαση των μικροοργανισμών στα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος.

Η ζύμωση των κόκκων κεφίρ έγινε σε αναερόβιες συνθήκες, υπό συνεχή ανάδευση του υποστρώματος και με ρύθμιση της τιμής pH στο 4,5. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε μετά τη μείωση του pH του γάλακτος εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τους Degeest et al. (2001) και Cheirsilp et al. (2003a) μεγαλύτερη παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από τα γαλακτικά βακτήρια παρατηρείται αναερόβια, ενώ οι Zajšek et al. (2013) αναφέρουν ότι η συνεχής ανάδευση του υποστρώματος επιτρέπει την ομοιόμορφη κατανομή των θρεπτικών συστατικών και την ευκολότερη πρόσβασή τους από τους μικροοργανισμούς, γεγονός το οποίο οδηγεί στη βέλτιστη ανάπτυξη τους. Όσον αφορά την επιλογή της τιμής pH 4,5 για την ολοκλήρωση της ζύμωσης, οι Cheirsilp et al. (2001) αναφέρουν ότι η παραγωγή της κεφιράνης από τον *Lactobacillus kefiranoferiens*, ο οποίος είναι ο κύριος μικροοργανισμός που παράγει τον πολυσακχαρίτη (Frengova et al., 2002; Cheirsilp et al., 2003b; Tada et al., 2007), στους κόκκους κεφίρ και στο υγρό υπόστρωμα είναι η μέγιστη όταν η τιμή pH του υποστρώματος μετά την αρχική μείωση της παραμένει στην τιμή 4,5.

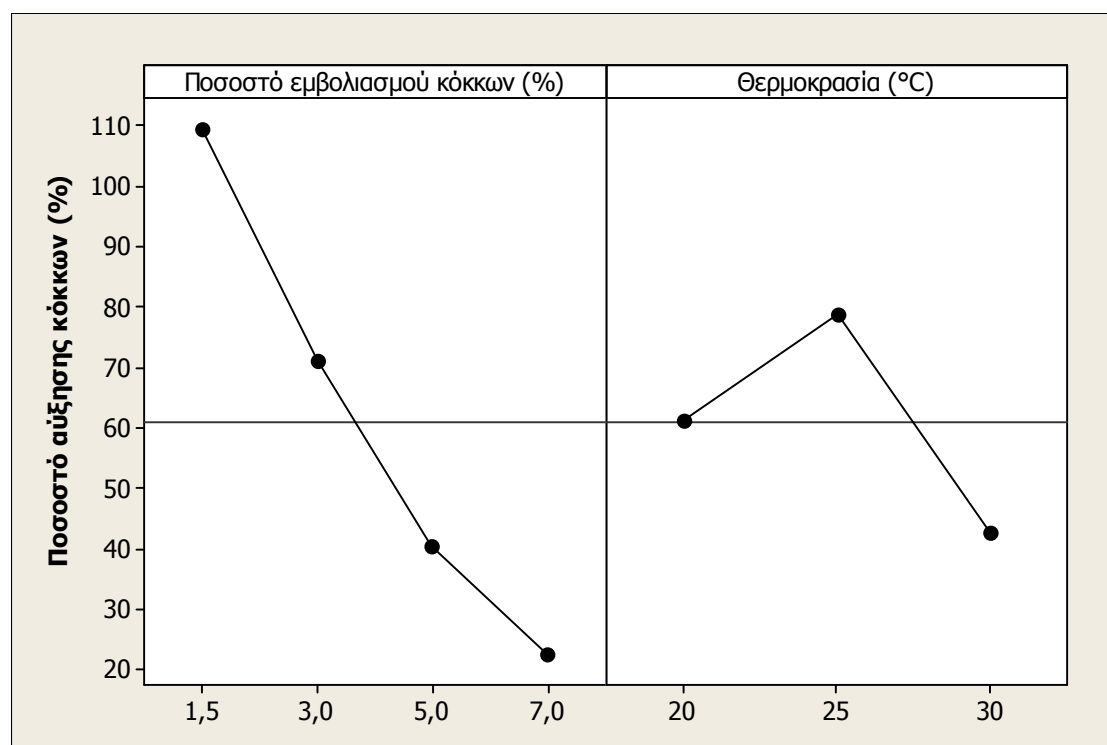
Το ποσοστό αύξησης (%) της μάζας των κόκκων κεφίρ σε διαφορετικές συνθήκες επώασης φαίνεται στον Πίνακα 4.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, το ποσοστό εμβολιασμού των κόκκων και η θερμοκρασία επώασης επηρεάζουν την αύξηση της μάζας των κόκκων κεφίρ ($p < 0.001$).

Πίνακας 4.1. Ποσοστό αύξησης (%) της μάζας των κόκκων κεφίρ που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες επώασης (θερμοκρασία επώασης και ποσοστό εμβολιασμού κόκκων).

Θερμοκρασία επώασης (°C)	Ποσοστό εμβολιασμού κόκκων (%)	Ποσοστό αύξησης κόκκων (%)
20	1,5	106,3 ($\pm 4,0$)
	3,0	74,3 ($\pm 4,0$)
	5,0	41,3 ($\pm 3,1$)
	7,0	23,7 ($\pm 1,5$)
25	1,5	138,3 ($\pm 8,6$)
	3,0	84,0 ($\pm 3,0$)
	5,0	55,0 ($\pm 3,6$)
	7,0	38,0 ($\pm 3,6$)
30	1,5	84,0 ($\pm 3,6$)
	3,0	55,0 ($\pm 3,0$)
	5,0	25,3 ($\pm 4,0$)
	7,0	6,7 ($\pm 3,5$)

Η μεγαλύτερη αύξηση της μάζας των κόκκων κεφίρ παρατηρήθηκε όταν το γάλα εμβολιάστηκε με το χαμηλότερο ποσοστό κόκκων (Σχήμα 4.1). Η κατάταξη των δειγμάτων κατά αύξουσα σειρά σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $7,0\% < 5,0\% < 3,0\% < 1,5\%$. Ο εμβολιασμός του γάλακτος με αυξημένο ποσοστό κόκκων έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη μείωση της τιμής pH εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο τη μείωση του πληθυσμού των ζυμών και των λακτόκοκκων (Koroleva, 1998b). Η παρουσία όλων των ομάδων μικροοργανισμών των κόκκων κεφίρ είναι σημαντική στο πολύπλοκο σύστημα της μικροχλωρίδας γιατί προάγει τη σχέση συμβίωσης της (Ottles & Cagindi, 2003; Farnworth, 2005) και οδηγεί σε σημαντική αύξηση της μάζας των κόκκων (Garrote et al., 2001). Η μείωση του αριθμού μίας ή περισσότερων ομάδων

μικροοργανισμών διαταράσσει τη συμβιωτική σχέση τους, γεγονός το οποίο σχετίζεται με την παραγωγή χαμηλής ποσότητας του πολυσακχαρίτη (Garrote et al., 2001) και φυσικά συμβάλει στη μείωση του ποσοστού αύξησης των κόκκων κεφίρ κατά την επώαση. Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών, η αργή ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων οδηγεί σε αργό ρυθμό σύνθεσης πολυσακχαριτών μεγαλύτερης όμως συγκέντρωσης (Degeest et al., 2001). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, οι Garrote et al. (1998) αναφέρουν ότι η χρησιμοποίηση ποσοστού κόκκων 1% οδήγησε στην μεγαλύτερη αύξηση του φαινομενικού ιξώδους σε δείγματα κεφίρ, ως αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής του πολυσακχαρίτη. Οι συγγραφείς είχαν χρησιμοποιήσει στα πειράματα τους 5 διαφορετικά ποσοστά εμβολιασμού κόκκων 0,1%, 1%, 2%, 5% και 10%.



Σχήμα 4.1. Επίδραση του ποσοστού εμβολιασμού των κόκκων κεφίρ και της θερμοκρασίας επώασης στην αύξηση (%) της μάζας των κόκκων.

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την αύξηση της μάζας των κόκκων κεφίρ ήταν 25°C (Σχήμα 4.1). Σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey, η

κατάταξη των δειγμάτων κατά αύξουσα σειρά είναι η εξής: $30^{\circ}\text{C} < 20^{\circ}\text{C} < 25^{\circ}\text{C}$. Σύμφωνα με την Koroleva (1988b), επώαση σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των λακτόκοκκων και των ζυμών, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της σχέσης συμβίωσης των μικροοργανισμών και επομένως τη μείωση της αύξησης της μάζας των κόκκων. Η αύξηση του αριθμού των συγκεκριμένων μικροοργανισμών συντελεί σε αύξηση της μάζας των κόκκων. Η μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των κόκκων που εμφανίστηκε στους 25°C συνδέεται με την αυξημένη παραγωγή κεφίρανης, η οποία αυξάνει τη μάζα των κόκκων. Οι Zajšek et al. (2013) αναφέρουν ότι σε αυτήν τη θερμοκρασία η ποσότητα της κεφίρανης που παράγεται από τους μικροοργανισμούς και παραμένει στην βιομάζα των κόκκων κεφίρ είναι η μέγιστη. Ωστόσο σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η μέγιστη αύξηση του ποσοστού των κόκκων παρατηρήθηκε στους 37°C , γεγονός τα οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Οι συγγραφείς απέδωσαν τη μειωμένη παραγωγή κεφίρανης στους κόκκους στη βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης της μάζας των κόκκων, στην αύξηση της διαλυτότητας του πολυσακχαρίτη με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης, αναφέρουν ότι η αυξημένη παραγωγή κεφίρανης στις μη-βέλτιστες συνθήκες οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί αυξάνουν την παραγωγή κεφίρανης προκειμένου να προστατευτούν όταν οι συνθήκες στο μέσο ζύμωσης είναι δυσμενείς. Μία άλλη πιθανή εξήγηση που δίνουν είναι ότι πιθανόν με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης η παραγόμενη ποσότητα κεφίρανης παραμένει σταθερή και παρατηρείται μόνο αύξηση της μάζας των κόκκων.

Σε αντίθεση οι Zajšek et al. (2011) αναφέρουν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία τόσο για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων όσο και για την παραγωγή της κεφίρανης είναι η ίδια (30°C). Οι διαφορές όσον αφορά τη βέλτιστη θερμοκρασία πολλαπλασιασμού των κόκκων ανάμεσα στην παρούσα εργασία και τις αναφορές της βιβλιογραφίας πιθανόν να οφείλονται στη διαφορετική προέλευση των κόκκων αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες επώασης όπως για παράδειγμα το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε δηλ. πλήρες γάλα ή αποβουτυρωμένο. Η μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ επηρεάζεται σημαντικά από την προέλευση των κόκκων, τις συνθήκες επώασης και τις συνθήκες αποθήκευσής τους. Κόκκοι διαφορετικής προέλευσης ποικίλουν ως προς τη μικροβιολογική τους σύσταση με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται ως προς τις άριστες συνθήκες επώασης για τη βέλτιστη ανάπτυξη της μάζας τους. Όπως προαναφέρθηκε (παράγραφος 1.1.2.1.) η μικροχλωρίδα των κόκκων αποτελείται από

μεσόφιλους και θερμοφίλους λακτοβάκιλους, μεσόφιλους λακτόκοκκους, ζύμες και οξικά βακτήρια (Koroleva, 1988b). Για τα μεσόφιλα γαλακτικά βακτήρια θερμοκρασίες χαμηλότερες των 30°C ευνοούν την παραγωγή πολυσακχαριτών. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ευνοεί την σύνθεση των πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα (Zajšek et al., 2013).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η μέγιστη αύξηση της μάζας των κόκκων επιτεύχθηκε στους 25°C, ως αποτέλεσμα τόσο της αύξησης του πληθυσμού των μικροοργανισμών των κόκκων όσο και της παραγωγής της κεφिरάνης. Οι Dimitreli & Antoniou (2011) αναφέρουν ότι στους 25°C επώαση το φαινομενικό ιξώδες δειγμάτων κεφίρ σε όλο το εύρος των μετρήσιμων τιμών της ταχύτητας διάτμησης ήταν το μέγιστο σε σύγκριση με τους 20°C και 30°C, και το οποίο συνδέεται με αυξημένη παραγωγή του πολυσακχαρίτη. Οι πολυσακχαρίτες λόγω της ικανότητας τους να δεσμεύουν το νερό και πιθανώς να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες συμβάλλουν στην αύξηση του ιξώδους των όξινων γαλακτοκομικών προϊόντων (Amatayakul et al., 2006). Η αύξηση της μάζας των κόκκων είναι το αποτέλεσμα της εναπόθεσης πρωτεϊνών από το υπόστρωμα, της σύνθεσης πολυσακχαριτών από τους μικροοργανισμούς που τους παράγουν και του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών των κόκκων κεφίρ (Abraham & De Antoni, 1999; Garrote et al., 2001). Αυτό σημαίνει ότι η μέγιστη αύξηση της μάζας των κόκκων συνδέεται με τη μέγιστη παραγωγή του πολυσακχαρίτη (Zajšek et al., 2011).

4.1.2. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα

Σε προκαταρκτικά πειράματα παραγωγής, απομόνωσης και μελέτης των ιδιοτήτων της κεφिरάνης χρησιμοποιώντας ζυμωτήρα χωρητικότητας ενός λίτρου διαπιστώθηκε ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες της παραγόμενης κεφिरάνης από παρτίδα σε παρτίδα διέφεραν όσον αφορά τα αριθμητικά μεγέθη τους, με αποτέλεσμα να διακυβεύεται η αξιοπιστία των πραγματοποιούμενων μετρήσεων και κατ' επέκταση των εργαστηριακών δεδομένων αναγκαίων για τη μελέτη της κεφिरάνης, σε μοριακό επίπεδο, για τα οποία απαιτείται να υπάρχει υψηλός βαθμός ακρίβειας (precision). Αυτό προφανώς οφειλόταν στο ότι το βιο-σύστημα παραγωγής των κόκκων και κατ'

επέκταση της κεφिरάνης είναι εξαιρετικά πολύπλοκο και εξαρτάται από τόσους πολλούς παράγοντες, όπως προαναφέρθηκε, που είναι εντελώς φυσικό να παρατηρείται διαφοροποίηση και διακύμανση στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των διαφόρων παρτίδων της παραγόμενης κεφिरάνης. Οπότε αποφασίστηκε η παραγωγή κεφिरάνης να γίνει άπαξ και σε μεγάλη ποσότητα ώστε τα δείγματα κεφिरάνης που επρόκειτο να μελετηθούν να είναι το κατά δυνατό ομοιογενή εφ' όσον θα προέρχονταν από μια αρχική ενιαία παρτίδα.

Χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των κόκκων κατέστη δυνατή η παραγωγή συνολικής ποσότητας 30 Kg κόκκων κεφίρ (Σχήμα 4.2), ξεκινώντας από αρχική μάζα κόκκων 80 g. Οι πρώτες ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L (Σχήμα 4.3) εξαιτίας της αρχικής μικρής ποσότητας κόκκων κεφίρ. Όταν λήφθηκε επαρκής ποσότητα των κόκκων (3,75 Kg) οι ζυμώσεις συνεχίστηκαν με τη χρήση του ζυμωτήρα ημιβιομηχανικής κλίμακας (428 L) (Σχήμα 4.4 και 4.5).



Σχήμα 4.2. Παραγωγή κόκκων κεφίρ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (αριστερά) και μετά τη στράγγιση (δεξιά).

Για την αποφυγή επιμολύνσεων αλλά και για να προαχθεί η σχέση συμβίωσης των μικροοργανισμών των κόκκων κεφίρ οι ζυμωτήρες αλλά και τα σκεύη που έρχονταν σε επαφή με τους κόκκους κατά το χειρισμό τους (στράγγισμα, συλλογή, ζύγισμα, ξέπλυμα κ.τ.λ.) ήταν αποστειρωμένα.

Όλοι οι κύκλοι των ζυμώσεων τόσο σε πιλοτική κλίμακα όσο και σε ημιβιομηχανική όπως επίσης και η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού της

κεφειράνης πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Βιομηχανικού Εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.



Σχήμα 4.3. Ζυμωτήρας 12 L.

Η αποστείρωση του ζυμωτήρα χωρητικότητας 428 L γινόταν με απευθείας έγχυση ζωντανού ατμού (Sterilization In Place, SIP). Η ποσότητα του ατμού που εισέρχονταν στον ζυμωτήρα ρυθμίζονταν με τη χρήση ηλεκτροβάνας ατμού μέσω κατάλληλου λογισμικού και controller. Οι συνθήκες αποστείρωσης ήταν 121°C για 20 min.

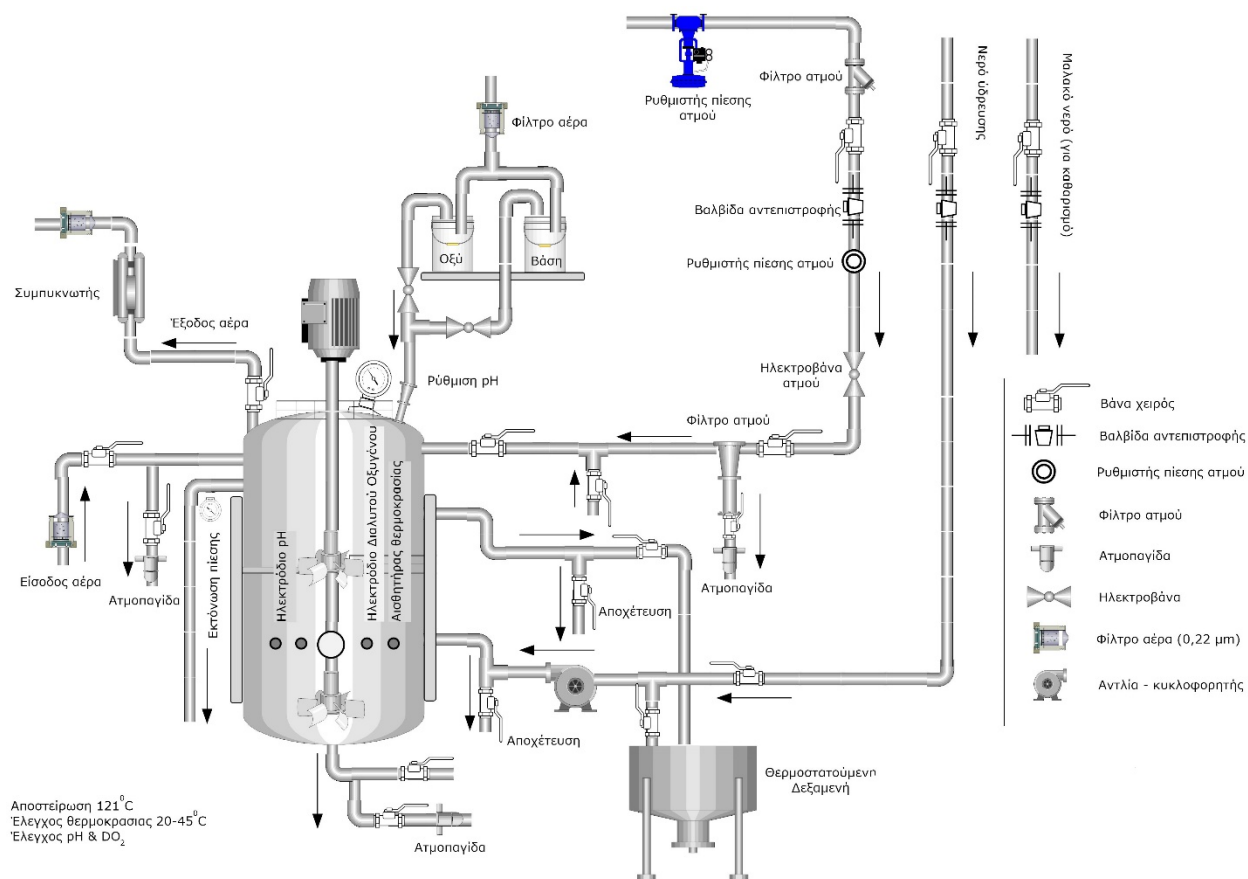
Οι επωάσεις (και στους δύο ζυμωτήρες) διαρκούσαν 96 h (1 κύκλος επώασης), κατά τις οποίες η τιμή pH του εμβολιασμένου γάλακτος διατηρούνταν σταθερή με την προσθήκη διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 4 M. Ο έλεγχος του pH και στους δύο ζυμωτήρες γινόταν με τον ίδιο τρόπο. Μόλις η τιμή pH του υποστρώματος έφτανε την τιμή 4,5 ξεκινούσε η προσθήκη διαλύματος NaOH μέσω ειδικών βαλβίδων (pinch valves).



Σχήμα 4.4. Ζυμωτήρας 428 L.

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας (25°C) στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L γινόταν με τη χρήση ηλεκτρικών αντιστάσεων, οι οποίες διατηρούσαν σταθερή τη θερμοκρασία επώασης όταν το περιβάλλον είχε μικρότερη θερμοκρασία από την επιθυμητή. Στην περίπτωση που η θερμοκρασία περιβάλλοντος ήταν μεγαλύτερη από 25°C η ψύξη γινόταν με κυκλοφορία νερού βρύσης μέσω ψυκτήρα που ήταν τοποθετημένος στο ζυμωτήρα.

Στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 428 L η ρύθμιση της θερμοκρασίας πραγματοποιείται μέσω θερμού ή κρύου νερού, ανάλογα με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, με τη χρήση κυκλοφορητή που ήταν συνδεδεμένος στον controller του οργάνου.



Σχήμα 4.5. Σχεδιάγραμμα λειτουργίας ζυμωτήρα 428 L.

Ο ζυμωτήρας χωρητικότητας 12 L πριν από κάθε ζύμωση αποστειρωνόταν σε αποστειρωτήρα (Korimat) (Σχήμα 4.6) με τη χρήση ατμού σε θερμοκρασία 121°C για 20 min.



Σχήμα 4.6. Αποστειρωτήρας Korimat.

Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης πραγματοποιείτο χημικός καθαρισμός (Clean In Place, CIP) του ζυμωτήρα 428 L με χρήση σφαιρικού ψεκαστήρα (spray bulb), μέσω ανοξείδωτης φυγοκεντρικής αντλίας με επανακυκλοφορία σε κλειστό κύκλωμα. Πρώτα γινόταν πλύση με νερό για να φύγουν τα υπολείμματα, ακολουθούσε προσθήκη θερμού διαλύματος NaOH 10% με ανακυκλοφορία για την απομάκρυνση των οργανικών συστατικών, ξέπλυμα με νερό, ανακυκλοφορία με όξινο (θερμό)

διάλυμα (κιτρικό οξύ 5%) για την απομάκρυνση ανόργανων συστατικών και τέλος ξέπλυμα με νερό.

Ο κάθε κύκλος ζύμωσης ολοκληρωνόταν μετά από 96 h, όπου και σταματούσε η παραγωγή επιπλέον ποσότητας γαλακτικού οξέος. Συγκεκριμένα, το pH του υποστρώματος παρέμενε σταθερό, δεδομένου ότι σταματούσε η προσθήκη διαλύματος NaOH. Η ζύμωση επιλέχθηκε να συνεχιστεί για όσο χρονικό διάστημα υπήρχε παραγωγή οξέος, γεγονός το οποίο σήμαινε ότι η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών και επομένως η εναπόθεση στην επιφάνεια των κόκκων νέας ποσότητας υλικών και κατ' επέκταση η αύξηση της μάζας τους συνεχιζόταν.

Μετά το τέλος του κάθε κύκλου ζύμωσης οι κόκκοι συλλέγονταν και ξεπλένονταν με αποστειρωμένο νερό προκειμένου να αποφευχθούν επιμολύνσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να διαταράξουν την ισορροπία της μικροχλωρίδας των κόκκων και θα προκαλούσαν προβλήματα τόσο στην αύξηση της μάζας των κόκκων όσο και στην παραγωγή του πολυσακχαρίτη.

4.1.3. Πειράματα ζυμώσεων με τη χρήση του ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L

Στον ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L πραγματοποιήθηκαν συνολικά 11 κύκλοι επώασης, ξεκινώντας από ποσότητα κόκκων 80 g και λαμβάνοντας τελικά ποσότητα ίση με 3,75 Kg. Στον πρώτο κύκλο επώασης χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ποσότητα γάλακτος από τη μέγιστη που θα μπορούσε να εμβολιαστεί, εξαιτίας της μικρότερης αρχικής ποσότητας κόκκων σε σχέση με αυτήν που θα μπορούσε να επωαστεί στον συγκεκριμένο ζυμωτήρα. Στη συνέχεια, καθώς αυξάνονταν η μάζα των κόκκων, η περίσσεια αυτών αποθηκεύονταν με γάλα στην ψύξη. Το γάλα ανανεωνόταν κάθε 10 μέρες και αφού προηγουμένως οι κόκκοι είχαν πλυθεί με αποστειρωμένο νερό για να αποφευχθεί η δυνατότητα επιμόλυνσής τους.

Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ζυμώσεις, όσον αφορά την αύξηση της μάζας των κόκκων και της κατανάλωσης διαλύματος NaOH. Παρατηρείται ότι το ποσοστό αύξησης των κόκκων ήταν μικρότερο στους πρώτους κύκλους ζύμωσης, ενώ στους επόμενους αυξανόταν. Αυτό μπορεί να

αποδοθεί στη περαιτέρω δραστηριοποίηση των κόκκων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων. Πιθανόν σε αυτόν τον λόγο να οφείλεται και η αύξηση της κατανάλωσης διαλύματος NaOH.

Πίνακας 4.2. Αποτελέσματα ζυμώσεων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 12 L.

Ζύμωση	Ποσότητα Γάλακτος (L)	Αρχική ποσότητα κόκκων (g)	Συγκέντρωση (%)	Τελική ποσότητα κόκκων (g)	Αύξηση μάζας κόκκων (%)	Χρόνος επώασης (h)	Κατανάλωση NaOH 4 M (mL)
1	8	80	1	154	92,5	96	250
2	12	180	1,5	404	121,0	96	900
3	12	180	1,5	422	134,4	96	1010
4	12	180	1,5	415	130,6	96	1000
5	12	180	1,5	430	138,9	96	1020
6	12	180	1,5	450	150,0	96	1070
7	12	180	1,5	447	148,3	96	1060
8	12	180	1,5	433	140,6	96	1050
9	12	180	1,5	461	156,1	96	1080
10	12	180	1,5	469	160,6	96	1100
11	12	180	1,5	474	163,3	96	1120

4.1.4. Πειράματα ζυμώσεων με τη χρήση του ζυμωτήρα χωρητικότητας 428 L

Οι κύκλοι ζυμώσεων στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 428 L ήταν συνολικά 5 και οδήγησαν στην παραγωγή 30 Kg κόκκων κεφίρ. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ζυμώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα ζυμώσεων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο ζυμωτήρα χωρητικότητας 428 L.

Ζύμωση	Ποσότητα Γάλακτος (L)	Αρχική ποσότητα κόκκων (g)	Συγκέντρωση (%)	Τελική ποσότητα κόκκων (g)	Αύξηση μάζας κόκκων (%)	Χρόνος επώασης (h)	Κατανάλωση NaOH 4 M (mL)
1	240	3458	1,38	6220	79,8	96	7500
2	340	5100	1,5	11676	129	96	20000
3	340	5300	1,6	13054	146	96	25000
4	340	5200	1,52	12504	140	96	25000
5	340	5508	1,62	12162	121	96	24000

4.1.5. Ανάπτυξη μεθοδολογίας απομόνωσης της κεφिरάνης σε πιλοτική κλίμακα

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε για την παραλαβή της κεφिरάνης σε πιλοτική κλίμακα περιλάμβανε συνδυασμό σταδίων από τις μεθόδους απομόνωσης και καθαρισμού της κεφिरάνης που αναφέρουν οι Rimada & Abraham (2003) και οι Ruas-Mediedo & de los Reyes-Gavilan (2005). Όπου ήταν απαραίτητο έγιναν αλλαγές σε διάφορα στάδια της διαδικασίας μετά την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους, με στόχο η παραγωγή του πολυσακχαρίτη να μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα.

Για την απομόνωση του πολυσακχαρίτη, αρχικά οι κόκκοι κεφίρ αναμίχθηκαν με ποσότητα αποσταγμένου νερού σε αναλογία νερού-κόκκων 5:1 και ακολούθησε έντονη θερμική επεξεργασία με ταυτόχρονη ανάδευση, ώστε η κεφिरάνη να αποκολληθεί από τα βακτηριακά κύτταρα και τις πρωτεΐνες και να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν υδρόλυση. Μία διπλότοιχη ανοξείδωτη δεξαμενή χωρητικότητας 194 L με μηχανικό αναδευτήρα (Σχήμα 4.7) χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό. Η θέρμανση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ατμού στους 85°C για 1 h. Σε περίπτωση που δεν πραγματοποιούνταν η θερμική επεξεργασία, μεγάλη ποσότητα του πολυσακχαρίτη θα απομακρυνόταν μαζί με τις πρωτεΐνες κατά τη φυγοκέντρωση που ακολουθούσε.



Σχήμα 4.7. Διπλότοιχη ανοξείδωτη δεξαμενή με μηχανικό αναδευτήρα που χρησιμοποιήθηκε για τη θέρμανση και τη διάσπαση των κόκκων κεφίρ.

Μετά την ψύξη του διαλύματος (περίπου 180 L) προστέθηκε ποσότητα υπερχλωρικού οξέος για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, σε τελική συγκέντρωση 0,6 N. Ακολούθησε ανάμιξη και παραμονή για 12 h στους 4°C. Το υπερχλωρικό οξύ αντικατέστησε το τριχλωροοξικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται στην εργαστηριακή μέθοδο, γιατί έχει χαμηλότερο κόστος αγοράς σε εμπορική κλίμακα και είναι πιο εύκολη η προμήθειά του σε μεγάλες ποσότητες.

Για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες και τα βακτηριακά κύτταρα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση του διαλύματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε πιλοτικός φυγοκεντρικός διαχωριστής δίσκων συνεχούς λειτουργίας, ο οποίος λειτούργησε ως διαυγαστής (Westfalia separator, Germany) (Σχήμα 4.8). Η ταχύτητα περιστροφής ήταν $8000 \times g$. Ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών απορρίψεων των στερεών ρυθμίστηκε στα 3 min, ενώ ο χρόνος που παρέμενε ανοιχτό το δοχείο διαχωρισμού (κατά την απόρριψη) ρυθμίστηκε στα 30 s.



Σχήμα 4.8. Φυγοκεντρικός διαχωριστής δίσκων συνεχούς λειτουργίας (διαυγαστής).

Για να ληφθεί η κεφίρανη σε υψηλό βαθμό καθαρότητας η διεργασία της φυγοκέντρωσης επαναλήφθηκε μια επιπλέον φορά. Κατά τη δεύτερη φυγοκέντρωση ο χρόνος που μεσολαβούσε μεταξύ των δύο διαδοχικών απορρίψεων ήταν 10 min. Η παροχή εξόδου του προϊόντος ήταν 400 mL/min. Η φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε στους 4°C.

Για την απομάκρυνση των μικρού μοριακού βάρους μορίων (άλατα, λακτόζη, μονοσακχαρίτες, κ.τ.λ.) έγινε προσπάθεια χρήσης μεμβρανών υπερδιήθησης σε συσκευή με διάταξη (module) πλάκας-πλαισίου (Plate & Frame) της εταιρίας DDS (Δανία) (Σχήμα 4.9). Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολυμερικές με MWCO (molecular weight cut off) 2000, συνολικού εμβαδού 0,72 m². Ωστόσο, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε γρήγορα το φαινόμενο της απόφραξης μεμβρανών (fouling), το οποίο ήταν μη αντιστρεπτό και μετά τον χημικό καθαρισμό

τους, με αποτέλεσμα να μην καταστεί δυνατή η χρήση τους για την παραλαβή του πολυσακχαρίτη σε καθαρή μορφή.



Σχήμα 4.9. Συσκευή υπερδιήθησης τύπου Plate & Frame.

Δεδομένου ότι οι μεμβράνες υπερδιήθησης δεν έφεραν το επιθυμητό αποτέλεσμα, ο καθαρισμός του διαλύματος έγινε καταβυθίζοντας την κεφιράνη με τη χρήση αιθανόλης. Προκειμένου να μειωθεί ο όγκος του διαυγασμένου διαλύματος και επομένως η απαιτούμενη ποσότητα αιθανόλης, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση σε διβάθμιο συμπυκνωτή κατερχόμενης στοιβάδας (Alpha Laval, Sweden) (Σχήμα 4.10). Η θερμοκρασία στο πρώτο και το δεύτερο στάδιο συμπύκνωσης ήταν 62°C και 50°C, αντίστοιχα. Η αρχική συγκέντρωση των διαλυτών στερεών ήταν 5,5 Brix, ενώ μετά το τέλος της συμπύκνωσης αυξήθηκε στα 21,5 Brix. Ο τελικός όγκος του διαλύματος πολυσακχαρίτη που παραλήφθηκε ήταν 50 L.



Σχήμα 4.10. Διβάθμιος συμπυκνωτής κατερχόμενης στοιβάδας.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η καταβύθιση της κεφिरάνης με τη χρήση αιθανόλης, σε τρία στάδια καθαρισμού. Συγκεκριμένα, προστέθηκε διπλάσιος όγκος (100 L) ψυχρής (4°C) αιθανόλης συγκέντρωσης 96% και ακολούθησε παραμονή για 12 h στους 4°C . Η καταβυθισμένη κεφिरάνη (Σχήμα 4.11) συλλέχθηκε μετά την στράγγιση της με τη χρήση φίλτρου από ανοξείδωτο χάλυβα. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε σε ζεστό αποσταγμένο νερό (70°C) (20 L) και ακολούθησε εκ νέου προσθήκη διπλάσιου όγκου (40 L) ψυχρής αιθανόλης και παραμονή για 12 h στους 4°C . Όπως προαναφέρθηκε η καταβύθιση με αιθανόλη πραγματοποιήθηκε τρεις φορές

για την παραλαβή του πολυσακχαρίτη με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Προκειμένου να ανακτηθεί όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα κεφίρανης, το εναπομείναν μετά τις στραγγίσεις διάλυμα αιθανόλης (και από τα τρία στάδια καταβύθισης) διαυγάστηκε στον φυγοκεντρικό διαχωριστή δίσκων (Westfalia separator, Germany) όπως περιγράφηκε πιο πάνω, με τον χρόνο μεταξύ δύο διαδοχικών απορρίψεων να είναι 10 min.



Σχήμα 4.11. Καταβύθιση κεφίρανης με αιθανόλη σε τρία στάδια.

Η τελική ποσότητα κεφίρανης που συλλέχθηκε μετά και την τρίτη καταβύθιση με αιθανόλη αρχικά ξηράθηκε σε ξηραντήρα δίσκων (APEX, construction engineering, England) (Σχήμα 4.12) με ρεύμα αέρα συνεχούς ροής, θερμοκρασίας περιβάλλοντος, μέχρι ποσοστό υγρασίας 15%. Η εναπομείνασα ποσότητα υγρασίας απομακρύνθηκε με τη χρήση πιλοτικού λυοφιλιωτή (Σχήμα 4.13).

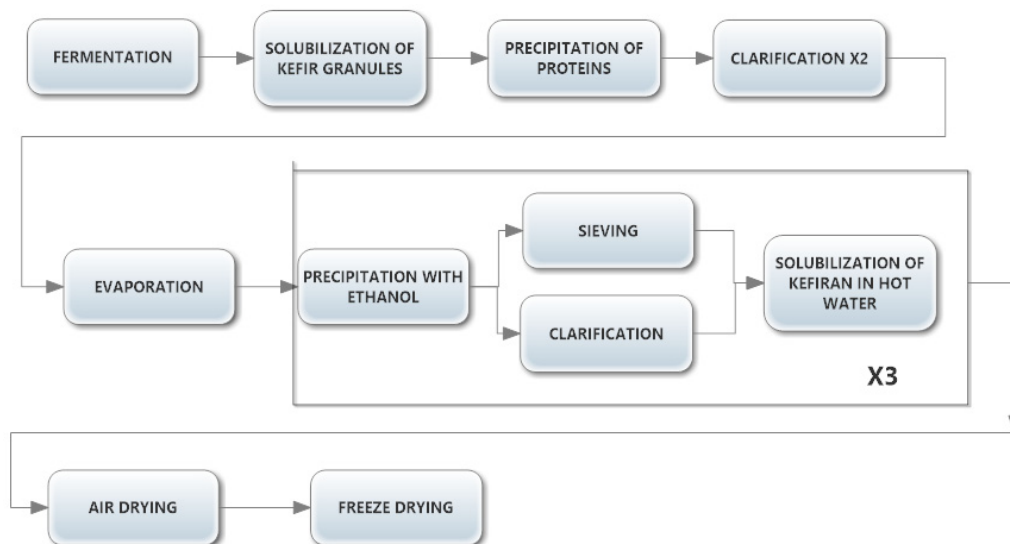


Σχήμα 4.12. Ξηραντήρας δίσκων για την εξάτμιση της αιθανόλης σε ρεύμα αέρα.



Σχήμα 4.13. Λυοφιλωτής για την ξήρανση της κεφिरάνης.

Στο Σχήμα 4.14 φαίνεται το διάγραμμα ροής παραγωγής της κεφिरάνης σε πιλοτική κλίμακα. Η απόδοση σε κεφिरάνη ήταν 3,58 g ξηρής κεφिरάνης ανά 100 g νωπών κόκκων κεφίρ. Συγκεκριμένα, από 26,6 8Kg νωπών κόκκων παραλήφθηκαν 954 g πολυσακχαρίτη.



Σχήμα 4.14. Διάγραμμα ροής για την παραγωγή κεφιράνης σε πιλοτική κλίμακα.

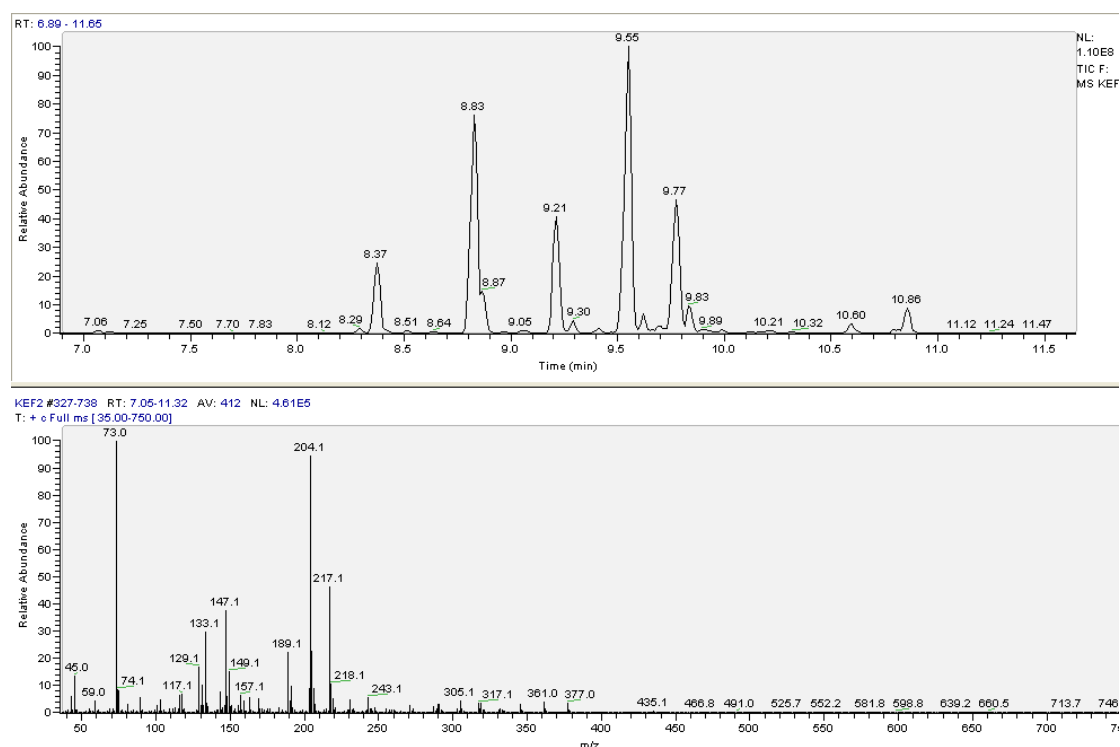
Συμπερασματικά, ο πολλαπλασιασμός των κόκκων κεφίρ μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιώντας βιοαντιδραστήρες για την επώση των κόκκων σε αποβουτυρωμένο γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας, χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες πολλαπλασιασμού τους και εφαρμόζοντας πολλαπλούς κύκλους ζυμώσεων. Η μεθοδολογία απομόνωσης της κεφιράνης που αναπτύχθηκε σε πιλοτική (ημιβιομηχανική) κλίμακα μπορεί να εφαρμοστεί επίσης σε βιομηχανική κλίμακα, με την ανάλογη κλιμάκωση μεγέθους (scale-up) της πιλοτικής κλίμακας, δεδομένου ότι οι ποσότητες και τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν στην παραλαβή επαρκούς ποσότητας αυτής.

4.2. Μοριακή διαμόρφωση και χαρακτηρισμός του πολυσακχαρίτη κεφιράνης

4.2.1. Χημική σύσταση κεφιράνης

Η κεφιράνη η οποία παράχθηκε είχε περιεκτικότητα σε υγρασία 4,54%, σε πρωτεΐνες 0,1% (επί ξηρού), ενώ το ποσοστό σε ολικούς υδατάνθρακες ήταν 99,5% (επί ξηρού). Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων υποδηλώνουν ότι η μεθοδολογία απομόνωσης και καθαρισμού που αναπτύχθηκε είχε ως αποτέλεσμα την παραλαβή πολυσακχαρίτη υψηλού βαθμού καθαρότητας.

Σύμφωνα με την αεριοχρωματογραφική ανάλυση, (Σχήμα 4.15), στο μόριο της κεφιράνης ανιχνεύτηκαν δύο μονομερή, η γλυκόζη και η γαλακτόζη. Η αναλογία των μονομερών βρέθηκε να είναι ίση με 52,4% γλυκόζη και 47,6% γαλακτόζη (1,0:0,91). Παρόμοια αποτελέσματα για την κεφιράνη, όσον αφορά τη σύσταση των δυο μονομερών αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, οι Yokoi et al. (1990) και Micheli et al. (1999) αναφέρουν αναλογία μονοσακχαριτών γλυκόζης προς γαλακτόζη 1:1, οι Ghasemlou et al. (2012) 1,0:1,1, οι Zajšek & Goršek (2011) 1,0:0,82 και οι Zajšek et al. (2011) 1,0:0,7.



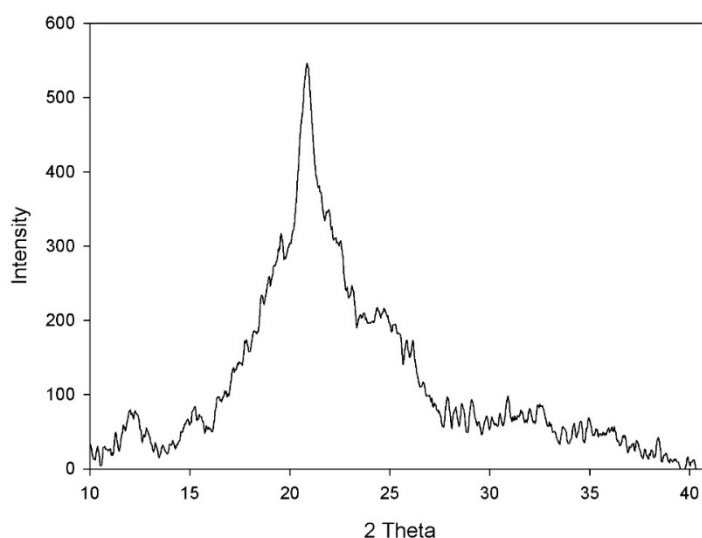
Σχήμα 4.15. Χρωματογράφημα θραυσμάτων της υδρολυμένης κεφιράνης (επάνω) και το αντίστοιχο φάσμα μαζών (κάτω).

4.2.2. Δομικός χαρακτηρισμός της κεφιράνης σε στερεά κατάσταση

Το παρακάτω φάσμα περίθλασης των ακτίνων X υποδεικνύει ότι η κεφιράνη εμφανίζει εν μέρει κρυσταλλική δομή. (Σχήμα 4.16). Ο ημικρυσταλλικός χαρακτήρας του πολυσακχαρίτη διαπιστώνεται από τη μεγάλη κορυφή που καταγράφεται στις 20,9° (2θ). Το ποσοστό κρυσταλλικότητας X_c προσδιορίστηκε υπολογίζοντας το εμβαδόν του άμορφου ποσοστού (halo) και το εμβαδόν της κρυσταλλικής περιοχής σύμφωνα με τη σχέση (Stribeck, 2007):

$$X_c = \frac{I_{cr}}{I_{am} + I_{cr}} \quad 4.1$$

όπου I_{cr} είναι το εμβαδόν που περικλείεται μεταξύ της γραμμής του φάσματος και του υποβάθρου και ορίζει την κρυσταλλική περιοχή, ενώ όπου I_{am} είναι το εμβαδόν ανάμεσα στο υπόβαθρο και τη γραμμή βάσης (baseline) και ορίζει την άμορφη περιοχή. Το ποσοστό κρυσταλλικότητας ήταν $X_c=26,96\%$.

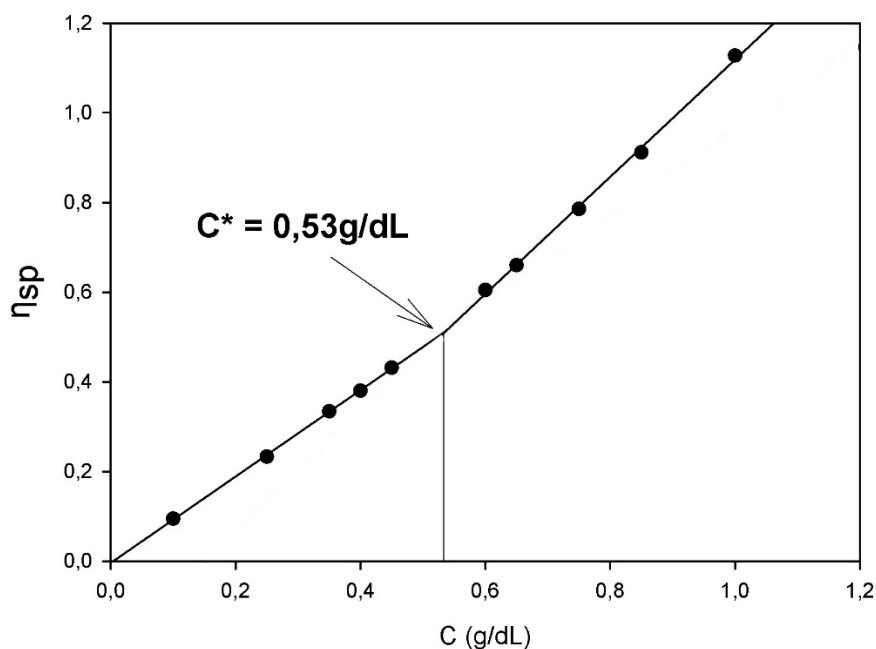


Σχήμα 4.16. Φάσμα περίθλασης ακτίνων X κεφιράνης σε στερεά κατάσταση

4.2.3. Υδροδυναμικές μετρήσεις για το χαρακτηρισμό του μορίου της κεφιράνης

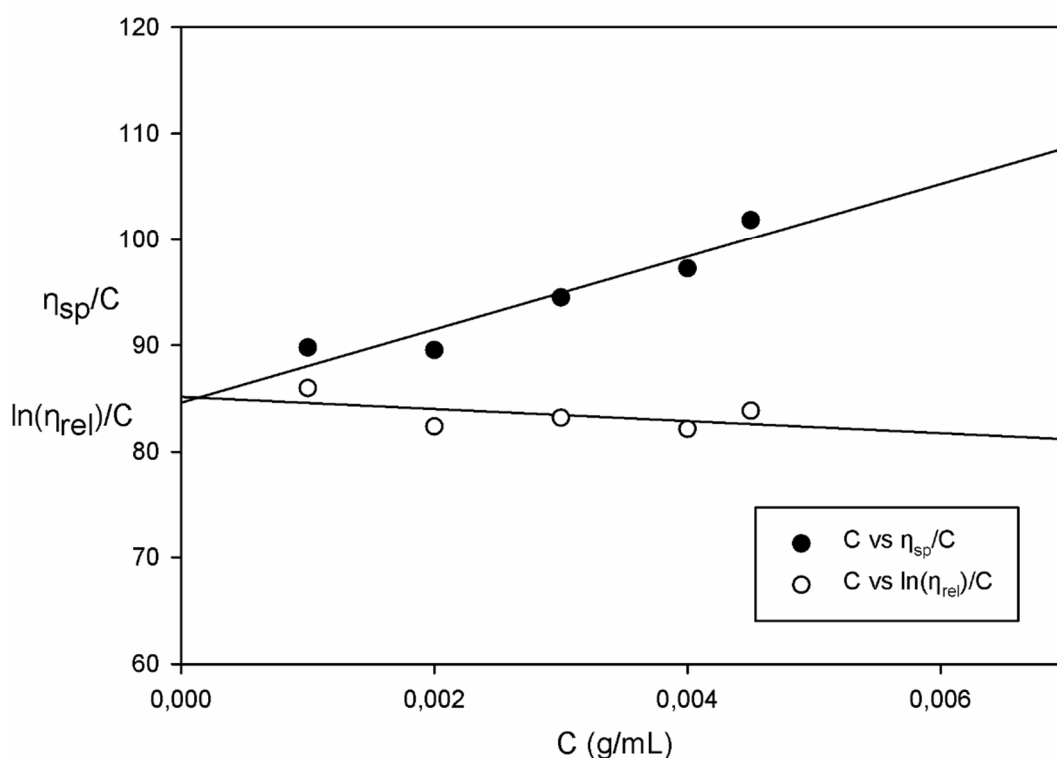
Η μεταβολή του ειδικού ιξώδους υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης συναρτήσει της συγκέντρωσης, φαίνεται στο Σχήμα 4.17. Όπως παρατηρείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις το ειδικό ιξώδες μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη. Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρείται μεγαλύτερη

επίδραση της συγκέντρωσης στις τιμές του ειδικού ιξώδους της κεφिरάνης. Η κρίσιμη συγκέντρωση (C^*) όπου παρατηρείται αυτή η μεταβολή, δηλαδή η μετάβαση από ένα χαμηλής σε ένα αυξημένης συγκέντρωσης διάλυμα όπου εμφανίζεται αλληλεπίδραση των μορίων (coil overlap), αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0,53 g/dL. Οι Piermaria et al. (2008) αναφέρουν την τιμή 0,35 g/dL ως την κρίσιμη συγκέντρωση για την κεφिरάνη που απομόνωσαν από κόκκους κεφίρ. Η τιμή αυτή θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με κάθε επιφύλαξη αναφορικά με την ορθότητά της γιατί οι μετρήσεις που πραγματοποίησαν οι ερευνητές έγιναν με τριχοειδές ιξωδόμετρο Ostwald, το οποίο είναι γνωστό ότι δεν παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω πειραματικού σφάλματος που προκαλείται από την εμφάνιση φαινομένων άκρων (end effects). Επιπλέον η καμπύλη που παρουσίασαν δεν είναι ευθεία γραμμή με τη χαρακτηριστική απότομη μεταβολή της κλίσης στο σημείο της C^* αλλά κυρτή οπότε δεν είναι δυνατός ο ακριβής εντοπισμός του σημείου της C^* . Για λόγους σύγκρισης, η C^* για την αμυλόζη ένα μόριο με μοριακό βάρος αντίστοιχο της κεφिरάνης, με δομικό μόριο την α-D-γλυκόζη και γραμμικό είναι 1,5 g/dL (Miles et al, 1985).



Σχήμα 4.17. Η μεταβολή του ειδικού ιξώδους υδατικών αραιών και πυκνών διαλυμάτων κεφिरάνης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση εκφρασμένη σε g/dL. Όπου C^* η κρίσιμη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

Στο Σχήμα 4.18 παρουσιάζεται ο προσδιορισμός του εσωτερικού ιξώδους $[\eta]$ αραιών υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer. Το $[\eta]$ αποτελεί μέτρο του υδροδυναμικού όγκου που καταλαμβάνουν τα μόρια του πολυσακχαρίτη και σχετίζεται με το μοριακό βάρος και τη γυροσκοπική ακτίνα του μορίου (Rao, 1999). Όπως παρατηρείται, το $[\eta]$ της κεφιράνης βρέθηκε να ισούται με 84,62 mL/g και 85,16 mL/g κατά Huggins και Kraemer, αντίστοιχα. Υψηλότερες τιμές $[\eta]$ σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer αναφέρουν οι Ghasemlou et al. (2012) (584 mL/g και 553 mL/g, αντίστοιχα), Piermaria et al. (2008) (600 mL/g και 595 mL/g, αντίστοιχα), Micheli et al. (1999) (570 mL/g και 536 mL/g, αντίστοιχα) και Mukai et al. (1990) (290 mL/g και 150 mL/g, αντίστοιχα). Οι υψηλότερες τιμές εσωτερικού ιξώδους που αναφέρονται στη βιβλιογραφία μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στη μεθοδολογία απομόνωσης π.χ. χαμηλός βαθμός καθαρότητας του πολυσακχαρίτη ή σε διαφορές στη βιοσύνθεσή του.

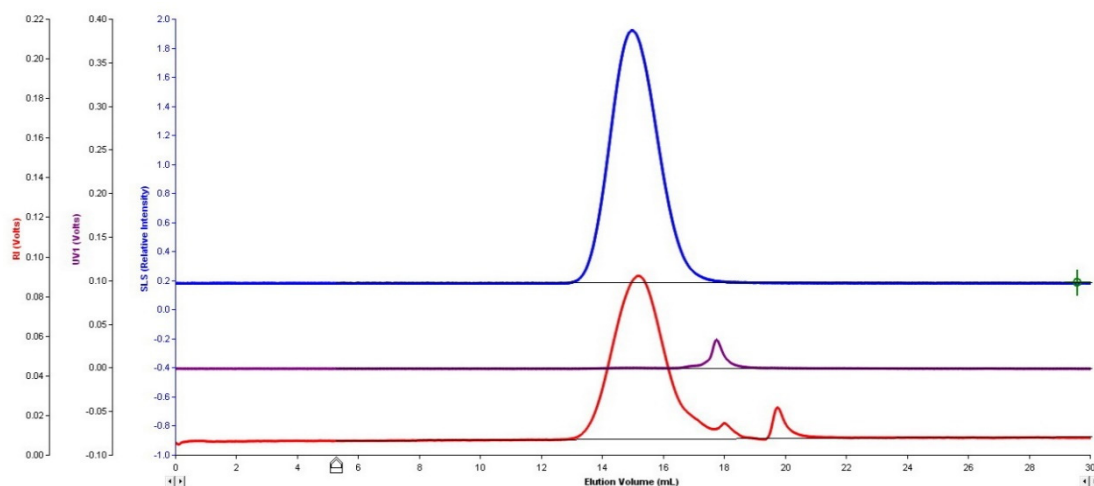


Σχήμα 4.18. Προσδιορισμός εσωτερικού ιξώδους σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer.

Αξίζει να αναφερθεί ότι όλοι οι προαναφερθέντες ερευνητές κατά το στάδιο καθαρισμού της κεφिरάνης δεν προέβησαν σε καταβύθιση των υπαρχουσών πρωτεϊνών με κατεργασία είτε με τριχλωροξικό είτε με υπερχλωρικό οξύ διαδικασία απολύτως απαραίτητη για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών πριν την καταβύθιση της κεφिरάνης με αιθανόλη με την οποία διαχωρίζονται από την κεφिरάνη τα μικρού μοριακού βάρους μόρια που είναι διαλυτά στην αιθανόλη π.χ. σάκχαρα. Με δεδομένο ότι οι πρωτεΐνες είναι πρακτικά αδιάλυτες στην αιθανόλη, οι πιθανότητες παρουσίας πρωτεϊνών στην κεφिरάνη που απομόνωσαν, λόγω συγκαταβύθισης να είναι ιδιαίτερα αυξημένες (Rimada & Abraham, 2003; Ahmed et al., 2013).

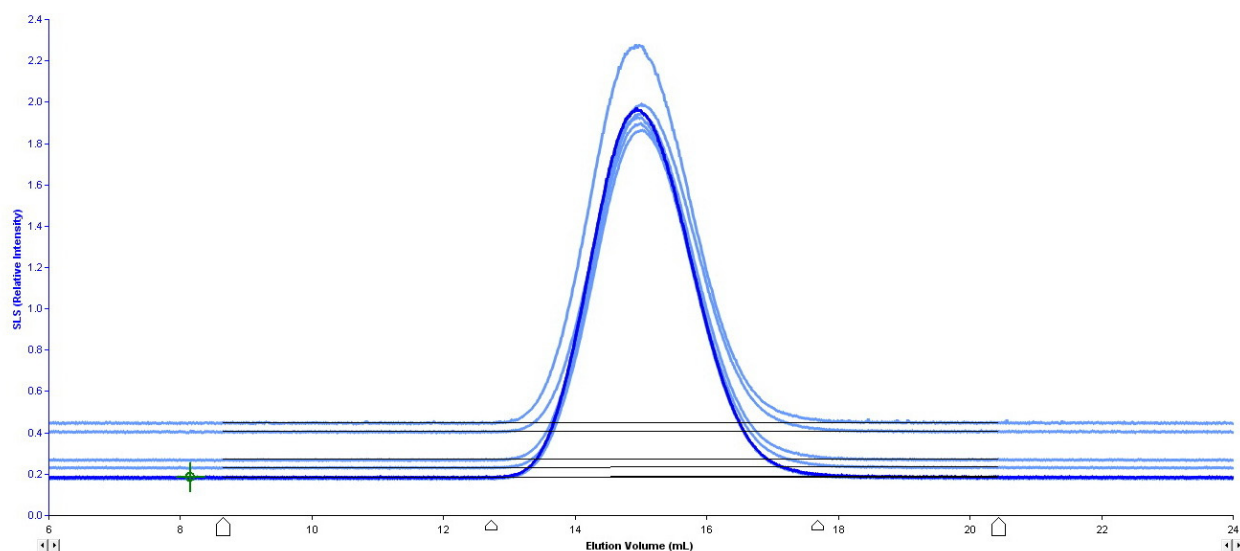
Η σταθερά του Huggins (k') μπορεί να χαρακτηρίσει τη φύση του διαλύτη, ενώ η διαφορά των δύο συντελεστών Huggins και Kraemer ($k' - k''$) χαρακτηρίζει τον υδροδυναμικό όγκο του πολυσακχαρίτη. Συγκεκριμένα, η σταθερά k' συνήθως παίρνει τιμές μεταξύ 0,3 και 0,8. Όταν κυμαίνεται μεταξύ 0,3 και 0,4 αναφέρεται σε καλό διαλύτη, ενώ τιμές μεταξύ 0,5 και 0,8 σε θ διαλύτη. Τιμές πάνω από 0,8 υποδηλώνουν συσσωμάτωση των μορίων του πολυσακχαρίτη. Επιπλέον, όταν τα μόρια του πολυσακχαρίτη εμφανίζουν τυχαία διαμόρφωση (random coil) η διαφορά $k' - k''$ ισούται με 0,5 (Yang & Zhang, 2009). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα υδατικά διαλύματα κεφिरάνης χαμηλής συγκέντρωσης ($C < C^*$) εμφάνισαν τιμή για το συντελεστή k' ίση με 0,43, ενώ η διαφορά $k' - k''$ ήταν 0,4, υποδηλώνοντας ότι το νερό πιθανόν να είναι καλός διαλύτης για την κεφिरάνη και ότι τα μόρια της έχουν τυχαία διαμόρφωση δηλ. του περιδινούμενου κουβαριού.

Στο Σχήμα 4.19 φαίνεται το χρωματογράφημα υδατικού διαλύματος κεφिरάνης. Στον ανιχνευτή υπεριώδους παρατηρείται μία μικρή κορυφή, η οποία εμφανίζεται και στον ανιχνευτή του δείκτη διάθλασης, αλλά δεν ανιχνεύεται στον ανιχνευτή σκέδασης πολλαπλών γωνιών. Στον ανιχνευτή σκέδασης συστατικά με μέσο μοριακό βάρος μικρότερο από ~1000 Da δεν μπορούν να ανιχνευτούν.



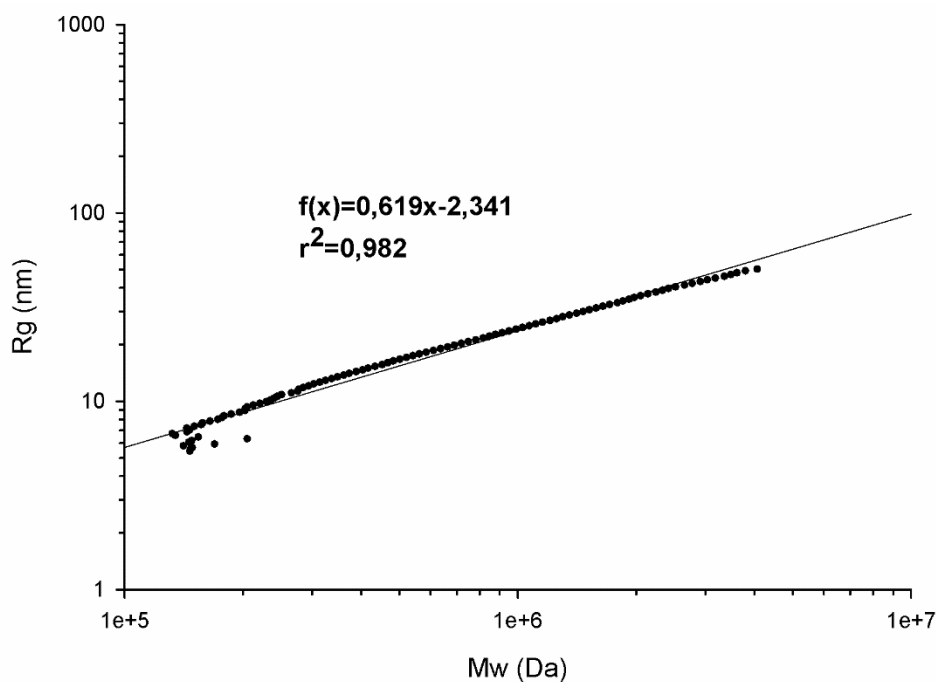
Σχήμα 4.19. Χρωματογράφημα υδατικού διαλύματος κεφιράνης χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Με μπλε χρώμα είναι το χρωματογράφημα του ανιχνευτή σκέδασης φωτός, με κόκκινο του ανιχνευτή δείκτη διάθλασης και με ιώδες του ανιχνευτή υπεριώδους.

Στο Σχήμα 4.20 φαίνεται το χρωματογράφημα των επτά γωνιών (35° , 50° , 75° , 90° , 105° , 130° και 145°) του ανιχνευτή στατικής σκέδασης για υδατικό διάλυμα κεφιράνης συγκεντρώσεως 0,5% (w/v). Δεν παρατηρείται διαφορά στη σκέδαση της κάθε γωνίας. Όπως φαίνεται, το χρωματογράφημα εμφανίζει μία σχετικά στενή κατανομή υποδηλώνοντας την παρουσία ενός πληθυσμού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μέσο μοριακό βάρος της κεφιράνης είναι $6,144 \times 10^5$ Da, ο λόγος $\frac{M_w}{M_n}$ (συντελεστής πολυδιασποράς) ισούται με 1,978 και η μέση γυροσκοπική ακτίνα ($R_{g(z)}$) είναι ίση με $35,84 \pm 0,1$ nm. Οι Maeda et al. (2004a) αναφέρουν για την κεφιράνη ότι έχει μέσο μοριακό βάρος $7,6 \times 10^5$ Da και R_g 39,9 nm, τιμές παραπλήσιες με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Μικρότερη τιμή για το μέσο μοριακό βάρος της κεφιράνης ($5,5 \times 10^4$ Da) προσδιορίστηκε από τους Ahmed et al. (2013), ενώ λίγο μεγαλύτερη τιμή ($1,35 \times 10^6$ Da) βρήκαν οι Ghasemlou et al. (2012). Οι Piermaria et al. (2008), οι οποίοι δεν χρησιμοποίησαν τριχλωροξικό οξύ για την καταβύθιση των πρωτεϊνών, αναφέρουν ακόμη μεγαλύτερη τιμή για το μέσο μοριακό βάρος της κεφιράνης που αντιστοιχεί σε 10^7 Da, χωρίς ωστόσο να εμφανίζουν το χρωματογράφημα στην εργασία τους.



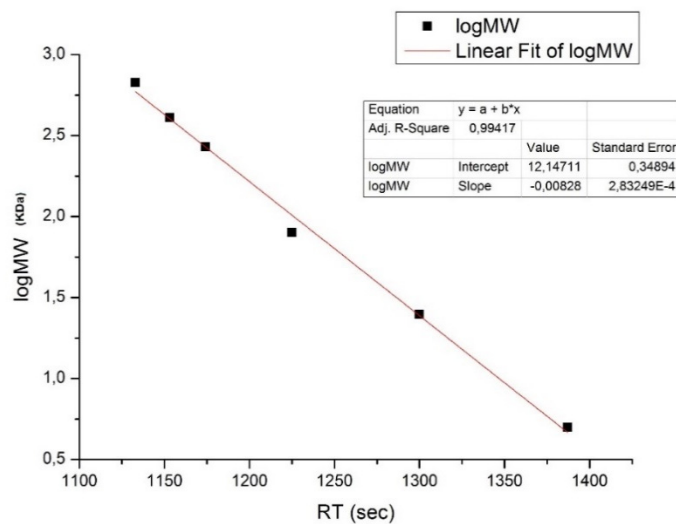
Σχήμα 4.20. Χρωματογράφημα υδατικού διαλύματος κεφिरάνης χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού του ανιχνευτή σκέδασης φωτός για επτά γωνίες σκέδασης.

Η κατανομή των τιμών της γυροσκοπικής ακτίνας συναρτήσει της κατανομής του μοριακού βάρους της κεφिरάνης σε διπλό λογαριθμικό διάγραμμα φαίνεται στο Σχήμα 4.21. Η κλίση της ευθείας αποτελεί ένδειξη της διαμόρφωσης του μορίου του πολυσακχαρίτη. Η τιμή 0,619, η οποία βρέθηκε υποδηλώνει ότι το μόριο έχει διαμόρφωση περιδινούμενου κουβαριού (random coil). Σύμφωνα με τους Goh et al. (2011), όταν η κλίση είναι ίση με 0,6 τα μόρια του πολυσακχαρίτη σχηματίζουν ευθεία αλυσίδα διαμόρφωσης περιδινούμενου κουβαριού σε καλό διαλύτη (good solvent). Όταν η κλίση ισούται με 0,5, τότε τα μόρια του πολυσακχαρίτη σχηματίζουν ευθεία αλυσίδα αλλά σε θ διαλύτη, η τιμή 0,3 υποδηλώνει διακλαδισμένα μόρια, ενώ κλίση ίση με 1 αποτελεί ένδειξη ότι τα μόρια του πολυσακχαρίτη είναι άκαμπτα (rigid).

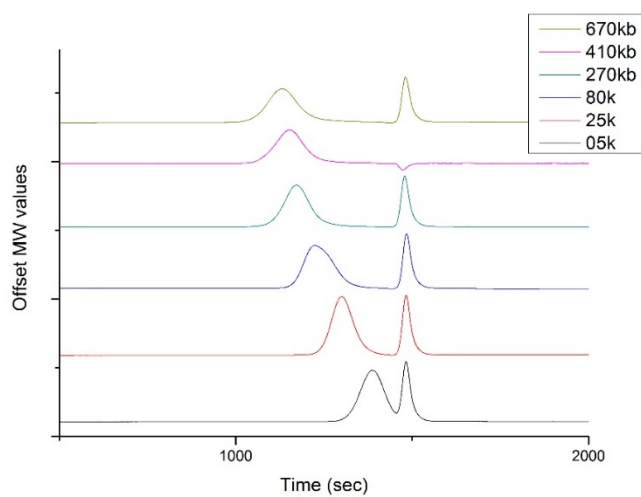


Σχήμα 4.21. Κατανομή της γυροσκοπικής ακτίνας υδατικού διαλύματος κεφिरάνης συναρτήσει της κατανομής του μοριακού βάρους, όπως προκύπτει από τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

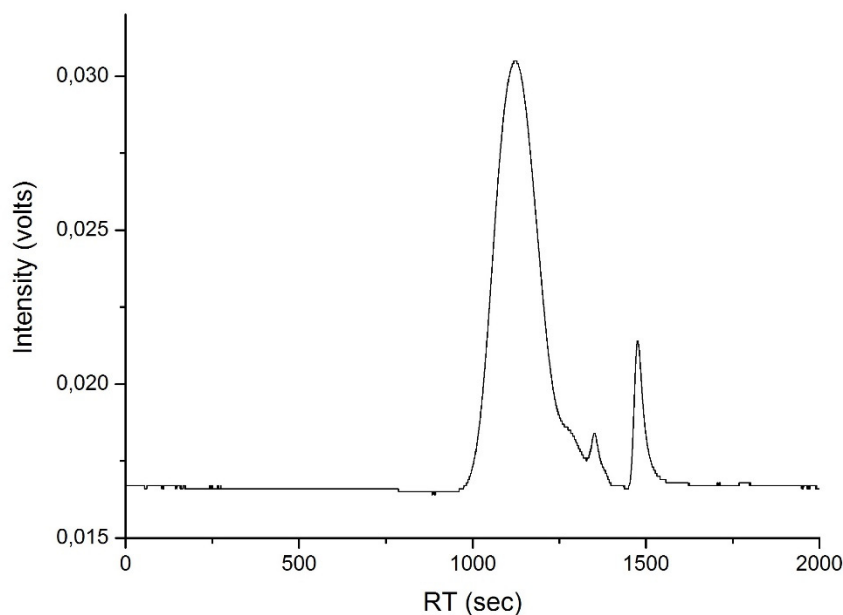
Το μέσο M_w της κεφिरάνης προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με την χρήση καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 4.22) διαλυμάτων προτύπων δεξτρανών (Σχήμα 4.23) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Στο Σχήμα 4.24 φαίνεται το χρωματογράφημα υδατικού διαλύματος κεφिरάνης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε σαν μία επιπρόσθετη μέθοδος υπολογισμού του μοριακού βάρους, η οποία επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της σκέδασης φωτός, δεδομένου ότι το μέσο μοριακό βάρος βρέθηκε να ισούται με $M_w = 7,06 \times 10^5$.



Σχήμα 4.22. Καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων προτύπων δεξτρανών.



Σχήμα 4.23. Χρωματογραφήματα HPSEC διαλυμάτων προτύπων δεξτρανών.

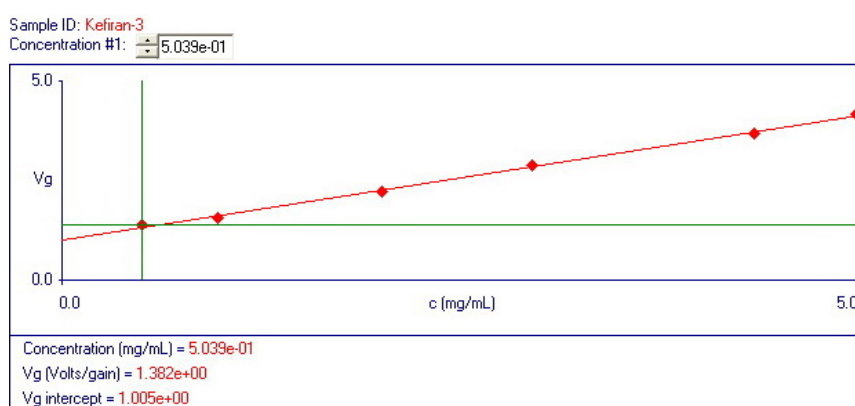


Σχήμα 4.24. Χρωματογράφημα HPSEC υδατικού διαλύματος κεφिरάνης.

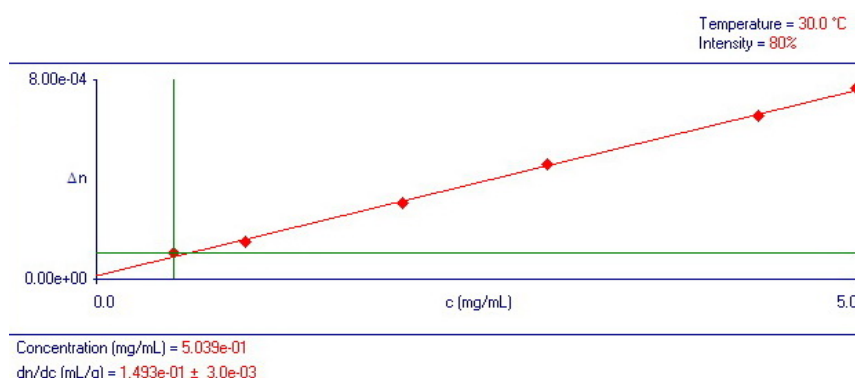
Για τον προσδιορισμό του $\frac{dn}{dc}$ αρχικά παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα χλωριούχου καλίου διαφορετικών συγκεντρώσεων και μετρήθηκαν στο διαφορικό διαθλασίμετρο, όπου και υπολογίστηκε ο συντελεστής βαθμονόμησης (calibration constant). Αυτό έγινε γιατί το χλωριούχο κάλιο έχει γνωστή τιμή $\frac{dn}{dc}$ σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και διαλύτη. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα κεφिरάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων και προσδιορίστηκε η τάση V_g (Volts/gain) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση. Από την τεταγμένη (V_g intercept) του διαγράμματος τάσης – συγκέντρωσης (Σχήμα 4.25) υπολογίζεται το ΔV_g που ισούται με $V_g - V_g$ intercept για κάθε συγκέντρωση. Με δεδομένη τη σταθερά βαθμονόμησης από τις μετρήσεις των διαλυμάτων του χλωριούχου καλίου το Δn υπολογίζεται από το ΔV_g . Από την κλίση της ευθείας του Σχήματος 4.26, το οποίο δείχνει τη μεταβολή του Δn σε σχέση με τη συγκέντρωση της κεφिरάνης, υπολογίστηκε το $\frac{dn}{dc}$ της κεφिरάνης στους 30°C.

Η τιμή του $\frac{dn}{dc}$ διαλυμάτων κεφίρανης σε pH 4,5 (ρυθμιστικό διάλυμα) βρέθηκε

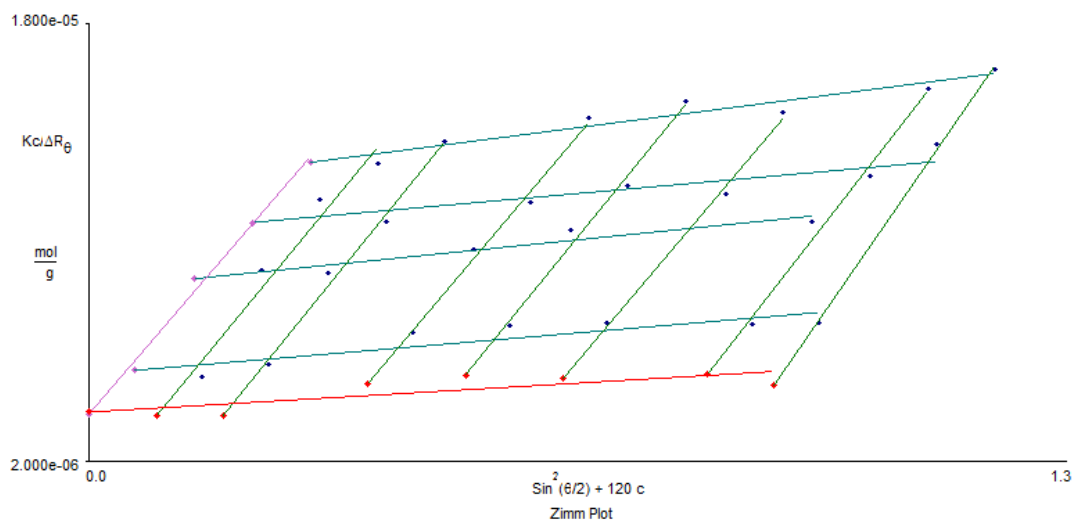
ίση με $0,1493 \pm 0,003$, η οποία αποτελεί τυπική τιμή για πολυσακχαρίτες (~ 0.14) (Goh et al., 2011). Σύμφωνα με το διάγραμμα Zimm των διαλυμάτων κεφίρανης (Σχήμα 4.27), υπολογίστηκαν το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος (M_w), η γυροσκοπική ακτίνα (R_g) και ο δεύτερος δυναμικός συντελεστής (A_2). Το M_w της κεφίρανης βρέθηκε ίσο με $6,71 \times 10^5$ Da, η R_g ίση με $43,2 \pm 2,7$ nm και ο A_2 ίσος με $1,92 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol/g}^2$. Θετικές τιμές του A_2 υποδηλώνουν ότι τα μόρια του πολυσακχαρίτη βρίσκονται σε καλό διαλύτη (Goh et al., 2011). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις του διαγράμματος Zimm βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα που προέκυψαν από τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.



Σχήμα 4.25. Μεταβολή της μετρούμενης τάσης διαφορικού διαθλασίμετρου σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης.



Σχήμα 4.26. Μεταβολή του Δn σε σχέση με τη συγκέντρωση υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης.



Σχήμα 4.27. Διάγραμμα Zimm υδατικών διαλυμάτων κεφιβράνης.

Από τις μετρήσεις της δυναμικής σκέδασης φωτός υπολογίστηκε η τιμή R_h , η οποία βρέθηκε ίση με 36,3 nm. Από τη γυροσκοπική ακτίνα (R_g) και την υδροδυναμική ακτίνα (R_h) μπορεί να προσδιοριστεί ο παράγοντας δομής p σύμφωνα με την εξίσωση:

$$p = \frac{R_g}{R_h} \quad 4.2$$

Η τιμή που προέκυψε ήταν ίση με 1,2, και υποδεικνύει διαμόρφωση περιδινούμενου κουβαριού. Σύμφωνα με τους Xu et al. (2009), τιμές μεταξύ 1,5-1,3 υποδηλώνουν διαμόρφωση περιδινούμενου κουβαριού, τιμή ίση με 0,775 υποδηλώνει διαμόρφωση σφαίρας, ενώ όταν το $p = \infty$ τα μόρια του πολυσακχαρίτη είναι άκαμπτα.

Στον Πίνακα 4.4 συνοψίζονται τα μοριακά χαρακτηριστικά υδατικού διαλύματος κεφειράνης.

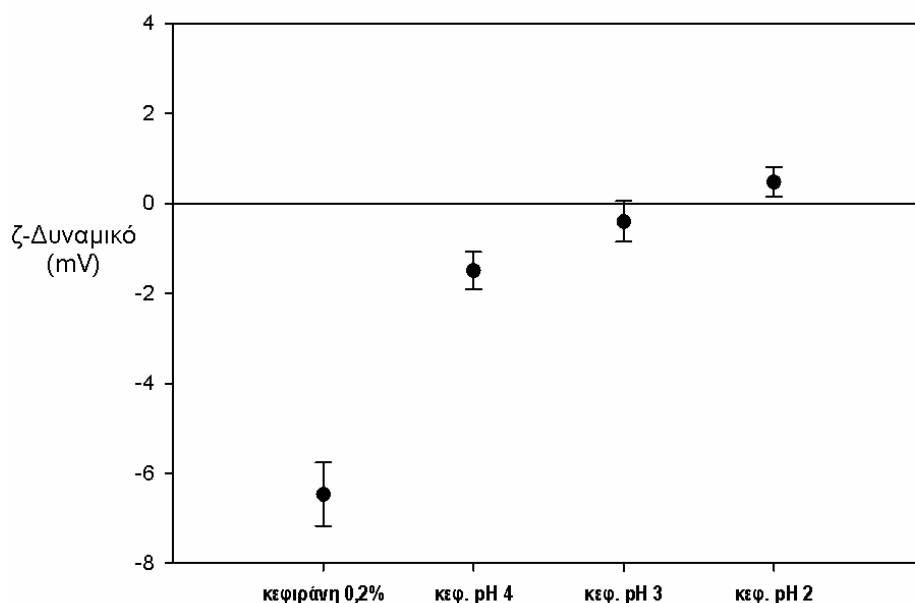
Πίνακας 4.4. Συνοπτικός πίνακας τιμών μοριακών χαρακτηριστικών υδατικών διαλυμάτων κεφειράνης που ελήφθησαν με χρήση διαφόρων φυσικοχημικών τεχνικών.

Ιξωδομετρία	Τιμή
$[\eta]$ (mL/g)	84,89
Σταθερά Huggins k'	0,43
$k' - k''$	0,4
C^* (g/dL)	0,53
Στατική σκέδαση φωτός	
dn/dC (mL/g)	$0,1493 \pm 0,003$
M_w (Da)	$6,71 \pm 0,24 \times 10^5$
$R_{g(z)}$ (nm)	$43,2 \pm 2,7$
A_2 (mole mL/g ²)	$1,92 \pm 0,15 \times 10^{-3}$
M_w/M_n	1,978
Κλίση $R_{g(z)}$ vs M_w	0,619
Δυναμική σκέδαση φωτός	
R_h (nm)	36,3
p παράγοντας σχήματος	1,2

4.2.4. Μεταβολές στη διαμόρφωση του μορίου της κεφिरάνης σε διαφορετικά υδατικά περιβάλλοντα

4.2.4.1. Επίδραση του pH

Στο Σχήμα 4.28 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφिरάνης, καθώς και διαλυμάτων του πολυσακχαρίτη σε διαφορετικές τιμές pH. Όπως παρατηρείται το φορτίο της κεφिरάνης σε pH 6,63 είναι -7,26 mV και το οποίο βαθμιαία μειώνεται σε συνάρτηση με τη μείωση του pH έως ότου μηδενίζεται όταν το pH μειωθεί στο εύρος 2-3.



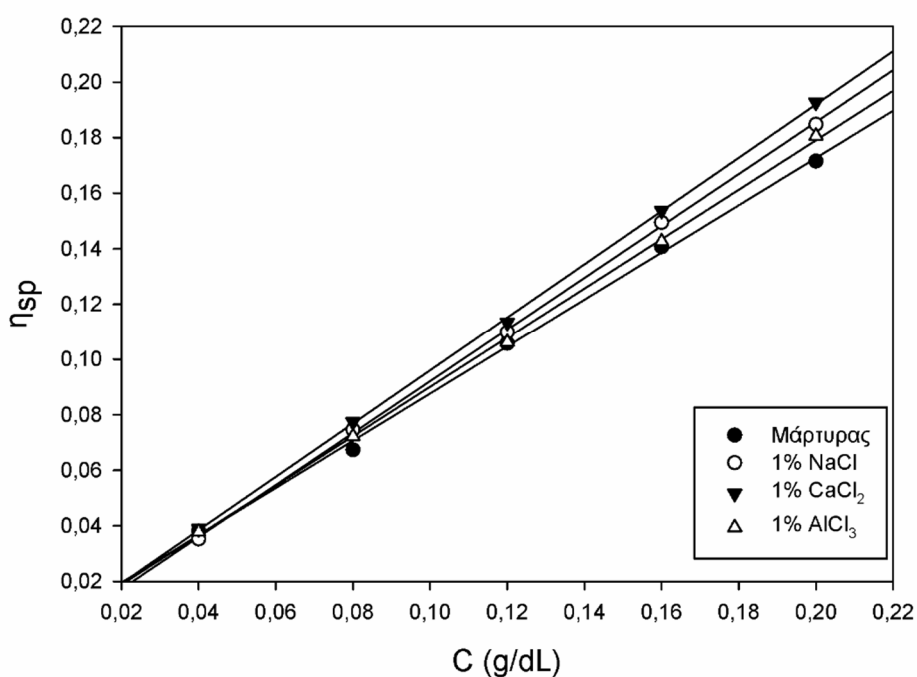
Σχήμα 4.28. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφιράνης, καθώς και διαλυμάτων του πολυσακχαρίτη σε διαφορετικές τιμές pH.

Από τις τιμές αυτές συμπεραίνεται ότι η κεφιράνη είναι ουδέτερος πολυσακχαρίτης με ελαφρά αρνητικό φορτίο. Σε pH 6,63 φαίνεται ότι οι κολλοειδείς ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ των συστημάτων των μορίων επικρατούν και συντελούν στη σταθερότητα του συστήματος του πολυσακχαρίτη, ενώ με τη

μείωση του pH επέρχεται σταδιακά εξασθένηση του φορτίου των κολλοειδών σωματιδίων και αυξάνεται η πιθανότητα κυριαρχίας των ελκτικών δυνάμεων van der Waals έναντι των κολλοειδών ηλεκτροστατικών απώσεων.

4.2.4.2. Επίδραση των αλάτων

Στο Σχήμα 4.29 παρατηρείται η μεταβολή του ειδικού ιξώδους σε αραιό υδατικό διάλυμα κεφिरάνης και σε αραιά διαλύματα κεφिरάνης διαφορετικής ιονικής ισχύος (διαλύματα NaCl, CaCl₂ και AlCl₃ συγκέντρωσης 1% w/v). Το συγκεκριμένο γράφημα καταδεικνύει την επίδραση της ιονικής ισχύος στην μικρή αλλά αξιοσημείωτη αύξηση του ειδικού ιξώδους του μορίου της κεφिरάνης που οφείλεται στην παρουσία των ιόντων. Η αύξηση της ιονικής ισχύος αυξάνει τη πολικότητα των μορίων του νερού και πιθανόν να συντελεί στην αύξηση της ενυδάτωσης των μορίων της κεφिरάνης που έχει ως συνέπεια την αύξηση του ειδικού ιξώδους (Fennema, 1996).

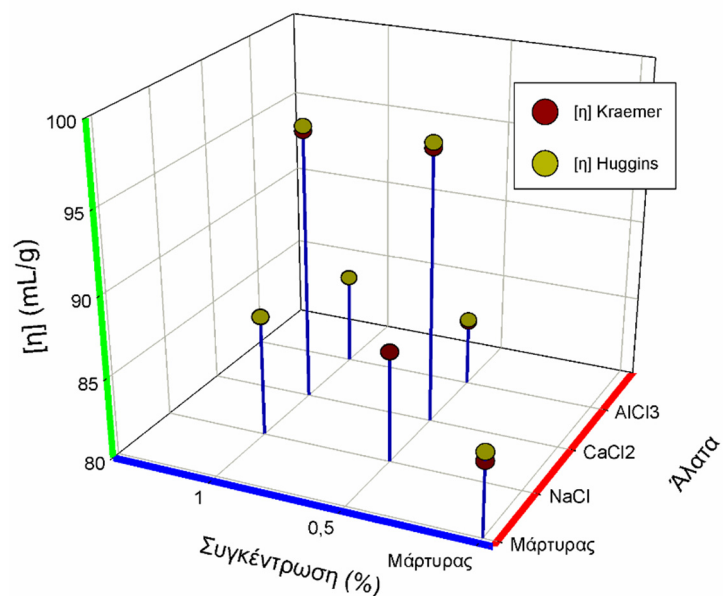


Σχήμα 4.29. Μεταβολή ειδικού ιξώδους υδατικών αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης σε περιβάλλοντα διαφορετικής ιονικής ισχύος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη (●, μάρτυρας, ○, χλωριούχο νάτριο, ▼, χλωριούχο ασβέστιο, Δ, χλωριούχο αργίλιο).

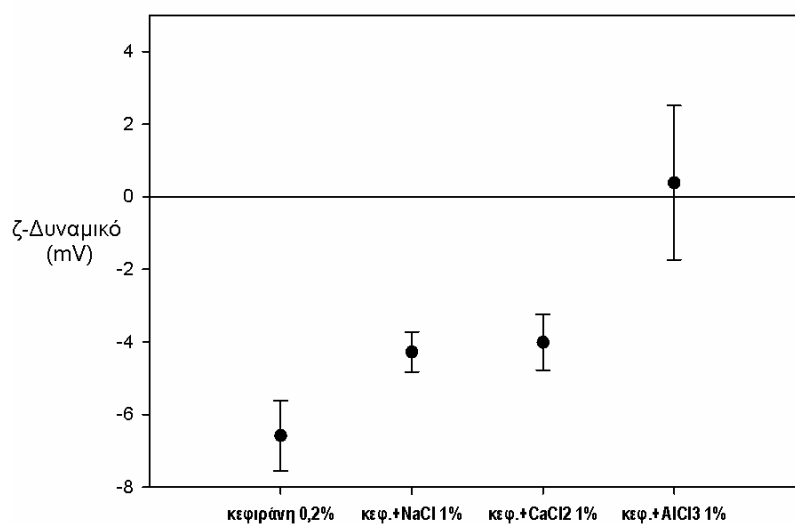
Στην περίπτωση όμως του διαλύματος της κεφίρανης στο οποίο περιέχεται το AlCl_3 παρατηρείται ότι δεν εμφάνισε μεγαλύτερο ειδικό ιξώδες από το αντίστοιχο διάλυμα που περιείχε το CaCl_2 , αλλά ήταν ακόμη χαμηλότερο και από εκείνο του NaCl . Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί σε εξουδετέρωση του φορτίου του πολυσακχαρίτη, δεδομένου ότι το διάλυμα του AlCl_3 είχε μικρότερη τιμή pH (3,23) σε σχέση με εκείνο των διαλυμάτων του NaCl (5,93) και του CaCl_2 (5,67) που πλησιάζουν εκείνο του αποσταγμένου νερού (6,63) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος του μάρτυρα. Οπότε υπεισέρχεται το αντίθετο φαινόμενο της επίδρασης του pH του περιβάλλοντος του διαλύματος του κάθε ηλεκτρολύτη, όπου όσο το pH μειώνεται τόσο αποφορτίζονται τα ενυδατωμένα μόρια του πολυμερούς με αποτέλεσμα τη μείωση του ειδικού ιξώδους λόγω της μείωσης των μορίων νερού που αλληλεπιδρούν με το μόριο του πολυμερούς, όπως καταδείχτηκε και στην προηγούμενη περίπτωση που εξετάστηκε η επίδραση του pH (παράγραφος 4.2.4.1.).

Η μεταβολή του εσωτερικού ιξώδους των διαλυμάτων κεφίρανης παρουσία διαφορετικών αλάτων φαίνεται στο Σχήμα 4.30. Όπως φαίνεται, το εσωτερικό ιξώδες είναι παρόμοιο με εκείνο του διαλύματος της κεφίρανης (μάρτυρα) στις περιπτώσεις των διαλυμάτων των αλάτων NaCl και AlCl_3 με συγκεντρώσεις 0,5% ενώ ελαφρώς αυξάνεται στις περιπτώσεις των διαλυμάτων των αλάτων αυτών με συγκέντρωση 1%. Αντίθετα, αισθητά μεγαλύτερες τιμές εσωτερικού ιξώδους εμφάνισαν τα διαλύματα του πολυσακχαρίτη παρουσία CaCl_2 .

Στο Σχήμα 4.31, φαίνονται οι τιμές του ζ-δυναμικού του διαλύματος της κεφίρανης (μάρτυρας) και διαλυμάτων κεφίρανης παρουσία NaCl , CaCl_2 και AlCl_3 . Όπως προαναφέρθηκε λόγω του διαφορετικού pH και της διαφορετικής ιονικής ισχύος του κάθε διαλύματος, το αρνητικό φορτίο που εμφανίζει ο πολυσακχαρίτης στο υδατικό διάλυμα μειώνεται παρουσία των αλάτων, με αποκορύφωμα την πλήρη αποφόρτιση του συστήματος του διαλύματος της κεφίρανης το οποίο περιέχει το AlCl_3 .

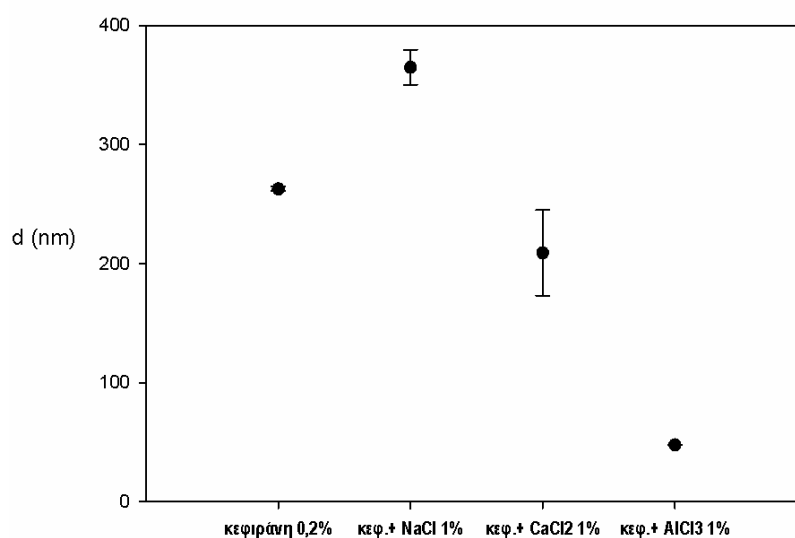


Σχήμα 4.30. Επίδραση της συγκέντρωσης και του είδους των αλάτων (NaCl, CaCl₂ και AlCl₃) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης.



Σχήμα 4.31. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφίρ-άνης, καθώς και διαλυμάτων κεφίρ-άνης σε διαφορετικά άλατα (NaCl, CaCl₂ και AlCl₃) συγκεντρώσεως 1% w/v.

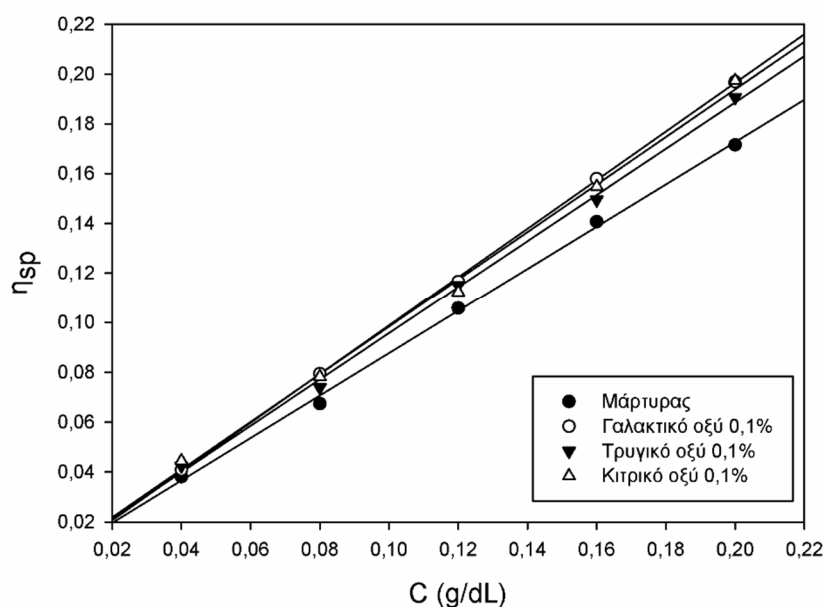
Στο Σχήμα 4.32 παρουσιάζονται οι διάμετροι των σωματιδίων, που μετρήθηκαν με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός, υδατικού διαλύματος κεφिरάνης (μάρτυρας) και των διαλυμάτων κεφिरάνης παρουσία αλάτων. Όπως παρατηρείται, τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά που προέκυψαν από τις υδροδυναμικές μετρήσεις. Αυτά δείχνουν ότι ενώ η αύξηση της ιονικής ισχύος, συνεισφέρει στην ενυδάτωση του μορίου της κεφिरάνης με αποτέλεσμα να αυξάνει η διάμετρος των σωματιδίων όταν το pH μεταβάλλεται μειούμενο, λόγω της συντελούμενης αποφόρτισης μειώνεται η διάμετρος των σωματιδίων με αποτέλεσμα ο διαλύτης να μη συμπεριφέρεται πλέον ως καλός διαλύτης. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση της διαμέτρου των σωματιδίων του πολυσακχαρίτη και πιθανόν ο διαλύτης να έχει μετατραπεί σε θ διαλύτη.



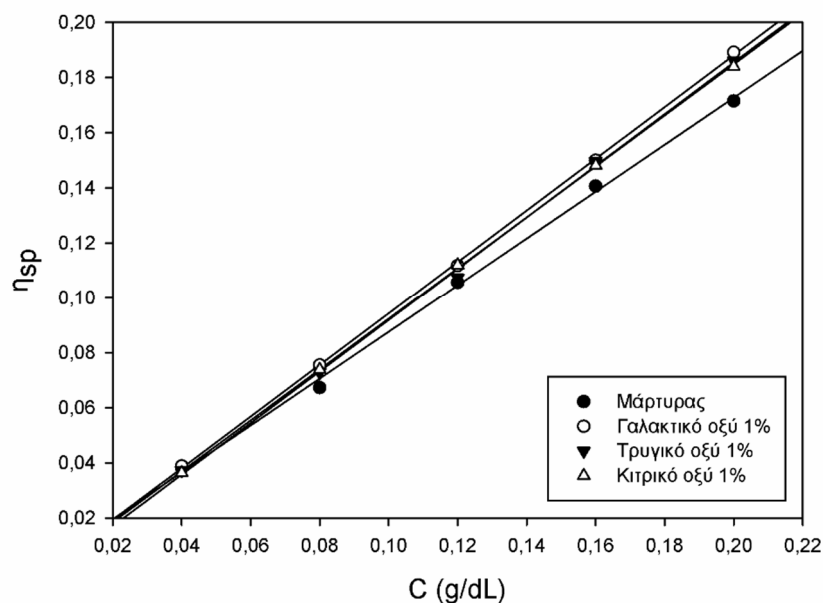
Σχήμα 4.32. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφिरάνης και διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικά άλατα (NaCl, CaCl₂ και AlCl₃) συγκεντρώσεως 1% w/v.

4.2.4.3. Επίδραση των οξέων

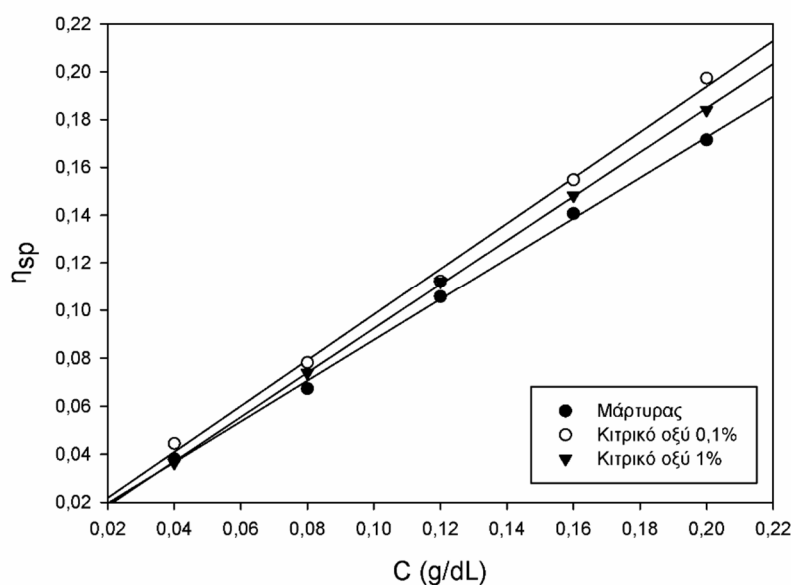
Στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων οργανικών οξέων με διαφορετικό αριθμό καρβοξυλίων (γαλακτικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεων 0,1% και 1% w/v (Σχήματα 4.33 και 4.34), το ειδικό ιξώδες εμφανίζεται να είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του υδατικού διαλύματος κεφिरάνης, ωστόσο δε διαφοροποιείται μεταξύ των οξέων. Επιπλέον, και για τα τρία διαφορετικά οξέα στη χαμηλότερη συγκέντρωση (0,1%) το ειδικό ιξώδες ήταν μεγαλύτερο από το ιξώδες της υψηλότερης συγκέντρωσης (1%) όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.35 για το κιτρικό οξύ.



Σχήμα 4.33. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφिरάνης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικά οξέα (○, γαλακτικό, ▼, τρυγικό και Δ, κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 0,1% w/v σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

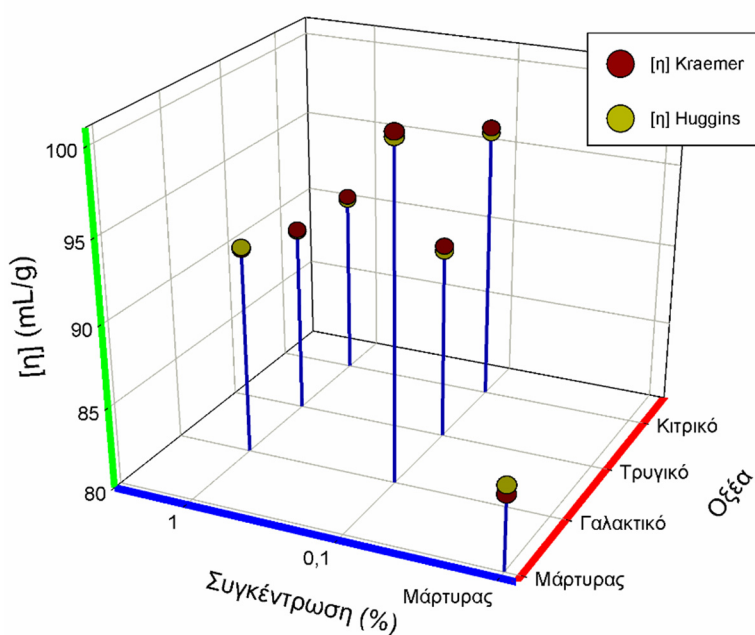


Σχήμα 4.34. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε διαφορετικά οξέα (○, γαλακτικό, ▼, τρυγικό και △, κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 1% w/v σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.



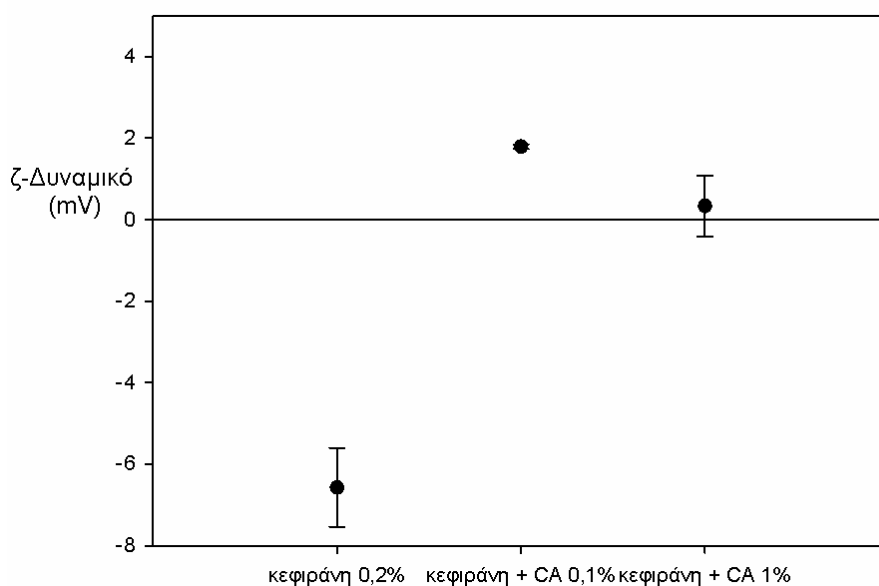
Σχήμα 4.35. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε κιτρικό οξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 0,1% και ▼, 1% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

Οι μεταβολές αυτές οφείλονται στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης των οξέων στην αύξηση των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των γειτονικών μορίων λόγω της αύξησης του υδροδυναμικού όγκου των μορίων και αυτό αντανακλάται στην αύξηση του ειδικού ιξώδους. Στην περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης των οξέων η χαμηλότερη τιμή του ειδικού ιξώδους που παρουσιάζουν τα δείγματα προφανώς οφείλεται στη μείωση των ηλεκτροστατικών απώσεων με επακόλουθη τη μείωση του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς που προσεγγίζει αυτό του μάρτυρα. Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 4.36 το εσωτερικό ιξώδες διαλυμάτων κεφίρανης παρουσία διαφορετικών οξέων μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των οξέων από 0,1% σε 1%. Επίσης, οι μεγαλύτερες τιμές εσωτερικού ιξώδους εμφανίστηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε το γαλακτικό οξύ και οι μικρότερες παρουσία τρυγικού οξέος.



Σχήμα 4.36. Επίδραση της συγκέντρωσης και του είδους των οξέων (γαλακτικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφίρανης.

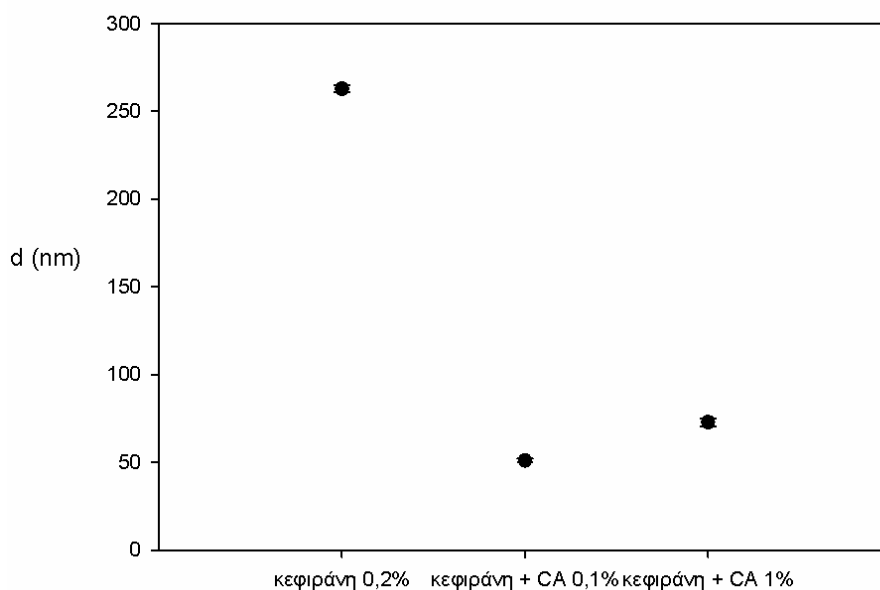
Στο Σχήμα 4.37 παρατηρείται ότι το ζ-δυναμικό που ενώ έχει αρνητική τιμή στο διάλυμα του μάρτυρα αποκτά θετική τιμή, αν και μικρή, στο διάλυμα της κεφίρανης που περιέχει κιτρικό οξύ συγκέντρωσης 0,1%, οπότε μεταξύ των γειτονικών μορίων και πάλι κυριαρχούν οι ηλεκτροστατικές απώσεις και έτσι αυξάνεται το ειδικό ιξώδες που συνεπάγεται αύξηση του υδροδυναμικού όγκου. Στην περίπτωση του διαλύματος που περιέχει 1,0% κιτρικό οξύ παρατηρείται ότι το ζ-δυναμικό σχεδόν μηδενίζεται με αποτέλεσμα να μειωθούν και οι ηλεκτροστατικές απώσεις κατά ένα μεγάλο ποσοστό. Έτσι, μειώνεται η ενυδάτωση των μορίων της κεφίρανης και ο υδροδυναμικός όγκος κατά συνέπεια μειώνεται. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μείωση του συντελεστή ενεργότητας του διαλύματος του οξέος (activity coefficient) λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης του οξέος κατά μία τάξη μεγέθους (Coupland, 2014).



Σχήμα 4.37. Τιμές ζ – δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφίρανης, καθώς και διαλυμάτων του πολυσακχαρίτη σε κιτρικό οξύ συγκεντρώσεων 0,1% και 1% (w/v).

Όσον αφορά τη διάμετρο των σωματιδίων το Σχήμα 4.38 δείχνει την επίδραση της παρουσίας του κιτρικού οξέος στα διαλύματα της κεφίρανης, στη μείωση της διαμέτρου. Όπως φαίνεται το μέγεθος των σωματιδίων συρρικνώνεται σε τέτοιο βαθμό

που υποδηλώνει ότι όξινα υδατικά περιβάλλοντα συντελούν στη μετάβαση ενός καλού διαλύτη σε καθεστώς Θ διαλύτη αναφορικά με το μόριο της κεφिरάνης.

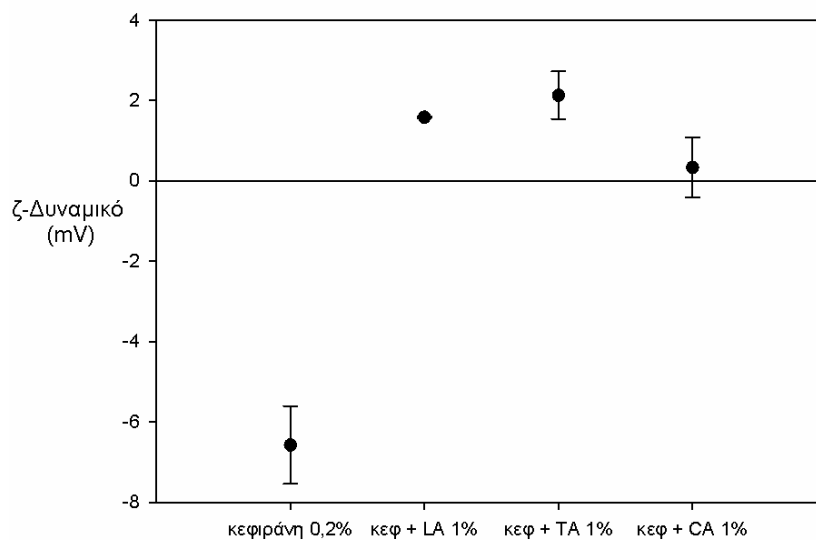


Σχήμα 4.38. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφिरάνης και διαλυμάτων κεφिरάνης σε κιτρικό οξύ συγκεντρώσεων 0,1% και 1% (w/v).

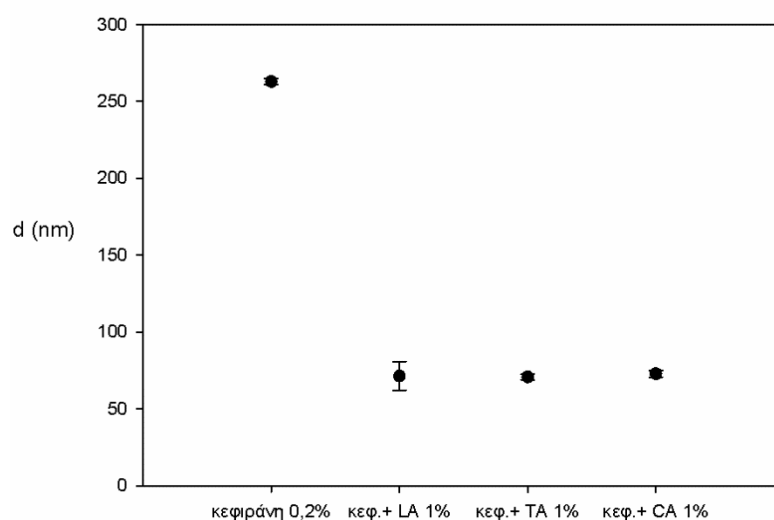
Στην περίπτωση των διαλυμάτων με 1% συγκέντρωση των οξέων παρατηρείται (Σχήμα 4.39) ότι το ζ-δυναμικό αποκτά μικρή θετική τιμή και στις τρεις περιπτώσεις των οξέων με αποτέλεσμα το μόριο της κεφिरάνης να εξακολουθεί να είναι φορτισμένο και οι ηλεκτροστατικές απώσεις αν και κατά πολύ μειωμένες να εξακολουθούν να υφίστανται και έτσι το ειδικό ιζώδες των διαλυμάτων να είναι ελαφρά αυξημένο σε σχέση με εκείνο του μάρτυρα (Σχήμα 4.34).

Η σημαντική μείωση του φορτίου της κεφिरάνης είναι υπεύθυνη για τη μείωση της διαμέτρου των σωματιδίων που μετρήθηκε με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός των διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικά οξέα σε σχέση με το υδατικό διάλυμα (Σχήμα 4.40). Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν και πάλι την επίδραση των χαμηλών τιμών pH των διαλυμάτων των οξέων που χρησιμοποιήθηκαν. Για παράδειγμα το pH του διαλύματος με 1% κιτρικό οξύ ήταν 2,3 ενώ αυτό που περιείχε 0,1% ήταν 2,5. Οπότε η μερική αποφόρτιση των ενυδατωμένων μορίων κεφिरάνης

προκαλεί μείωση της ικανότητας συγκράτησης μορίων νερού από το μόριο της κεφιράνης.



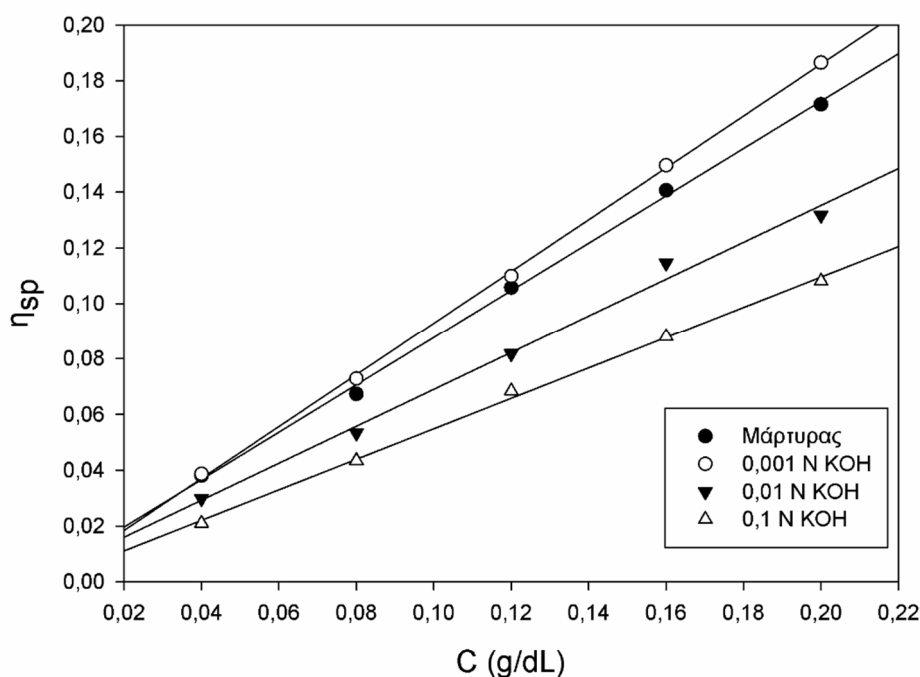
Σχήμα 4.39. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφιράνης, καθώς και διαλυμάτων κεφιράνης σε διαφορετικά οξέα (γαλακτικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 1% w/v.



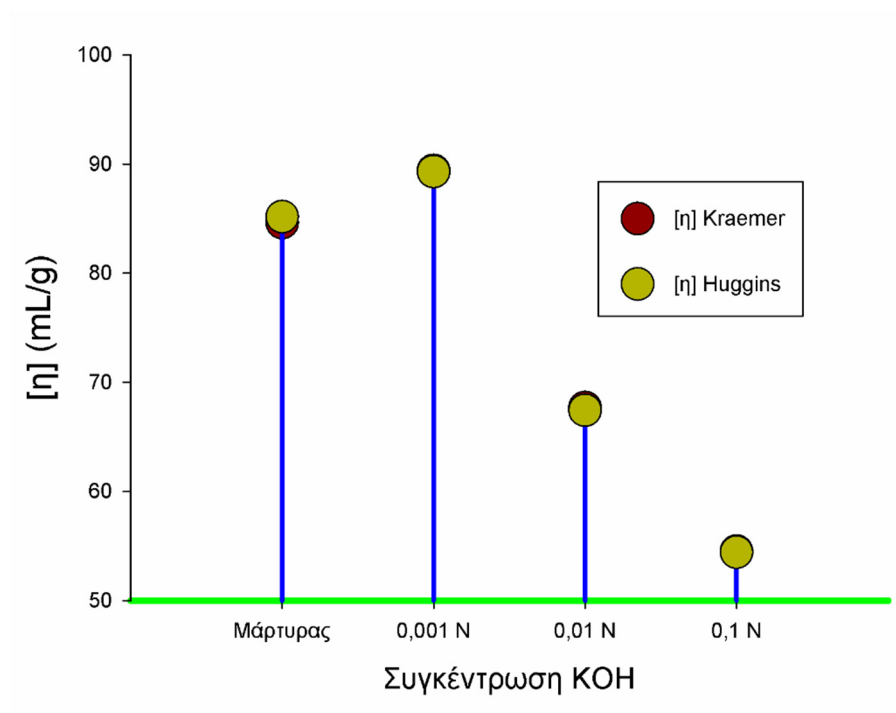
Σχήμα 4.40. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφιράνης και διαλυμάτων κεφιράνης σε διαφορετικά οξέα (γαλακτικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) συγκεντρώσεως 1% w/v.

4.2.4.4. Επίδραση του καυστικού καλίου

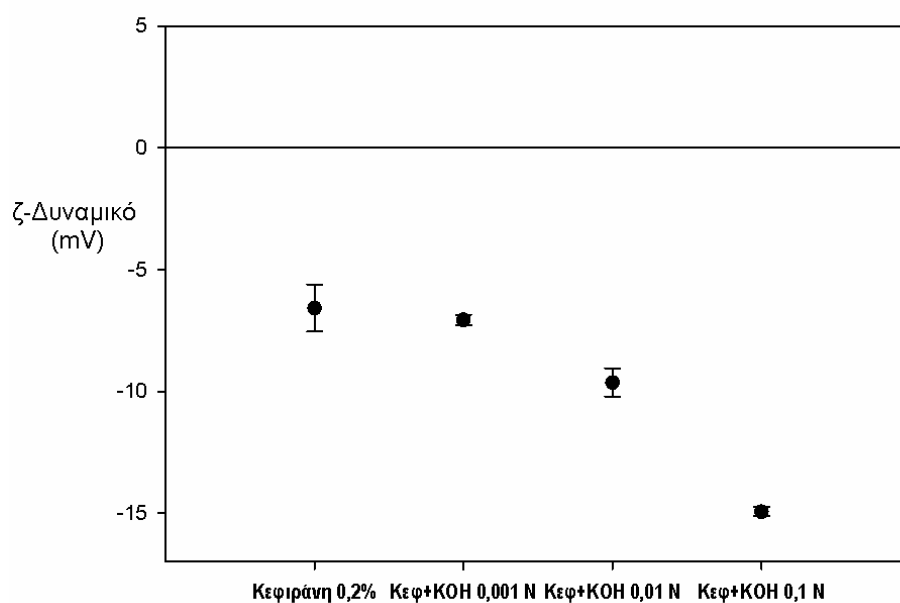
Στα Σχήματα 4.41 και 4.42 φαίνεται η μεταβολή του ειδικού και του εσωτερικού ιξώδους διαλυμάτων κεφίρανης σε διαφορετικής κανονικότητας διαλύματα ΚΟΗ σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη. Οι κανονικότητες των διαλυμάτων του ΚΟΗ που παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχες τιμές pH ήταν: 0,001 N και 10,7 – 0,01 N και 12,0 - 0,1 N και 13,1. Παρατηρείται ότι αμφότερα τα ιξώδη για το διάλυμα με κανονικότητα 0,001 N είναι ελαφρώς υψηλότερα από εκείνα του μάρτυρα. Το ζ-δυναμικό του διαλύματος (Σχήμα 4.43) είναι αρνητικό και ιδίου μεγέθους με αυτό του μάρτυρα και προφανώς ο προκαλούμενος ιονισμός των μορίων του νερού ενυδατώνει τα μόρια κεφίρανης στον ίδιο βαθμό με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των ενυδατωμένων μορίων της κεφίρανης με επακόλουθη αύξηση του υδροδυναμικού όγκου τους όπως καταδεικνύεται από την αυξημένη τιμή του εσωτερικού ιξώδους και τη θεαματική αύξηση της διαμέτρου των σωματιδίων (Σχήμα 4.44).



Σχήμα 4.41. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε καυστικό κάλιο (ΚΟΗ) διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 0,001, ▼, 0,01 και Δ, 0,1 N) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

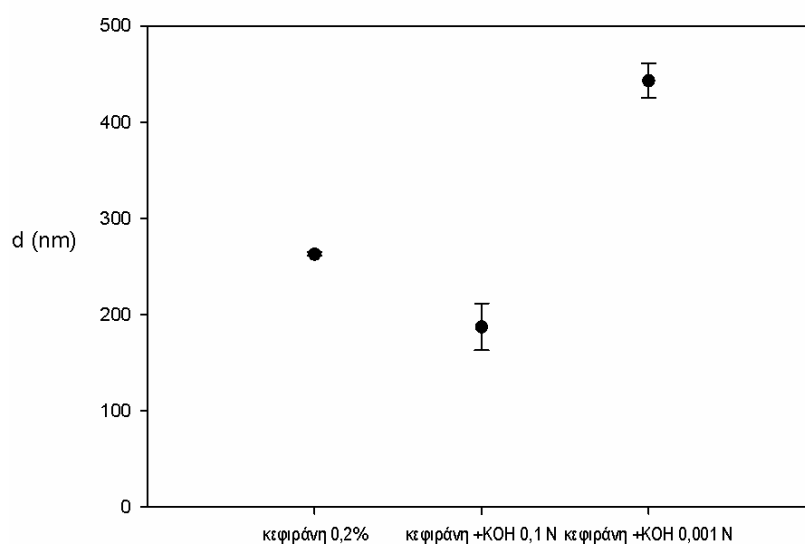


Σχήμα 4.42. Επίδραση της συγκέντρωσης του καυστικού καλίου (KOH) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης.



Σχήμα 4.43. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφιράνης, καθώς και διαλυμάτων κεφιράνης σε καυστικό κάλιο (KOH) διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,001, 0,01 και 0,1 N).

Αντίθετα, στην περίπτωση των διαλυμάτων με κανονικότητες 0,01 N και 0,1 N KOH τόσο το ειδικό όσο και το εσωτερικό ιξώδες έχουν υποστεί αξιοσημείωτη μείωση ενώ το ζ-δυναμικό αμφοτέρων εμφανίζει πολύ πιο αρνητική τιμή από εκείνη του μάρτυρα. Σύμφωνα με τη μέχρι τώρα συμπεριφορά των συστημάτων κεφίρανης σε διάφορα υδατικά περιβάλλοντα θα αναμενόταν οι ηλεκτροστατικές απώσεις να κυριαρχούν και στο περιβάλλον των μορίων της κεφίρανης στα διαλύματα με 0,01 και 0,1 N KOH με σύγχρονη αύξηση της ενυδάτωσής τους. Όμως η μείωση του υδροδυναμικού τους όγκου συνηγορεί στην υπόθεση ότι στις υψηλές τιμές pH δηλ. 12,0 και 13,1 των διαλυμάτων, τα υδροξύλια των δομικών μορίων της κεφίρανης ιονίζονται σε μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα κάποια από αυτά να δημιουργούν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους αντί με τα μόρια νερού που τα περιβάλλουν, εκδιώκοντας μέρος των μορίων του νερού από το χώρο που καταλαμβάνει το μόριο της κεφίρανης με συνέπεια τα μόρια της κεφίρανης να συρρικνώνονται και η δομή τους να γίνεται πιο πυκνή και να υιοθετούν τη διαμόρφωση της συνεκτικής σφαίρας (hard sphere). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται εκτός από τις υδροδυναμικές μετρήσεις που δείχνουν την μείωση του υδροδυναμικού όγκου και από τις μετρήσεις της διαμέτρου των σωματιδίων με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης του φωτός που δείχνουν μείωση της διαμέτρου των σωματιδίων στο διάλυμα με 0,1 N KOH σε σχέση με αυτή του μάρτυρα (Σχήμα 4.44).

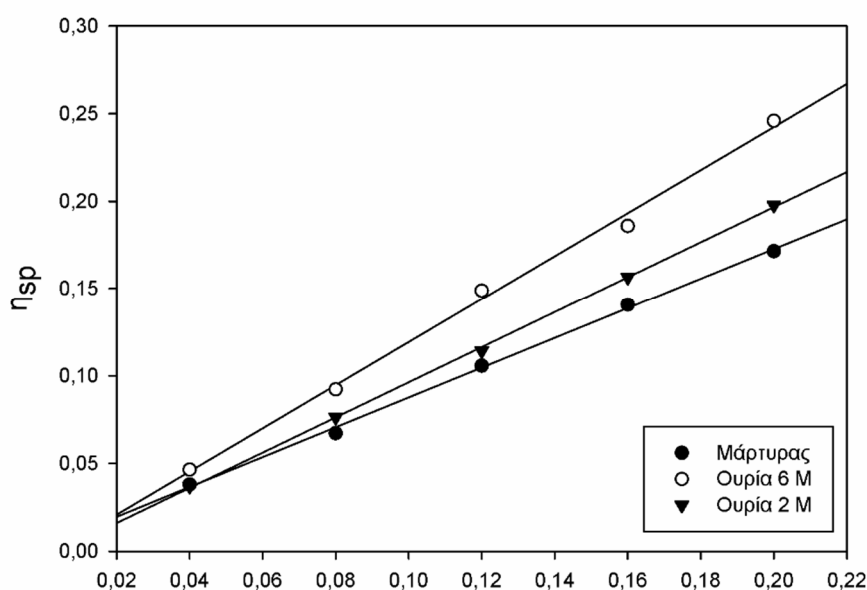


Σχήμα 4.44. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων κεφίρανης σε καυστικό κάλιο (KOH) διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,001 και 0,1 N).

4.2.4.5. Επίδραση της ουρίας

Η μεταβολή του ειδικού ιξώδους σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων αυτής σε ουρία διαφορετικής συγκέντρωσης φαίνεται στο Σχήμα 4.45.

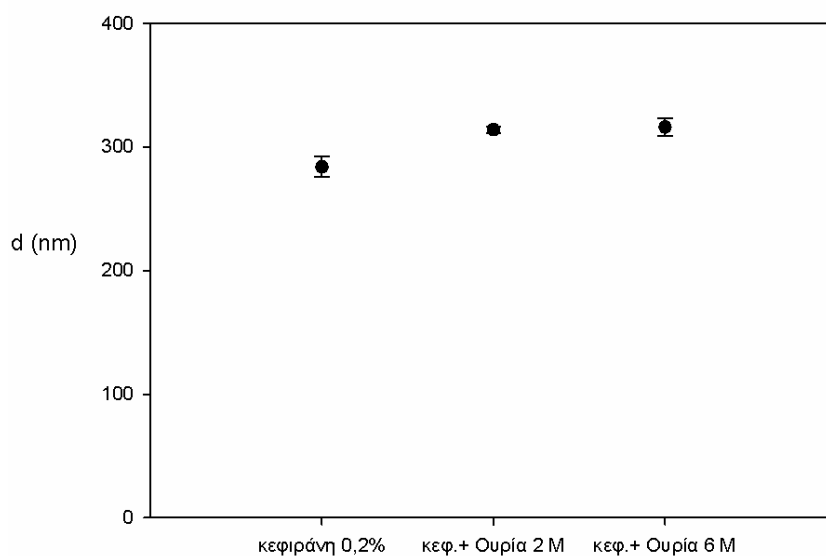
Με δεδομένο ότι η παρουσία της ουρίας προκαλεί διάσπαση των δεσμών υδρογόνου σε συσσωματώματα μορίων νερού αλλά και σε διάφορες περιπτώσεις συστημάτων υδροκολλοειδών, η ουρία προστέθηκε σε δύο συγκεντρώσεις 2 Μ και 6 Μ στο διάλυμα της κεφίρανης. Παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του ειδικού ιξώδους (Σχήμα 4.45) όσο και του εσωτερικού ιξώδους (Σχήμα 4.48) με την προσθήκη της ουρίας και η αύξηση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουρίας δηλ. το ειδικό ιξώδες και το εσωτερικό ιξώδες αυξάνουν με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουρίας.



Σχήμα 4.45. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε ουρία διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 2 Μ και ▼, 6 Μ) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

Επομένως, φαίνεται ότι όχι μόνο δεν επηρεάζονται οι δεσμοί υδρογόνου του μορίου της κεφίρανης με τα μόρια νερού που την περιβάλλουν από τη παρουσία της

ουρίας αλλά και επιπλέον φαίνεται ότι τα μόρια της ουρίας συμβάλλουν στη δημιουργία περισσότερων δεσμών υδρογόνου με μόρια νερού που συμμετέχουν στο σύστημα του μορίου της κεφιράνης με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο υδροδυναμικός όγκος της. Η παρουσία ωστόσο της ουρίας, δεν φαίνεται να επηρέασε σημαντικά τη διάμετρο σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός (Σχήμα 4.46).



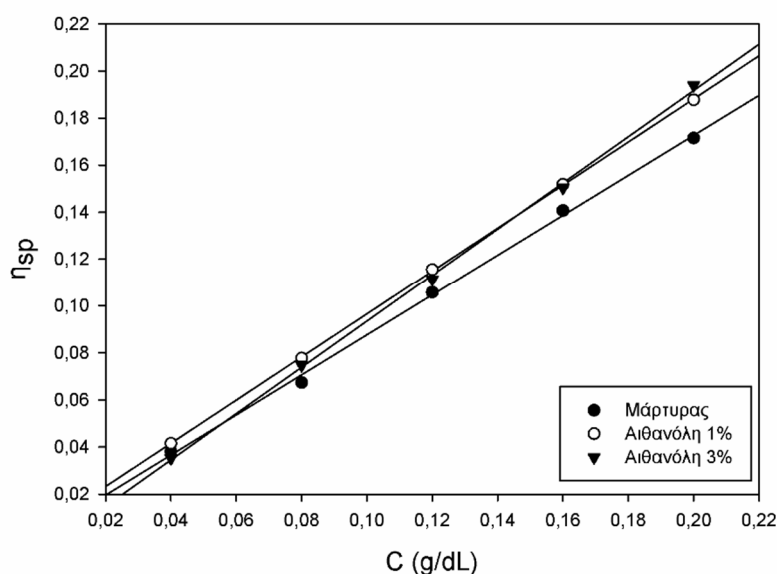
Σχήμα 4.46. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφιράνης και διαλυμάτων κεφιράνης σε ουρία συγκεντρώσεων 2 Μ και 6 Μ.

4.2.4.6. Επίδραση της αιθανόλης

Η μεταβολή του ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφιράνης και αραιών διαλυμάτων κεφιράνης σε αιθανόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (1% και 3% v/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη φαίνεται στο Σχήμα 4.47. Όπως παρατηρείται, παρουσία αιθανόλης το ειδικό ιξώδες αυξάνεται. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η αιθανόλη, η οποία είναι πολικός διαλύτης, δρα ανταγωνιστικά με τον πολυσακχαρίτη ως προς τη δέσμευση των μορίων του νερού. Με την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης από 1% σε 3% το εσωτερικό ιξώδες και επομένως ο υδροδυναμικός όγκος μειώνεται και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η

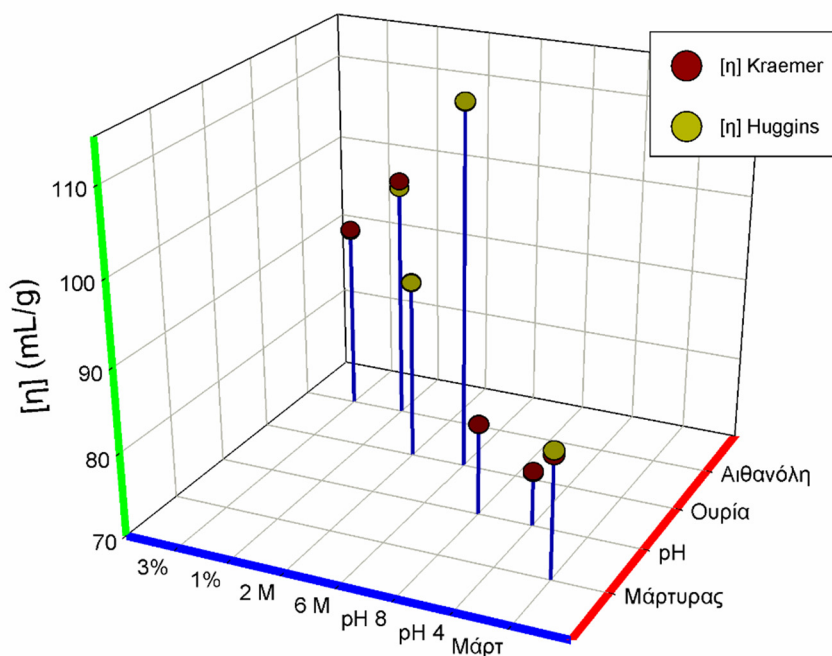
αιθανόλη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα αφαιρεί μόρια νερού που ήταν ενυδατωμένα στα μόρια της κεφिरάνης. Οπότε, τα μόρια του πολυσακχαρίτη έρχονται σε επαφή και αναπτύσσουν περισσότερους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους και λιγότερους με μόρια νερού όπως επίσης συνδέονται το ένα με το άλλο μέσω ελκτικών δυνάμεων (van der Waals) έτσι ο υδροδυναμικός όγκος μειώνεται. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργούνται βαθμιαία συσσωματώματα όσο αυξάνει η συγκέντρωση της αιθανόλης και αυτό αποτυπώνεται στην απότομη αύξηση της διαμέτρου σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός σε συγκεντρώσεις της αιθανόλης πάνω από 3% (Σχήμα 4.49).

Ως γνωστό, η προσθήκη μεγάλων συγκεντρώσεων αιθανόλης σε διαλύματα κεφिरάνης προκαλεί μείωση της διαλυτότητας της κεφिरάνης λόγω δέσμευσης μεγάλου αριθμού μορίων νερού από την αιθανόλη με συνέπεια τη δημιουργία συσσωματωμάτων μορίων της κεφिरάνης τα οποία με την αύξηση των μεγεθών τους και την επίδραση βαρυτικών δυνάμεων διαχωρίζονται από το διάλυμα (phase out effect) με τη δημιουργία νέας φάσης (στερεής). Στο συγκεκριμένο φαινόμενο βασίζεται η μέθοδος παραλαβής και καθαρισμού της κεφिरάνης από υδατικά συστήματα (κεφάλαιο 3 - Υλικά & Μέθοδοι, ενότητα 3.2).

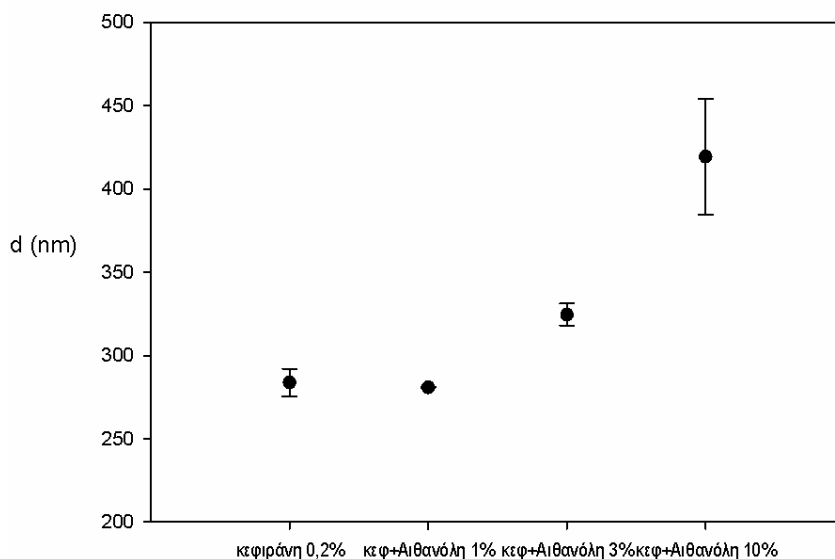


Σχήμα 4.47. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφिरάνης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης σε αιθανόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 1% και ▼, 3% v/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

Στο Σχήμα 4.48 εκτός των άλλων φαίνεται επίσης και η μεταβολή του εσωτερικού ιξώδους της κεφिरάνης σε υδατικά περιβάλλοντα με διαφορετική τιμή pH (4 και 8). Σε συμφωνία με προηγούμενα γραφήματα που αναφέρονται στην επίδραση του pH στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα διαλυμάτων της κεφिरάνης παρατηρείται η μείωση του εσωτερικού ιξώδους και επομένως και του υδροδυναμικού όγκου της κεφिरάνης σε pH 4 λόγω μείωσης του ζ-δυναμικού του διαλύματος της κεφिरάνης σε pH 4 σε σχέση με εκείνο που έχει σε pH 6,63 (μάρτυρας) με αποτέλεσμα τη μείωση των ηλεκτροστατικών απώσεων των ενυδατωμένων μορίων της κεφिरάνης μεταξύ τους και επακόλουθη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Στην περίπτωση του διαλύματος με pH 8 παρατηρείται μικρότερη μείωση του εσωτερικού ιξώδους σε σχέση με εκείνου του μάρτυρα (pH 6,63), προφανώς λόγω της εμφάνισης ελαφρά μεγαλύτερης τιμής ζ-δυναμικού που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των ηλεκτροστατικών απώσεων των ενυδατωμένων μορίων της κεφिरάνης μεταξύ τους και επακόλουθη αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων.



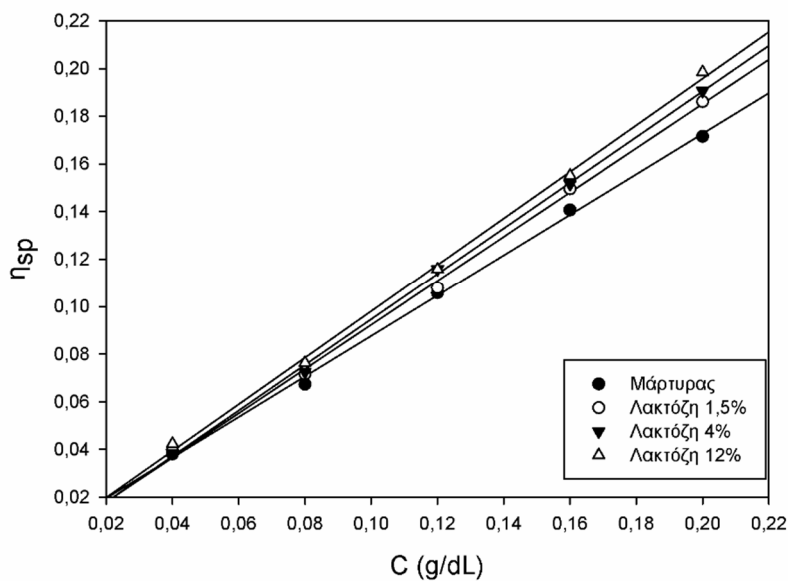
Σχήμα 4.48. Επίδραση της συγκέντρωσης της ουρίας, του pH και της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφिरάνης.



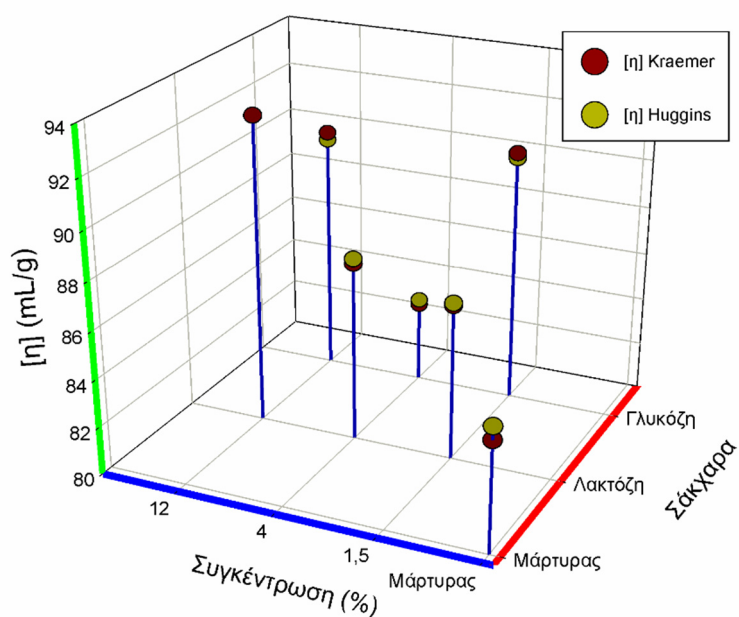
Σχήμα 4.49. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλυμάτων κεφίρανης σε αιθανόλη συγκεντρώσεων 1%, 3% και 10% (v/v).

4.2.4.7. Επίδραση των σακχάρων

Στο Σχήμα 4.50 φαίνεται η μεταβολή του ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε λακτόζη διαφορετικών συγκεντρώσεων (1,5%, 4% και 12% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη. Με την αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης παρατηρείται αύξηση του ειδικού ιξώδους. Η λακτόζη έχει την ιδιότητα να συγκρατεί αριθμό μορίων νερού μέσω δεσμών υδρογόνου και από αυτή την άποψη δρα ανταγωνιστικά με την κεφίρανη η οποία και αυτή ενυδατώνεται με αριθμό μορίων νερού μέσω δεσμών υδρογόνου. Η αύξηση του ειδικού ιξώδους μπορεί να οφείλεται στη δημιουργία υπερδομών μεταξύ μορίων κεφίρανης και λακτόζης μέσω δεσμών υδρογόνου οπότε σ' αυτή την αιτία να οφείλεται και η βαθμιαία αύξηση και του εσωτερικού ιξώδους σε σχέση με την αύξηση στη συγκέντρωση της λακτόζης (Σχήμα 4.51) ή στην συνένωση μορίων της κεφίρανης μεταξύ τους λόγω της απομάκρυνσης μορίων νερού που τα περιβάλλουν από την αφυγραντική δράση της λακτόζης που συνεπάγεται και βαθμιαία αύξηση του υδροδυναμικού όγκου.

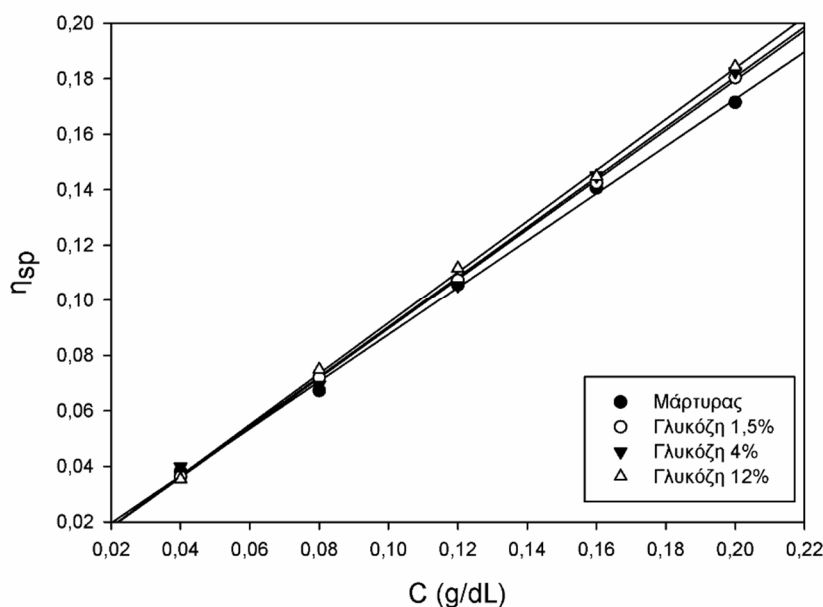


Σχήμα 4.50. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφιράνης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφιράνης σε λακτόζη διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 1,5%, ▼, 4% και Δ, 12% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.



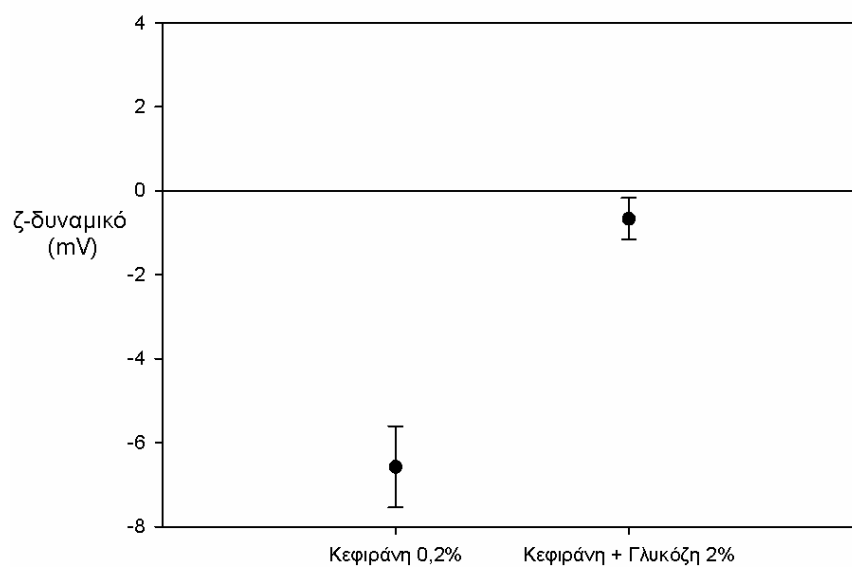
Σχήμα 4.51. Επίδραση της συγκέντρωσης και του είδους των σακχάρων (γλυκόζη και λακτόζη) στο εσωτερικό ιξώδες, το οποίο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer, αραιών διαλυμάτων κεφιράνης.

Παρουσία γλυκόζης (Σχήμα 4.52) το ειδικό ιξώδες αυξάνεται σε σχέση με το υδατικό διάλυμα της κεφίρανης, ωστόσο με την αύξηση της συγκέντρωσης δεν παρατηρείται μεταβολή του ιξώδους. Αναφορικά με το εσωτερικό ιξώδες παρατηρείται (Σχήμα 4.51) επίσης, μια ελαφρά αύξηση στα δείγματα με 1,5 και 12% συγκέντρωση γλυκόζης και μια ελαφρά μείωση στο δείγμα με 4% γλυκόζη σε σχέση με το μάρτυρα.

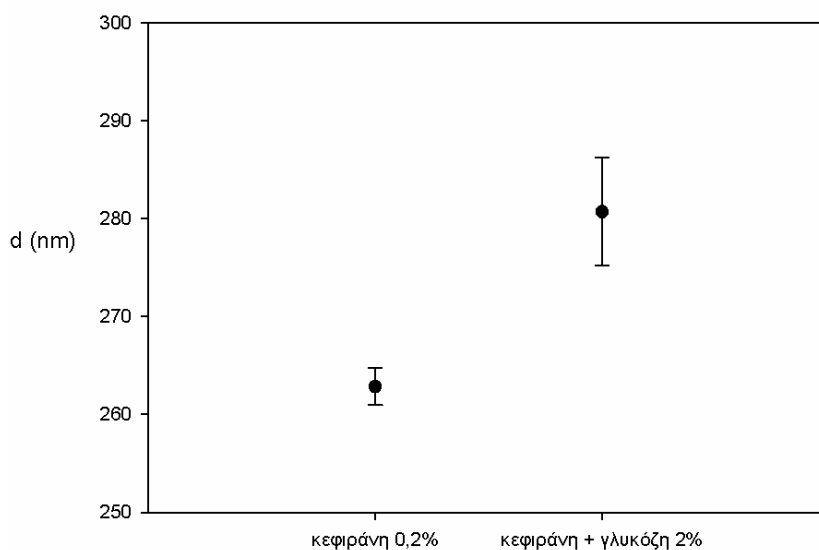


Σχήμα 4.52. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε γλυκόζη διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 1,5%, ▼, 4% και Δ, 12% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

Με δεδομένο ότι τα σάκχαρα είναι ιδιαίτερα υδρόφιλα όταν βρίσκονται σε ένα υδατικό διάλυμα κεφίρανης αφαιρούν μόρια νερού από το περιβάλλον των μορίων της κεφίρανης. Από τη στιγμή που το υδατικό διάλυμα γίνεται ηλεκτρικά ουδέτερο (Σχήμα 4.53) αυξάνονται οι ελκτικές δυνάμεις van der Waals μεταξύ των μορίων της κεφίρανης και έτσι η πιθανότητα δημιουργίας συσσωματωμάτων μεταξύ των μορίων της κεφίρανης, έστω και περιορισμένα, αυξάνει όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.54, όπου η παρουσία 2% γλυκόζης στο διάλυμα της κεφίρανης αυξάνει την διάμετρο σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός σε σχέση με εκείνη του μάρτυρα.



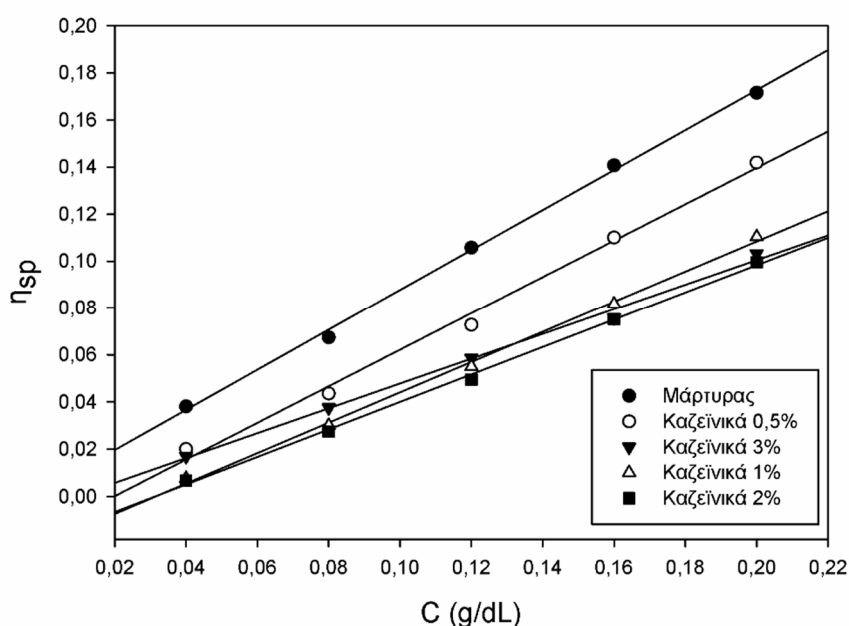
Σχήμα 4.53. Τιμές ζ-δυναμικού υδατικού διαλύματος κεφίρανης, καθώς και διαλύματος κεφίρανης σε γλυκόζη συγκεντρώσεως 2% w/v.



Σχήμα 4.54. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφίρανης και διαλύματος κεφίρανης σε γλυκόζη συγκεντρώσεως 2% w/v.

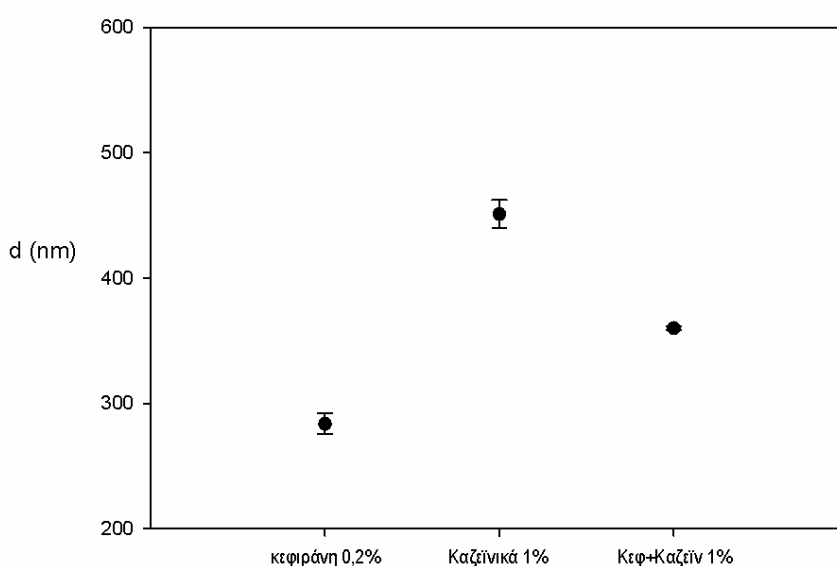
4.2.4.8. Επίδραση των καζεϊνών

Στο Σχήμα 4.55 φαίνεται η μεταβολή του ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε καζεϊνικά άλατα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,5%, 1%, 2% και 3% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη. Όπως παρατηρείται, η αύξηση της συγκέντρωσης των καζεϊνικών αλάτων έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του ειδικού ιξώδους. Αυτό πιθανόν να μπορεί να αποδοθεί σε ασυμβατότητα (incompatibility) των δύο πολυμερών, που ως γνωστό κυριαρχεί μεταξύ ουδέτερων πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Επειδή αμφότερα τα μόρια, κεφίρανη και καζεΐνη, είναι διαλυτά στο νερό έλκοντας αριθμό μορίων νερού στο περιβάλλον τους προφανώς υφίσταται ανταγωνισμός μεταξύ τους αναφορικά με την ενυδάτωση και έτσι ο αριθμός των διαθέσιμων μορίων νερού για την ενυδάτωση είτε της κεφίρανης είτε της καζεΐνης να μειώνεται με αποτέλεσμα το ειδικό ιξώδες να μειώνεται.

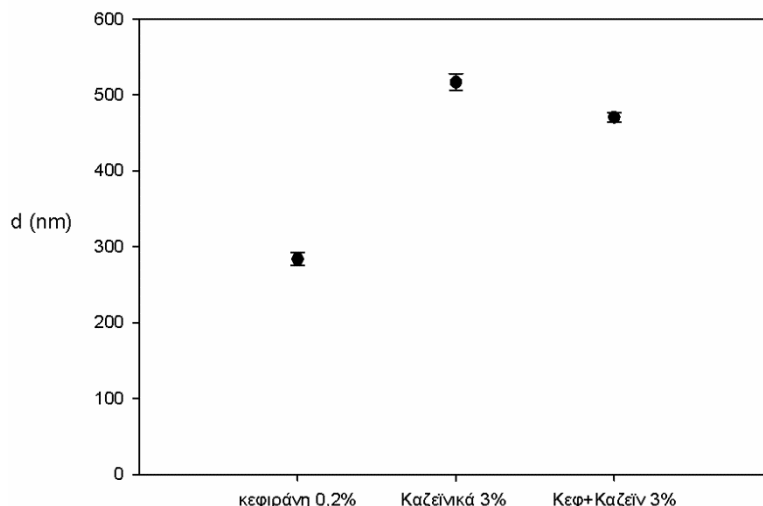


Σχήμα 4.55. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε καζεϊνικά άλατα διαφορετικών συγκεντρώσεων (○, 0,5%, ▼, 1%, Δ, 2% και ■, 3% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

Τα Σχήματα 4.56 και 4.57, φανερώουν το πώς η συνύπαρξη των δύο πολυμερών δηλ. της κεφिरάνης και της καζεΐνης επιδρά στο μέγεθος των σωματιδίων που υπάρχουν στο διάλυμα τους. Συγκεκριμένα, η διάμετρος σωματιδίων που μετρήθηκε με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός σε διαλύματα αμιγώς καζεΐνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (συγκέντρωση 1% και 3%) δείχνει ότι αφ' ενός είναι μεγαλύτερη από τη διάμετρο σωματιδίων του διαλύματος αμιγώς κεφिरάνης (μάρτυρας), αφ' ετέρου αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της καζεΐνης προφανώς λόγω της δημιουργίας συσσωματωμάτων με μεγαλύτερη διάμετρο στο πυκνότερο διάλυμα. Όταν στο διάλυμα της κεφिरάνης προστεθεί καζεΐνη τότε η μέση διάμετρος του συστήματος κεφिरάνη - καζεΐνη, είναι μεγαλύτερη από τη διάμετρο των σωματιδίων στο διάλυμα της κεφिरάνης αλλά μικρότερη από τις διαμέτρους των σωματιδίων της καζεΐνης και στα δύο διαλύματα με διαφορετική συγκέντρωση καζεΐνης. Επιπλέον, εμφανίζεται η μέση διάμετρος σωματιδίων να είναι και πάλι ανάλογη της συγκέντρωσης της καζεΐνης δηλ. αυξάνει η συγκέντρωση της κεφिरάνης αυξάνει και το μέγεθος των σωματιδίων.



Σχήμα 4.56. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφिरάνης, διαλύματος καζεΐνικών αλάτων 1% (w/v) και διαλύματος κεφिरάνης σε καζεΐνικά άλατα συγκεντρώσεως 1% (w/v).



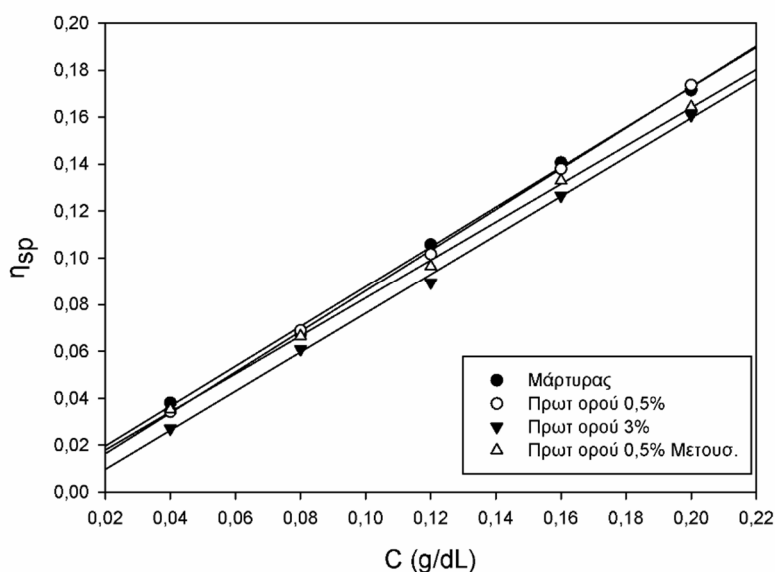
Σχήμα 4.57. Διάμετρος σωματιδίων δυναμικής σκέδασης φωτός υδατικού διαλύματος κεφιράνης, διαλύματος καζεϊνικών αλάτων 3% (w/v) και διαλύματος κεφιράνης σε καζεϊνικά άλατα συγκεντρώσεως 3% (w/v).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων των δύο πολυμερών εκτός από την ενυδάτωσή τους και έτσι η μέση τιμή της διαμέτρου των σωματιδίων στο σύστημα κεφιράνης-καζεϊνης εμφανίζεται να είναι μεταξύ των τιμών των διαμέτρων των σωματιδίων των δύο μορίων και μάλιστα η δημιουργία των συσσωματωμάτων της καζεϊνης να συμβαίνει και στο σύστημα των δύο πολυμερών. Το γιατί το ειδικό ιξώδες μειώνεται λόγω της παρουσίας της καζεϊνης στο διάλυμα της κεφιράνης αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μείωση του αριθμού των μορίων νερού που περιβάλλουν τόσο τα μόρια της κεφιράνης όσο και τα μόρια της καζεϊνης λόγω, όπως προαναφέρθηκε, του ανταγωνισμού μεταξύ τους οπότε μειώνεται και ο υδροδυναμικός όγκος.

4.2.4.9. Επίδραση των πρωτεϊνών ορού

Η μεταβολή του ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφιράνης και αραιών διαλυμάτων κεφιράνης σε μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού συγκεντρώσεως 0,5% (w/v) και μη-μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού συγκεντρώσεων 0,5% και 3% (w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη φαίνεται στο Σχήμα 4.58. Όπως παρατηρείται, παρουσία πρωτεϊνών ορού, το ειδικό ιξώδες των διαλυμάτων δε μεταβάλλεται σε σημαντικό βαθμό, όπως στην περίπτωση των καζεϊνικών αλάτων.

Συγκεκριμένα, οι μη-μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού όταν βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση (0,5%) δεν επηρεάζουν το ειδικό ιξώδες. Ως γνωστό οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού είναι σφαιρικές και η δομή τους δημιουργείται και διατηρείται από ενδομοριακούς δεσμούς (δεσμοί υδρογόνου, δεσμοί θείου-θείου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις). Όπως και στην περίπτωση των καζεϊνών υπάρχει ασυμβατότητα μεταξύ ουδέτερων πολυσακχαριτών και των πρωτεϊνών ορού και αυτό αντανακλά και στη μη μεταβολή του ειδικού ιξώδους διαλύματος κεφίρανης (μάρτυρας) όταν σ' αυτό προστεθούν πρωτεΐνες ορού. Μείωση των τιμών του ειδικού ιξώδους παρατηρείται όταν μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες ορού στην ίδια συγκέντρωση ή όταν αυξηθεί η συγκέντρωσή τους χωρίς να λάβει χώρα μετουσίωσή τους. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού έχει ως αποτέλεσμα το ξεδίπλωμα των μορίων και την έκθεση δισουλφιδικών και υδρόφοβων δεσμών που βρίσκονταν στο εσωτερικό των μορίων. Αυτό προκαλεί το σχηματισμό γεφυρών θείου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων (Walstra et al., 2006).



Σχήμα 4.58. Μεταβολή ειδικού ιξώδους αραιού υδατικού διαλύματος κεφίρανης (●) και αραιών διαλυμάτων κεφίρανης σε μετουσιωμένες (Δ, 0,5% w/v) ή μη πρωτεΐνες ορού (○, 0,5% και ▼, 3% w/v) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη.

Η αύξηση του μεγέθους των μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού ή η αύξηση του αριθμού των μορίων των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού πιθανόν να αυξάνει την

ένταση της ασυμβατότητας μεταξύ των μορίων της κεφिरάνης και των πρωτεϊνών ορού, μειώνοντας το ειδικό ιξώδες των διαλυμάτων.

Στον Πίνακα 4.5 φαίνονται οι τιμές του εσωτερικού ιξώδους σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer σε διαλύματα κεφिरάνης σε διαφορετικούς διαλύτες.

Πίνακας 4.5. Τιμές του εσωτερικού ιξώδους διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικούς διαλύτες σύμφωνα με τις εξισώσεις των Huggins και Kraemer .

Διαλύτης	$[\eta]$ Huggins (mL/g)	$[\eta]$ Kraemer (mL/g)
Deionized water	84,62	85,16
Buffer citrate pH 4	76,67	76,53
Buffer tris pH 8	81,03	80,98
0,5% NaCl	86,83	86,86
1% NaCl	87,47	87,44
0,5% CaCl ₂	97,13	96,81
1% CaCl ₂	96,97	96,68
0,5% AlCl ₃	84,23	84,09
1% AlCl ₃	85,60	85,57
0,1% AlCl ₃	85,03	85,00
KOH 0,001 N	89,40	89,30
KOH 0,01 N	67,67	67,43
KOH 0,1 N	54,53	54,43
Lactic acid 0,1%	100,6	100,3
Lactic acid 1%	92,6	92,7
Tartaric acid 0,1%	92,0	91,7
Tartaric acid 1%	91,5	91,4
Citric acid 0,1%	97,0	96,7
Citric acid 1%	91,4	91,2
Urea 6 M	113,3	113,4
Urea 2 M	91,6	91,7
Lactose 1,5%	86,5	86,6
Lactose 4%	87,5	87,7
Lactose 12%	92,8	92,8
Glucose 1,5%	90,6	90,4
Glucose 4%	83,4	83,6
Glucose 12%	90,3	90,0
Ethanol 1%	99,4	98,6
Ethanol 3%	92,5	92,3

Συνοψίζοντας, με τη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε είναι δυνατή η παραλαβή του πολυσακχαρίτη κεφिरάνη σε καθαρή μορφή. Η κεφिरάνη δεν επηρεάζεται σημαντικά από μεταβολές στην ιονική ισχύ των διαλυμάτων της και η διαμόρφωση των μορίων της δεν επηρεάζεται από την παρουσία πρωτεϊνών γάλακτος.

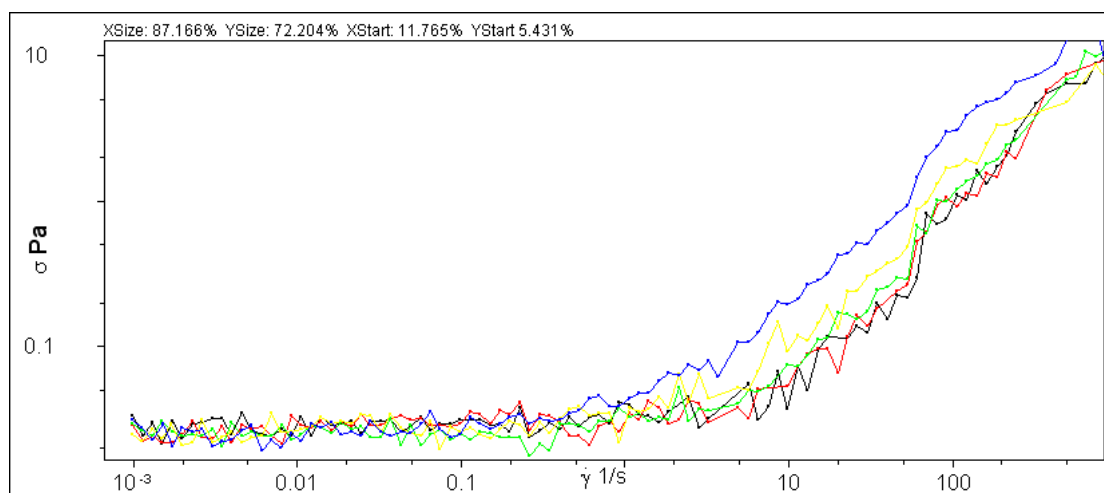
4.3. Μελέτη ρεολογικής συμπεριφοράς του πολυσακχαρίτη κεφιράνης

4.3.1. Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων κεφιράνης

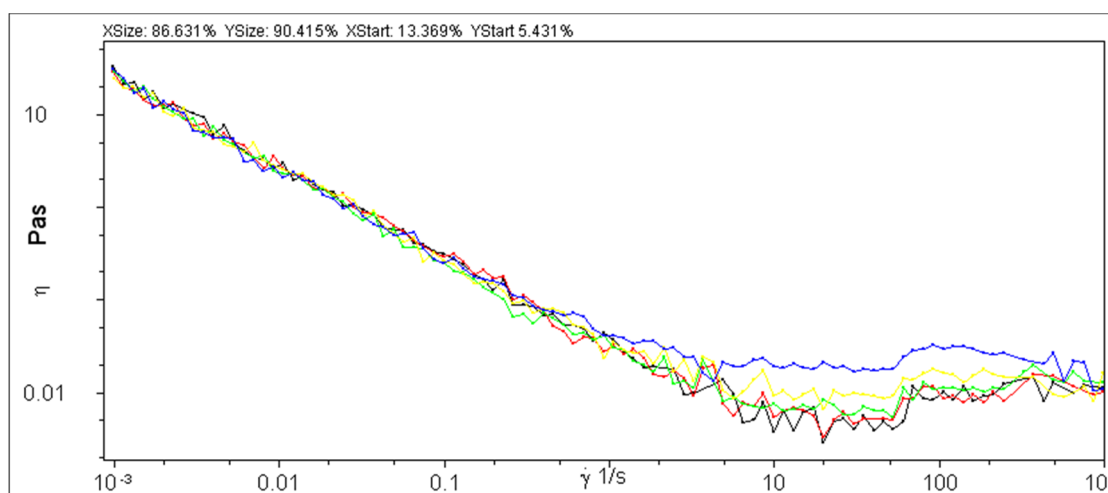
Η ρεολογική συμπεριφορά της κεφιράνης μελετήθηκε με την πραγματοποίηση μετρήσεων του ιξώδους υδατικών διαλυμάτων του πολυσακχαρίτη συγκεντρώσεων 0,25-0,55-1,0-2,0 και 4,0% σε καθεστώς ελεγχόμενου ρυθμού διάτμησης και σε ένα εύρος τιμών ρυθμού διάτμησης από 10^{-3} έως 10^3 s^{-1} . Η επιλογή των συγκεντρώσεων έγινε με το σκεπτικό να μελετηθεί η ρεολογική συμπεριφορά της κεφιράνης σε συγκέντρωση χαμηλότερη αυτής της κρίσιμης συγκέντρωσης (C^*), στην κρίσιμη συγκέντρωση ($\sim 0,55\%$) και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ένα εύρος τιμών ρυθμού διάτμησης έξι τάξεων μεγέθους ώστε να διαπιστωθεί αν μπορούν να ανιχνευθούν διαφορές στα δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις όταν μελετώνται σε συνθήκες όχι μόνο μικροκλίμακας όπως στην περίπτωση των υδροδυναμικών μετρήσεων αλλά και σε συνθήκες μακροκλίμακας (continuum hypothesis) όπως είναι η μέτρηση του ιξώδους σε ρεόμετρο όπου επιπλέον μπορούν να επιτευχθούν συνθήκες μηδενικής διάτμησης (περιοχή πολύ χαμηλών τιμών ρυθμού διάτμησης, 10^{-3} s^{-1}) αλλά και συνθήκες που προσομοιάζουν πρακτικές διαχείρισης και χρήσης των υδροκολλοειδών ουσιών που κυριαρχούν στη βιομηχανία τροφίμων (υψηλές τιμές ρυθμού διάτμησης, 10^3 s^{-1}). Επίσης, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (4, 25 και 40°C) ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο το ιξώδες των διαλυμάτων της κεφιράνης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και ποια είναι η φύση των δεσμών που διέπουν τη διαμόρφωση του μορίου της κεφιράνης στα διαλύματα δηλ. αν είναι ενθαλπικής ή εντροπικής φύσης.

Στο Σχήμα 4.59 παρουσιάζονται οι καμπύλες ροής, διαλυμάτων κεφιράνης πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων στους 4°C , της διατμητικής τάσης ως συνάρτηση του ρυθμού διάτμησης. Παρατηρείται ότι για τιμές ρυθμού διάτμησης έως $0,8-1,0 \text{ s}^{-1}$ δεν υπάρχει καμία διαφοροποίηση μεταξύ των καμπυλών αναφορικά με τις τιμές της διατμητικής τάσης που καταγράφονται, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο ότι στη περιοχή τιμών ρυθμού διάτμησης κάτω από $0,8 \text{ s}^{-1}$ η τάση που καταγράφεται είναι χαμηλότερη από την τιμή της λεγόμενης «τάσης διαρροής» (yield stress). Όπως προαναφέρθηκε, οι μετρήσεις έγιναν σε καθεστώς ελεγχόμενου ρυθμού διάτμησης. Σ' αυτή την περιοχή τα δείγματα παρέμειναν πρακτικά στατικά και όταν η τιμή ρυθμού διάτμησης ξεπέρασε το $1,0 \text{ s}^{-1}$ τότε άρχισαν να καταγράφονται βαθμιαία αυξανόμενες τιμές διατμητικής τάσης σ' όλα τα δείγματα που μετρήθηκαν. Αν οι ίδιες καμπύλες

παρασταθούν ως γραφικές παραστάσεις με συντεταγμένες το διατμητικό ιξώδες (shear viscosity) και το ρυθμό διάτμησης (shear rate) (Σχήμα 4.60) τότε παρατηρείται μια βαθμιαία μείωση του ιξώδους μέχρι της τιμής ρυθμού διάτμησης $\sim 0,8 \text{ s}^{-1}$, κατόπιν η τιμή του ιξώδους παρέμεινε σταθερή σε μια περιοχή μέχρι περίπου τα $50\text{-}60 \text{ s}^{-1}$ και μετά αυξήθηκε αλλά παρέμεινε και πάλι σταθερή στην περιοχή από τα 60 έως 1000 s^{-1} .



Σχήμα 4.59. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίρας συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C .

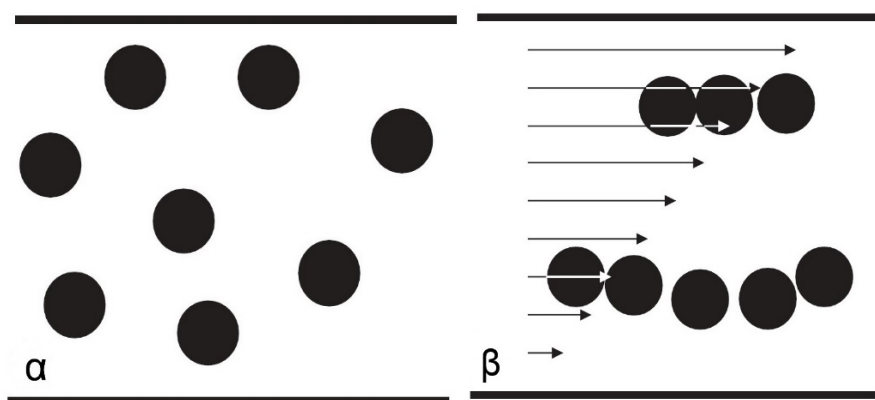


Σχήμα 4.60. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίρας συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C .

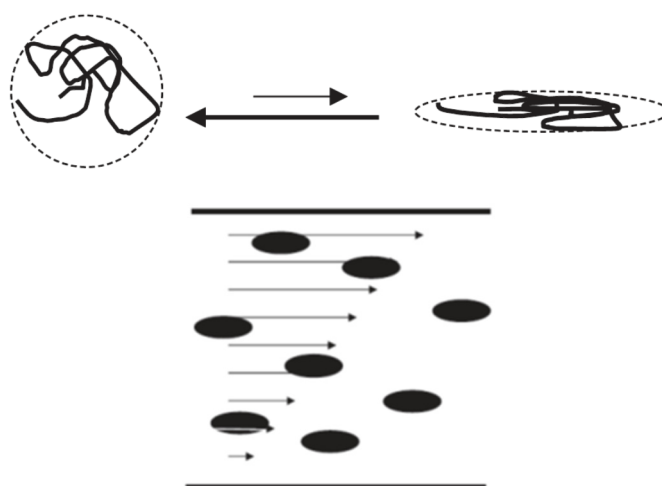
Τα πειραματικά δεδομένα, όπως προαναφέρθηκε, δείχνουν ότι σε πολύ χαμηλές τιμές ρυθμού διάτμησης τα μόρια της κεφिरάνης παραμένουν σχεδόν ακίνητα διατηρώντας τη διαμόρφωση του random coil (Σχήμα 4.61α), ενυδατωμένα με μόρια νερού και λόγω των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ τους μιας και είναι ελαφρώς αρνητικά φορτισμένα εμφανίζουν υψηλό ιξώδες ($\sim 35 \text{ Pa}\cdot\text{s}$). Με τη βαθμιαία αύξηση της ταχύτητας διάτμησης το ιξώδες βαίνει μειούμενο προφανώς λόγω της βαθμιαίας διάταξης των μορίων κεφिरάνης σε ευθύγραμμες τροχιές (Σχήμα 4.61β) οπότε και οι συγκρούσεις μεταξύ τους βαίνουν μειούμενες και έτσι το ιξώδες μειώνεται. Όταν όλα τα μόρια έχουν διευθετηθεί και ο ρυθμός διάτμησης έχει αυξηθεί τότε παρατηρείται η βαθμιαία αύξηση των τιμών της τάσης διάτμησης σε συνάρτηση με την ταχύτητα διάτμησης (Σχ. 4.59). Σ' αυτή την περιοχή τιμών ρυθμού διάτμησης η αύξηση της διατμητικής τάσης προκαλείται από την παραμόρφωση που προκαλείται στα μόρια της κεφिरάνης ώστε αυτά να υιοθετήσουν πιθανόν σχήμα ωοειδές (Σχήμα 4.62), με αποτέλεσμα το ιξώδες να μειώνεται μέχρι μιας ορισμένης τιμής και να παραμένει σταθερό (1^ο πλατό). Οι τιμές που καταγράφονται δείχνουν ότι ο υδροδυναμικός όγκος των μορίων έχει κατά πολύ μειωθεί πιθανώς και λόγω απομάκρυνσης μορίων νερού ενυδάτωσης από το περιβάλλον του. Η δεύτερη περιοχή σταθερού ιξώδους (2^ο πλατό) που έχει αυξημένη τιμή σε σχέση με την πρώτη πιθανώς να οφείλεται στην μηχανική αλληλεπίδραση των παραμορφωμένων μορίων μεταξύ τους λόγω των υψηλών ταχυτήτων διάτμησης. Η μηχανική αλληλεπίδραση μπορεί να έγκειται στο ότι τα μόρια πλησιάζουν πολύ μεταξύ τους με αποτέλεσμα να επιχειρούν να παρεισφρήσουν το ένα στο χώρο (domain) που καταλαμβάνει το άλλο (Σχήμα 4.63) με αποτέλεσμα να απωθούν το ένα το άλλο και έτσι το ιξώδες να αυξάνεται μεν αλλά να παραμένει σταθερό.

Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι οι τιμές του ιξώδους στα δείγματα, στους χαμηλούς ρυθμούς διάτμησης είναι πρακτικά ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση της κεφिरάνης στο διάλυμα, ενώ στις περιοχές ρυθμού διάτμησης των δύο πλατό διαφοροποιούνται με αυξημένο αρκετά το ιξώδες τουλάχιστο στις συγκεντρώσεις των 2 και 4%.

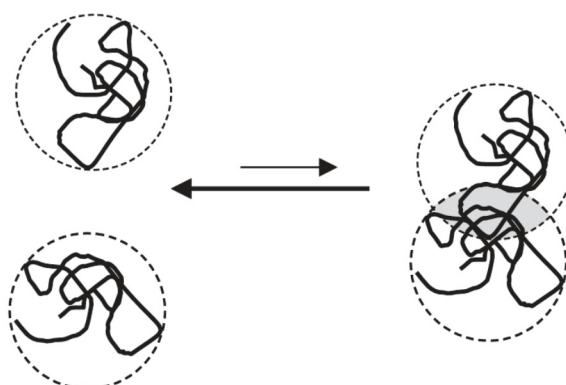
Αυτό γίνεται πιο εμφανές στα Σχήματα 4.64 και 4.65 όπου παρουσιάζονται οι καμπύλες ροής τόσο για την τάση διάτμησης όσο και για το διατμητικό ιξώδες στις περιοχές ρυθμού διάτμησης πάνω από 2 s^{-1} . Η ίδια συμπεριφορά επιδεικνύεται και στις θερμοκρασίες 25 και 40°C (Σχήματα 4.66, 4.67, 4.68, 4.69, 4.70, 4.71, 4.72 και 4.73).



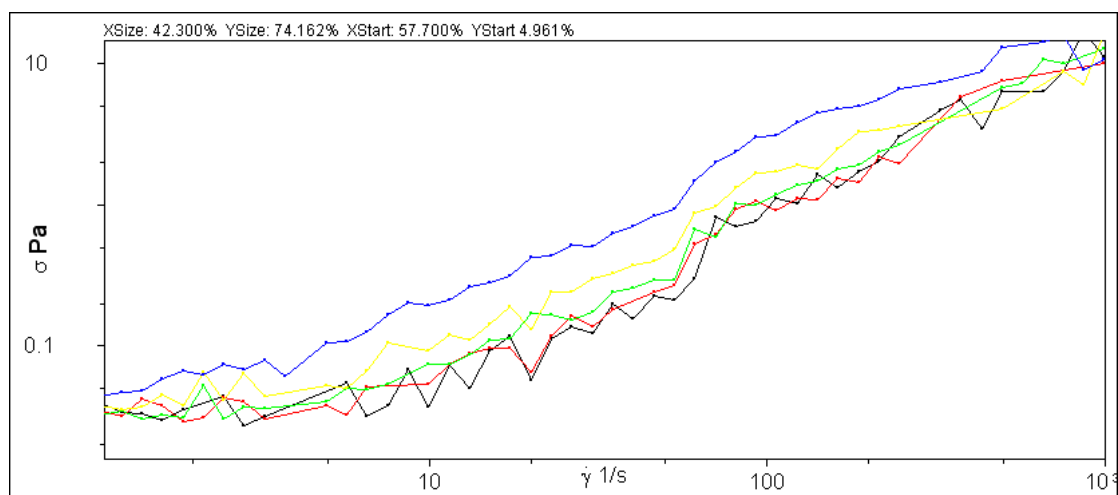
Σχήμα 4.61. Ακίνητα μόρια κεφिरάνης σε πολύ χαμηλές τιμές ρυθμού διάτμησης (α). Μόρια κεφिरάνης που προσανατολίζονται σε ευθύγραμμες τροχιές με την αύξηση της ταχύτητας διάτμησης (β).



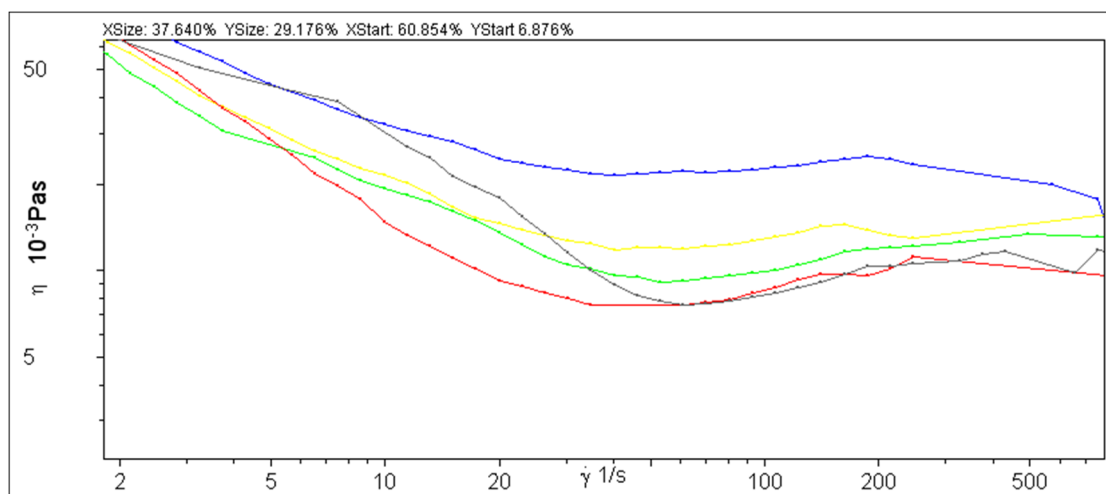
Σχήμα 4.62. Παραμόρφωση των μορίων της κεφिरάνης σε ωοειδές σχήμα σε υψηλές τιμές της ταχύτητας διάτμησης.



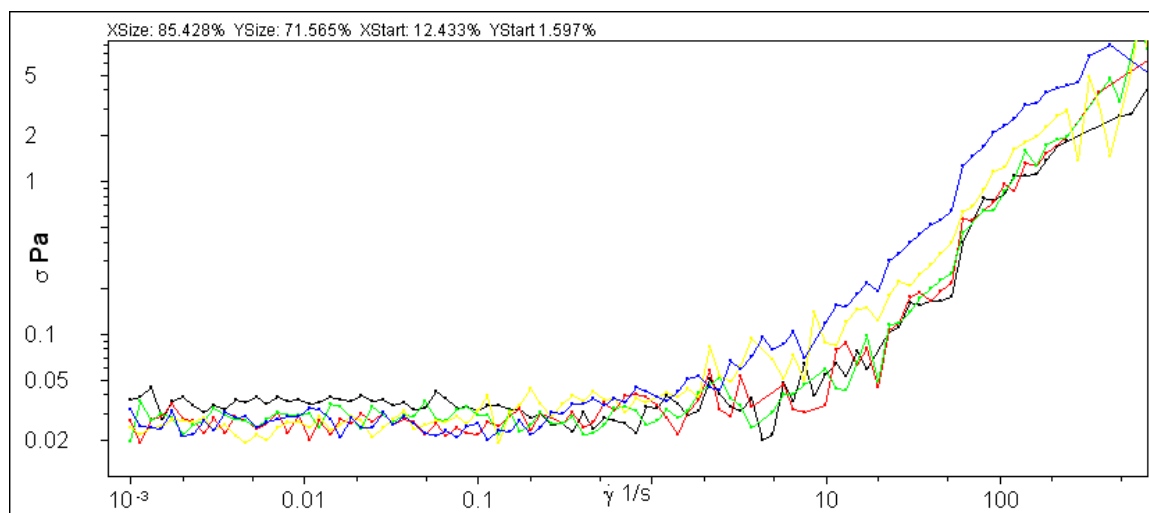
Σχήμα 4.63. Μηχανική αλληλεπίδραση των μορίων κεφिरάνης, τα οποία επιχειρούν να παρεισφρήσουν το ένα στο χώρο που καταλαμβάνει το άλλο σε πολύ υψηλές τιμές της ταχύτητας διάτμησης.



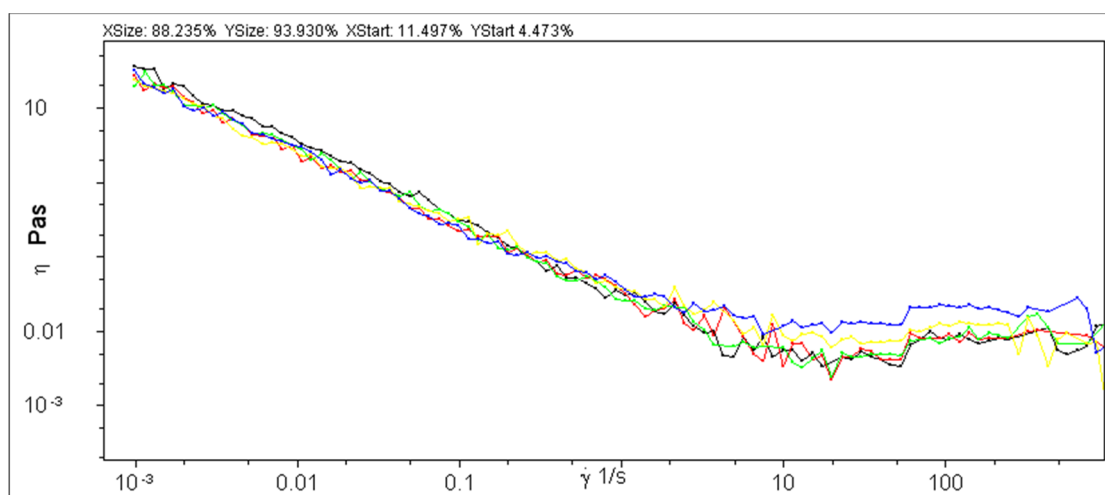
Σχήμα 4.64. Διατμητική τάση ως συνάρτηση του ρυθμού διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C.



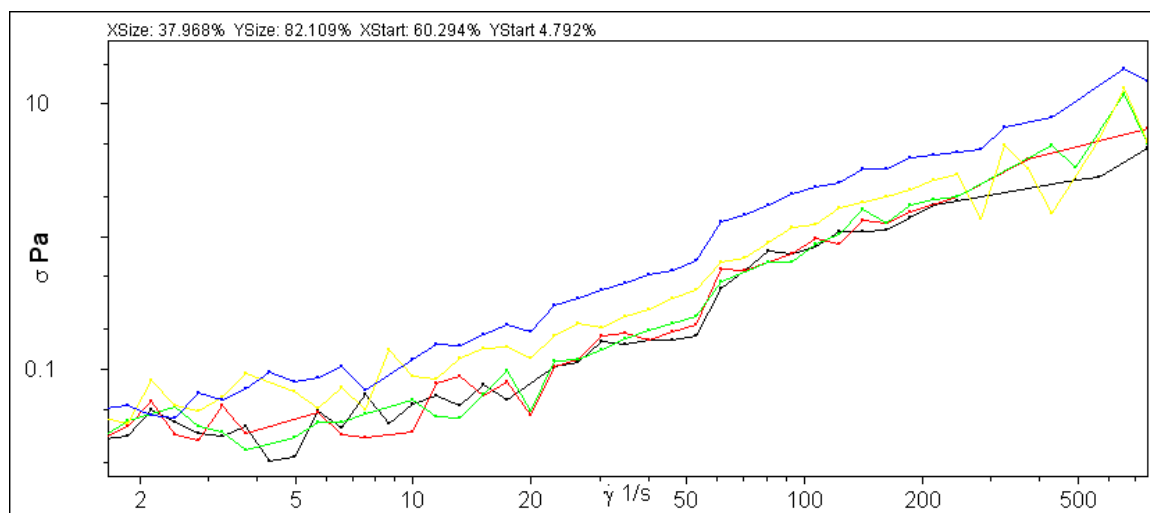
Σχήμα 4.65. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 4°C.



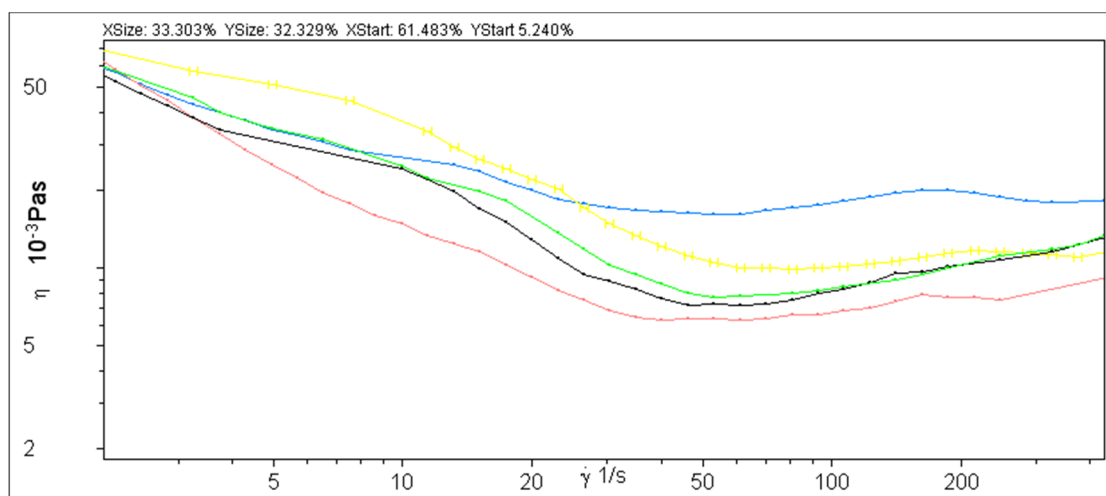
Σχήμα 4.66. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.



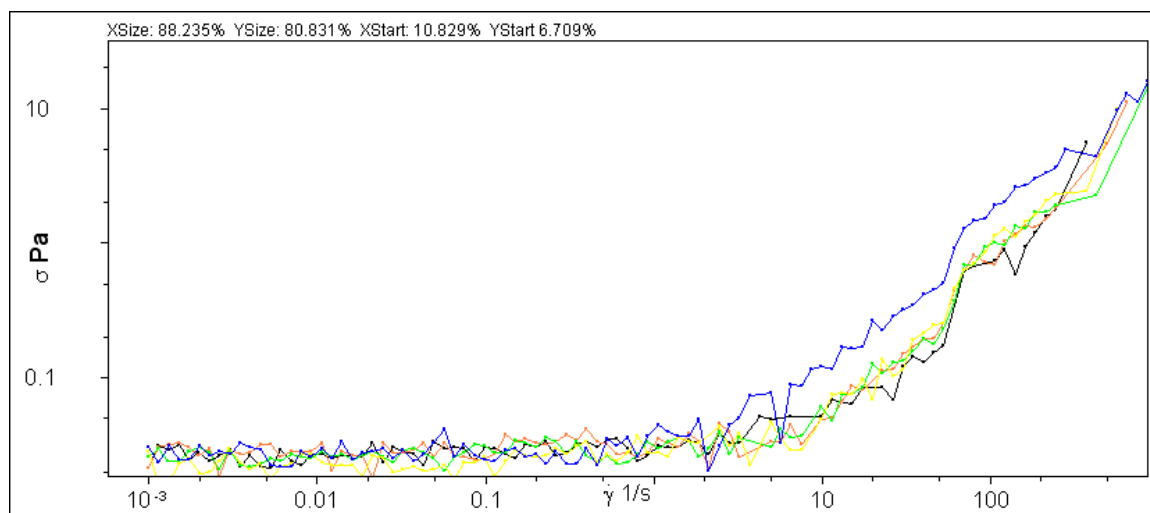
Σχήμα 4.67. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.



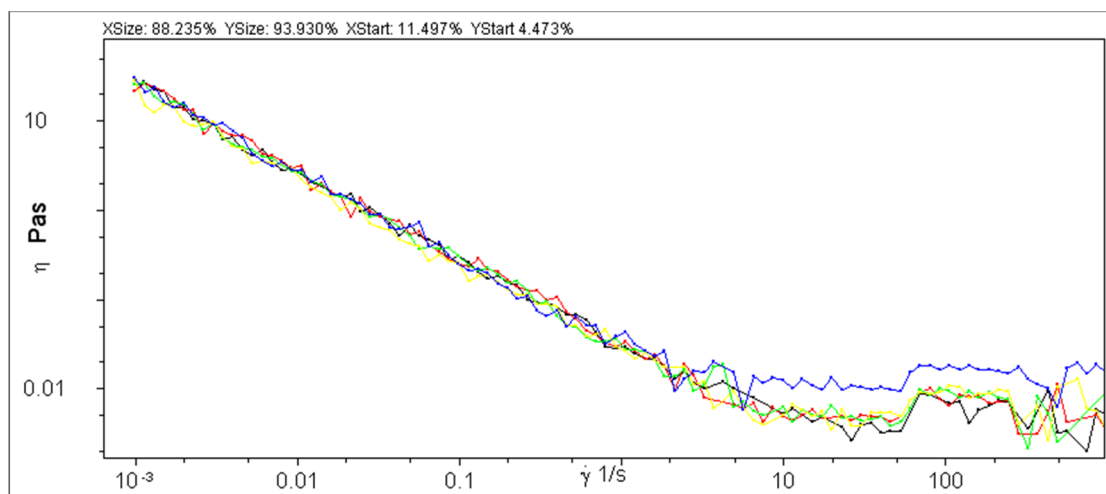
Σχήμα 4.68. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.



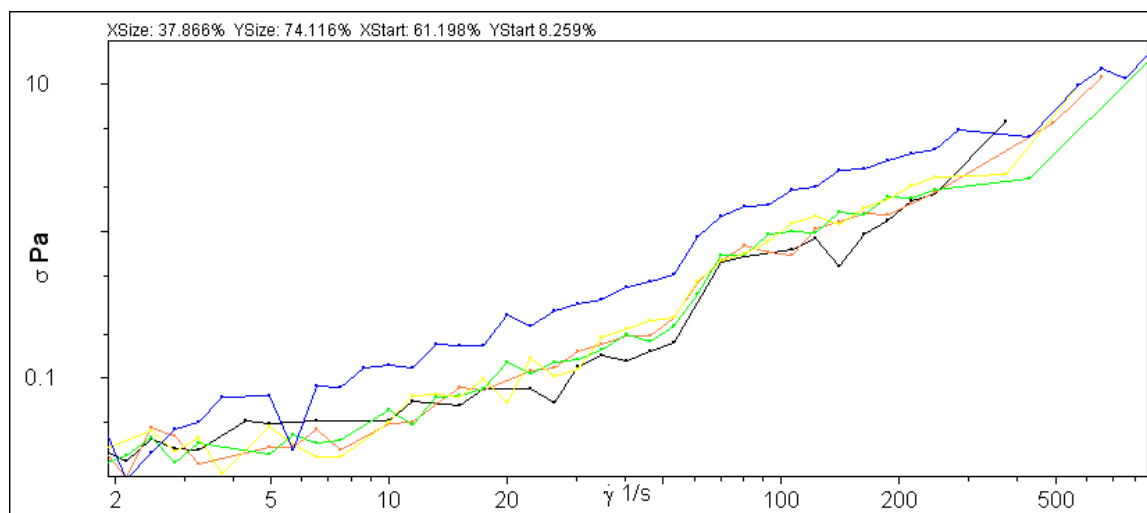
Σχήμα 4.69. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 25°C.



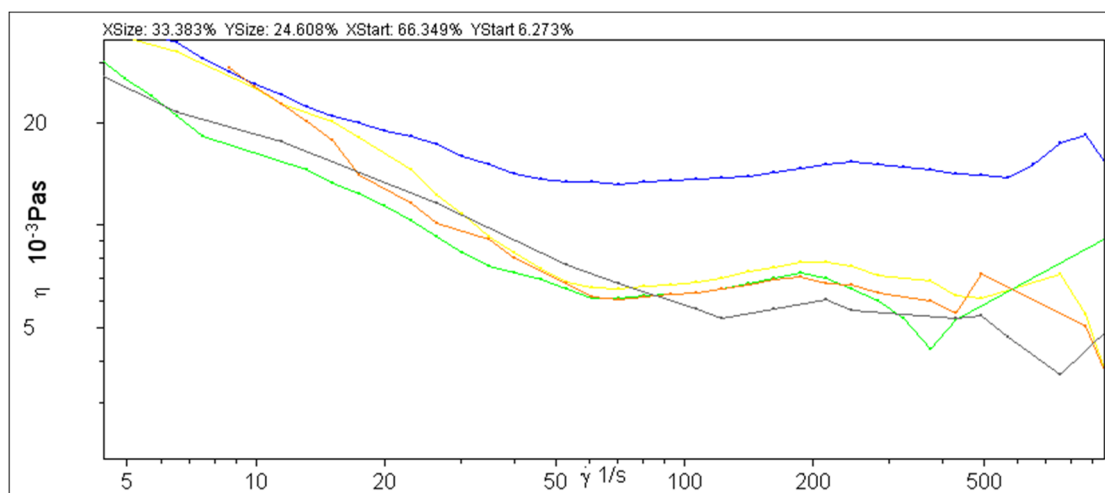
Σχήμα 4.70. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.



Σχήμα 4.71. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.



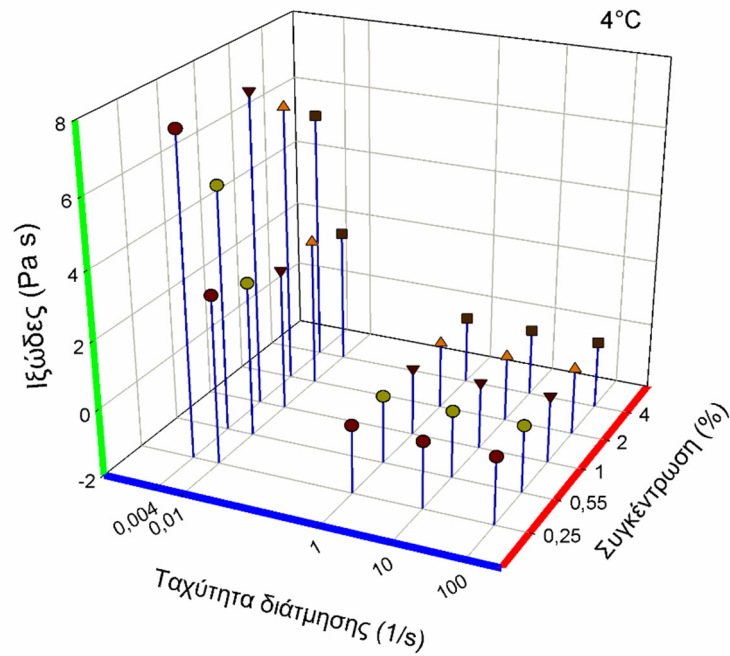
Σχήμα 4.72. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.



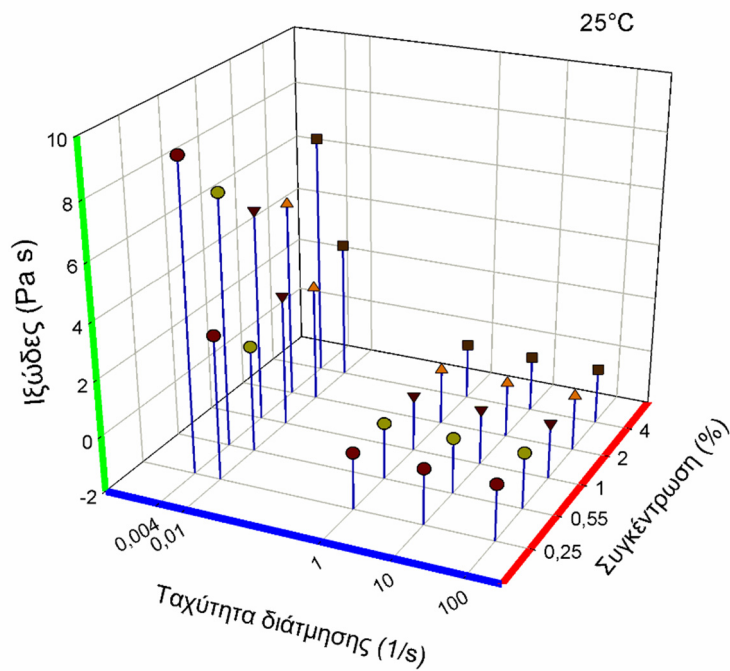
Σχήμα 4.73. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης συγκεντρώσεων: 0,25%, μαύρη καμπύλη, 0,55%, κόκκινη καμπύλη, 1,0%, πράσινη καμπύλη, 2,0%, κίτρινη καμπύλη, 4,0%, κυανή καμπύλη, στους 40°C.

Όπως φαίνεται από τα Σχήματα των καμπυλών ροής η θερμοκρασία επηρεάζει ελάχιστα το ιξώδες όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν και υποδεικνύει ότι οι δεσμοί που κυριαρχούν στα συστήματα των υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης είναι κατά κύριο λόγο οι ηλεκτροστατικές απώσεις και λιγότερο οι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι προφανώς μειώνονται στις υψηλότερες θερμοκρασίες αλλά όχι τόσο ώστε να γίνεται αντιληπτή η διαφορά στο ιξώδες από θερμοκρασία σε θερμοκρασία. Αυτό

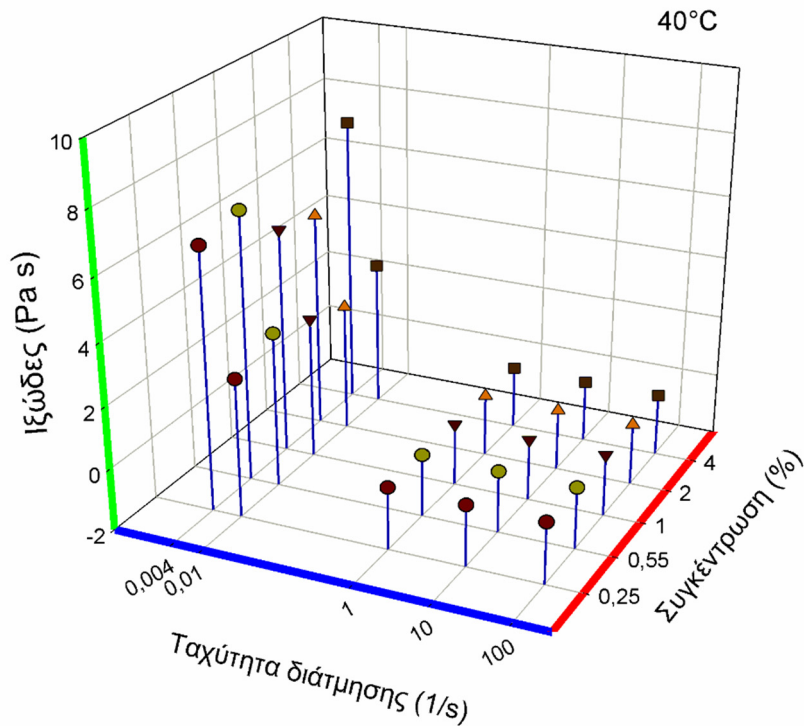
γίνεται ακόμη πιο εμφανές αν συγκριθούν δειγματοληπτικά τιμές ιξώδους σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της κεφिरάνης και τη θερμοκρασία (Σχήματα. 4.74, 4.75, 4.76).



Σχήμα 4.74. Διατμητικό ιξώδες υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας διάτμησης στους 4°C.



Σχήμα 4.75. Διατμητικό ιξώδες υδατικών διαλυμάτων κεφिरάνης σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας διάτμησης στους 25°C.



Σχήμα 4.76. Διατμητικό ιξώδες υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας διάτμησης στους 40°C.

Αν γίνει ανάλυση της ρεολογικής φύσης των διαλυμάτων με τη χρήση της εξίσωσης του εκθετικού νόμου (power law equation) (παράγραφος 1.3.2.2.):

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n \quad 4.3$$

όπου: σ , διατμητική τάση, (Pa)

K , συντελεστής συνεκτικότητας (consistency coefficient)

$\dot{\gamma}$, ρυθμός διάτμησης (s^{-1})

n , δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς (flow behavior index)

για το τμήμα της καμπύλης ροής όπου συμβαίνει βαθμιαία αύξηση της διατμητικής τάσης τότε παρατηρείται (Πίνακας 4.6) ότι ο δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς για όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία μέτρησης τους, έχει τιμή πολύ χαμηλότερη από 1,0, γεγονός που υποδεικνύει ότι σ' αυτή τη περιοχή των καμπυλών ροής η ρεολογική συμπεριφορά των συστημάτων κεφιράνης είναι αυτή του ψευδοπλαστικού ρευστού.

Πίνακας 4.6. Τιμές του δείκτη ρεολογικής συμπεριφοράς (n) υδατικών διαλυμάτων κεφιράνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες μέτρησης.

Συγκέντρωση κεφιράνης (%)	Θερμοκρασία μέτρησης (°C)	n
0,25	4	0,3366
0,55		0,3404
1		0,3895
2		0,4058
4		0,4748
0,25	25	0,3117
0,55		0,3629
1		0,3448
2		0,3804
4		0,4432
0,25	40	0,2705
0,55		0,3034
1		0,3298
2		0,3415
4		0,4167

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της θερμοκρασίας στις ρεολογικές ιδιότητες των συστημάτων κεφιράνης, υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης E_a της ροής με τη χρήση της ακόλουθης εξίσωσης (Steffe, 1996):

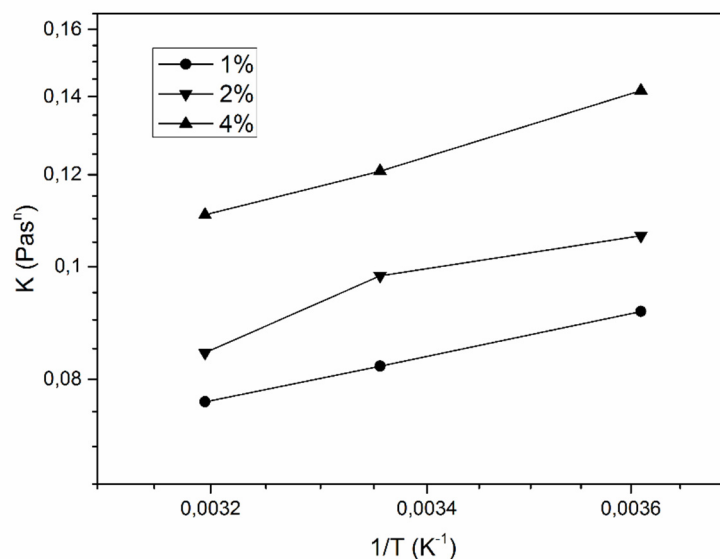
$$K = K_o \exp \left(\frac{E_a}{RT} \right) \quad 4.4$$

Όπου, K , συντελεστής συνεκτικότητας

R , η παγκόσμια σταθερά των αερίων, 1,987 cal/mole

T , η απόλυτη θερμοκρασία

Το Σχήμα 4.77 δείχνει τις διακυμάνσεις της τιμής του συντελεστή συνεκτικότητας για υδατικά διαλύματα κεφιράνης με συγκέντρωση 1, 2 και 4% σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία [4°C (277 K), 25°C (298 K) και 40°C (313 K)] στην οποία έγιναν οι μετρήσεις του ιξώδους.



Σχήμα 4.77. Διακυμάνσεις του συντελεστή συνεκτικότητας, υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων 1, 2 και 4% ως συνάρτηση της θερμοκρασίας.

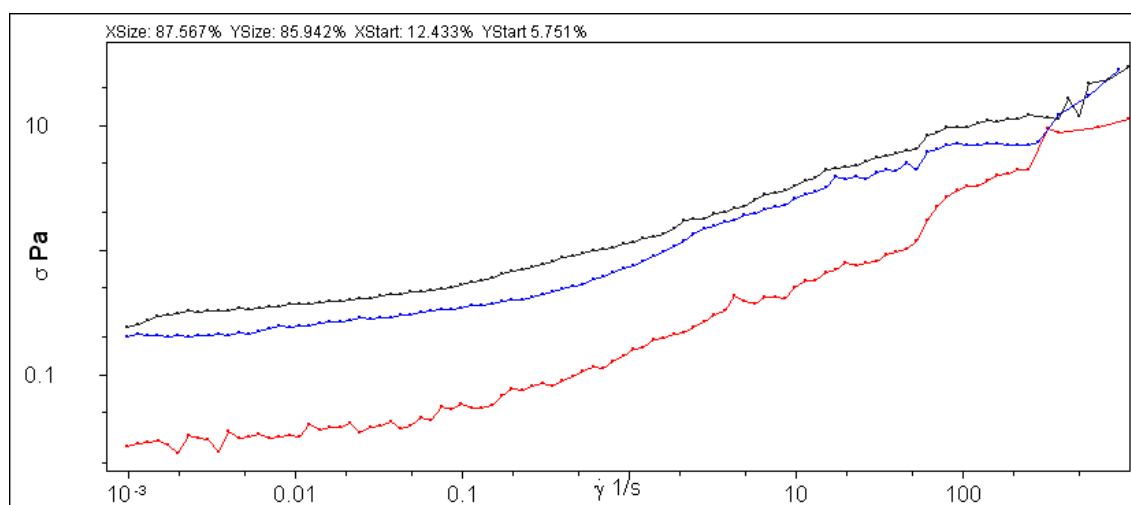
Οι τιμές ενέργειας ενεργοποίησης που προκύπτουν από τις καμπύλες του Σχήματος 4.77 είναι οι ακόλουθες:

Συγκέντρωση κεφίράνης (%)	K_o (Pa·s ⁿ)	E_a (cal/mole)
1	0.019321	856.15
2	0.015560	1066.48
4	0.016458	1187.70

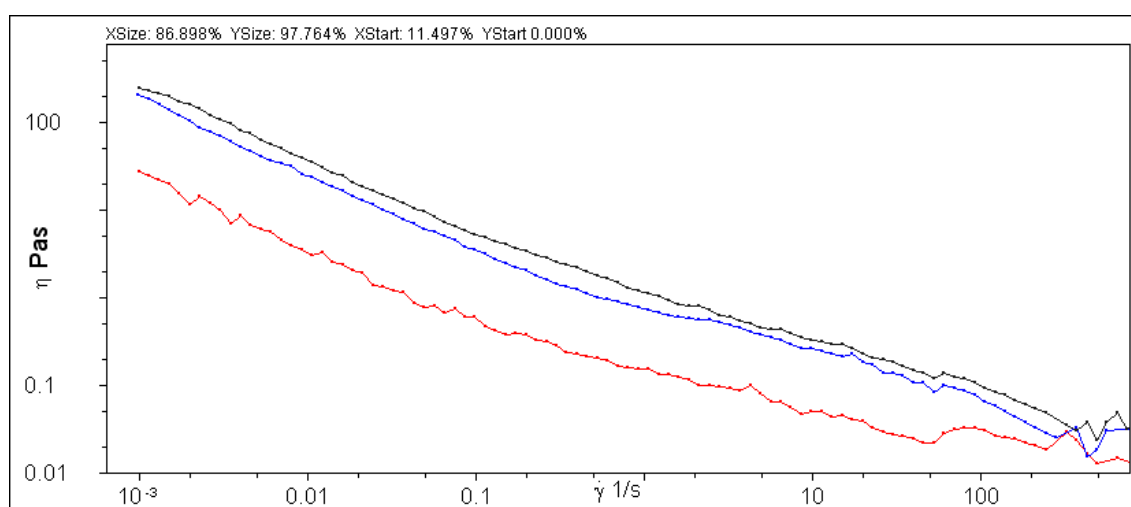
Είναι προφανές από το Σχήμα 4.77 ότι η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης της ροής διαλυμάτων κεφίράνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της κεφίράνης.

4.3.2. Ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων κεφίράνης που υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης – απόψυξης

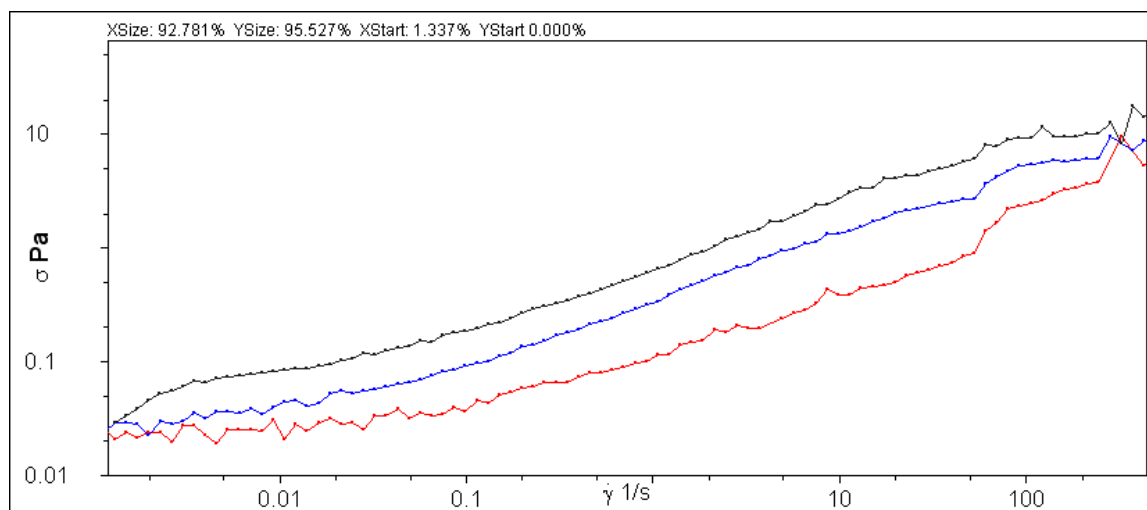
Για να διαπιστωθεί αν η ρεολογική συμπεριφορά διαλυμάτων κεφίράνης που έχουν υποστεί τη διεργασία της κατάψυξης–απόψυξης διαφοροποιείται από διαλύματα που δεν την υπέστησαν, διαλύματα κεφίράνης με συγκεντρώσεις 1, 2 και 4% καταψύχθηκαν στους -18°C για 24 h και κατόπιν αποψύχθηκαν για 24 h στους 4°C προτού να μετρηθούν. Τα Σχήματα 4.78, 4.79, 4.80, 4.81, 4.82 και 4.83, παρουσιάζουν τις καμπύλες ροής των δειγμάτων που μετρήθηκαν στους 4, 25 και 40°C αντίστοιχα.



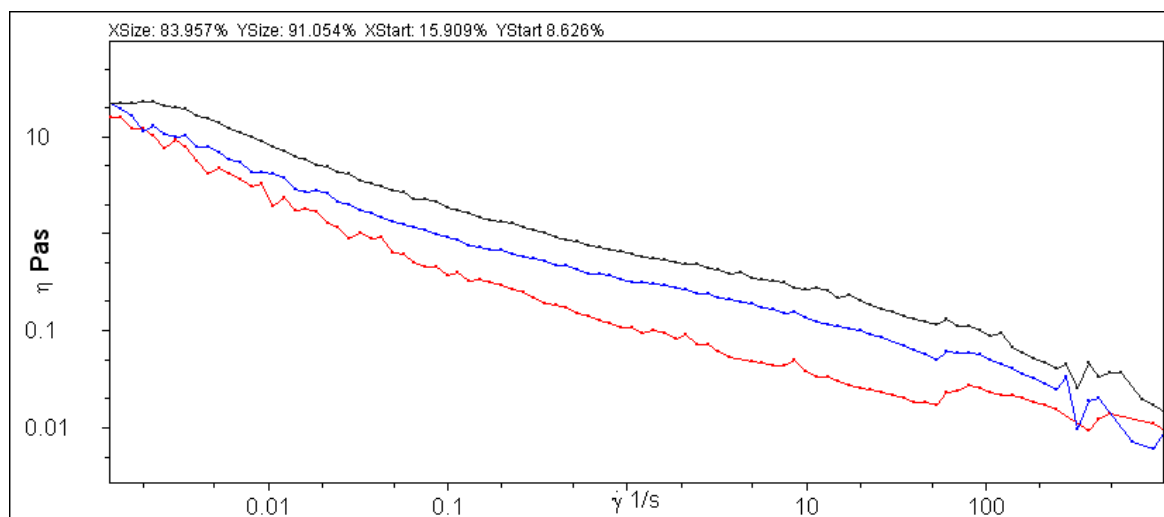
Σχήμα 4.78. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 4°C .



Σχήμα 4.79. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 4°C .



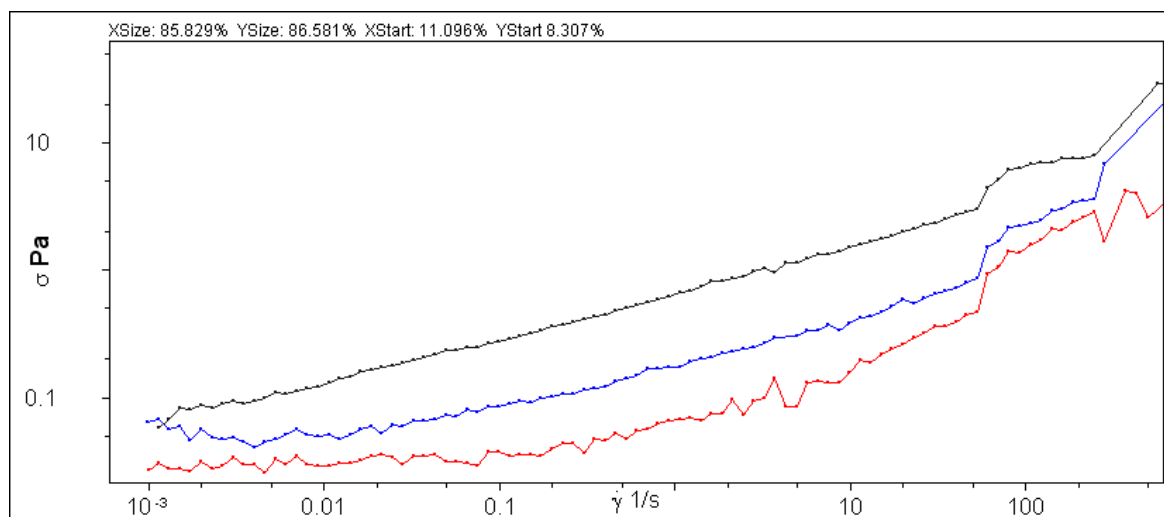
Σχήμα 4.80. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 25°C .



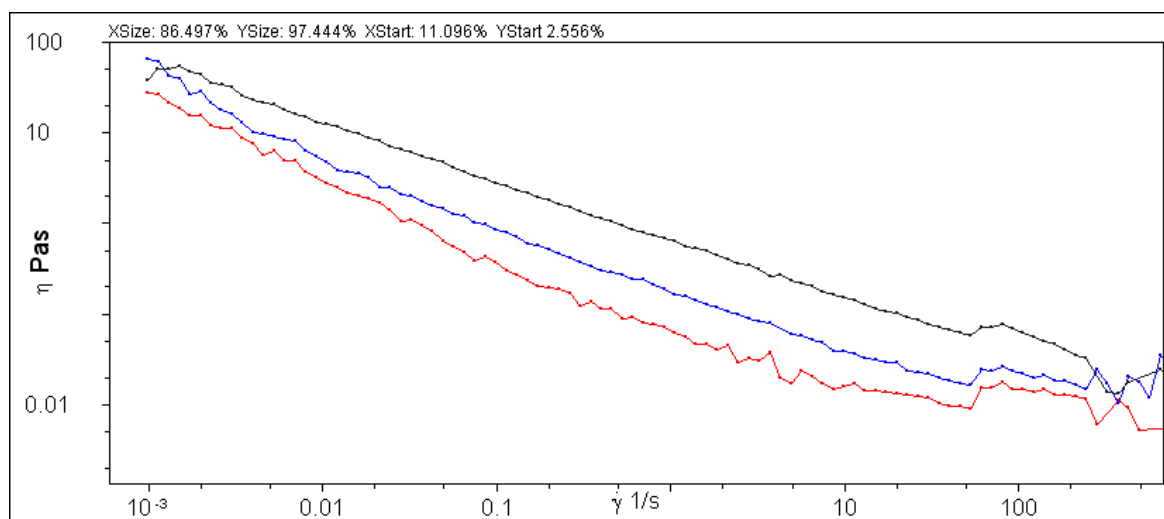
Σχήμα 4.81. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 25°C .

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διατήρηση των δειγμάτων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους στις χαμηλές τιμές του ρυθμού διάτμησης σε όλα τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 4°C σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που δεν καταψύχθηκαν. Ιδιαίτερα η αύξηση του ιξώδους στα

δείγματα με συγκεντρώσεις 2 και 4% ήταν κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με το ιξώδες που εμφάνισαν τα δείγματα χωρίς κατάψυξη. Επίσης, παρατηρείται ότι οι τιμές ιξώδους που εμφανίζουν τα δείγματα είναι ανάλογες των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων δηλ. όσο αυξάνεται η συγκέντρωση τόσο αυξάνεται και το ιξώδες κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση των δειγμάτων που δεν καταψύχθηκαν και



Σχήμα 4.82. Μεταβολή της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 40°C .



Σχήμα 4.83. Καμπύλες ροής υδατικών διαλυμάτων κεφίρανης που καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , συγκεντρώσεων: 1,0%, κόκκινη καμπύλη, 2,0%, κυανή καμπύλη, 4% μαύρη καμπύλη, και μετρήθηκαν στους 40°C .

αποψύχθηκαν σε μια μεγάλη περιοχή χαμηλών τιμών ρυθμού διάτμησης. Επιπλέον, παρατηρείται ότι στις καμπύλες της διατμητικής τάσης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης απουσιάζει το αρχικό πλατό της σταθερής τιμής διάτμησης για μια σχετικά μεγάλη περιοχή τιμών ρυθμού διάτμησης και αυτό δείχνει ότι ακόμη και σε πολύ χαμηλούς ρυθμούς διάτμησης η κίνηση των μορίων δυσχεραίνεται και απαιτείται μεγαλύτερη διατμητική τάση για μπορέσουν να κινηθούν. Τέλος, παρατηρείται ότι οι τιμές ιξώδους που εμφανίζουν τα δείγματα εξαρτώνται από τη θερμοκρασία μέτρησης κάτι που επίσης δεν συμβαίνει στην περίπτωση των δειγμάτων που δεν υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνει η θερμοκρασία μέτρησης των δειγμάτων τόσο μειώνεται το ιξώδες που εμφανίζουν.

Τα δεδομένα συνηγορούν στην υπόθεση ότι η διαφοροποίηση στη ρεολογική συμπεριφορά των διαλυμάτων κεφιράνης όταν αυτά καταψυχθούν και αποψυχθούν οφείλεται στη δημιουργία επιπλέον διαμοριακών δεσμών υδρογόνου το πιθανότερο μεταξύ γειτονικών μορίων κεφιράνης δημιουργώντας υπερδομές (superstructures) και λιγότερο πιθανόν με επιπλέον μόρια νερού, οπότε σε χαμηλούς ρυθμούς διάτμησης τα διαλύματα να εμφανίζουν αυξημένες τιμές ιξώδους ενώ όσο αυξάνεται ο ρυθμός διάτμησης και επομένως η διατμητική τάση, το ιξώδες μειώνεται δραματικά λόγω της καταστροφής των επιπλέον δεσμών υδρογόνου ώστε στις πολύ υψηλές τιμές ρυθμού διάτμησης η τιμή του ιξώδους να είναι παρόμοια με εκείνη των δειγμάτων που δεν υπέστησαν κατάψυξη και απόψυξη. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τις τιμές του δείκτη ρεολογικής συμπεριφοράς (Πίνακας 4.7) που είναι για όλα τα δείγματα μικρότερες της μονάδας και υποδηλώνει ότι τα δείγματα εμφανίζουν ψευδοπλαστική συμπεριφορά. Η ψευδοπλαστικότητα των δειγμάτων αποτελεί σαφή ένδειξη ότι η διαμόρφωση των μορίων της κεφιράνης μεταβάλλεται δραστικά κατά την επιτάχυνση της ροής τους λόγω μείωσης του υδροδυναμικού τους όγκου.

Πίνακας 4.7. Τιμές του δείκτη ρεολογικής συμπεριφοράς (n) καταψυγμένων/ αποψυγμένων διαλυμάτων κεφίρανης σε διαφορετικές θερμοκρασίες μέτρησης.

Δείγμα	Θερμοκρασία μέτρησης (°C)	n
Cryo 1	4	0,597
Cryo 2		0,458
Cryo 4		0,438
Cryo 1	25	0,604
Cryo 2		0,545
Cryo 4		0,548
Cryo 1	40	0,686
Cryo 2		0,505
Cryo 4		0,388

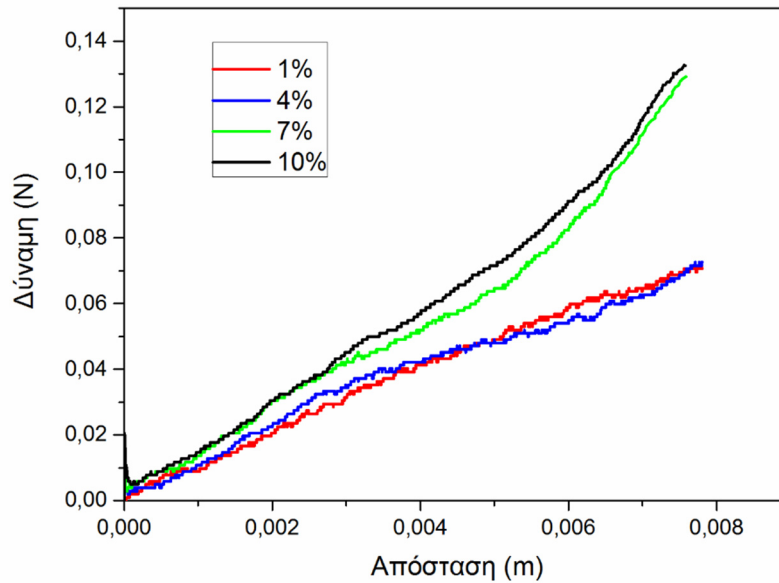
4.3.3. Λιπαινόμενη συμπιεστή ροή

Η τεχνική της λιπαινόμενης συμπιεστή ροής χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του εκτατού ιξώδους (elongational viscosity) που αποτελεί παράμετρο διεργασίας (process parameter) σε αντίθεση με το διατμητικό ιξώδες (shear viscosity) που αποτελεί παράμετρο της δομής ενός υλικού (material function). Η χρησιμότητα του είναι δεδομένη γιατί αποτελεί παράμετρο σχεδιασμού μηχανημάτων επεξεργασίας όπως γεμιστικών περιεκτών με παχύρευστα υγρά π.χ. αναδευμένη γιαούρτη, μαγιονέζα, μουστάρδα και άλλα.

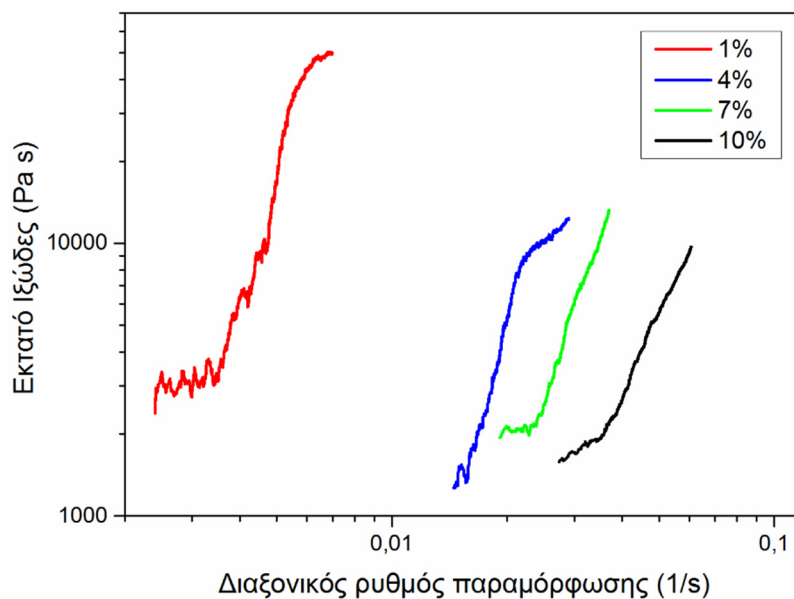
Το Σχήμα 4.84 παρουσιάζει καμπύλες δύναμης μοναξονικής συμπίεσης προς την απόσταση συμπίεσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Το Σχήμα 4.85 παρουσιάζει τις καμπύλες εκτατού ιξώδους σε διαφορετικούς ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4%.

Το Σχήμα 4.86 παρουσιάζει καμπύλες δύναμης μοναξονικής συμπίεσης προς την απόσταση συμπίεσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 7% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ το Σχήμα 4.87 παρουσιάζει τις καμπύλες εκτατού ιξώδους σε διαφορετικούς ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 7%.



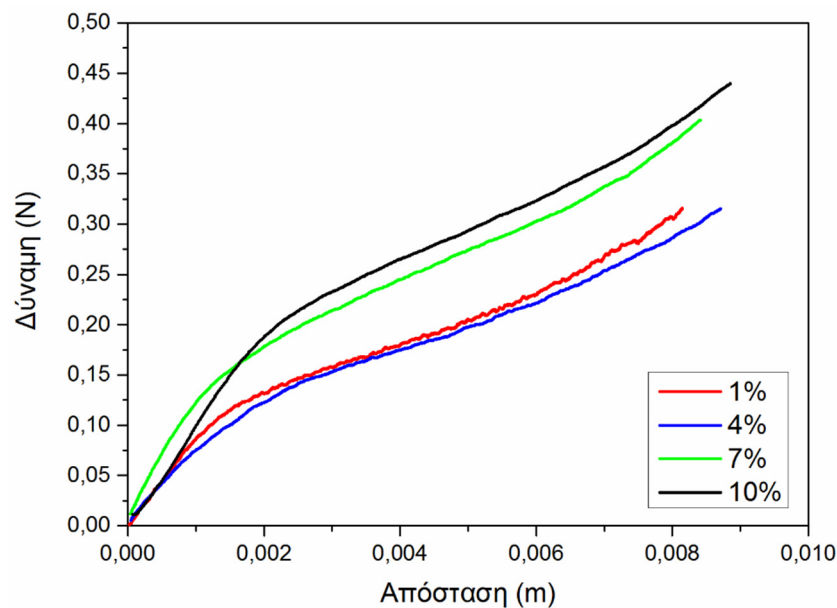
Σχήμα 4.84. Καμπύλες δύναμης μονοαξονικής συμπίεσης – απόστασης δειγμάτων κεφिरάνης συγκέντρωσης 4% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).



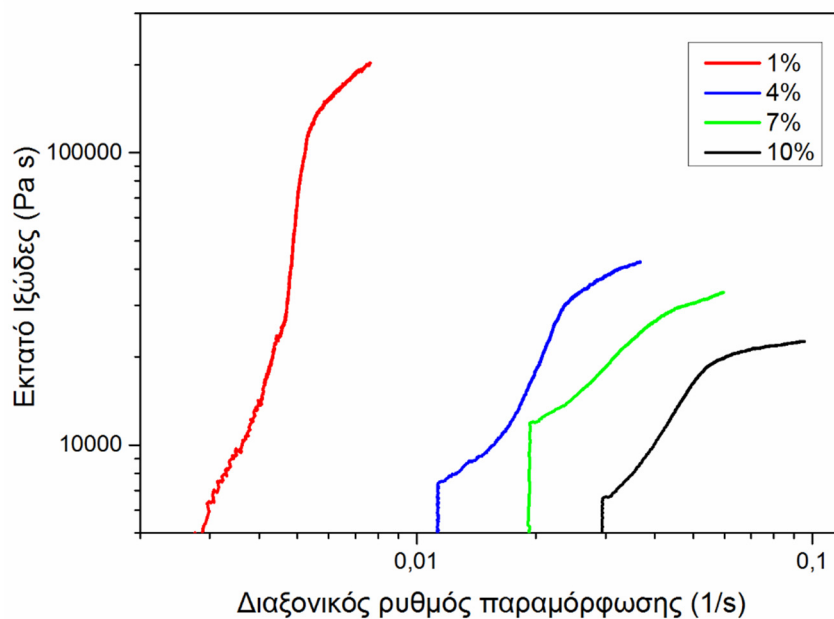
Σχήμα 4.85. Καμπύλες ροής εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφिरάνης (4%) μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση διαφορετικών ρυθμών διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).

Το Σχήμα 4.88 παρουσιάζει καμπύλες δύναμης μονοαξονικής συμπίεσης προς την απόσταση συμπίεσης δειγμάτων κεφिरάνης συγκέντρωσης 10% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ το Σχήμα

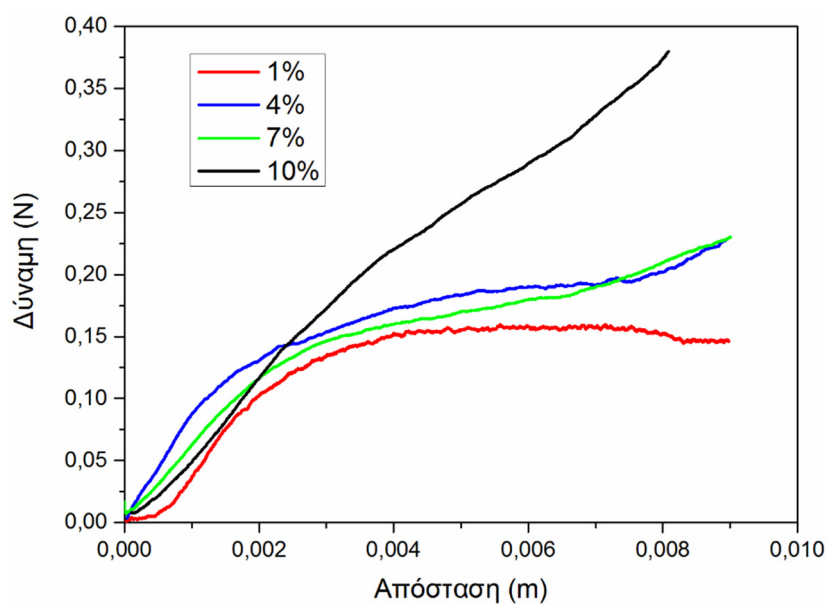
4.89 παρουσιάζει τις καμπύλες εκτατού ιξώδους σε διαφορετικούς ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης δειγμάτων κεφιράνης συγκέντρωσης 10%.



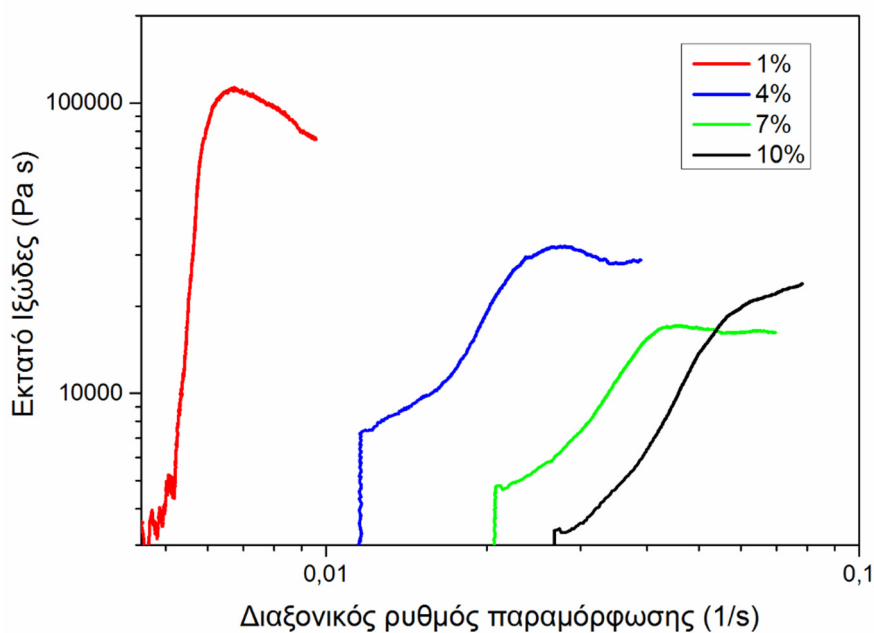
Σχήμα 4.86. Καμπύλες δύναμης μονοαξονικής συμπίεσης – απόστασης δειγμάτων κεφιράνης συγκέντρωσης 7% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).



Σχήμα 4.87. Καμπύλες ροής εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφιράνης (7%) μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση διαφορετικών ρυθμών διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).



Σχήμα 4.88. Καμπύλες δύναμης μονοαξονικής συμπίεσης – απόστασης δειγμάτων κεφιράνης συγκέντρωσης 10% σε ελεγχόμενους ρυθμούς διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).



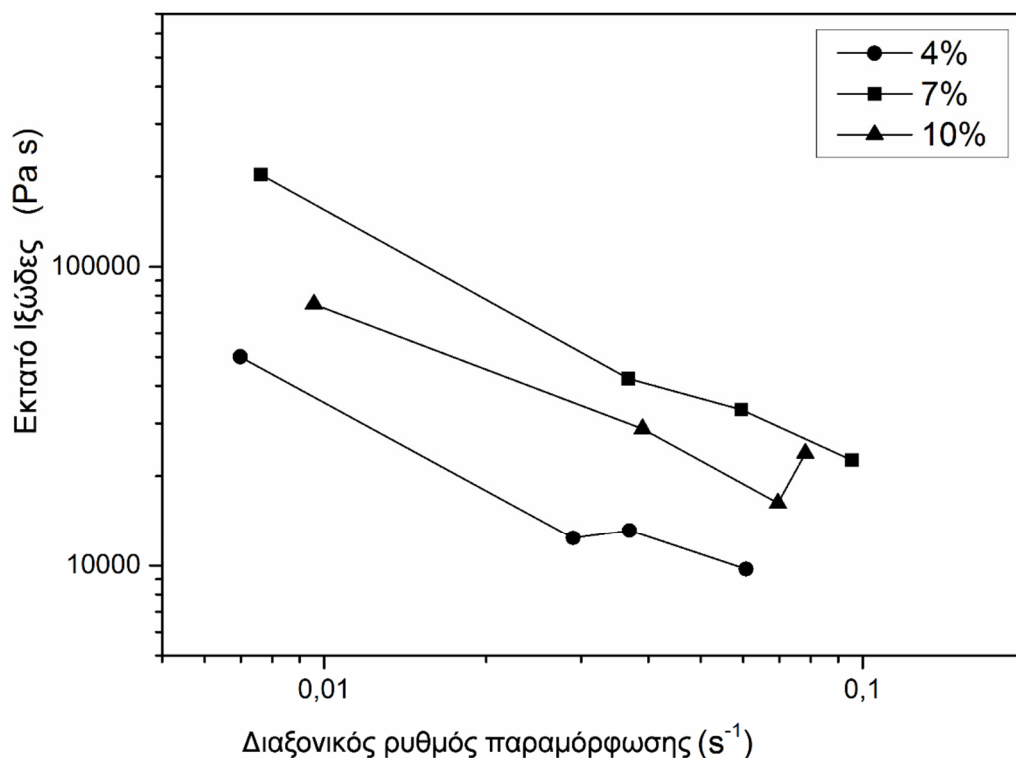
Σχήμα 4.89. Καμπύλες ροής εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφιράνης (10%) μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση διαφορετικών ρυθμών διαξονικής παραμόρφωσης (1,4,7,10%).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ενώ στις περιπτώσεις των δειγμάτων με συγκέντρωση κεφιράνης 4 και 7% η ρεολογική συμπεριφορά τους είναι αυτή ενός

πλαστικού υλικού δηλ. ενός υλικού που όσο αυξάνει η παραμόρφωση του δείγματος τόσο αυξάνει και η δύναμη συμπίεσης, στην περίπτωση των δειγμάτων με συγκέντρωση κεφιράνης 10% η συμπεριφορά τουλάχιστο στις καμπύλες με ρυθμούς παραμόρφωσης 1,4 και 7% (Σχήμα 4.88) δείχνει ότι το υλικό διαθέτει σε κάποιο βαθμό οργανωμένη δομή δηλ. είναι πηκτική και μόλις φθάσει η δύναμη συμπίεσης σε μια μέγιστη τιμή αυτή παραμένει σταθερή και δεν αυξάνει με την αύξηση της παραμόρφωσης όπως στις περιπτώσεις των δειγμάτων με 4 και 7% κεφιράνη. Η συμπεριφορά αυτή γίνεται εμφανέστερη στο Σχήμα 4.89 όπου οι καμπύλες του εκτατού ιξώδους στις περιπτώσεις ρυθμών παραμόρφωσης 1,4 και 7% εμφανίζουν μια μέγιστη τιμή (stress overshoot) και μετά οι τιμές μειώνονται μέχρι σταθεροποίησης (εμφάνιση πλατό). Τα σχήματα των καμπυλών δείχνουν ότι η δομή των δειγμάτων αντιστέκεται μέχρι κάποιας τιμής δύναμης συμπίεσης και μετά καταρρέει, εμφανίζοντας μετά την κατάρρευση της δομής συμπεριφορά ρευστού με μείωση του ιξώδους. Αυτή τη συμπεριφορά δεν την εμφανίζει το δείγμα με το μεγαλύτερο ρυθμό παραμόρφωσης 10% όπου η δύναμη συμπίεσης αυξάνει με την αύξηση της παραμόρφωσης (Σχήμα 4.88) και όπου το εκτατό ιξώδες επίσης αυξάνεται αναλογικά πολύ περισσότερο από ότι στους άλλους ρυθμούς παραμόρφωσης (Σχήμα 4.89). Αυτό πιθανώς να οφείλεται όπως και στην περίπτωση του διατμητικού ιξώδους των δειγμάτων με 2 και 4% κεφιράνη (παράγραφος 4.3.1) στην απώθηση των μορίων κεφιράνης μεταξύ τους που συμβαίνει στις υψηλές ταχύτητες ροής όταν έρχονται σε επαφή και προσπαθεί να υπεισέλθει το ένα στο χώρο του άλλου, οπότε λόγω απώθησης αυξάνει ο υδροδυναμικός τους όγκος και έτσι αυξάνεται το ιξώδες.

Το Σχήμα 4.90 καταδεικνύει την κατάρρευση της δομής του δείγματος με 10% κεφιράνη όπου φαίνονται οι τιμές του εκτατού ιξώδους να είναι χαμηλότερες από εκείνες του δείγματος με 7% κεφιράνη ενώ θα έπρεπε να συμβαίνει το αντίθετο. Οι καμπύλες αυτές προέκυψαν από την επιλογή και χρησιμοποίηση τιμών εκτατού ιξώδους από τις καμπύλες ροής (Σχήματα 4.85, 4.87 και 4.89) και συγκεκριμένα από την περιοχή των καμπυλών όπου οι τιμές του εκτατού ιξώδους σταθεροποιούνται, δηλ. έχει επέλθει σταθεροποίηση της ροής και όχι από περιοχές των καμπυλών όπου η ροή δεν είναι σταθεροποιημένη αλλά σε μεταβατική κατάσταση (transient flow) και επομένως τα όποια δεδομένα ληφθούν από περιοχές όπως για παράδειγμα κατά την άνοδο των καμπυλών δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μιας και το καθεστώς ροής είναι συνεχώς μεταβαλλόμενο. Οι τιμές του εκτατού ιξώδους των δειγμάτων με 10% κεφιράνη ελήφθησαν από την περιοχή του πλατό που δημιουργήθηκε μετά την

κατάρρευση της δομής γι' αυτό και είναι χαμηλότερες από εκείνες που αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών. Επίσης παρατηρείται και το γεγονός ότι η τιμή εκτατού ιξώδους του τελευταίου σημείου της καμπύλης του δείγματος με 10% κεφίράνη (Σχήμα 4.90) να είναι αυξημένη σε σχέση με τις τιμές των άλλων σημείων προφανώς λόγω της απόθησης των μορίων της κεφίράνης όπως προαναφέρθηκε, που συνεπάγεται την εμφάνιση αύξησης της τιμής του εκτατού ιξώδους στην υψηλή ταχύτητα ροής.



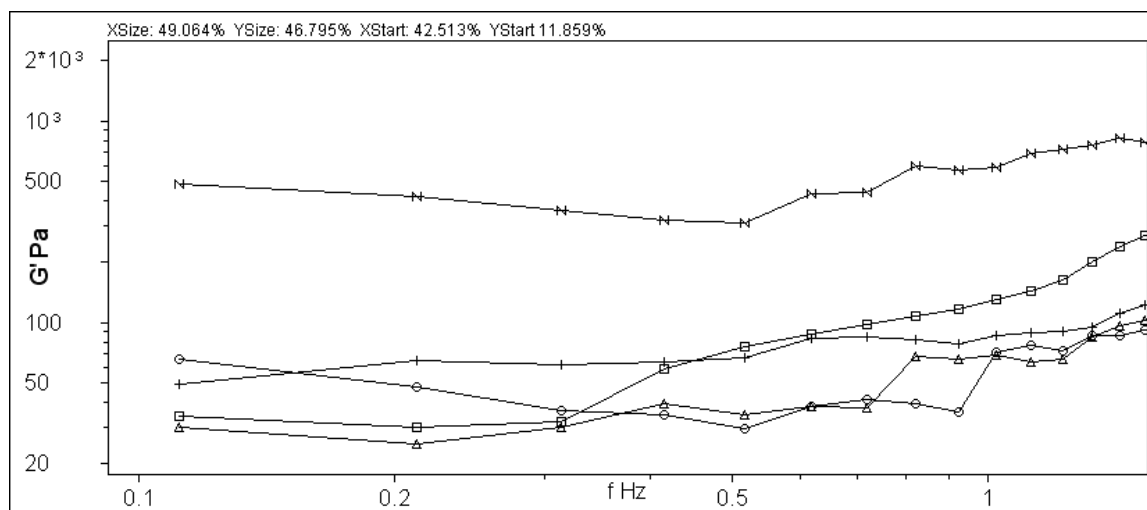
Σχήμα 4.90. Καμπύλες εκτατού ιξώδους δειγμάτων κεφίράνης συγκεντρώσεων 4, 7 και 10% μετά από κατάψυξη και απόψυξη ως συνάρτηση του ρυθμού διαξονικής παραμόρφωσης.

4.3.4. Δυναμικές δοκιμές

Οι δυναμικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης τόσο της τιμής του pH όσο της θερμοκρασίας στη δομή των διαλυμάτων κεφιράνης όπως επίσης και την επίπτωση της θερμικής κατεργασίας των δειγμάτων κεφιράνης με την υποβολή τους σε κατάψυξη στους -18°C για 24 h και επακόλουθη απόψυξη στους 4°C για 24 h. Επιπλέον, διερευνήθηκε αν υπάρχει πιθανή μεταβολή στις μηχανικές ιδιότητες των δειγμάτων κατά τη θερμοκρασιακή τους σάρωση σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 5 έως 50°C που θεωρείται ιδιαίτερης σημασίας αναφορικά με τη θερμοκρασιακή σταθερότητα της δομής των συστημάτων κεφιράνης σε διάφορα περιβάλλοντα που απαντώνται κατά τη διαχείριση, αποθήκευση και κατανάλωση προϊόντων τροφίμων που δυνητικά μπορούν να περιέχουν ως πρόσθετο την κεφιράνη.

4.3.4.1. Μελέτη του ιξωδοελαστικού χαρακτήρα διαλυμάτων και δειγμάτων κεφιράνης που υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης

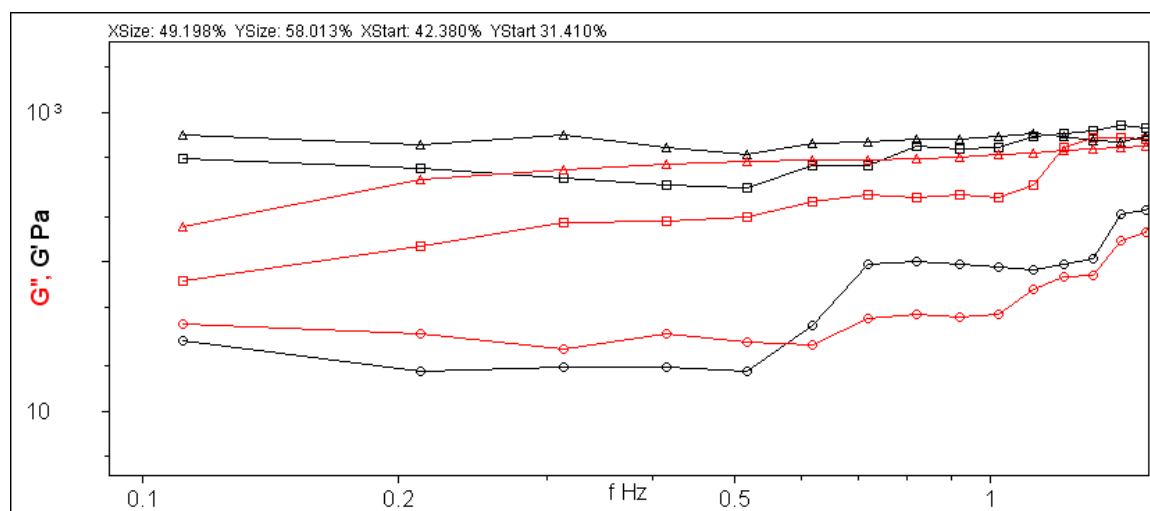
Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις, έδειξαν ότι η ρεολογική συμπεριφορά των δειγμάτων κεφιράνης σε συγκεντρώσεις από 0,25% μέχρι και 4% είναι ταυτόσημη σε δοκιμές σάρωσης συχνότητας ταλάντωσης και διαφοροποιείται στη συγκέντρωση του 4% μόνο μετά από την κατάψυξη στους -18°C και επακόλουθη απόψυξη στους 4°C . Χαρακτηριστικές καμπύλες του συντελεστή ελαστικότητας G' των δειγμάτων σε θερμοκρασία 4°C και τιμή pH 7,0 σε συνάρτηση με τη μεταβολή της συχνότητας ταλάντωσης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.91. Όπως παρατηρείται, η συμπεριφορά των δειγμάτων κεφιράνης στις συγκεντρώσεις μέχρι και 2% πρακτικά δε διαφοροποιείται και είναι χαρακτηριστική αυτής ενός αραιού διαλύματος με αύξηση της τιμής G' όσο αυξάνει η τιμή της συχνότητας ταλάντωσης. Στη συγκέντρωση 4% υπάρχει σαφής διαφοροποίηση και αύξηση της τιμής του G' κατά μία τάξη μεγέθους, σε σχέση με τις άλλες συγκεντρώσεις, αν και πάλι η συμπεριφορά του δείγματος μπορεί να θεωρηθεί ότι προσομοιάζει κατά ένα βαθμό αυτή ενός πυκνού διαλύματος ενώ φαίνεται να κυριαρχεί στις χαμηλές τιμές συχνότητας ταλάντωσης η συμπεριφορά ασθενούς πηκτής.



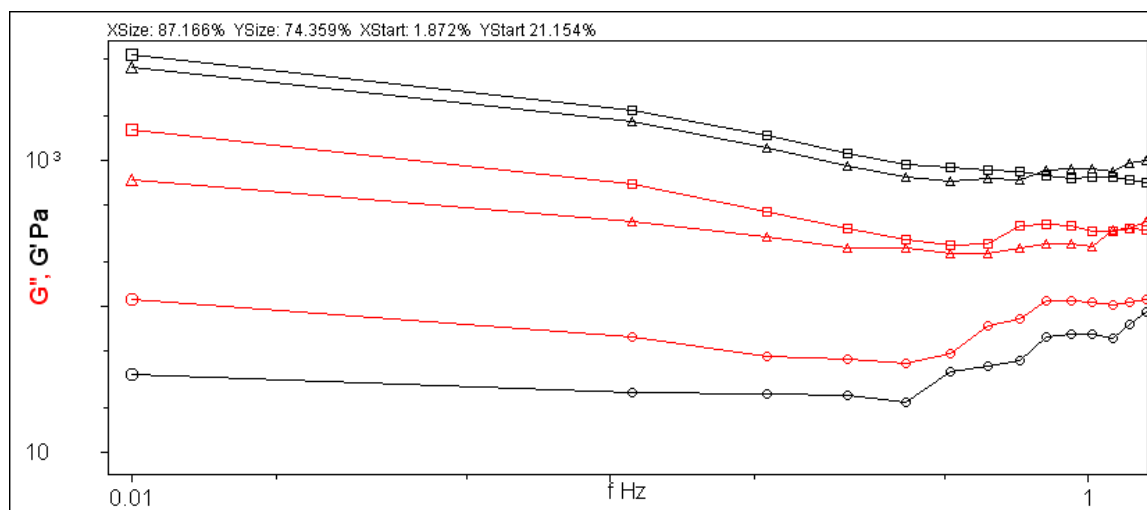
Σχήμα 4.91. Μηχανικά φάσματα συντελεστή G' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφिरάνης συγκέντρωσης: O, 0,25%, □, 0,55%, Δ, 1,0%, +, 2,0%, N, 4% σε pH 7,0 μετά από κατάψυξη στους -18°C , απόψυξη και μέτρηση στους 4°C .

Για να γίνει καλύτερα κατανοητή η επίδραση της διεργασίας κατάψυξης-απόψυξης διαλυμάτων της κεφिरάνης στις μηχανικές ιδιότητες της δομής των διαλυμάτων, δείγμα διαλύματος κεφिरάνης συγκέντρωσης 4% μετρήθηκε προτού να υποστεί κατάψυξη-απόψυξη, κατόπιν μετρήθηκε μετά από αυτή τη διεργασία και ξαναμετρήθηκε μετά από επανάληψή της. Όπως παρατηρείται (Σχήμα 4.92), το δείγμα χωρίς τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης παρουσιάζει τη χαρακτηριστική συμπεριφορά ενός διαλύματος με τον ιξώδη χαρακτήρα, που εκφράζεται από τον συντελεστή ιξώδους G'' , να κυριαρχεί στις χαμηλές τιμές συχνοτήτων ταλάντωσης, ενώ ο συντελεστής ελαστικότητας G' να κυριαρχεί στις υψηλές τιμές συχνοτήτων ταλάντωσης, λόγω αδράνειας απόκρισης του δείγματος, με την εμφάνιση της χαρακτηριστικής διασταύρωσης (cross over) των δύο καμπυλών στην τιμή συχνότητας $\sim 0,58 \text{ Hz}$. Όταν το δείγμα υπέστη κατάψυξη-απόψυξη τότε η μηχανική συμπεριφορά του ήταν η χαρακτηριστική μιας ασθενούς πηκτής με την καμπύλη του συντελεστή G' να υπερσχύει αυτής του συντελεστή G'' και η συμπεριφορά αυτή ενισχύθηκε μετά το δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης του δείγματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αύξηση της ελαστικότητας των δειγμάτων οφείλεται στην επιπλέον δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της κεφिरάνης που συντελούν στο σχηματισμό του πλέγματος της ασθενούς πηκτής. Την ίδια συμπεριφορά έδειξε το δείγμα κεφिरάνης με

συγκέντρωση 4% όταν οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν στους 25°C (Σχήμα 4.93) πράγμα που σημαίνει ότι οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργήθηκαν κατά τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης, παρέμειναν σε ένα μεγάλο ποσοστό σταθεροί κατά την αύξηση της θερμοκρασίας και προφανώς δεν καταστρέφονται εφ' όσον το δείγμα παραμένει πρακτικά στατικό.



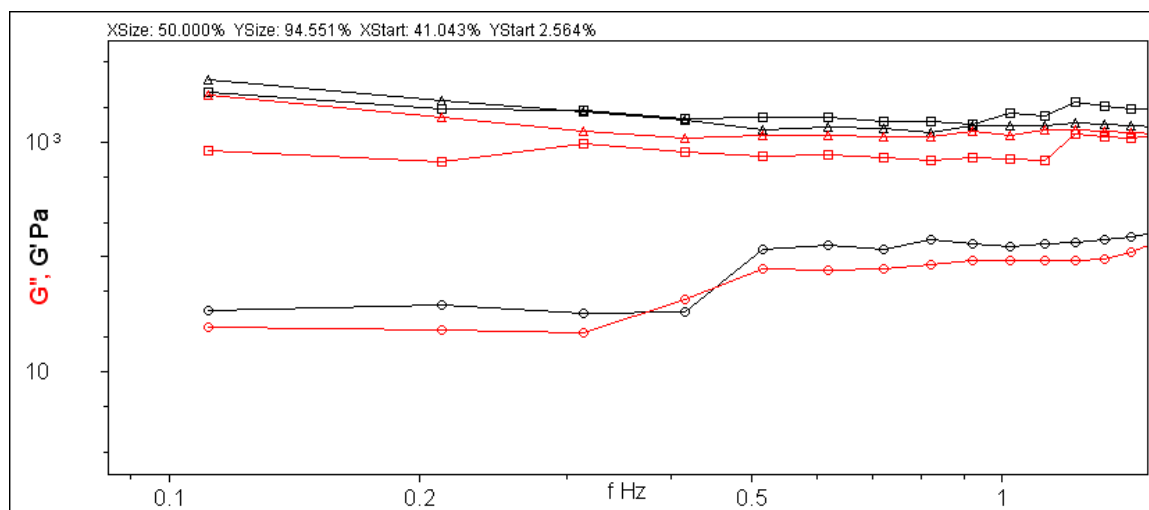
Σχήμα 4.92. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% σε pH 7,0 και μέτρηση στους 4°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, □, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ, μετά από 2^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.



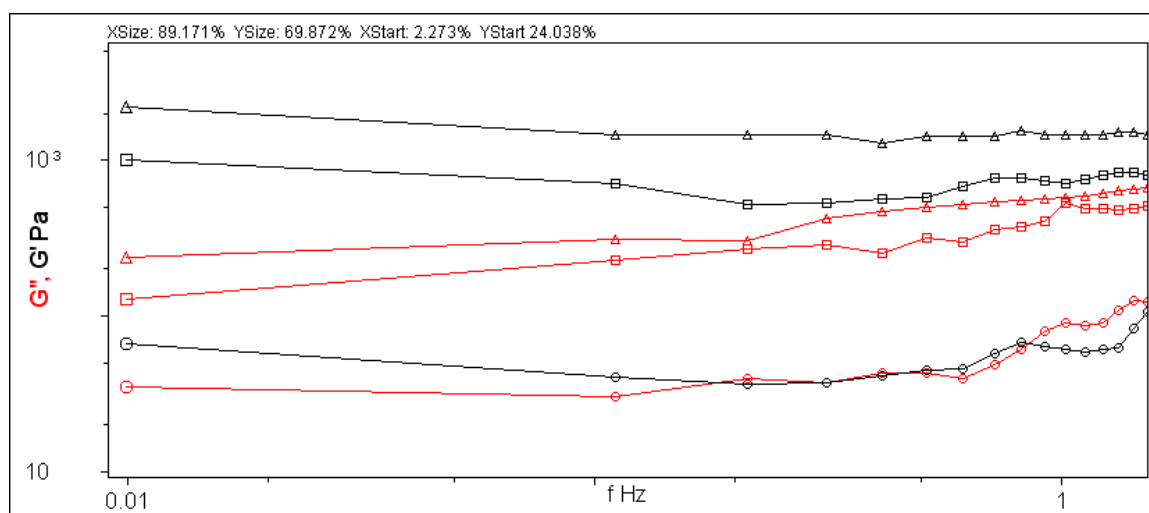
Σχήμα 4.93. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% σε pH 7,0 και μέτρηση στους 25°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, □, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ, μετά από 2^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.

Για να διερευνηθεί η επίδραση του pH στις μηχανικές ιδιότητες διαλυμάτων κεφίρανης που υπέστησαν ή δεν υπέστησαν κατάψυξη-απόψυξη, δείγματα κεφίρανης παρασκευασμένα σε pH 4,5 μετρήθηκαν τόσο στους 4 όσο και στους 25°C. Τα Σχήματα 4.94 και 4.95 παρουσιάζουν τα μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίρανης συγκέντρωσης 4% που μετρήθηκαν στους 4 και στους 25°C αντίστοιχα, σε περιβάλλον pH 4,5 πριν και μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C όπως επίσης και μετά από επανάληψη του θερμικού κύκλου για 2^η φορά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση στη μηχανική συμπεριφορά των δειγμάτων όταν μετρηθούν σε περιβάλλον pH 4,5 σε σύγκριση με τη συμπεριφορά των δειγμάτων σε περιβάλλον pH 7,0.



Σχήμα 4.94. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφiriάνης συγκέντρωσης 4% σε pH 4,5 και μέτρηση στους 4°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, $\square$, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ , μετά από 2^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.

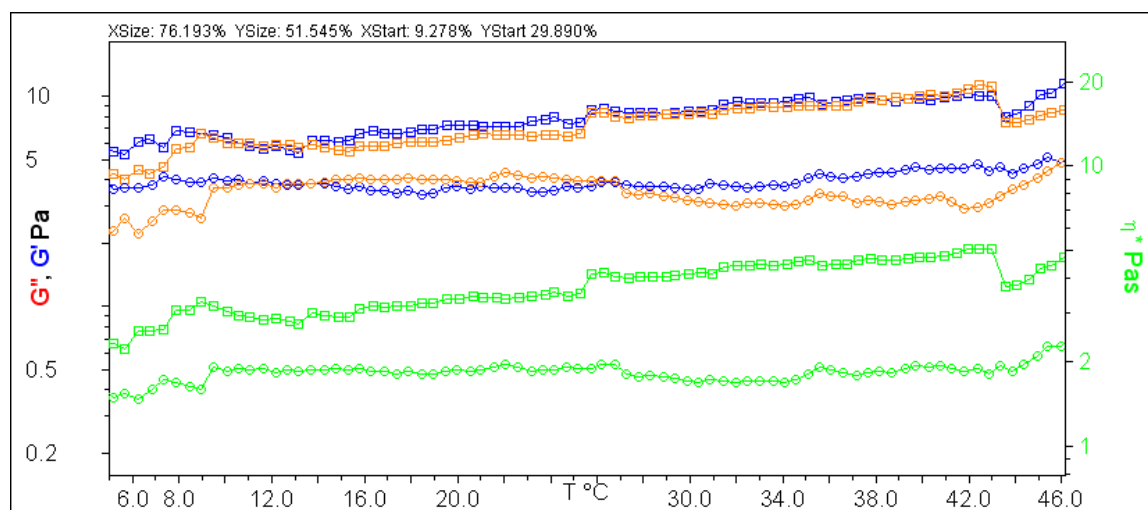


Σχήμα 4.95. Μηχανικά φάσματα συντελεστών G' και G'' σε συνάρτηση με τιμές σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης δειγμάτων κεφiriάνης συγκέντρωσης 4% σε pH 4,5 και μέτρηση στους 25°C : O, χωρίς κατάψυξη-απόψυξη, $\square$, μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη, Δ , μετά από 2^η κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη.

4.3.4.2. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασιακής σάρωσης στα ρεολογικά χαρακτηριστικά δειγμάτων κεφिरάνης που υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης

Για να διαπιστωθεί εάν διαλύματα κεφिरάνης που υπέστησαν τη διεργασία κατάψυξης-απόψυξης σε διάφορες συγκεντρώσεις παραμένουν ρεολογικά σταθερά όταν υποβληθούν σε καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης, δείγματα κεφिरάνης συγκεντρώσεων 0,25% - 0,55% - 1,0% - 2,0% και 4,0% μετρήθηκαν σε τιμές pH 4,5 και 7,0 υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης από 5 έως 50°C.

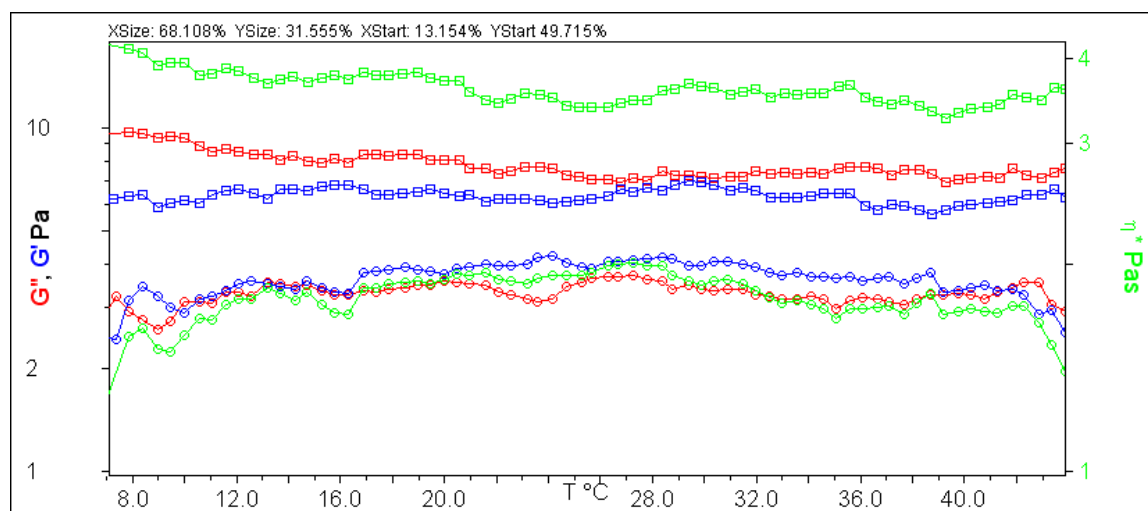
Το Σχήμα 4.96 παρουσιάζει τα μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης δειγμάτων κεφिरάνης συγκέντρωσης 0,25%, σε pH 4,5 που έχουν υποστεί κατάψυξη-απόψυξη. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα δείγματα συμπεριφέρονται ως αραιά διαλύματα, όμως η επανάληψη της διεργασίας αυτής προκάλεσε τη δημιουργία λίγων επιπλέον δεσμών υδρογόνου οι οποίοι όμως παρέμειναν σταθεροί καθ' όλη τη διάρκεια της θερμοκρασιακής σάρωσης.



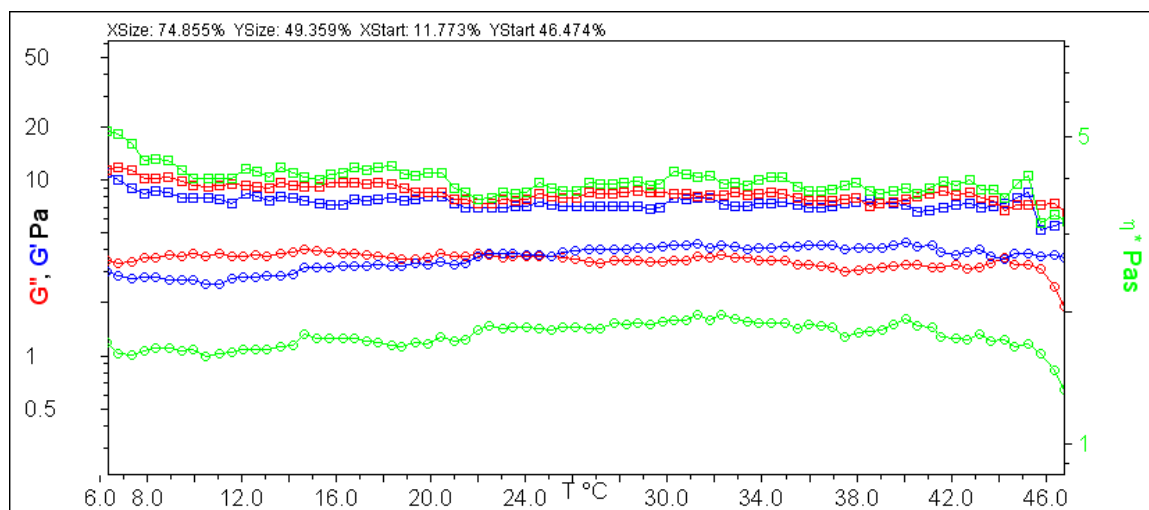
Σχήμα 4.96. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφिरάνης 0,25%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.

Στην περίπτωση των δειγμάτων ίδιας συγκέντρωσης αλλά σε pH 7,0 (Σχήμα 4.97) τα μηχανικά φάσματα τους δείχνουν ότι οι τιμές των ρεολογικών παραμέτρων είναι αυξημένες σε σχέση με εκείνες των δειγμάτων σε pH 4,5 και ιδιαίτερα αυτές του δείγματος του 2^{ου} κύκλου κατάψυξης-απόψυξης. Αυτό ίσως οφείλεται στην αύξηση του υδροδυναμικού όγκου των μορίων της κεφίρανης που όπως έχει προαναφερθεί (ενότητα 4.2.4.6) συμβαίνει σε αραιά διαλύματα κεφίρανης σε τιμή pH ~ 7,0 σε σχέση με τιμή pH 4,0.

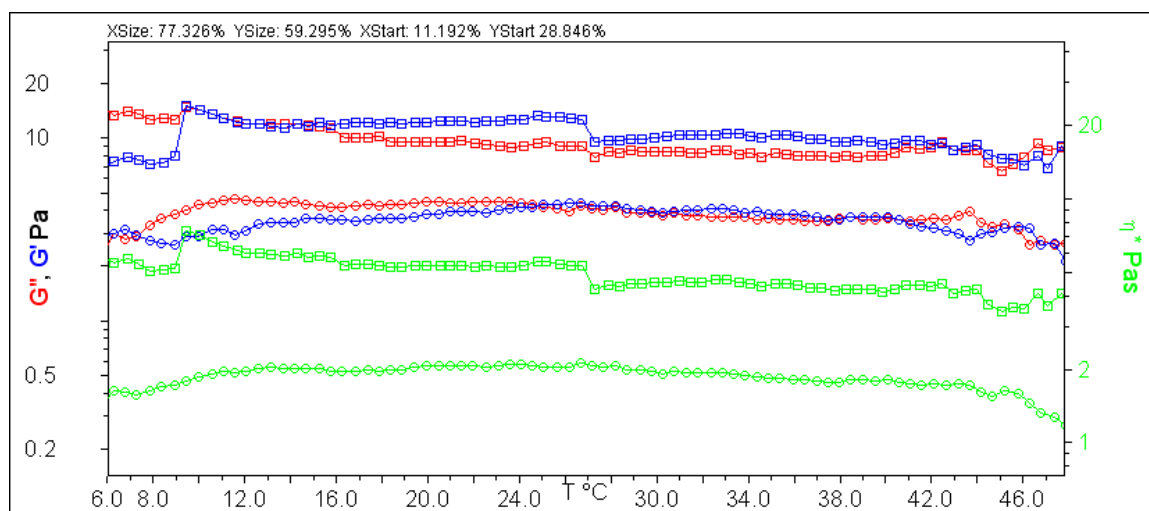
Ρεολογική συμπεριφορά αραιών διαλυμάτων έδειξαν και διαλύματα κεφίρανης με συγκεντρώσεις 0,55 και 1% που μετρήθηκαν σε pH 4,5 και 7,0 (Σχήματα 4.98, 4.99, 4.100 και 4.101).



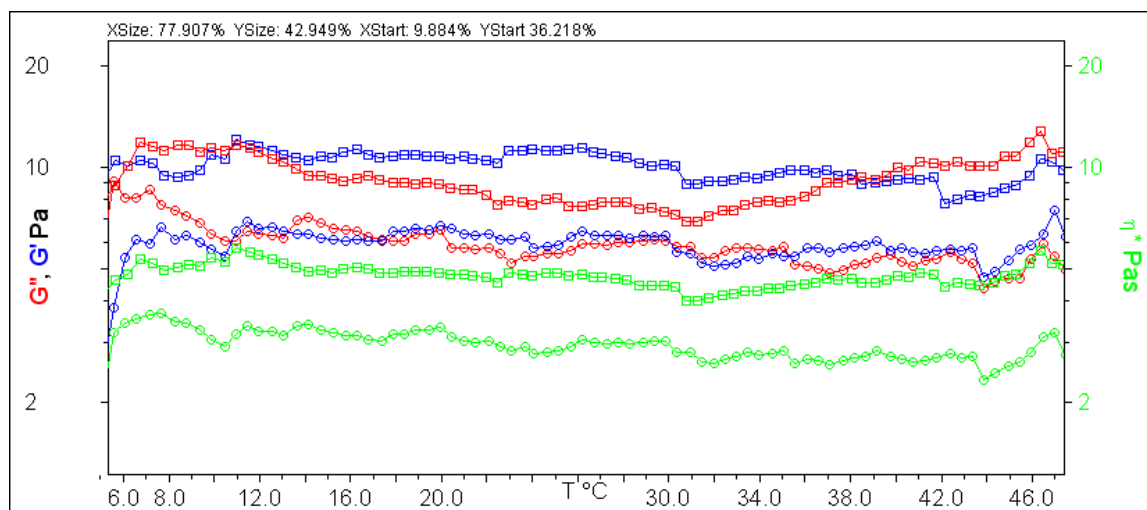
Σχήμα 4.97. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίρανης 0,25%, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: Ο, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.



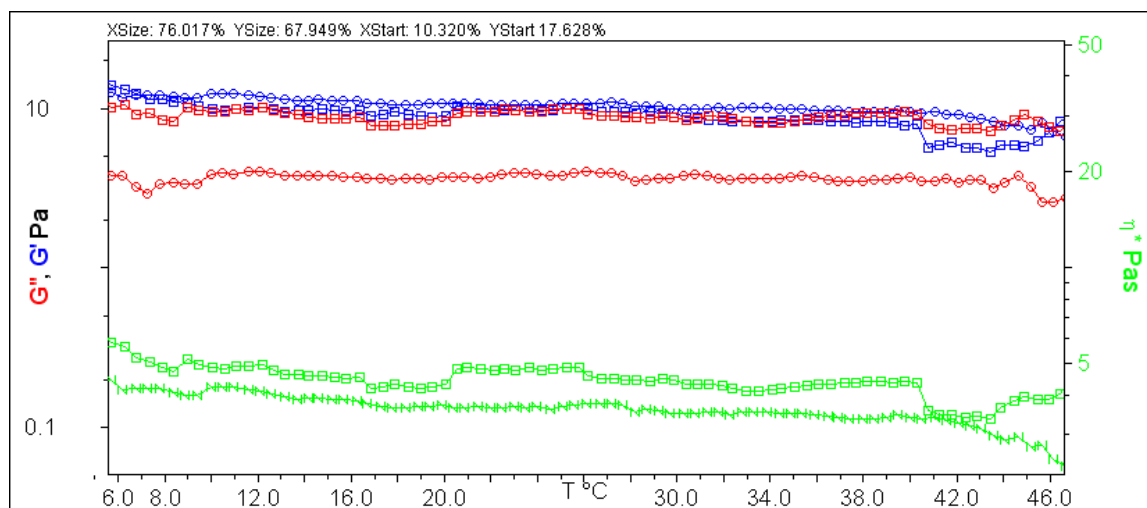
Σχήμα 4.98. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 0,55%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C , $\square$, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C . Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.



Σχήμα 4.99. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 0,55%, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C , $\square$, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C . Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.



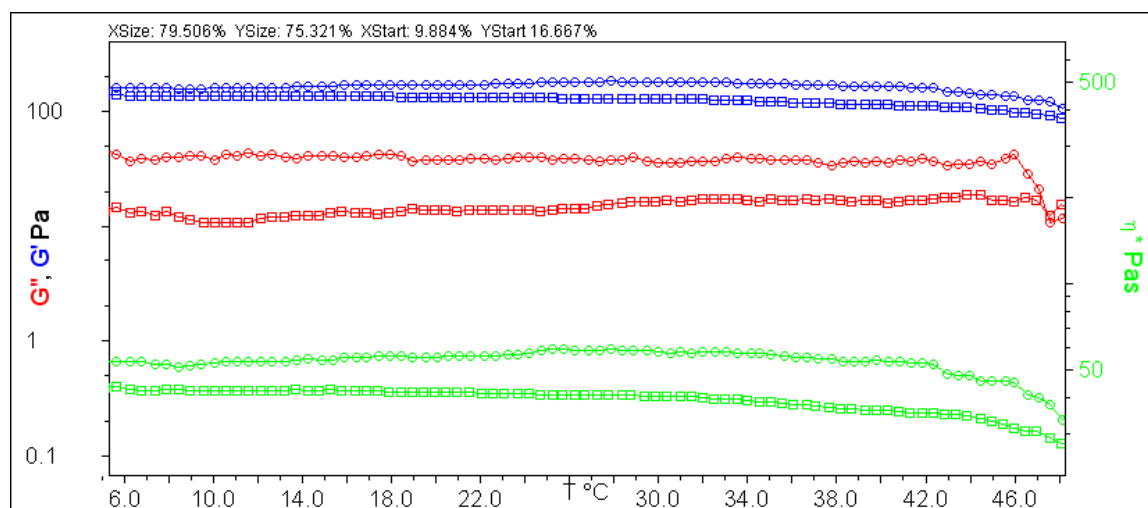
Σχήμα 4.100. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 1,0%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C , $\square$, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C . Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.



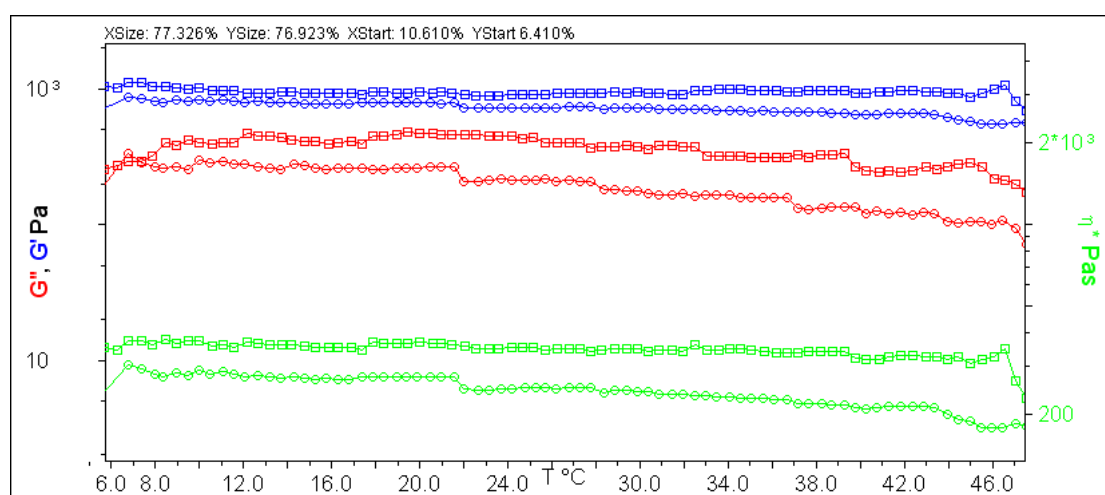
Σχήμα 4.101. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίράνης 1,0 %, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C , $\square$, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C . Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.

Στην περίπτωση των δειγμάτων με συγκεντρώσεις 2 και 4% οι ρεολογικές μετρήσεις έδειξαν ότι αυτά συμπεριφέρονται ως πηκτές των οποίων η συνεκτικότητα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του δείγματος σε κεφίράνη και δεν επηρεάζεται το

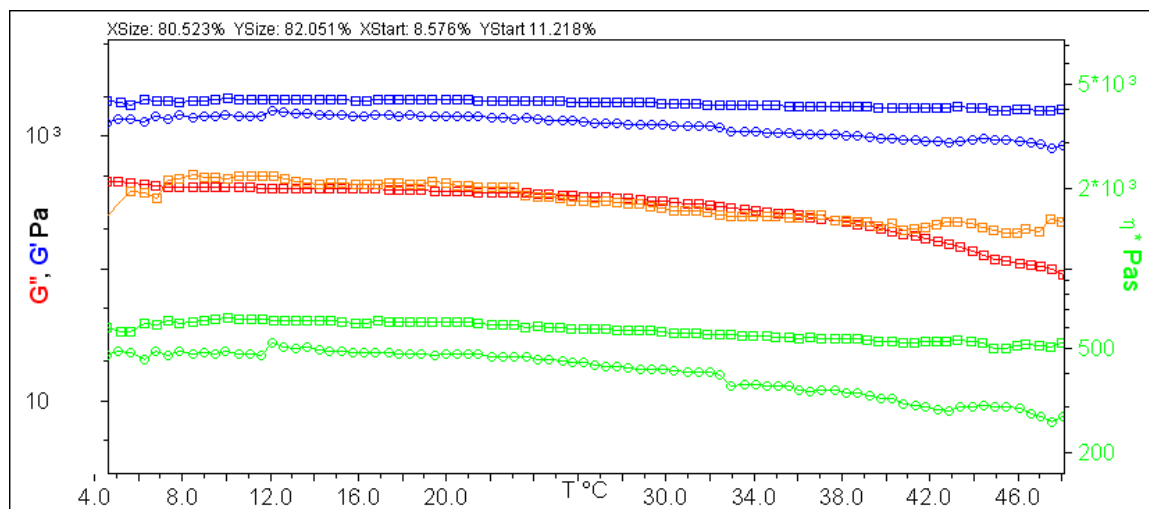
μέγεθός της από την επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης (Σχήματα 4.102, 4.103, 4.104, 4.105). Επιπλέον, η συνεκτικότητα του δείγματος με 2% κεφίρανη ήταν μεγαλύτερη στο δείγμα με pH 7,0 σε σχέση με αυτό με pH 4,5, ενώ στην περίπτωση του δείγματος με 4% κεφίρανη η συνεκτικότητα φαίνεται να ήταν ανεξάρτητη του pH του δείγματος.



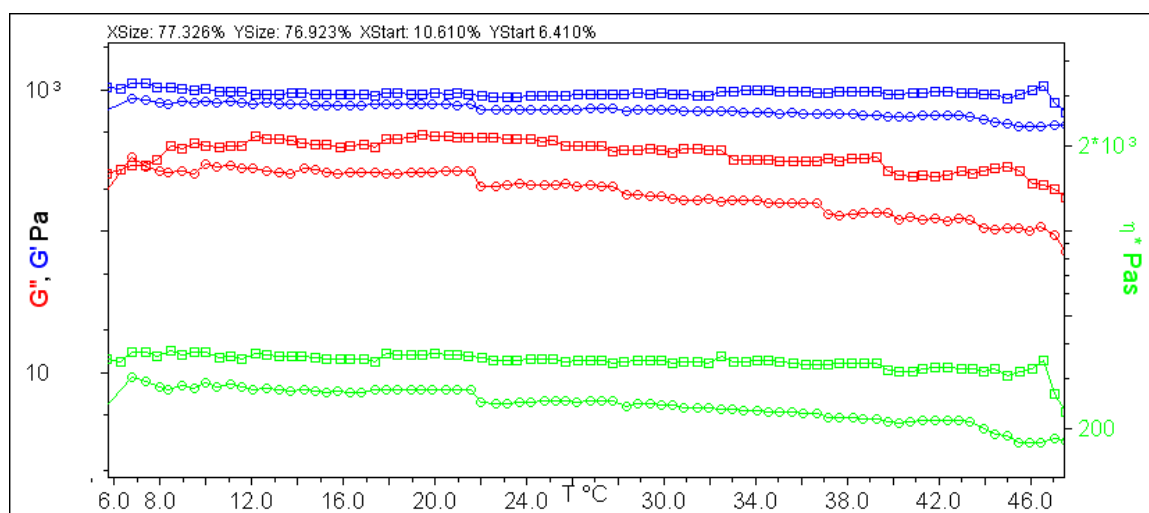
Σχήμα 4.102. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίρανης 2,0%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.



Σχήμα 4.103. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφίρανης 2,0 %, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C, □, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C. Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.



Σχήμα 4.104. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφειράνης 4,0%, σε pH 4,5 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C , $\square$, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C . Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.



Σχήμα 4.105. Μηχανικά φάσματα διαλυμάτων κεφειράνης 4,0%, σε pH 7,0 και υπό καθεστώς θερμοκρασιακής σάρωσης: O, καταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C , $\square$, επανακαταψύχθηκε στους -18°C και αποψύχθηκε στους 4°C . Συχνότητα ταλάντωσης 0,5 Hz.

4.3.5. Δοκιμές ερπυσμού

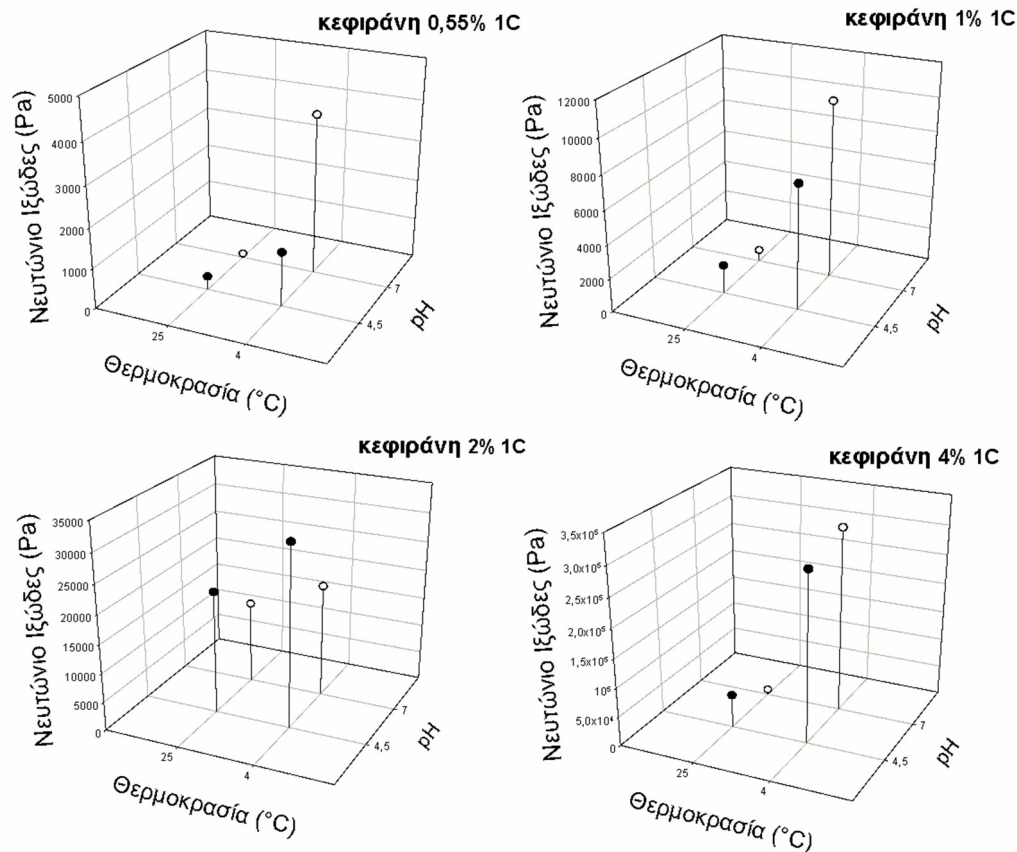
Ο Πίνακας 4.8 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της δοκιμής ερπυσμού δειγμάτων κεφιράνης συγκεντρώσεων από 0,55 έως 4% που έχουν υποστεί τη διεργασία κατάψυξης στους -18°C για 24 h απόψυξης στους 4°C για 24 h και επανάληψης του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης για 2^η φορά. Η ανάλυση των μετρήσεων έγινε χρησιμοποιώντας την καμπύλη ανάκαμψης (recovery) που δίνει περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα απ' ό,τι η καμπύλη έρπυσης (compliance). Όπως φαίνεται, τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά από τις δυναμικές δοκιμές και τα δείγματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις κεφιράνης εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές τόσο του νευτώνειου ιξώδους όσο και της ελαστικότητας (Σχήματα 4.106, 4.107, 4.108 και 4.109).

Όπως φαίνεται (Σχήμα 4.106) η τιμή του ιξώδους αυξάνει αναλογικά με τη συγκέντρωση της κεφιράνης, και μάλιστα σε pH 7,0 είναι υψηλότερη από ό,τι σε pH 4,5 και αυτό όπως προαναφέρθηκε οφείλεται στο αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο του μορίου της κεφιράνης που υπάρχει σε τιμή pH 7,0 οπότε τα ηλεκτρικά φορτισμένα μόρια της κεφιράνης απωθούνται μεταξύ τους και έτσι αυξάνεται η τιμή του ιξώδους, ενώ σχεδόν μηδενίζεται σε pH 4,5 οπότε μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απώσεις και έτσι το ιξώδες μειώνεται. Επίσης παρατηρείται ότι στους 4°C οι τιμές του ιξώδους είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C και αυτό οφείλεται στη δημιουργία περισσότερων δεσμών υδρογόνου στους 4°C από αυτούς που ακόμη υφίστανται στους 25°C .

Πίνακας 4.8. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού κρυοπηκτών (1^{ου} και 2^{ου} κύκλου κατάψυξης-απόψυξης) κεφιράνης συγκεντρώσεων 0,55%, 1%, 2% και 4% παρασκευασμένες από υδατικά διαλύματα σε pH 7,0 και 4,5. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C. Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν 0,05 Pa.

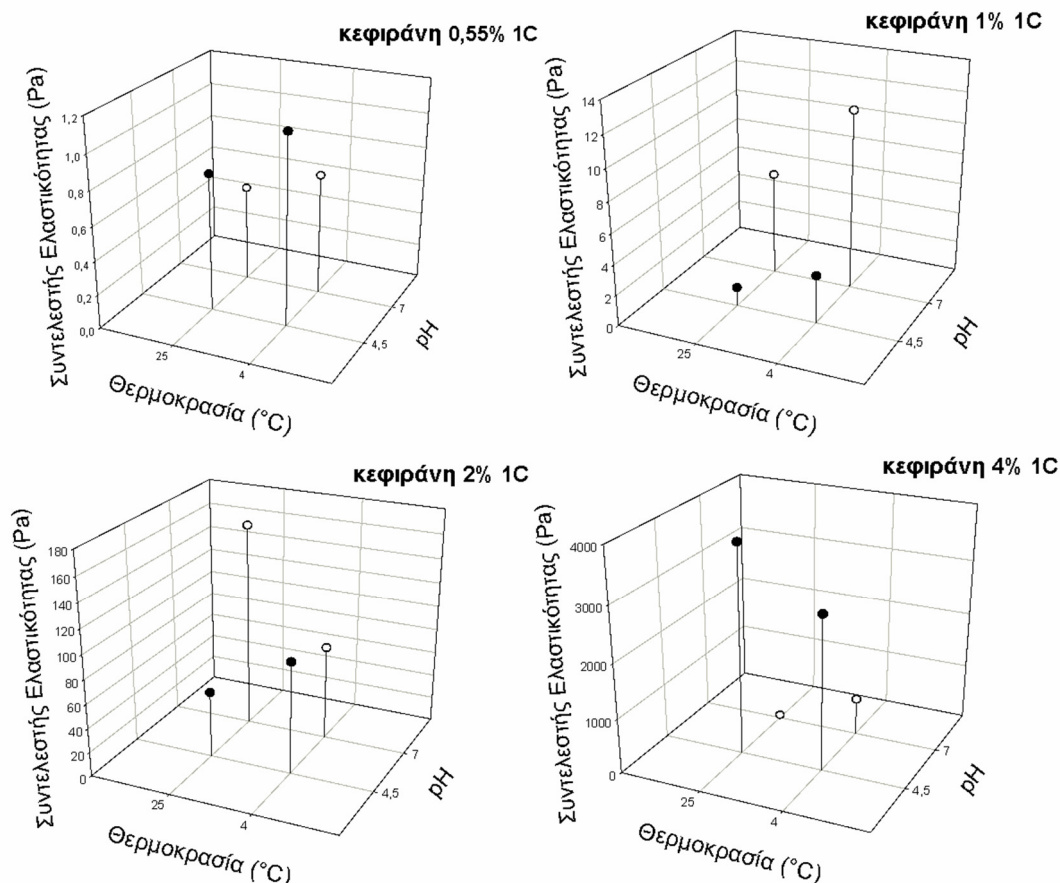
Δείγματα	G _g (Pa)	G ₁ (Pa)	τ ₁ (s)	G ₂ (Pa)	τ ₂ (s)	G ₃ (Pa)	τ ₃ (s)	strain
K0,55% pH 4,5 1ος κύκλος 4°C		3,426	0,2596	1,982	0,2596	9,320	47,51	0,02127
K0,55% pH 4,5 1ος κύκλος 25°C		0,960	0,5464	5,631	47,51	0,960		0,03344
K0,55% pH 4,5 2ος κύκλος 4°C		1,140	0,2596	4,587	100			0,0248
K0,55% pH 4,5 2ος κύκλος 25°C		1,126	0,2596	4,608	100			0,004094
K0,55% 1ος κύκλος 4°C		0,730	0,5464					0,01921
K0,55% 1ος κύκλος 25°C		0,713	0,5464	2,512	47,51			0,072
K0,55% 2ος κύκλος 4°C		0,396	0,5464	3,184	10,72			0,05087
K0,55% 2ος κύκλος 25°C		0,380	0,5464	4,202	10,72			0,01129
K1% pH 4,5 1ος κύκλος 4°C		4,050	0,1233	17,117	47,51			0,002875
K1% pH 4,5 1ος κύκλος 25°C		2,066	0,1233	13,369	22,57	2,674	100	0,00283
K1% pH 4,5 2ος κύκλος 4°C		4,677	0,1233	163,559	5,095	20,028	100	0,006464
K1% pH 4,5 2ος κύκλος 25°C		4,034	0,1233	103,135	5,095	6,702	100	0,003114
K1% 1ος κύκλος 4°C		12,822	0,1233	3290,556	2,421	53,619	100	0,00244
K1% 1ος κύκλος 25°C		8,658	0,1233	30,030	22,57			0,01594
K1% 2ος κύκλος 4°C		4,673	0,1233	26,110	1,15			0,002878
K1% 2ος κύκλος 25°C		4,852	0,1233					0,02016
K2% pH 4,5 1ος κύκλος 4°C	68,918	224,215	47,51					0,0003669
K2% pH 4,5 1ος κύκλος 25°C	60,864	1131,606	5,095	61,652	100			0,0009411
K2% pH 4,5 2ος κύκλος 4°C	52,110	984,252	0,5464	89,767	47,51			0,0009874
K2% pH 4,5 2ος κύκλος 25°C	134,084	1085,894	5,095					0,00128
K2% 1ος κύκλος 4°C	46,838	185,254	47,51					0,0004022
K2% 1ος κύκλος 25°C	111,408							0,0009099
K2% 2ος κύκλος 4°C	136,799	2701,972	0,5464	7434,944	2,421	427,350	47,51	0,000074
K2% 2ος κύκλος 25°C	178,253	1282,051	2,421					0,0004714
K4% pH 4,5 1ος κύκλος 4°C		794,913	0,1233	15243,902	22,57			0,0000563
K4% pH 4,5 1ος κύκλος 25°C	1254,390	8474,576	1,15					0,0001205
K4% pH 4,5 2ος κύκλος 4°C		469,484	0,1233					0,000031
K4% pH 4,5 2ος κύκλος 25°C	125,612	173,521	47,51					0,0006698
K4% 1ος κύκλος 4°C	361,533	2349,072	100					0,000051
K4% 1ος κύκλος 25°C	78,003	63,452	47,51					0,001339
K4% 2ος κύκλος 4°C	180,278	1260,239	0,1233	796,178	47,51			0,0007134
K4% 2ος κύκλος 25°C	237,925	2713,704	0,1233	373,832	100			0,00019

Όπου: G_g συντελεστής στιγμιαίας ελαστικότητας, G_{1,2,3} συντελεστές επιβραδυνόμενης ελαστικότητας, τ_{1,2,3} χρόνοι επιβράδυνσης, strain η παραμόρφωση.



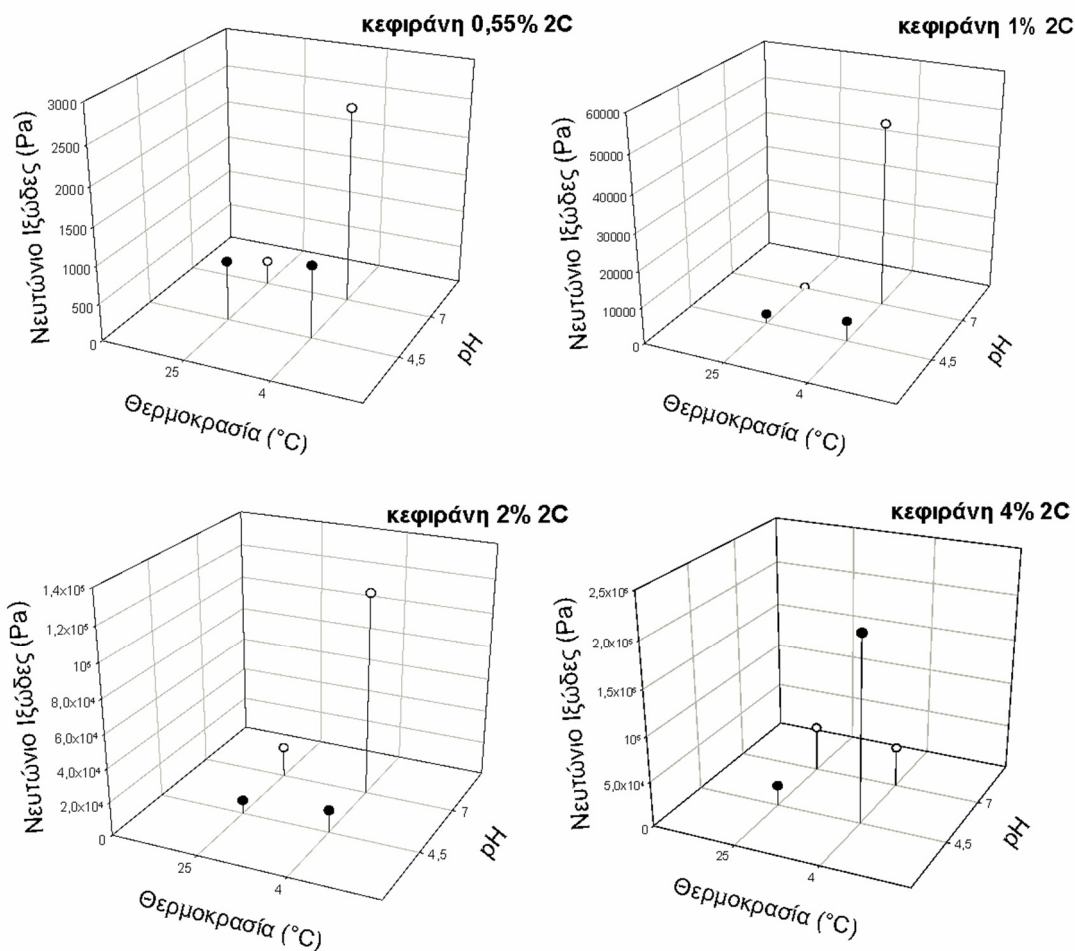
Σχήμα 4.106. Νευτώνιο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων κεφιράνης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από έρπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας έρπυσμού και της τιμής pH.

Αντίθετα στο Σχήμα 4.107 αν και πάλι καταδεικνύεται η επίδραση της συγκέντρωσης της κεφιράνης στη τιμή του συντελεστή ελαστικότητας (G) που αυξάνει όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κεφιράνης στα δείγματα, η επίδραση τόσο του pH όσο και της θερμοκρασίας δεν είναι ξεκάθαρη στις τιμές του G που καταγράφονται σε κάθε δείγμα και αυτό οφείλεται στη διαφορετική τιμή παραμόρφωσης (strain) που καταγράφηκε σε κάθε έρπυση των δειγμάτων που όπως φαίνεται (Πίνακας 4.8) είναι διαφορετική από δείγμα σε δείγμα και αυτό ήταν αναμενόμενο λόγω της χρήσης της ίδιας τιμής τάσης διάτμησης (0,05 Pa) για όλα τα δείγματα για λόγους πειραματικής ομοιογένειας.



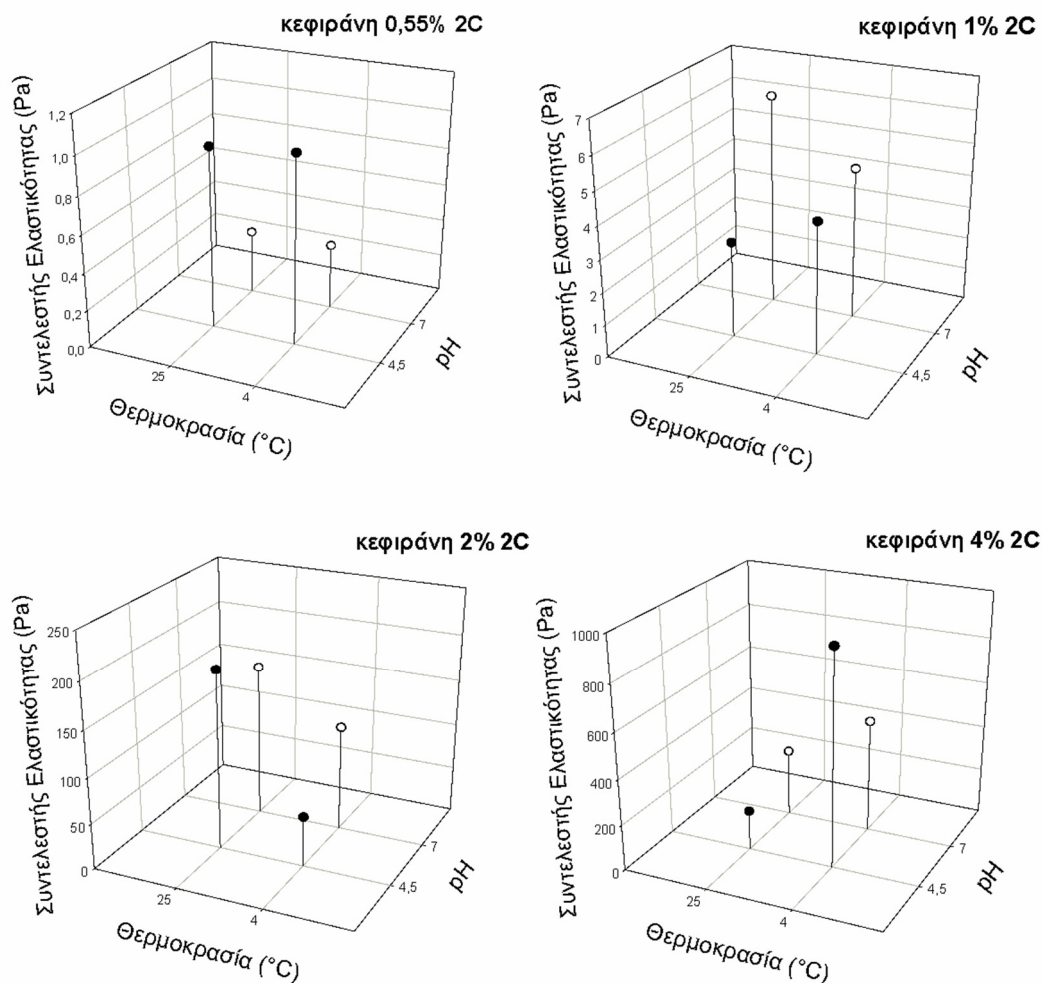
Σχήμα 4.107. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων κεφιράνης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της τιμής pH.

Όταν τα δείγματα υποβλήθηκαν και σε δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης τότε διαπιστώθηκε και πάλι στην περίπτωση του νευτώνειου ιξώδους (Σχήμα 4.108) ότι οι τιμές στα διάφορα δείγματα ήταν ανάλογες της συγκέντρωσης της κεφιράνης και επίσης αν και στις περισσότερες περιπτώσεις το ιξώδες ήταν αυξημένο σε περιβάλλον με pH 7 σε σχέση με περιβάλλον σε pH 4,5 όπως επίσης το ίδιο ίσχυε και στην περίπτωση της θερμοκρασίας με τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 4°C , στις περισσότερες περιπτώσεις, να έχουν υψηλότερο ιξώδες από ότι αυτά που μετρήθηκαν στους 25°C .



Σχήμα 4.108. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων κεφιράνης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της τιμής pH.

Στο Σχήμα 4.109 παρατηρείται, όπως και στην περίπτωση του 1^{ου} κύκλου κατάψυξης-απόψυξης (Σχήμα 4.107), ότι οι τιμές του G των δειγμάτων που υπέστησαν δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης διαφοροποιούνται σε σχέση με τη συγκέντρωση της κεφιράνης και αυξάνουν όσο η συγκέντρωση αυξάνει. Αναφορικά με τη θερμοκρασία και το pH οι τιμές των δειγμάτων διαφοροποιούνται αλλά όχι αναλογικά με τις συγκεντρώσεις και αυτό ως ένα βαθμό οφείλεται και πάλι στις διαφορετικές τιμές παραμόρφωσης που καταγράφηκαν.



Σχήμα 4.109. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων κεφίρανης με συγκεντρώσεις 0,55-1,00-2,00-4,00% μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση 0,05 Pa, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της τιμής pH.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από την δοκιμή ερπυσμού των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακα 4.8. Εμφανίζονται οι τιμές, τόσο της στιγμιαίας ελαστικότητας όσο και της επιμέρους επιβραδυνόμενης ελαστικότητας εκφρασμένα ως μηχανικά στοιχεία (mechanical elements) Kelvin. Παρατηρείται ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις (0,55% & 1,0%) δεν καταγράφονται τιμές συντελεστού στιγμιαίας ελαστικότητας G_g και αυτό δείχνει ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις κεφίρανης υπάρχουν λίγοι δευτερεύοντες ισχυροί δεσμοί και οι περισσότεροι που υπάρχουν όταν διασπαστούν απαιτούν κάποιο χρονικό διάστημα (τ) για να ξαναδημιουργηθούν και προφανώς όχι στο ίδιο σημείο όπου προϋπήρχαν. Αντίθετα, στα δείγματα με αυξημένη συγκέντρωση

κεφιράνης (2,0% & 4,0%) εμφανίζονται τιμές στιγμιαίας ελαστικότητας ενδεικτικό της παρουσίας περισσοτέρων ισχυρών δεσμών προφανώς υδρογόνου αλλά και ασθενέστερων δυνάμεων van der Waals από τα δείγματα με χαμηλότερη συγκέντρωση κεφιράνης, όπως ήταν αναμενόμενο.

Τα αποτελέσματα τόσο από τις δυναμικές δοκιμές όσο και από τις δοκιμές ερπυσμού έδειξαν ότι τα δείγματα κεφιράνης που έχουν καταψυχθεί και αποψυχθεί ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις παραμένουν μηχανικά σταθερά και δεν καταρρέουν τόσο σε ένα εύρος θερμοκρασιών, από 5 έως 50°C που υπάρχει περίπτωση να υφίσταται κατά την αποθήκευση και διαχείριση των συστημάτων της κεφιράνης που μελετήθηκαν όσο και από την επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης των συστημάτων αυτών που είναι δυνατό να συμβεί κατά τη διαχείρισή τους.

Επομένως η κεφιράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως τροποποιητής υφής σε προϊόντα που έχουν υποστεί τη διεργασία της κατάψυξης και έχουν αποψυχθεί.

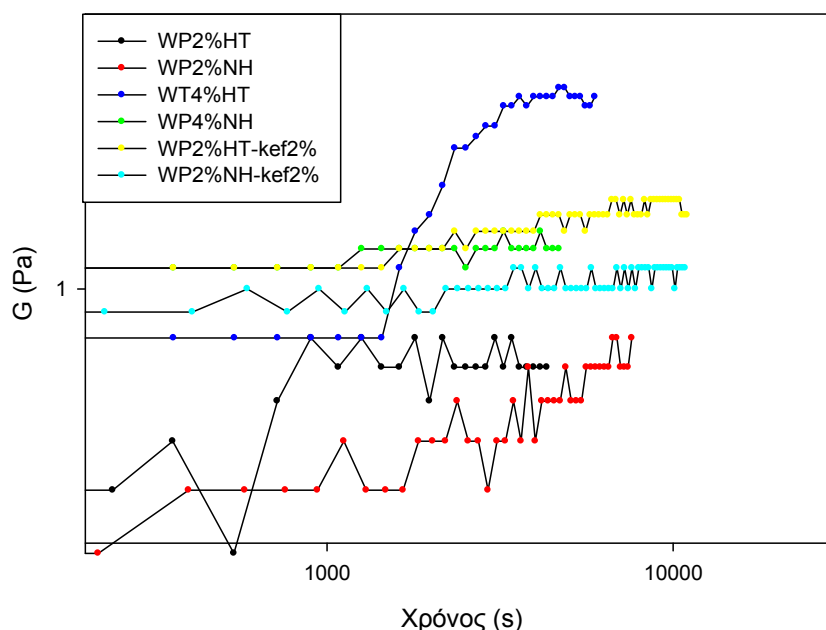
4.4. Μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων συστημάτων καζεϊνικών αλάτων, πρωτεϊνών ορού γάλακτος και κεφिरάνης

4.4.1. Μελέτη της πορείας σχηματισμού πηκτής συστημάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος ή καζεϊνικών αλάτων παρουσία κεφिरάνης

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνηθεί αν η παρουσία της κεφिरάνης επηρεάζει την πορεία σχηματισμού πηκτής όξινων συστημάτων είτε πρωτεϊνών ορού είτε καζεϊνης ή και σε συνδυασμό των δύο μαζί και με την κεφिरάνη. Τα αποτελέσματα πιστεύεται, ότι θα βοηθήσουν στην κατανόηση του μηχανισμού σχηματισμού πηκτής του όξινου γαλακτοκομικού προϊόντος κεφίρ και έτσι να διαλευκανθεί ο ρόλος της κεφिरάνης στο σύστημα του κεφίρ αν δηλ. δρα συνεργιστικά ή όχι με τις πρωτεΐνες με τις οποίες συνυπάρχει. Ως μέσο οξίνισης χρησιμοποιήθηκε η γλύκονο-δ-λακτόνη (gdl), η οποία ως γνωστό, μειώνει αργά το pH του συστήματος του γάλακτος έτσι ώστε να είναι δυνατό να προσομοιωθεί η διεργασία της όξινης πήξης του γάλακτος που γίνεται με γαλακτικά βακτήρια.

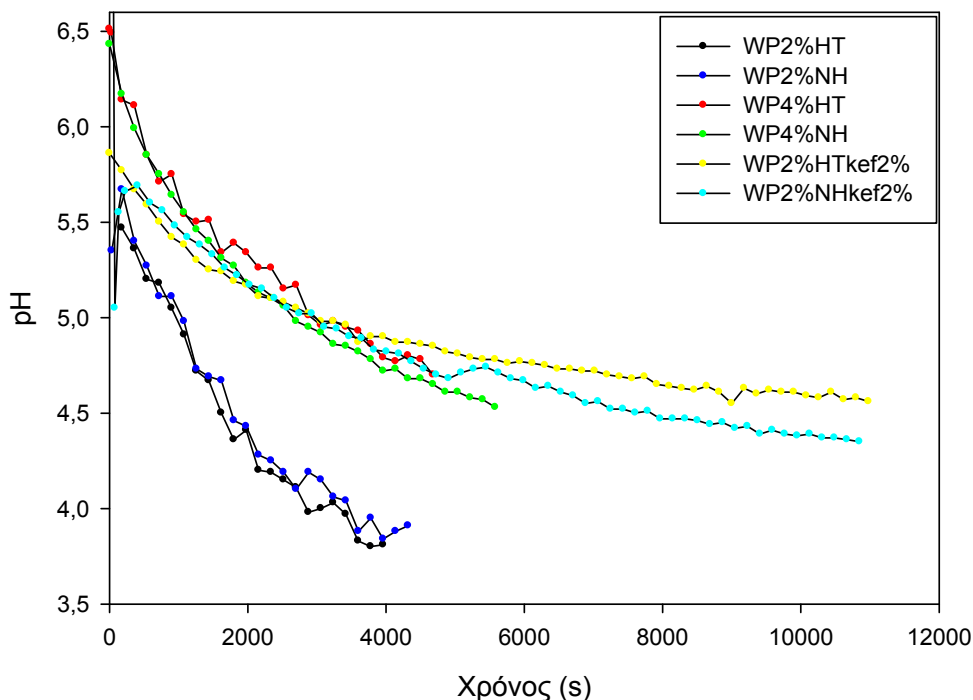
Το Σχήμα 4.110 παρουσιάζει τη μεταβολή του συντελεστή ελαστικότητας σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής του συστήματος κατά τη διάρκεια σχηματισμού του πλέγματος που αναμένεται να συμβεί με τη μείωση του pH. Όπως φαίνεται, τα δείγματα με 2% πρωτεΐνες ορού παρουσιάζουν ελάχιστη αύξηση του συντελεστή ελαστικότητάς τους που είναι μικρότερη από 1,0 Pa, είτε είχαν υποστεί θέρμανση στους 85°C για 15 min, ώστε να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες, είτε όχι.

Το ίδιο ισχύει και για τα μίγματα πρωτεϊνών ορού συγκέντρωσης 2% - κεφिरάνης 2%, είτε είχαν θερμανθεί είτε όχι, όπως επίσης και το δείγμα πρωτεϊνών ορού 4% που δεν είχε θερμανθεί. Αντίθετα, το δείγμα πρωτεϊνών ορού 4% που είχε θερμανθεί εμφάνισε μικρή αύξηση του G της τάξης περίπου των 2 Pa. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρουσία της κεφिरάνης δεν επηρεάζει καθόλου τη ρεολογική συμπεριφορά των πρωτεϊνών ορού οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν είναι σε θέση να δημιουργήσουν πλέγμα. Η διαφοροποίηση του θερμασμένου δείγματος συγκέντρωσης 4% οφείλεται στη μετουσίωση των πρωτεϊνών που απελευθέρωσε δραστικές ομάδες των μορίων των πρωτεϊνών (αμινομάδες, καρβοξυλομάδες, θείου) που συνέβαλαν στη δημιουργία νέων δεσμών μεταξύ των μορίων και έτσι αυξήθηκε η τιμή του G.



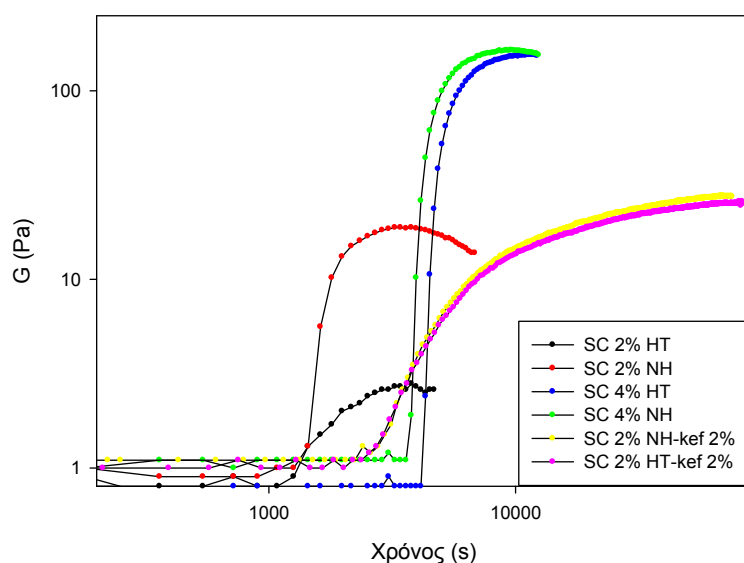
Σχήμα 4.110. Μεταβολή του συντελεστή ελαστικότητας (G) σε συνάρτηση με το χρόνο δειγμάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφिरάνης. Κωδικοί: WP, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφिरάνη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.

Το Σχήμα 4.111 εμφανίζει τη μεταβολή του pH σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρατηρείται ότι στα δείγματα με συγκέντρωση πρωτεϊνών 2%, η μείωση του pH ήταν ταχύτερη ενώ στα δείγματα με συγκέντρωση 4% ή με συγκέντρωση 2% πρωτεΐνες και 2% κεφирάνη, η μείωση του pH ήταν κατά πολύ βραδύτερη. Αυτό προφανώς, οφείλεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ρυθμιστικών συστημάτων (buffers) που αναλογικά υπάρχει στη συγκέντρωση 4% πρωτεϊνών σε σχέση με εκείνη του 2%, που παρεμποδίζουν, σε μεγαλύτερο βαθμό, τη δράση της γλύκονο-δ-λακτόνης (gdl) απ' ότι στην περίπτωση των δειγμάτων με 2%, ενώ στα δείγματα που περιείχαν εκτός από 2% πρωτεΐνες και 2% κεφирάνη μπορεί να οφείλεται σε πιθανή ρυθμιστική δράση και της κεφирάνης, λόγω της μερικής εξουδετέρωσης του αρνητικού φορτίου των μορίων της κεφирάνης με τη σταδιακή μείωση του pH από 6,6 σε 4,4 (κεφάλαιο υδροδυναμικών μελετών 4.2.4.1) .

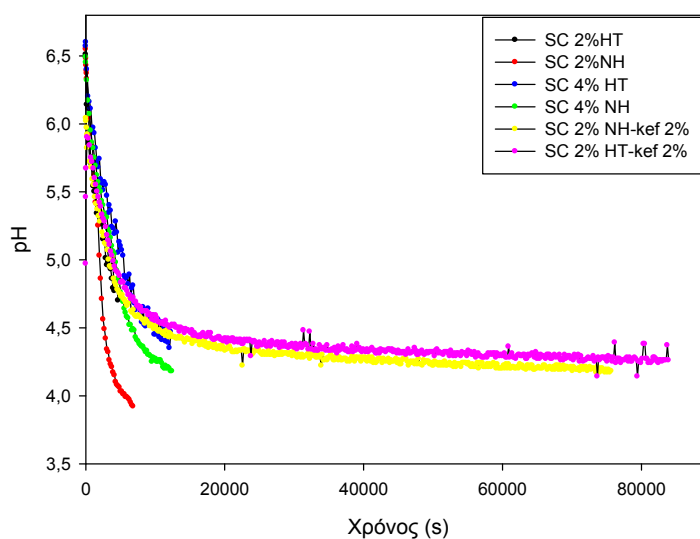


Σχήμα 4.111. Μεταβολή του pH σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής συστημάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφिरάνης. Κωδικοί: WP, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφिरάνη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.

Το Σχήμα 4.112 παρουσιάζει τις καμπύλες ανάπτυξης του συντελεστή ελαστικότητας (G) σε συνάρτηση με το χρόνο, δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου θερμασμένων και μη θερμασμένων στους 85°C και με ή χωρίς προσθήκη κεφिरάνης. Παρατηρείται ότι το μη θερμασμένο δείγμα του καζεϊνικού νατρίου συγκέντρωσης 2% εμφανίζει υψηλότερη τιμή του G από το θερμασμένο αντίστοιχο του ενώ τα δείγματα με 4% συγκέντρωση έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Όπως στην περίπτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών ορού έτσι και στην περίπτωση των δειγμάτων με καζεϊνικό νάτριο η προσθήκη κεφिरάνης δεν επιφέρει καμία συνεργιστική δράση. Αναφορικά με το ρυθμό μείωσης του pH, οι καμπύλες μεταβολής του pH σε συνάρτηση με το χρόνο δείχνουν (Σχήμα 4.113) ότι συντελέστηκε η μείωση του pH στο 4,4, με μεγαλύτερη ταχύτητα στα μη θερμασμένα δείγματα ανεξαρτήτως συγκέντρωσης απ' ότι σε όλα τα άλλα δείγματα.



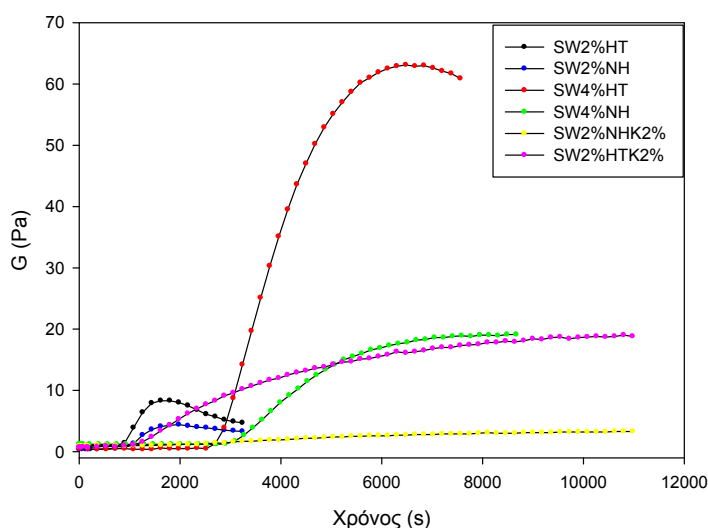
Σχήμα 4.112. Μεταβολή του συντελεστή ελαστικότητας (G) σε συνάρτηση με το χρόνο δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης. Κωδικοί: SC, καζεϊνικό νάτριο, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.



Σχήμα 4.113. Μεταβολή του pH σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής συστημάτων καζεϊνικού νατρίου με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης. Κωδικοί: SC, καζεϊνικό νάτριο, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, kef, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.

Στην περίπτωση των μιγμάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης τα αποτελέσματα δείχνουν (Σχήμα 4.114) ότι η

παρουσία των θερμασμένων πρωτεϊνών ορού είναι αυτή που διαφοροποιεί την πορεία αύξησης του συντελεστή ελαστικότητας των συστημάτων. Συγκεκριμένα, το δείγμα θερμασμένου μίγματος καζεϊνικού άλατος– πρωτεϊνών ορού, συνολικής συγκέντρωσης 4%, εμφανίζει τη μεγαλύτερη αύξηση του G ($G_{\max} \sim 65$ Pa) και αυτό πρέπει να αποδοθεί στην παρουσία των μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού που με την εμφάνιση ενεργών ομάδων (αμινομάδων, καρβοξυλομάδων και θείου) συνέβαλαν στην ανάπτυξη του πλέγματος ώστε να δημιουργηθεί πηκτή. Αντίθετα, στην περίπτωση του αντίστοιχου μη θερμασμένου μίγματος η μέγιστη τιμή του G είναι ~ 15 Pa που οφείλεται κατά βάση στην παρουσία του καζεϊνικού άλατος. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρείται και στην περίπτωση των μιγμάτων με συνολική συγκέντρωση 2% όπου το μη θερμασμένο δείγμα εμφανίζει μικρότερη τιμή $G_{\max}$ σε σύγκριση με το θερμασμένο δείγμα.

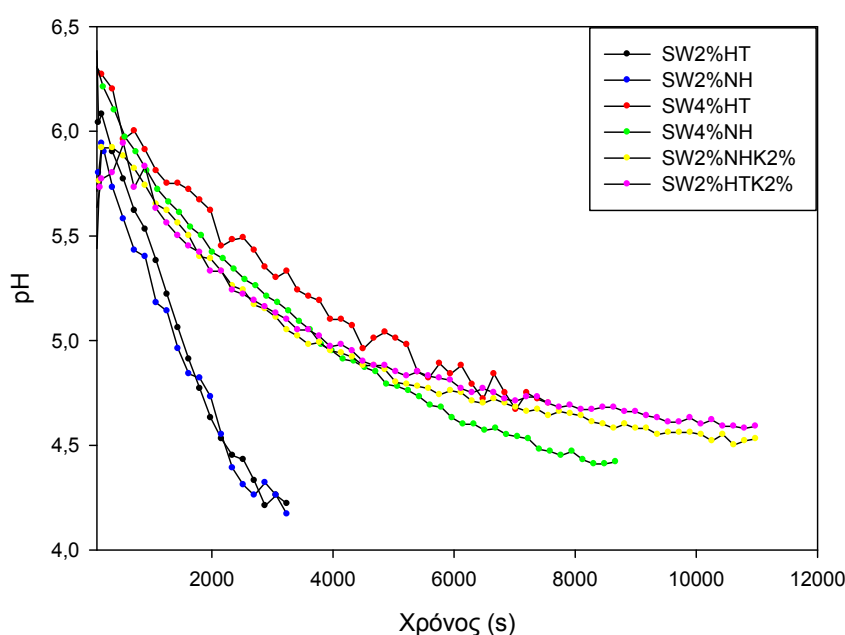


Σχήμα 4.114. Μεταβολή του συντελεστή ελαστικότητας (G) σε συνάρτηση με το χρόνο συστημάτων καζεϊνικού νατρίου - πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφίρανης (σε αναλογία 1:1 και τελική συγκέντρωση 2% και 4%). Κωδικοί: S, καζεϊνικό νάτριο, W, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, K, κεφίρανη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.

Στην περίπτωση των δειγμάτων που περιείχαν και κεφίρανη (συνολική συγκέντρωση 2% πρωτεϊνικό μίγμα & 2% κεφίρανη), παρατηρείται (Σχήμα 4.114) ότι η αύξηση του G ήταν αμελητέα στο μη θερμασμένο δείγμα όπου φαίνεται ότι το κάθε μεγαλομόριο ανταγωνίζεται τα άλλα για να ενυδατωθεί. Ενώ στο θερμασμένο δείγμα εμφανίζεται αύξηση του $G_{\max} \sim 15$ Pa που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις των μορίων

των μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού μεταξύ τους και πιθανώς ελάχιστα και με τα μόρια της καζεΐνης.

Όσον αφορά το ρυθμό μείωσης του pH το Σχήμα 4.115 δείχνει ότι τα δείγματα μιγμάτων των πρωτεϊνών με χαμηλή συγκέντρωση 2% ανεξάρτητα αν είχαν θερμανθεί ή όχι εμφάνισαν την ταχύτερη μείωση του pH σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα συστήματα που μελετήθηκαν και αυτό μπορεί να αποδοθεί στη μικρή συγκέντρωση των ρυθμιστικών συστημάτων στα δείγματα αυτά που δεν επιβράδυναν τη μείωση του pH στο βαθμό που επέδρασαν στα άλλα συστήματα που είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση συστατικών.



Σχήμα 4.115. Μεταβολή του pH σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής συστημάτων καζεϊνικού νατρίου-πρωτεϊνών ορού γάλακτος με ή χωρίς την προσθήκη κεφिरάνης (σε αναλογία 1:1 και τελική συγκέντρωση 2% και 4%). Κωδικοί: S, καζεϊνικό νάτριο, W, πρωτεΐνες ορού, 2% & 4%, συγκέντρωση, HT, θερμασμένο δείγμα, NH, μη θερμασμένο δείγμα, K, κεφिरάνη. Θερμοκρασία παραμονής 30°C.

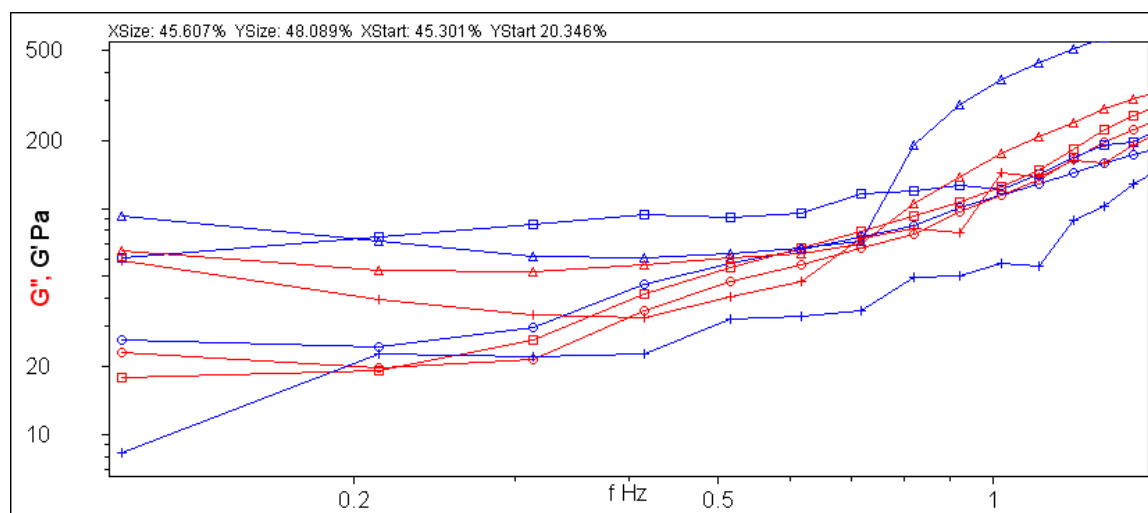
Συμπερασματικά μπορεί να αναφερθεί ότι η παρουσία της κεφिरάνης σε συστήματα μοντέλα των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο γάλα και σε συνθήκες προσομοίωσης γαλακτικής οξίνισης όχι μόνο δεν συνεργεί με τις πρωτεΐνες αλλά και τις ανταγωνίζεται αναφορικά με την προσέλκυση μορίων νερού στο άμεσο περιβάλλον των μορίων της.

4.4.2. Δυναμικές δοκιμές συστημάτων πρωτεϊνών γάλακτος και κεφίρανης

Οι δυναμικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί διεξοδικά και με συστηματικό τρόπο, αν η δομή των συστημάτων μοντέλων κεφίρανης μεταβάλλεται από την παρουσία τόσο των καζεϊνικών αλάτων όσο και των πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε ουδέτερο pH 7,0 ή σε όξινο pH 4,4 όπως επίσης και αν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία μέτρησης και από τη θέρμανση, στους 85°C για 15 min, ή όχι, των καζεϊνικών αλάτων και των πρωτεϊνών ορού.

4.4.2.1. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης

Το Σχήμα 4.116 παρουσιάζει τα μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% στους 4°C θερμασμένου και μη θερμασμένου του καζεϊνικού άλατος και σε τιμές pH 7,0 και 4,4. Όπως φαίνεται, το θερμασμένο δείγμα σε pH 7,0 εμφανίζει ιξωδοελαστικό χαρακτήρα με τιμές G' και G'' παραπλήσιες περίπου στα 20 Pa και με ανοδική τάση στις υψηλότερες τιμές συχνότητας ταλάντωσης ένδειξη ότι το σύστημα είναι σε κατάσταση ρευστού.

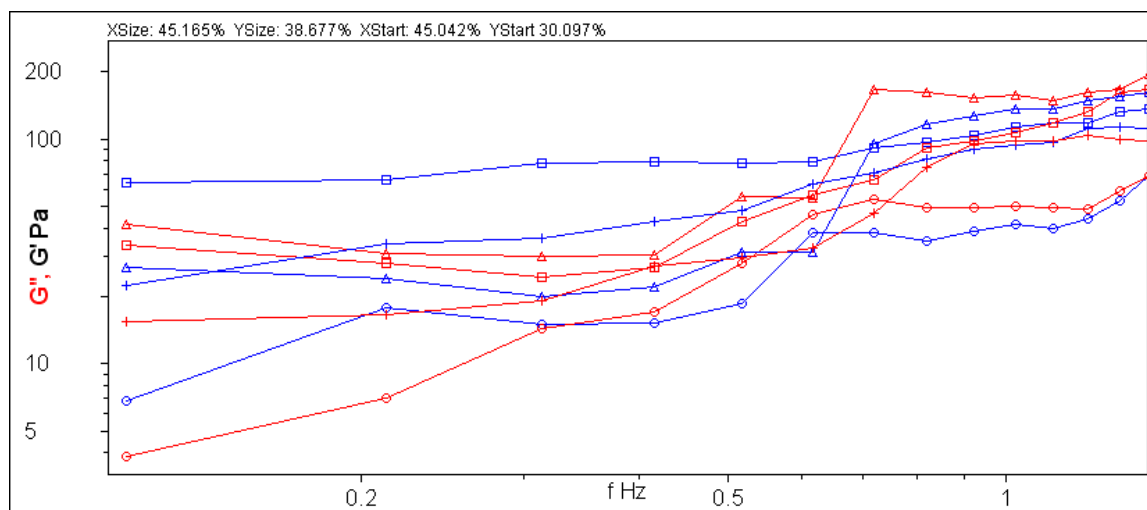


Σχήμα 4.116. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% στους 4°C. Σύμβολα: O, καζεϊνικό νάτριο θερμασμένο στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 7,0), +, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4).

Αντίθετα, σε pH 4,4 το ίδιο σύστημα εμφανίζει συμπεριφορά ασθενούς πηκτής με τον ελαστικό χαρακτήρα (G') να υπερτερεί του ιξώδους χαρακτήρα (G'') και αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι στη τιμή 4,4 που είναι κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης, το καζεϊνικό νάτριο γίνεται αδιάλυτο και δημιουργεί συσσωματώματα με αποτέλεσμα να αυξάνει ο συντελεστής ελαστικότητας.

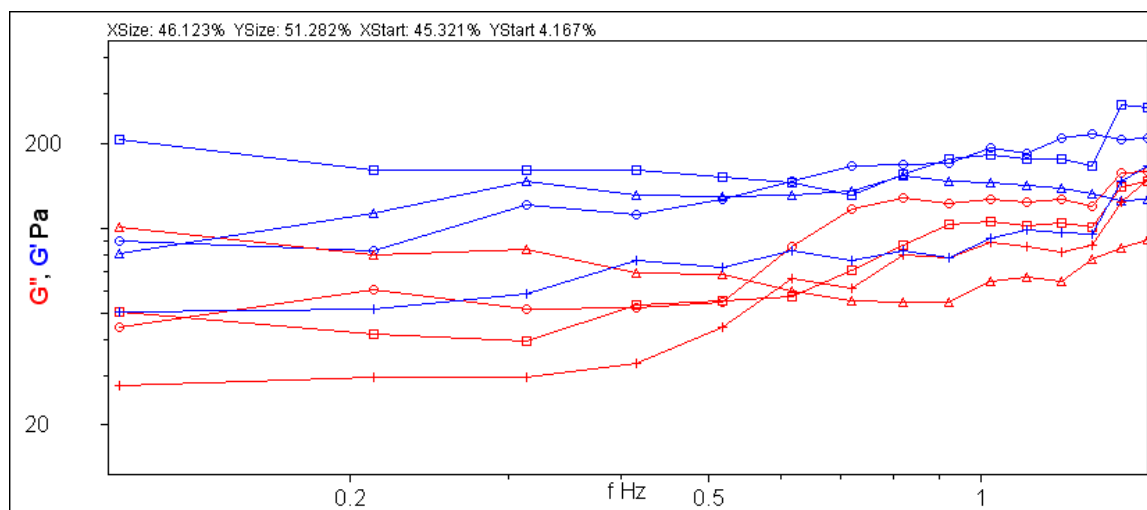
Το μη θερμασμένο δείγμα σε pH 7,0 εμφανίζει παρεμφερή συμπεριφορά με το θερμασμένο δείγμα σε pH 4,4 και αυτό πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία των αρνητικά φορτισμένων μορίων της κεφिरάνης όπου λόγω των ηλεκτροστατικών απώσεων προκαλείται αύξηση των τιμών των συντελεστών G' και G'' . Αντίθετα, σε pH 4,4 το μη θερμασμένο δείγμα εμφανίζει συμπεριφορά ρευστού, προφανώς λόγω της αποφόρτισης των μορίων της κεφिरάνης.

Στο Σχήμα 4.117 παρατηρείται ότι τα ίδια δείγματα όταν μετρήθηκαν στους 25°C, εμφάνισαν: συμπεριφορά ρευστού το δείγμα που περιείχε θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο με pH 7,0 με τιμές G' και G'' χαμηλότερες από αυτές του ίδιου δείγματος που μετρήθηκε στους 4°C γεγονός που οφείλεται στη μείωση των δεσμών υδρογόνου που είχαν σχηματιστεί στους 4°C, ενώ το θερμασμένο δείγμα που μετρήθηκε σε pH 4,4 εμφάνισε συμπεριφορά ασθενούς πηκτής με τιμές G' και G'' παραπλήσιες αυτών του δείγματος που μετρήθηκε στους 4°C. Το μη θερμασμένο δείγμα σε pH 7,0, εμφάνισε συμπεριφορά ρευστού με υψηλότερες τις τιμές του G'' απ' ότι του G' . Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι σε pH 7,0 το καζεϊνικό νάτριο δε δημιουργεί συσσωματώματα και επιπλέον στους 25°C οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των μορίων της κεφिरάνης και του νερού είναι λιγότεροι από ότι στους 4°C. Αντίθετα, το μη θερμασμένο δείγμα που μετρήθηκε σε pH 4,4, εμφάνισε συμπεριφορά πολύ ασθενούς πηκτής προφανώς λόγω της δημιουργίας συσσωματωμάτων του καζεϊνικού νατρίου αλλά με πολύ χαμηλές τιμές του G' και με τάση ανόδου στις υψηλές συχνότητες ταλάντωσης ενδεικτικό του γεγονότος ότι η δομή είναι εξαιρετικά εύθραυστη, καταρρέει, με αποτέλεσμα στις υψηλές τιμές συχνότητας οι καμπύλες του G' και του G'' να συμπίπτουν.



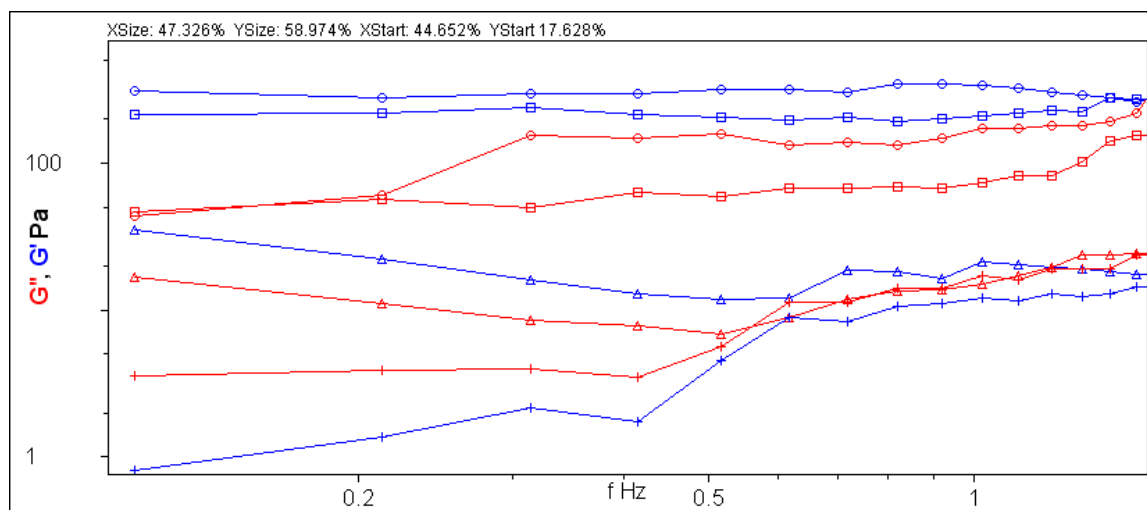
Σχήμα 4.117. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφιράνης 2% στους 25°C. Σύμβολα: O, καζεϊνικό νάτριο θερμασμένο στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 7,0), +, μη θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο (pH 4,4).

Το Σχήμα 4.118 εμφανίζει τα μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων θερμασμένου καζεϊνικού νατρίου – κεφιράνης που υπέστησαν τη διεργασία της κατάψυξης στους -18°C για 24 h και της απόψυξης στους 4°C για 24 h και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης. Παρατηρείται ότι τα δείγματα που μετρήθηκαν μετά τον πρώτο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης επιδεικνύουν συμπεριφορά πηκτής ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία μέτρησης. Αυτό σημαίνει ότι οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργήθηκαν στις χαμηλές θερμοκρασίες παρέμειναν και στις υψηλότερες. Τα δείγματα που μετρήθηκαν μετά τον δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης εξακολουθούν να εμφανίζουν συμπεριφορά πηκτής ιδιαίτερα αυτό που μετρήθηκε στους 4°C ενώ αυτό που μετρήθηκε στους 25°C εμφάνισε συμπεριφορά πολύ ασθενούς πηκτής μιας και σε υψηλές ταχύτητες ταλάντωσης οι καμπύλες των συντελεστών G' και G'' συμπίπτουν, ενδεικτικό συμπεριφοράς ρευστού.



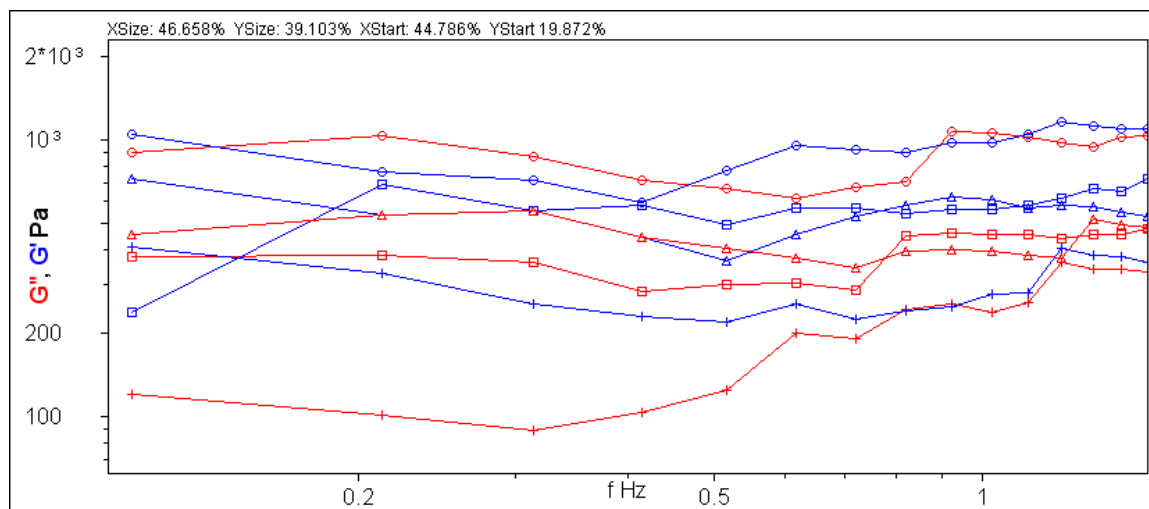
Σχήμα 4.118. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων θερμασμένου καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφिरάνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C , $\square$, μέτρηση στους 25°C , επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ , στους 4°C , +, στους 25°C .

Το Σχήμα 4.119 παρουσιάζει τα μηχανικά φάσματα συστημάτων μη θερμασμένου καζεϊνικού νατρίου – κεφिरάνης που έχουν υποστεί τη διεργασία των κύκλων κατάψυξης-απόψυξης. Παρατηρείται, ότι τα δείγματα που υπέστησαν μόνο τον πρώτο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης επιδεικνύουν συμπεριφορά πηκτής με τις ίδιες μηχανικές αντοχές ανεξάρτητα της θερμοκρασίας μέτρησης οι οποίες είναι παραπλήσιες αυτών των δειγμάτων με θερμασμένο καζεϊνικό νάτριο που υπέστησαν ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης (Σχήμα 4.118). Αντίθετα, αυτά που μετρήθηκαν μετά το δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης εμφάνισαν συμπεριφορά πολύ ασθενούς πηκτής στους 4°C ενώ στους 25°C εμφάνισαν συμπεριφορά ρευστού γεγονός που καταδεικνύει ότι η μη θέρμανση του καζεϊνικού νατρίου που, ως γνωστό, δεν υφίσταται μετουσίωση κατά τη θέρμανση όπως οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, παρ' όλα αυτά επηρεάζει τη δομή του συστήματος προφανώς σε συνδυασμό με την κεφिरάνη ώστε ιδιαίτερα μετά από επανάληψη της κατάψυξης-απόψυξης η δομή τους να αδυνατίζει και σε υψηλές θερμοκρασίες να καταρρέει επειδή στηρίζεται στην παρουσία δεσμών υδρογόνου των οποίων ο αριθμός μειώνεται στους 25°C .



Σχήμα 4.119. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων μη θερμασμένου καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C , $\square$, μέτρηση στους 25°C , επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, Δ , μέτρηση στους 4°C , +, μέτρηση στους 25°C .

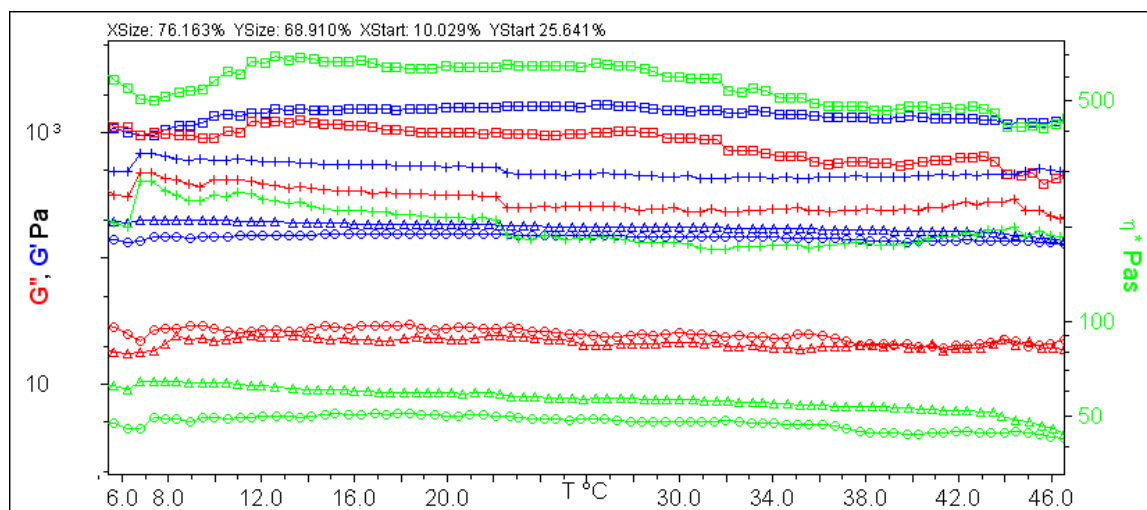
Το Σχήμα 4.120 εμφανίζει μηχανικά φάσματα δειγμάτων σε pH 4,4 που καταψύχθηκαν και αποψύχθηκαν. Τα φάσματα δείχνουν ότι όλα τα δείγματα είτε θερμασμένα είτε μη θερμασμένα εμφανίζουν κατά πολύ υψηλότερες τιμές των G' και G'' σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρασκευάστηκαν σε ουδέτερο pH (Σχήματα 4.118 & 4.119). Τα δείγματα εμφανίζουν ιξωδοελαστικό χαρακτήρα ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία θέρμανσης και οι τιμές των G' είναι υψηλότερες στους 4°C από εκείνες στους 25°C προφανώς λόγω της παρουσίας περισσότερων δεσμών υδρογόνου στη χαμηλή θερμοκρασία από ότι στην υψηλή. Οι υψηλές τιμές των μηχανικών παραμέτρων οφείλονται στη δημιουργία συσσωματωμάτων των μορίων του καζεϊνικού νατρίου που είναι πιθανό κατά τον κύκλο της κατάψυξης-απόψυξης να έγιναν μεγαλύτερα και διατηρήθηκαν μετά την απόψυξη. Η ερμηνεία αυτή υποστηρίζεται και από τις φωτογραφίες δειγμάτων που ελήφθησαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser (confocal laser scanning microscope) όπου φαίνεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων στα δείγματα που παρασκευάστηκαν σε pH 4,4 (Σχήμα 4.158) σε σχέση με αυτά που παρασκευάστηκαν σε pH 7,0 (Σχήμα 4.155) όπου η δομή δεν εμφανίζει συσσωματώματα.



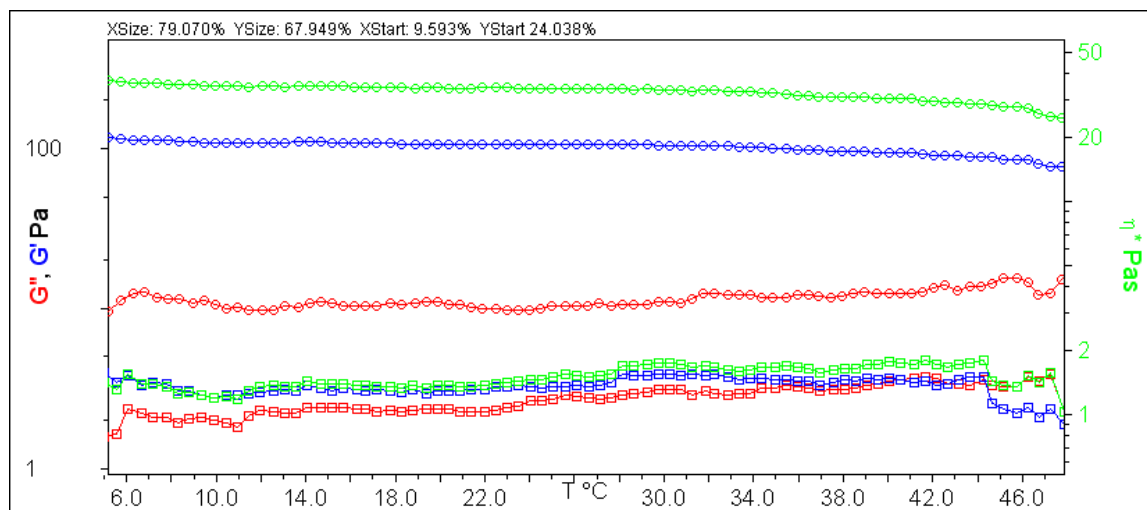
Σχήμα 4.120. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 4,4. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μέτρηση στους 4°C , □, μέτρηση στους 25°C , μη θερμασμένο δείγμα, Δ, μέτρηση στους 4°C , +, μέτρηση στους 25°C .

Η διαφοροποίηση των μηχανικών ιδιοτήτων των δειγμάτων είναι ακόμη πιο εμφανής στο Σχήμα 4.121 όπου τα δείγματα που παρασκευάστηκαν σε pH 4,4 είχαν υψηλότερες τιμές μηχανικών παραμέτρων σε σχέση με εκείνα που παρασκευάστηκαν σε pH 7,0 και μάλιστα αυτές του θερμασμένου ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του μη θερμασμένου. Γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι η θέρμανση των καζεϊνικών αλάτων επηρεάζει τις ιδιότητες τους τουλάχιστο ως ένα βαθμό.

Το Σχήμα 4.122, παρουσιάζει τη μηχανική σταθερότητα του θερμασμένου δείγματος με pH 7,0 που έχει υποστεί τη διεργασία της κατάψυξης-απόψυξης σε δύο επαναληπτικούς κύκλους και παρ' όλα αυτά οι τιμές των μηχανικών παραμέτρων παραμένουν σταθερές με αυτές που είχε μετά από ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης σε αντίθεση με το μη θερμασμένο δείγμα του οποίου η δομή έχει καταρρεύσει όπως δείχνει η σύγκριση των τιμών των μηχανικών παραμέτρων του δείγματος που έχει υποστεί ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης (Σχήμα 4.121) με το ίδιο δείγμα που έχει υποστεί δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης (Σχήμα 4.122).



Σχήμα 4.121. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφिरάνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C . Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, σε pH 7,0, $\square$, σε pH 4,4, μη θερμασμένο δείγμα, Δ , σε pH 7,0, +, σε pH 4,4.

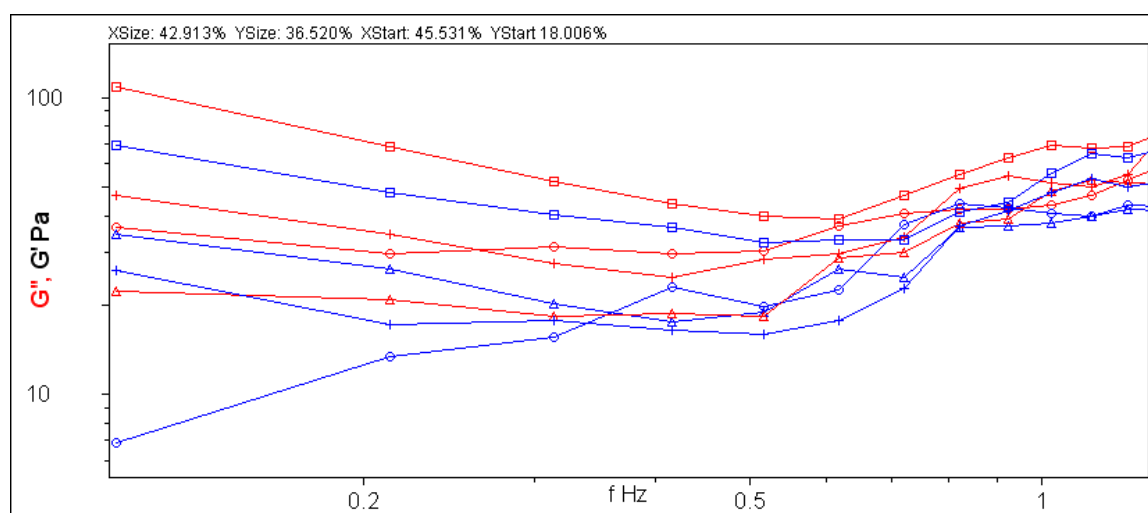


Σχήμα 4.122. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 2% - κεφिरάνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν-αποψύχθηκαν σε δύο επαναληπτικούς κύκλους. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μη θερμασμένο δείγμα, $\square$.

4.4.2.2. Συστήματα πρωτεϊνών ορού γάλακτος – κεφिरάνης

Το Σχήμα 4.123 παρουσιάζει τα μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος – κεφिरάνης, δειγμάτων με θερμασμένες πρωτεΐνες στους 85°C για 15 min και δειγμάτων με μη θερμασμένες πρωτεΐνες σε pH 7,0 ή 4,4, που μετρήθηκαν στους 4°C. Όπως παρατηρείται, όλα τα δείγματα εμφανίζουν συμπεριφορά ρευστού με τον ιξώδη χαρακτήρα να κυριαρχεί του ελαστικού, όπως αναμενότανε μιας και οι πρωτεΐνες ορού δύσκολα δημιουργούν πλέγμα, στη χαμηλή συγκέντρωση (2%) που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.

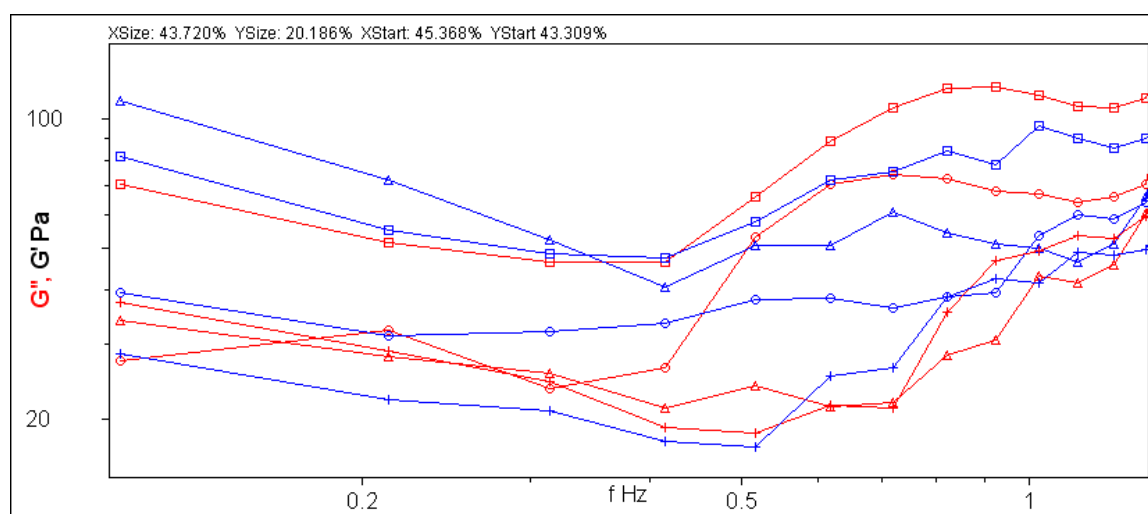
Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζουν και τα ίδια δείγματα που μετρήθηκαν στους 25°C (Σχήμα 4.124).



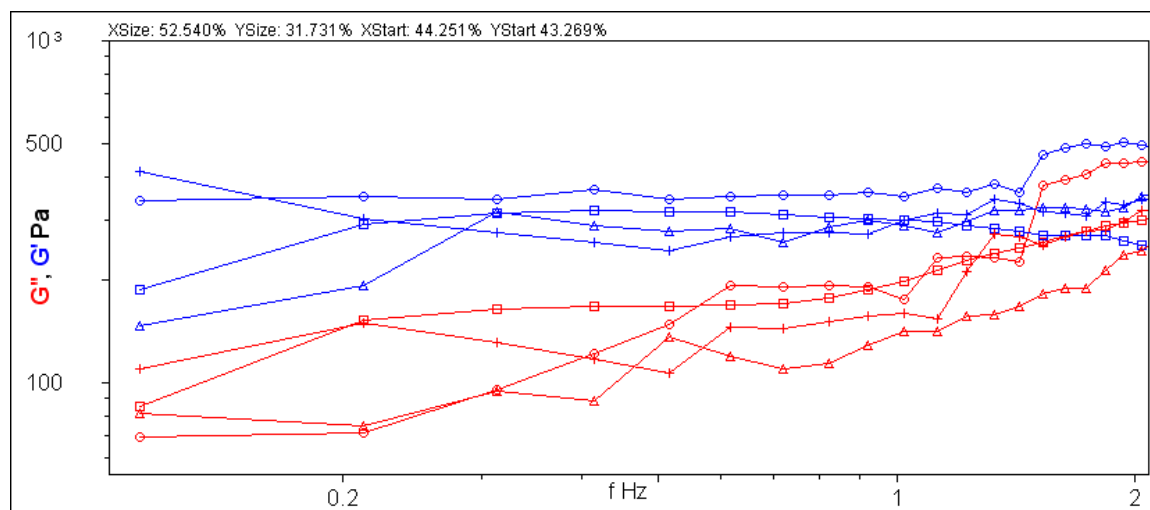
Σχήμα 4.123. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος πρωτεϊνών ορού γάλακτος 2% - κεφिरάνης 2% στους 4°C. Σύμβολα: O, πρωτεΐνες θερμασμένες στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 7,0), +, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4).

Η διεργασία των πρωτεϊνών ορού κατάψυξης στους -18°C για 24 h και απόψυξης στους 4°C για 24 h και επανάληψη του κύκλου της κατάψυξης-απόψυξης επέδρασε στη δομή των συστημάτων πρωτεϊνών ορού-κεφिरάνης όπως φαίνεται στα ακόλουθα Σχήματα. Συγκεκριμένα, στο Σχήμα 4.125 παρουσιάζονται τα μηχανικά φάσματα των θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων που παρασκευάστηκαν σε pH 7,0. Όλα τα δείγματα εμφανίζουν χαρακτήρα πηκτής, με ελαφρά υψηλότερες τιμές του συντελεστή G' αυτά που υπέστησαν ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης και μάλιστα με υψηλότερες

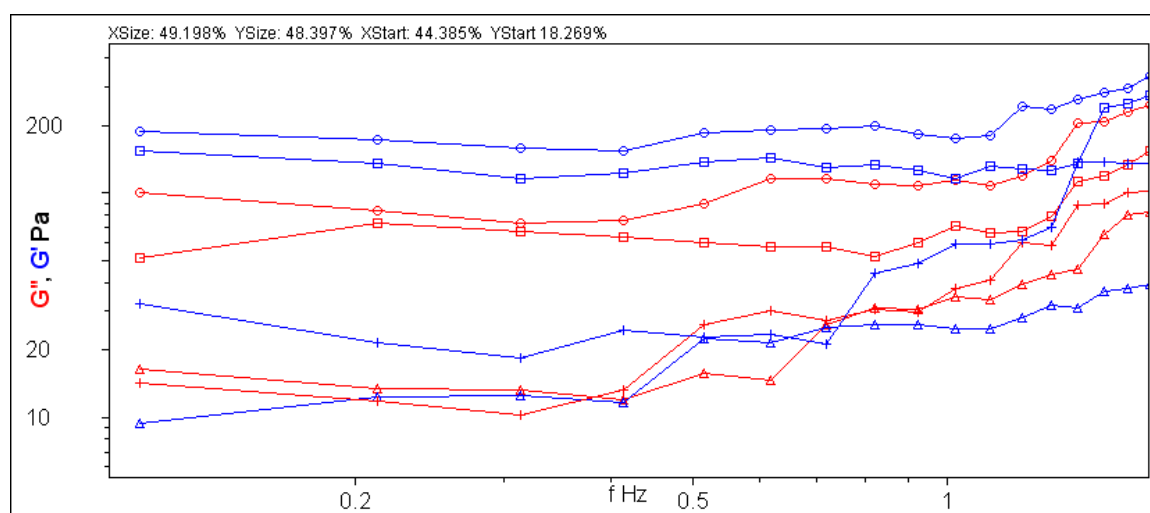
τιμές αυτά που μετρήθηκαν στους 4°C από αυτά που μετρήθηκαν στους 25°C, γεγονός που αποδεικνύει ότι η δημιουργία του πλέγματος της πηκτής οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου που προφανώς σχηματίστηκαν από τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την έκθεση χαρακτηριστικών ομάδων τους ικανών να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου. Η ερμηνεία αυτή υποστηρίζεται και από τα μηχανικά φάσματα των δειγμάτων στα οποία οι πρωτεΐνες ορού δεν υπέστησαν θέρμανση προτού να υποστούν τη διεργασία της κατάψυξης-απόψυξης. Το Σχήμα 4.126 παρουσιάζει τα μηχανικά φάσματα συστημάτων μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης που μετρήθηκαν στους 4°C και στους 25°C. Όπως φαίνεται, οι τιμές των συντελεστών G' είναι σαφώς χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των δειγμάτων με μετουσιωμένες πρωτεΐνες και επιπλέον τα δείγματα που υπέστησαν και δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης εμφάνισαν πολύ χαμηλές τιμές και μάλιστα φαίνεται να συμβαίνει κατάρρευση της δομής. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στη δημιουργία πολύ λίγων δεσμών υδρογόνου μιας και οι πρωτεΐνες δεν ήταν μετουσιωμένες και έτσι το πλέγμα που δημιουργήθηκε κατά την κατάψυξη-απόψυξη ήταν πολύ ασθενές.



Σχήμα 4.124. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος πρωτεϊνών ορού γάλακτος 2% - κεφίρανης 2% στους 25°C. Σύμβολα: O, πρωτεΐνες θερμασμένες στους 85°C για 15 min (pH 7,0), □, θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4), Δ, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 7,0), +, μη θερμασμένες πρωτεΐνες (pH 4,4).

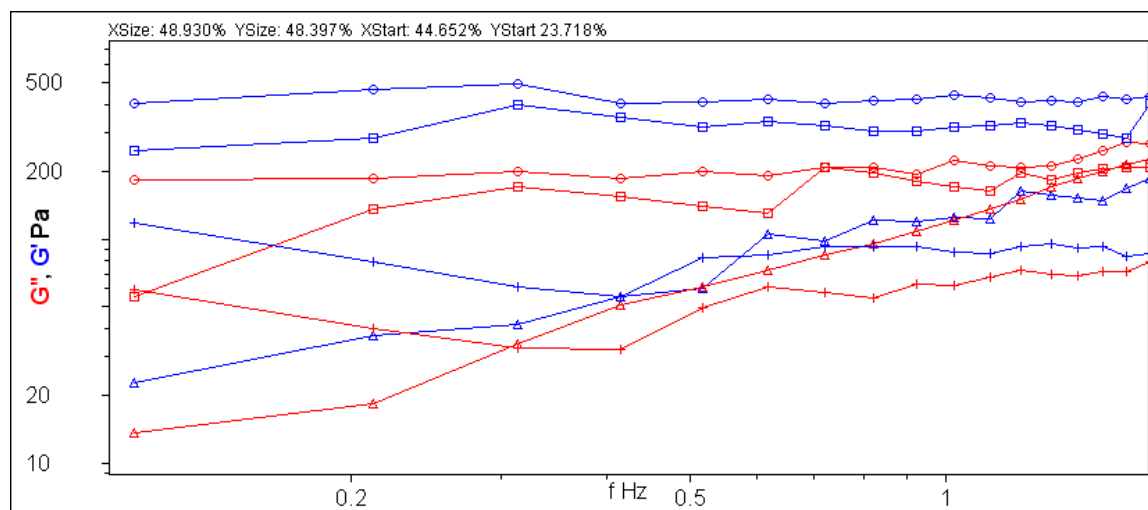


Σχήμα 4.125. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων θερμασμένων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφिरάνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C , $\square$, μέτρηση στους 25°C , επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ , στους 4°C , +, στους 25°C .



Σχήμα 4.126. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων μη θερμασμένων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφिरάνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C , $\square$, μέτρηση στους 25°C , επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ , στους 4°C , +, στους 25°C .

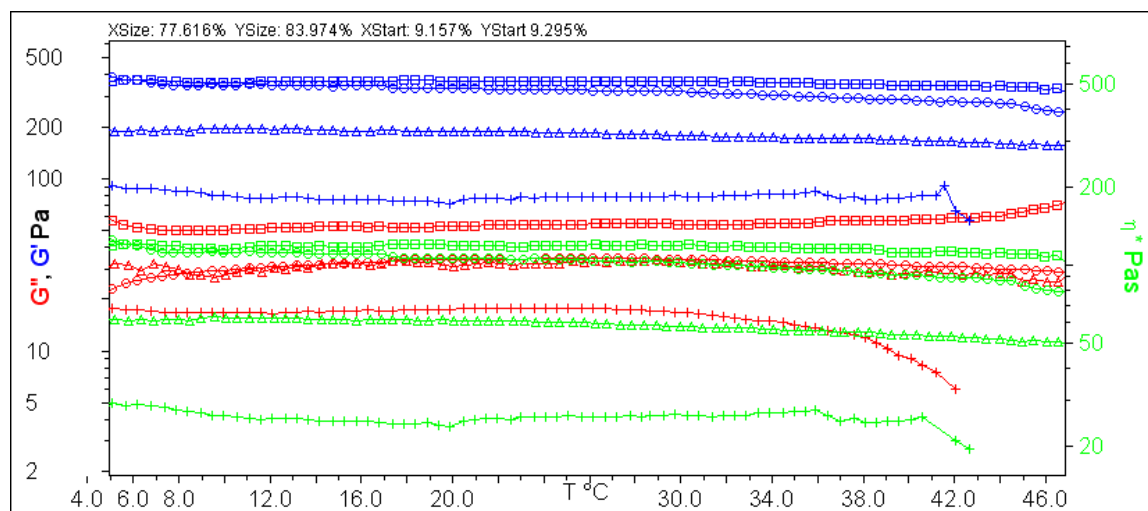
Στο Σχήμα 4.127 παρουσιάζονται τα μηχανικά φάσματα συστημάτων πρωτεϊνών ορού-κεφίρανης που παρασκευάστηκαν σε pH 4,4, και είτε οι πρωτεΐνες είχαν μετουσιωθεί είτε όχι, ενώ όλα τα δείγματα υπέστησαν ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C για 24 h, απόψυξης στους 4°C για 24 h και μετρήθηκαν είτε στους 4°C είτε στους 25°C . Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα εμφανίζουν συμπεριφορά πηκτής όπου τις υψηλότερες τιμές του G' έχουν τα θερμασμένα δείγματα σε σχέση με τα μη θερμασμένα. Επίσης, παρατηρείται ότι τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 4°C εμφάνισαν υψηλότερες τιμές G' σε σχέση με αυτά που μετρήθηκαν στους 25°C και πάλι αυτό αποτελεί απόδειξη ότι οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες δημιουργούν πλέγματα με δεσμούς υδρογόνου.



Σχήμα 4.127. Μηχανικά φάσματα συχνότητας ταλάντωσης συστημάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος 2% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 4,4. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μέτρηση στους 4°C , $\square$, μέτρηση στους 25°C , μη θερμασμένο δείγμα, Δ , μέτρηση στους 4°C , +, μέτρηση στους 25°C .

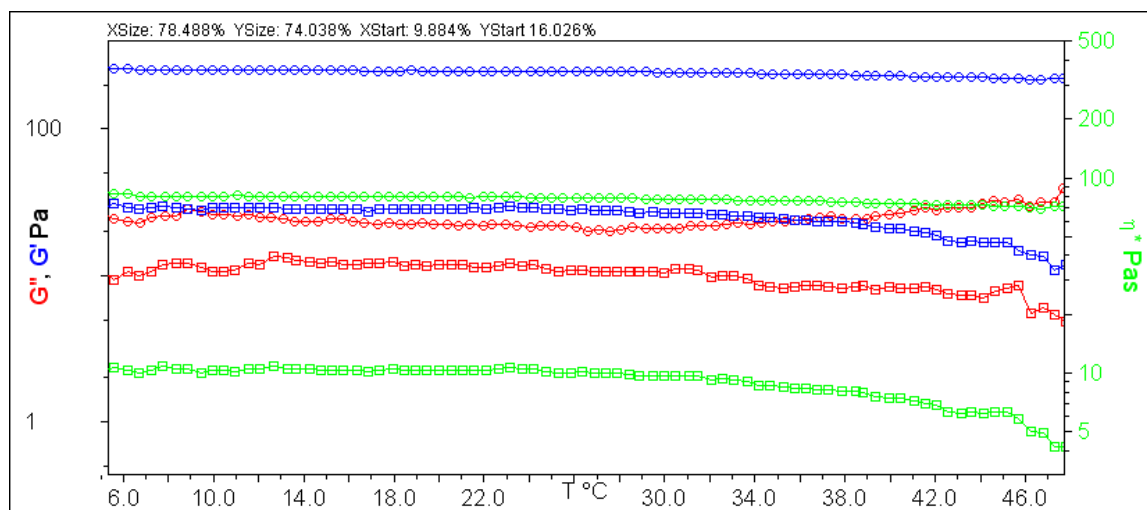
Στο Σχήμα 4.128, παρουσιάζονται τα μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης συστημάτων πρωτεϊνών ορού - κεφίρανης που υπέστησαν κατάψυξη-απόψυξη. Παρατηρείται ότι τα δείγματα των οποίων οι πρωτεΐνες υπέστησαν μετουσίωση εμφάνισαν υψηλότερες τιμές του συντελεστή G' ανεξάρτητα της τιμής pH που παρασκευάστηκαν σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα των οποίων οι πρωτεΐνες δεν υπέστησαν θερμική μετουσίωση. Όλα τα δείγματα εμφάνισαν μηχανική

σταθερότητα σε όλο το εύρος των τιμών θερμοκρασίας που μετρήθηκαν. Επιπλέον, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν τη σημασία της μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού για τον σχηματισμό του πλέγματος της πηκτής.



Σχήμα 4.128. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C . Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, σε pH 7,0, $\square$, σε pH 4,4, μη θερμασμένο δείγμα, Δ , σε pH 7,0, +, σε pH 4,4.

Στο Σχήμα 4.129 παρουσιάζονται τα μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης συστημάτων πρωτεϊνών ορού-κεφιράνης που υπέστησαν δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Παρατηρείται ότι οι τιμές του συντελεστή G' τόσο του δείγματος του οποίου οι πρωτεΐνες είχαν μετουσιωθεί όσο και εκείνου που οι πρωτεΐνες δεν είχαν θερμανθεί έχουν χαμηλότερες τιμές από εκείνες των δειγμάτων που υπέστησαν μόνο ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης και αυτό αποτελεί ένδειξη ότι έχει επέλθει κατάρρευση μέρους της δομής μετά τον δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.

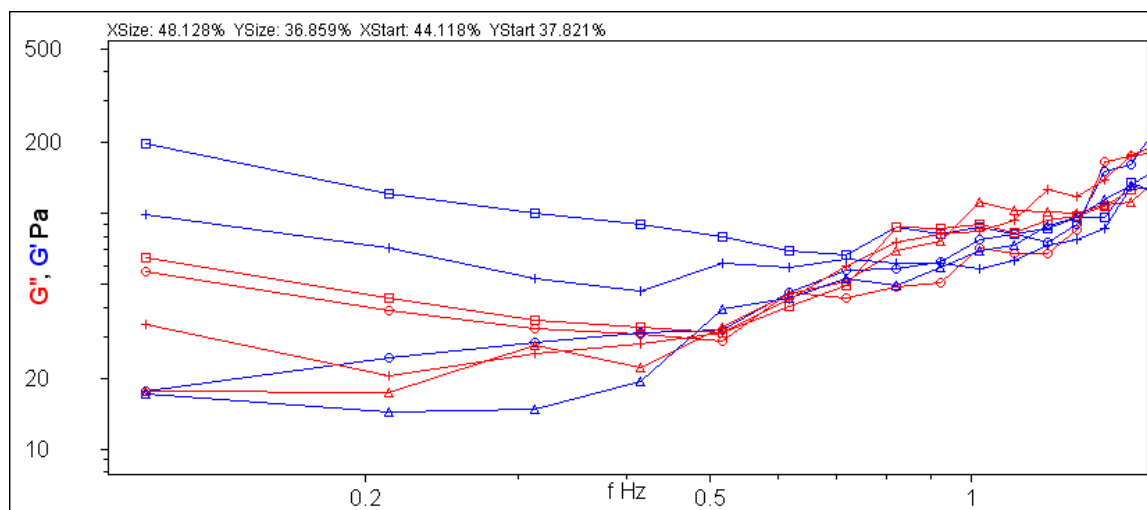


Σχήμα 4.129. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων πρωτεϊνών ορού 2% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν-αποψύχθηκαν σε δύο επαναληπτικούς κύκλους. Σύμβολα: θερμοασμένο δείγμα, O, μη θερμοασμένο δείγμα, □.

4.4.2.3. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφιράνης

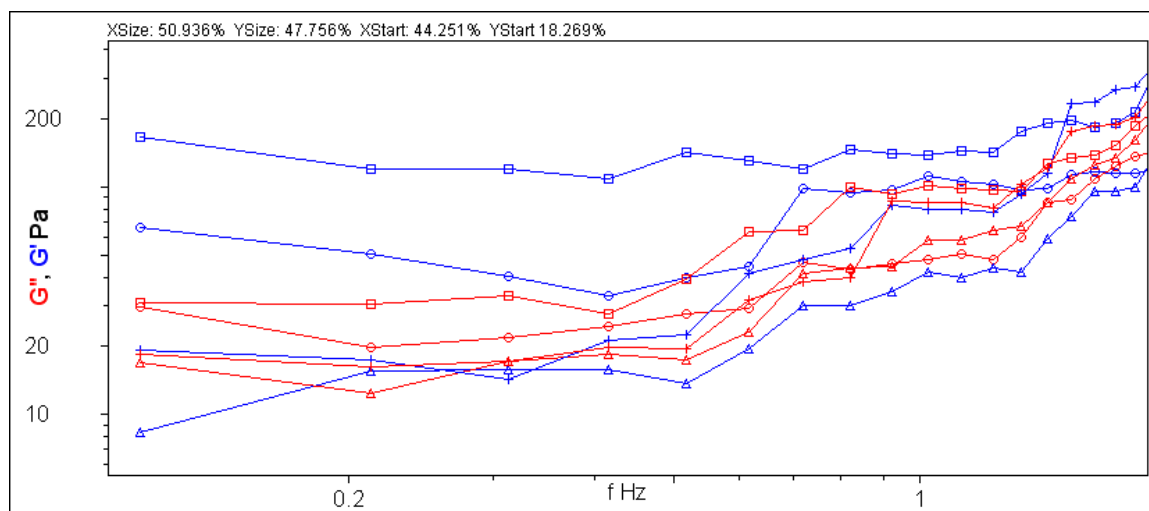
Για να κατανοηθεί καλύτερα η επίδραση της προσθήκης κεφιράνης στις μηχανικές ιδιότητες συστημάτων καζεϊνικών αλάτων-πρωτεϊνών ορού γάλακτος μελετήθηκε πρώτα, η μηχανική συμπεριφορά των συστημάτων καζεϊνικών αλάτων-πρωτεϊνών ορού χωρίς την προσθήκη κεφιράνης και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στο Σχήμα 4.130.

Παρατηρείται ότι σε αυτές τις χαμηλές συγκεντρώσεις τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 25°C είτε ήταν θερμοασμένα είτε όχι εμφανίζουν στις χαμηλές συχνότητες ταλάντωσης ελαστικό χαρακτήρα ο οποίος όμως ταχύτατα μειώνεται, ένδειξη κατάρρευσης της δομής με αποτέλεσμα σε υψηλότερες συχνότητες να εμφανίζει χαρακτήρα ρευστού, τον οποίο εμφανίζουν εξ' αρχής, τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 4°C. Η συμπεριφορά αυτή αποτελεί ένδειξη ότι στο σύστημα καζεϊνης-πρωτεϊνών ορού αναπτύσσονται, σε pH 7,0 οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις οι οποίες λόγω του εντροπικού τους χαρακτήρα κυριαρχούν στις υψηλότερες θερμοκρασίες ενώ περιορίζονται στις χαμηλότερες και επειδή είναι χαμηλής ισχύος εύκολα υπερνικούνται κατά την παραμόρφωση του δείγματος και έτσι η όποια δομή έχει σχηματισθεί, καταρρέει.

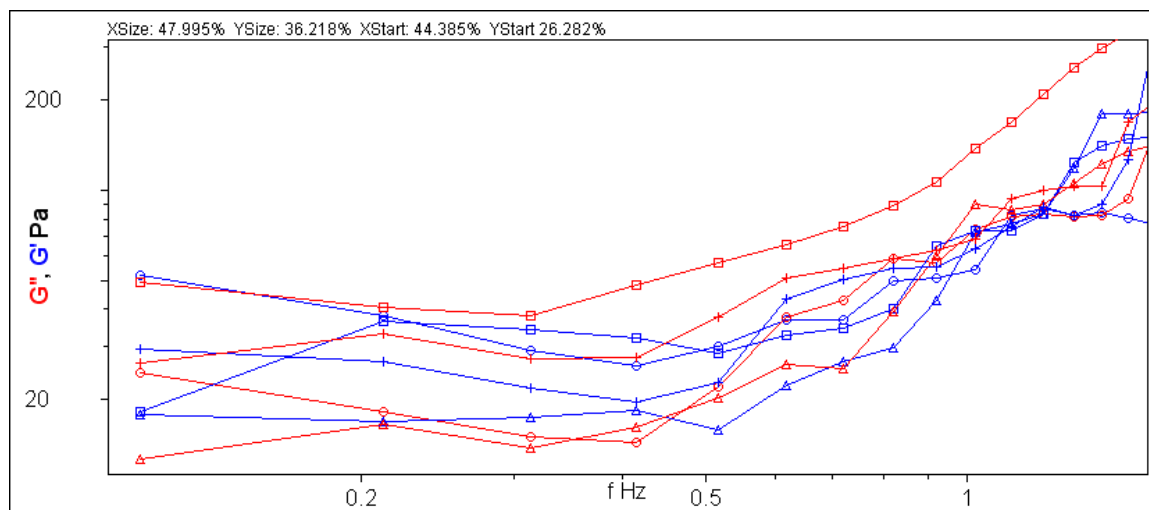


Σχήμα 4.130. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% σε pH 7,0. Σύμβολα: δείγμα θερμασμένο στους 85°C για 15 min, O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.

Το Σχήμα 4.131 παρουσιάζει τα φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου-πρωτεϊνών ορού γάλακτος και κεφίρανης όπου τα πρωτεϊνικά συστατικά είτε έχουν θερμανθεί στους 85°C για 15 min είτε όχι, επίσης τα δείγματα μελετήθηκαν σε δύο pH 7,0 και 4,4. Παρατηρείται, ότι το θερμασμένο δείγμα με pH 4,4 εμφανίζει χαρακτηριστικά πηκτής με τιμή του συντελεστή G' περίπου στα 180 Pa, ενώ το επίσης θερμασμένο δείγμα με pH 7,0 εμφανίζει χαρακτηριστικά ασθενούς πηκτής με τιμή του G' περίπου στα 65 Pa. Αντίθετα, τα μη θερμασμένα δείγματα εμφανίζουν χαρακτηριστικά ρευστού με χαμηλές τιμές αμφοτέρων των συντελεστών G' και G'' . Τα αποτελέσματα δείχνουν την επίδραση τόσο των καζεϊνικών όσο και των πρωτεϊνών ορού στα μηχανικά χαρακτηριστικά του συστήματος όπου η χαμηλή τιμή pH 4,4 προκαλεί τη συσσωμάτωση των καζεϊνικών ενώ η μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού συντελεί στην δημιουργία δεσμών υδρογόνου που ενισχύουν την μηχανική αντοχή του πλέγματος που δημιουργείται. Αντίθετα, τα μηχανικά φάσματα των ίδιων συστημάτων (Σχήμα 4.132) που μετρήθηκαν στους 25°C εμφανίζουν όλα, ανεξάρτητα αν είναι θερμασμένα ή όχι ή αν το pH τους είναι όξινο ή ουδέτερο, συμπεριφορά ρευστού γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι το πλέγμα που όπως προαναφέρθηκε ότι δημιουργείται σε θερμοκρασία 4°C (Σχήμα 4.131) είναι ενθαλπικής φύσης και οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου.

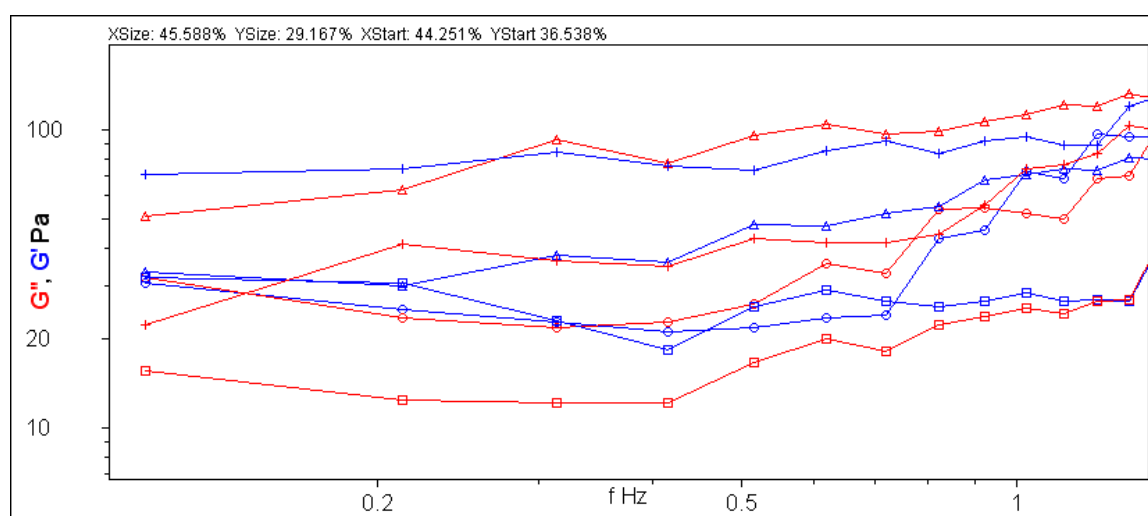


Σχήμα 4.131. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφιράνης 2% στους 4°C. Σύμβολα: πρωτεϊνικά συστατικά θερμασμένα στους 85°C για 15 min, O, (pH 7,0), □, (pH 4,4), μη θερμασμένα συστατικά, Δ, (pH 7,0), +, (pH 4,4).



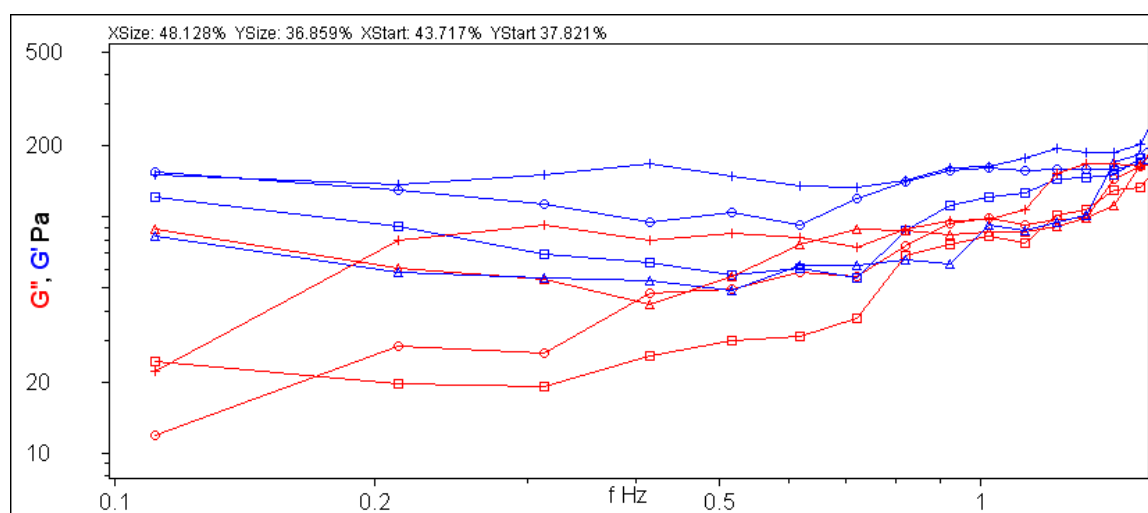
Σχήμα 4.132. Μηχανικά φάσματα σάρωσης συχνοτήτων ταλάντωσης συστήματος καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφιράνης 2% στους 25°C. Σύμβολα: πρωτεϊνικά συστατικά θερμασμένα στους 85°C για 15 min, O, (pH 7,0), □, (pH 4,4), μη θερμασμένα συστατικά, Δ, (pH 7,0), +, (pH 4,4).

Το Σχήμα 4.133 παρουσιάζει τα μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου - πρωτεϊνών ορού γάλακτος - κεφιράνης τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0, με τον κύκλο κατάψυξης-απόψυξης να επαναλαμβάνεται. Παρατηρείται ότι παρά το γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά συστατικά θερμάνθηκαν στους 85°C για 15 min, τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 4°C ανεξάρτητα αν υπέστησαν ένα ή δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης εμφάνισαν συμπεριφορά ρευστού σε αντίθεση με τα αντίστοιχα δείγματα που μετρήθηκαν στους 25°C που εμφάνισαν συμπεριφορά ασθενούς πηκτής, αυτό που υπέστη ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης και ισχυρότερης πηκτής, αυτό που υπέστη δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Όπως προαναφέρθηκε, σε pH 7,0 δεν σχηματίζονται συσσωματώματα των καζεϊνικών αλάτων οπότε η κύρια συνεισφορά στην ανάπτυξη της δομής του συστήματος προέρχεται από τις πρωτεΐνες ορού και την κεφιράνη με την ύπαρξη ηλεκτροστατικών απώσεων και μικρού αριθμού δεσμών υδρογόνου ενώ στους 25°C κυριαρχούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 25°C να επιδεικνύουν συμπεριφορά πηκτής.



Σχήμα 4.133. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφιράνης 2% τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C , □, μέτρηση στους 25°C , επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και μέτρησης, Δ, στους 4°C , +, στους 25°C . Τα πρωτεϊνικά συστατικά θερμάνθηκαν στους 85°C για 15 min.

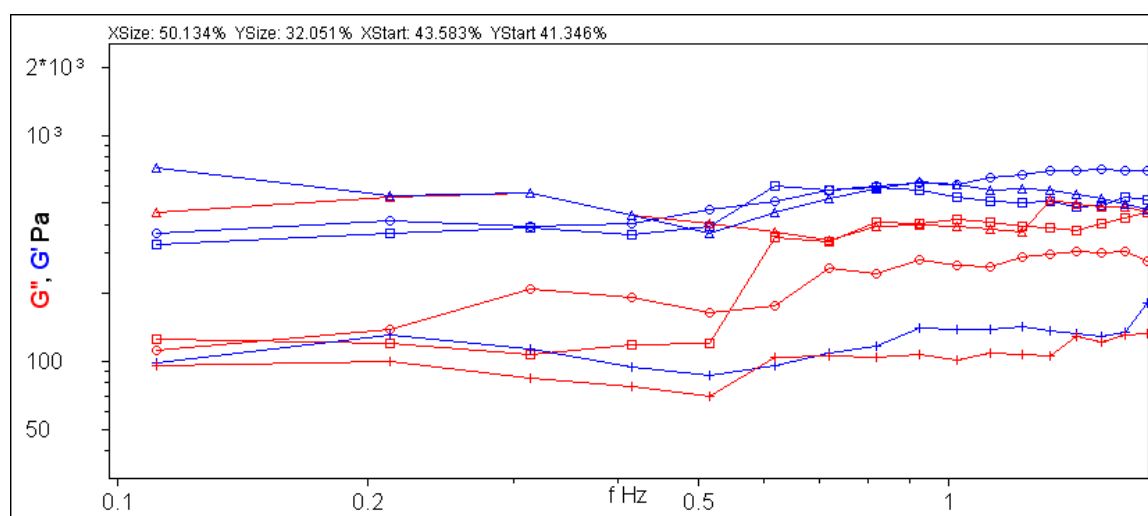
Στο Σχήμα 4.134 εμφανίζονται τα φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου - πρωτεϊνών ορού γάλακτος - κεφίρανης τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0, με τον κύκλο κατάψυξης-απόψυξης να επαναλαμβάνεται. Τα πρωτεϊνικά συστατικά δεν υπέστησαν θέρμανση. Παρατηρείται, ότι τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 25°C εμφανίζουν συμπεριφορά πηκτής ανεξάρτητα από τους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης που υπέστησαν, γεγονός που οφείλεται τόσο στην ανάπτυξη των ηλεκτροστατικών απώσεων των μορίων της κεφίρανης όπως επίσης και στην ανάπτυξη των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του συστήματος. Επίσης και το δείγμα που μετρήθηκε στους 4°C και υπέστη ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης εμφάνισε συμπεριφορά πηκτής ενώ το αντίστοιχο δείγμα που μετρήθηκε στους 4°C και έχει υποστεί δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης εμφάνισε συμπεριφορά ρευστού.



Σχήμα 4.134. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων μη θερμασμένων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% -κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C , σε pH 7,0. Σύμβολα: O, μέτρηση στους 4°C , □, μέτρηση στους 25°C , επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, Δ, μέτρηση στους 4°C , +, μέτρηση στους 25°C .

Στην περίπτωση των συστημάτων που παρασκευάστηκαν σε pH 4,4 και υπέστησαν ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης το Σχήμα 4.135 εμφανίζει τα μηχανικά φάσματα θερμασμένων και μη θερμασμένων δειγμάτων που μετρήθηκαν στους 4°C ή στους 25°C . Παρατηρείται ότι τα θερμασμένα δείγματα επιδεικνύουν συμπεριφορά

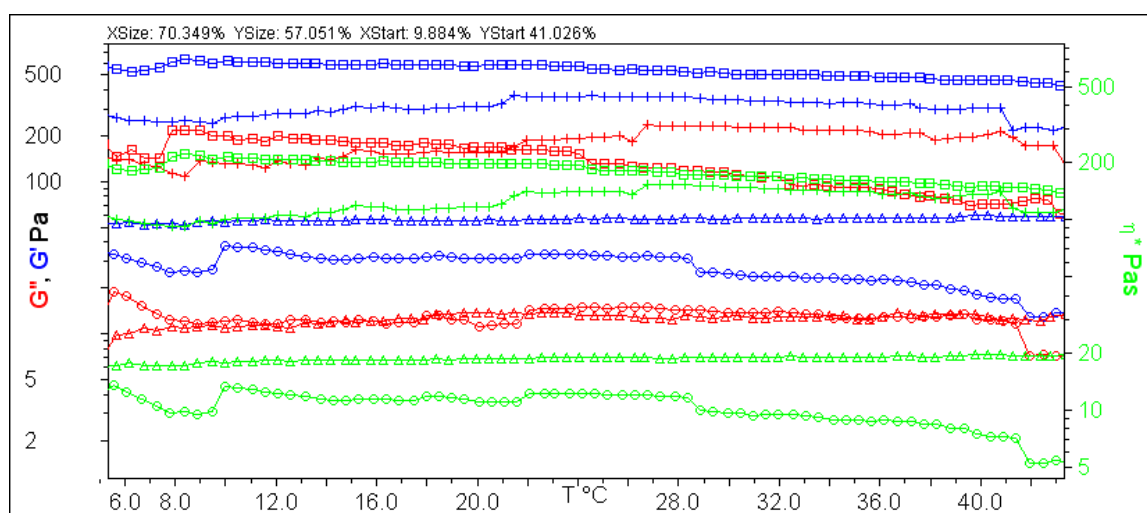
πηκτής και μάλιστα σχετικά ισχυρής με τιμές του G' περίπου 350 Pa ανεξάρτητα της θερμοκρασίας μέτρησης και αυτό οφείλεται τόσο στη δημιουργία των συσσωματωμάτων της καζεΐνης που όπως προαναφέρθηκε συμβαίνει σε όξινες τιμές pH όσο και στην δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού και των καζεϊνικών αλάτων. Αντίθετα, στα μη θερμασμένα δείγματα κυριαρχεί ο χαρακτήρας ρευστού ιδιαίτερα στο δείγμα που μετρήθηκε στους 25°C λόγω προφανώς της μείωσης των δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 4.135. Μηχανικά φάσματα συχνοτήτων ταλάντωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού γάλακτος 1% - κεφίρανης 2%, τα οποία καταψύχθηκαν στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C, σε pH 4,4. Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, μέτρηση στους 4°C, □, μέτρηση στους 25°C, μη θερμασμένο δείγμα, Δ, μέτρηση στους 4°C, +, μέτρηση στους 25°C.

Το Σχήμα 4.136 εμφανίζει τα μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης συστημάτων καζεϊνικού νατρίου - πρωτεϊνών ορού - κεφίρανης τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C. Παρατηρείται ότι το δείγμα του οποίου τα πρωτεϊνικά συστατικά είχαν θερμανθεί στους 85°C για 15 min και παρασκευάστηκε σε pH 4,4 εμφανίζει συμπεριφορά ισχυρής πηκτής γεγονός αναμενόμενο γιατί όπως προαναφέρθηκε σε όξινο περιβάλλον σχηματίζονται συσσωματώματα της καζεΐνης και επιπλέον λόγω της θερμικής μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμμετεχόντων στο σύστημα μεγαλομορίων. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και το μη θερμασμένο δείγμα που παρασκευάστηκε σε όξινο περιβάλλον με τη διαφορά ότι η τιμή του συντελεστή

G' είναι υποδιπλάσια του αντίστοιχου θερμασμένου δείγματος και αυτό οφείλεται στην απουσία ικανού αριθμού δεσμών υδρογόνου λόγω της μη μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού που θα ενίσχυαν τη μηχανική αντοχή του πλέγματος. Όσον αφορά τα δείγματα που παρασκευάστηκαν σε ουδέτερο pH εμφάνισαν σαφώς πιο χαμηλές τιμές του συντελεστή G', περίπου κατά μία τάξη μεγέθους, από τα αντίστοιχα δείγματα που παρασκευάστηκαν σε όξινο περιβάλλον και αυτό αποδεικνύει τη σημασία που έχει αφ' ενός η θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού όσο και η οξίνιση των καζεϊνικών, στην δημιουργία ισχυρού πλέγματος πηκτής το οποίο παραμένει σταθερό για ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών χωρίς να καταρρέει.



Σχήμα 4.136. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης σε συχνότητα ταλάντωσης 0,1 Hz, συστημάτων καζεϊνικού νατρίου 1% - πρωτεϊνών ορού 1% - κεφίρανης 2% τα οποία καταψύχθηκαν για 24 h στους -18°C και αποψύχθηκαν στους 4°C . Σύμβολα: θερμασμένο δείγμα, O, σε pH 7,0, $\square$, σε pH 4,4, μη θερμασμένο δείγμα, Δ , σε pH 7,0, +, σε pH 4,4.

Συμπερασματικά, μπορεί να αναφερθεί ότι οι μηχανικές ιδιότητες των συστημάτων πρωτεϊνικών συστατικών του γάλακτος-κεφίρανης επηρεάζονται κατά κύριο λόγο από τις διεργασίες που υφίστανται οι πρωτεΐνες όπως η οξίνιση οπότε δημιουργούνται συσσωματώματα των καζεϊνικών ή όπως η θέρμανση η οποία προκαλεί τη μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού και κατά δεύτερο λόγο από την παρουσία των μορίων της κεφίρανης. Οι κρυοπηκτές που δημιουργούνται εμφανίζουν

αξιοσημείωτη θερμική σταθερότητα σ' όλο το εύρος των τιμών θερμοκρασίας που μελετήθηκαν και επιπλέον είναι δυνατό να σχηματιστούν κρυοπηκτές με καθορισμένες εκ των προτέρων μηχανικές ιδιότητες με τη χρήση συνδυασμού πειραματικών συνθηκών (θέρμανση, pH, συγκεντρώσεις συστατικών) για την επίτευξη του επιδιωκόμενου αποτελέσματος.

4.4.3. Δοκιμές ερπυσμού συστημάτων πρωτεϊνών γάλακτος και κεφίρανης

Η δοκιμή ερπυσμού χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω μελέτη της δομής των συστημάτων πρωτεϊνών γάλακτος –κεφίρανης ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για τη φύση των δεσμών που συνυπάρχουν σε αυτά και το πως το κάθε συστατικό επηρεάζει τη δομή.

4.4.3.1. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – κεφίρανης

Ο Πίνακας 4.9 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των πειραμάτων ερπυσμού χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από την καμπύλη ανάκαμψης (recovery) που θεωρούνται πολύ περισσότερο αξιόπιστα από εκείνα της καμπύλης έρπυσης.

Παρατηρείται (Πίνακας 4.9) ότι ο συντελεστής στιγμιαίας ελαστικότητας G_g , του οποίου η τιμή αποτελεί κριτήριο για την ύπαρξη ισχυρών δευτερευόντων δεσμών, οι οποίοι κατά την εφαρμογή διατμητικής τάσης υφίστανται τάνυση χωρίς κατ' ουσία να διαρραγούν και μετά την άρση της διάτμησης, επανέρχονται στη πρότερη κατάσταση τους και τοπολογικά δηλ. στο ίδιο σημείο που σχηματίστηκαν. Τα δείγματα που μετρήθηκαν σε pH 4,4 (προσθήκη gdl) ιδιαίτερα σε θερμοκρασία 25°C, και επιπλέον υπέστησαν την διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές G_g που προφανώς οφείλεται στον συνδυασμό της παρουσίας των καζεϊνικών συσσωματωμάτων σε pH 4,4 και στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου κατά την κατάψυξη οι οποίοι διατηρήθηκαν και κατά την απόψυξη. Επίσης, παρατηρείται ότι η θέρμανση ή μη των καζεϊνικών αλάτων δεν επηρεάζει τη τιμή του G_g . Τα δείγματα που

δεν είχαν υποστεί τη διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης δεν εμφανίζουν τιμές G_g ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία μέτρησης που σημαίνει ότι οι δεσμοί που δημιουργήθηκαν ήταν και λίγοι και πιθανόν ασθενείς με αποτέλεσμα τη δημιουργία δομών ψευδοπηκτής. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης είναι απολύτως αναγκαία για τη δημιουργία σταθερών πηκτών. Επίσης, παρατηρείται ότι η επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης οδηγεί σε δημιουργία συστημάτων με δομές ασθενέστερες αυτών που υπέστησαν ένα μόνο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης. Οι τιμές των συντελεστών επιβραδυνόμενης ελαστικότητας είναι ανάλογες αυτών του G_g για τα αντίστοιχα δείγματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο αριθμός των δεσμών που έχουν διαρραγεί και επανασχηματιστεί πιθανώς σε άλλα σημεία του matrix της δομής είναι ανάλογος της μορφής της δομής του δείγματος δηλ. αν πρόκειται για πηκτή ή ψευδοπηκτή και μάλιστα στις πηκτές οι χρόνοι επανασχηματισμού (τ , Πίνακας 4.9) των δεσμών είναι σχετικά μικρότεροι από αυτούς που απαιτούνται για τις ψευδοπηκτές γεγονός που υποδηλώνει ότι τοπολογικά επανασχηματίζονται κοντά στο σημείο που προϋπήρχαν και μάλλον πρόκειται για σχετικά ισχυρούς δευτερεύοντες δεσμούς.

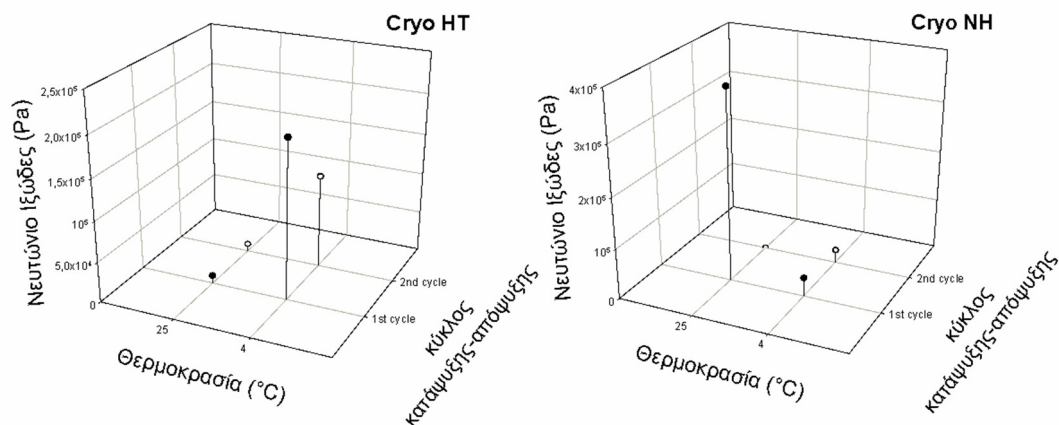
Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αυτά των δυναμικών δοκιμών για τα αντίστοιχα δείγματα.

Αναφορικά με το ιξώδες σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης η_N , τα Σχήματα 4.137, 4.138 και 4.139, δείχνουν ότι η τιμή του ιξώδους των δειγμάτων που έχουν υποστεί ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ίδιων δειγμάτων που έχουν υποστεί δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης (Σχήμα 4.137) και πλέον επηρεάζεται από τη θερμοκρασία μέτρησης και το εάν το καζεϊνικό άλας θερμάνθηκε ή όχι. Ο συνδυασμός της οξίνισης και της διαδικασίας κατάψυξης-απόψυξης (Σχήμα 4.138) αυξάνει το ιξώδες κατά πολύ σε σχέση με τα δείγματα που έχουν μόνο οξινισθεί όπως αναμενόταν. Ενώ για τα δείγματα που δεν έχουν οξινισθεί αλλά μόνο καταψυχθεί-αποψυχθεί παρατηρείται (Σχήμα 4.139) ότι το δείγμα του οποίου το καζεϊνικό άλας θερμάνθηκε εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή ιξώδους στους 4°C ενώ το μη θερμασμένο στους 25°C .

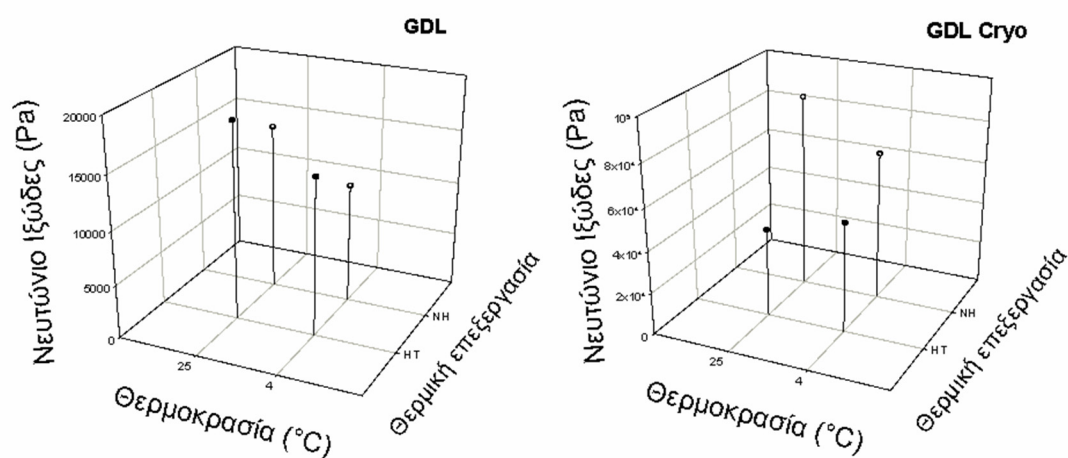
Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφειράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C (Cryo) και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, καθώς επίσης και δειγμάτων με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης με (GDL Cryo) και χωρίς (GDL) την εφαρμογή ενός κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και με την εφαρμογή (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C . Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν $0,05\text{ Pa}$.

Δείγματα	G_g (Pa)	G_1 (Pa)	τ_1 (s)	G_2 (Pa)	τ_2 (s)	G_3 (Pa)	τ_3 (s)	G_4 (Pa)	τ_4 (s)	strain
SC2%K2%HTcryo 1ος κύκλος 4°C	150,898	2402,691	5,095	663,570	22,57	619,9628	100			0,0000643
SC2%K2%HTcryo 1ος κύκλος 25°C	130,582	6775,068	0,5464	1846,722	10,72					0,001132
SC2%K2%HTcryo 2ος κύκλος 4°C	89,526	408,497	47,51							0,0000678
SC2%K2%HTcryo 2ος κύκλος 25°C	101,968	462,963	10,72							0,0009553
SC2%K2%HTcryo gdl 4°C	223,614	6480,881	1,15	388,048	100					0,0002083
SC2%K2%HTcryo gdl 25°C	328,299	4640,371	2,421	710,732	47,51					0,0000762
SC2%K2%HT gdl 4°C		85,106	0,1233	256,608	2,421	355,2398	10,72	112,752	47,51	0,000687
SC2%K2%HT gdl 25°C		64,226	0,1233	342,818	2,421	253,4854	10,72	78,864	47,51	0,0000444
SC2%K2%NHcryo 1ος κύκλος 4°C	285,633	1795,332	10,72							0,0002046
SC2%K2%NHcryo 1ος κύκλος 25°C	161,760	24473,813	5,095	632,911	22,57	913,242	100			0,0002066
SC2%K2%NHcryo 2ος κύκλος 4°C	5,618	94,518	5,095	21,867	100					0,0006436
SC2%K2%NHcryo 2ος κύκλος 25°C	5,464	234,302	0,1233	117,454	2,421	28,88504	10,72	18,546	47,51	0,03054
SC2%K2%NHcryo gdl 4°C	200,602	877,193	100							0,000003618
SC2%K2%NHcryo gdl 25°C	571,102	3176,620	0,2596	2635,741	5,095					0,000196
SC2%K2%NH gdl 4°C	95,602	82,781	0,1233	89,206	2,421	340,3676	10,72	34,518	47,51	0,0007647
SC2%K2%NH gdl 25°C		30,395	0,1233	75,245	2,421	23,72479	47,51			0,0004969

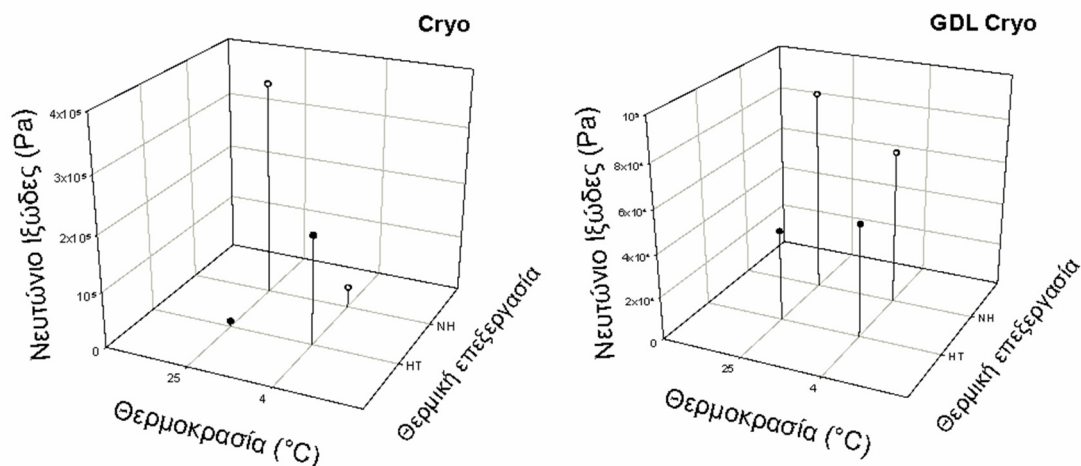
Όπου: G_g συντελεστής στιγμιαίας ελαστικότητας, $G_{1,2,3,4}$ συντελεστές επιβραδυνόμενης ελαστικότητας, $\tau_{1,2,3,4}$ χρόνοι επιβράδυνσης, strain η παραμόρφωση.



Σχήμα 4.137. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφिरάνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.

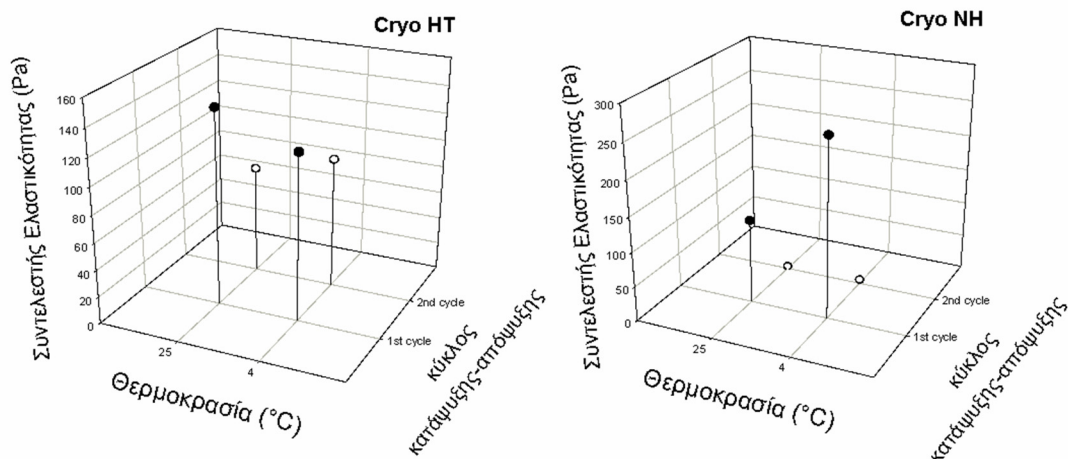


Σχήμα 4.138. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφिरάνης με την προσθήκη γλυκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.

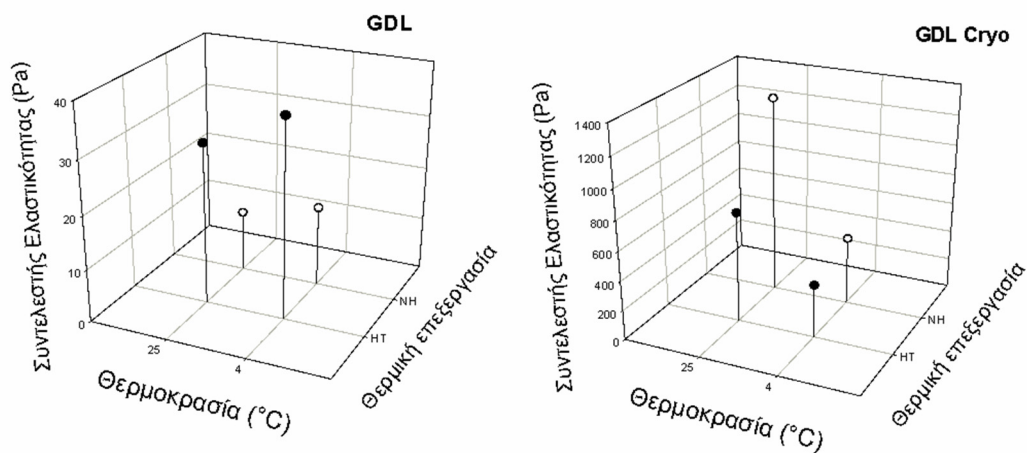


Σχήμα 4.139. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφίράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλυκονο-δ-λακτόνης.

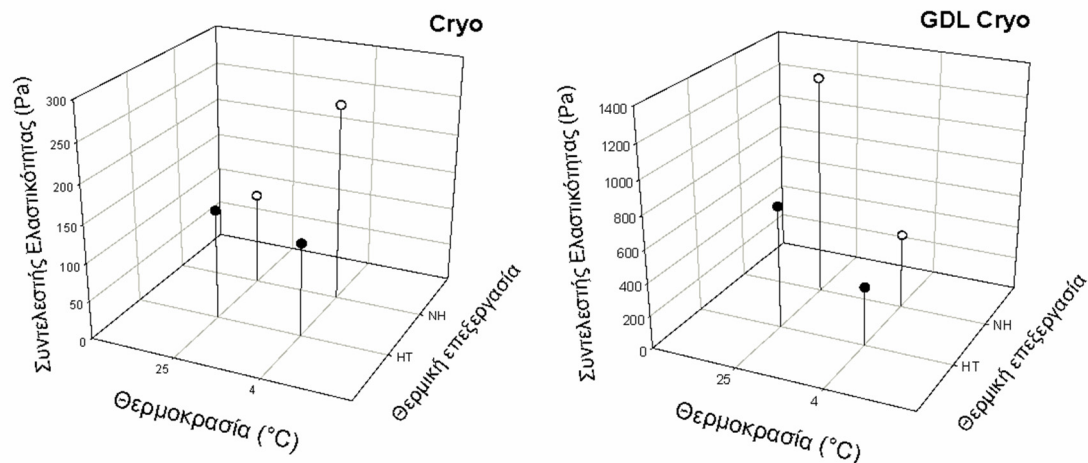
Αναφορικά με το συντελεστή ελαστικότητας και στην περίπτωση αυτή παρατηρείται (Σχήματα 4.140, 4.141 και 4.142) ότι η τιμή του είναι αυξημένη στα δείγματα που έχουν οξινισθεί και κυρίως σ' αυτά που έχουν υποστεί ένα κύκλο κατάψυξης-απόψυξης ενώ είναι χαμηλότερη στα ίδια δείγματα που έχουν υποστεί δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.



Σχήμα 4.140. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφειράνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.



Σχήμα 4.141. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφειράνης με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.



Σχήμα 4.142. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – κεφिरάνης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.

4.4.3.2. Συστήματα πρωτεϊνών ορού γάλακτος – κεφिरάνης

Στην περίπτωση των συστημάτων αυτών όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 4.10, και όπως ήταν αναμενόμενο από προηγούμενα πειραματικά δεδομένα (Κεφάλαιο 4.3.4.) τα δείγματα που θερμάνθηκαν ώστε να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες ορού και είτε υπέστησαν τη διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης είτε της οξίνισης είτε και τα δύο μαζί εμφανίζουν υψηλότερες τιμές του συντελεστή G_e ιδιαίτερα αυτά που μετρήθηκαν στους 4°C . Δείγματα που υπέστησαν δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης εμφανίζουν υψηλότερες τιμές στους συντελεστές επιβραδυνόμενης ελαστικότητας γεγονός που υποδηλώνει ότι λόγω της εξασθένησης της δομής από τους επαναλαμβανόμενους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης ένα σημαντικό μέρος των δευτερευόντων ισχυρών δεσμών κατά την διάτμηση είχαν διαρραγεί και επανασχηματίστηκαν σε άλλα σημεία του matrix της δομής μετά από κάποιο χρονικό διάστημα (τ , χρόνος επιβράδυνσης).

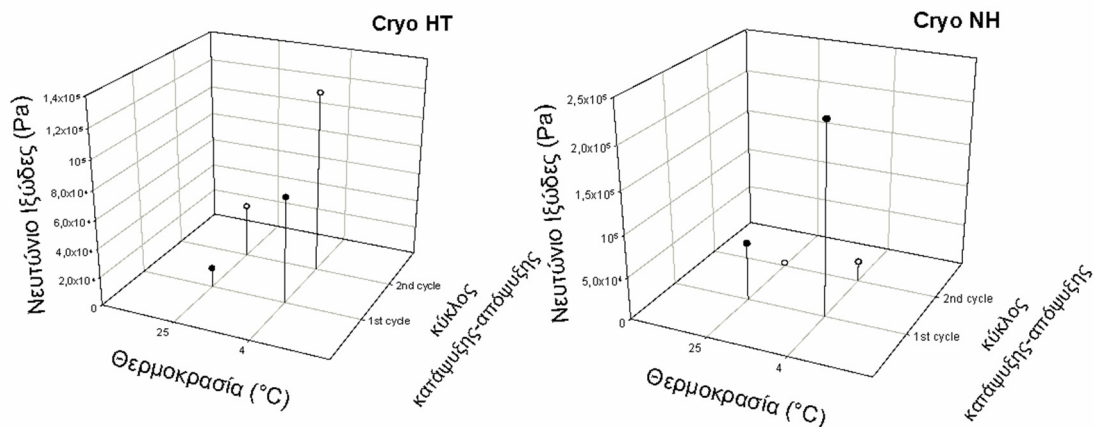
Πίνακας 4.10. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού δειγμάτων πρωτεϊνών ορού– κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C (Cryo) και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, καθώς επίσης και δειγμάτων με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης και την εφαρμογή ενός κύκλου κατάψυξης-απόψυξης (GDL Cryo) και με την εφαρμογή (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C . Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν $0,05\text{ Pa}$.

Δείγματα	G_g (Pa)	G_l (Pa)	τ_1 (s)	G_2 (Pa)	τ_2 (s)	G_3 (Pa)	τ_3 (s)	strain
WP2%K2%HTcryo 1ος κύκλος 4°C	280,426	2302,556	10,72	2367,424	47,51			0,00001994
WP2%K2%HTcryo 1ος κύκλος 25°C	37,538	941,620	1,15	91,158	100			0,001481
WP2%K2%HTcryo 2ος κύκλος 4°C	118,301	6944,444	1,15	753,580	22,57			0,0002251
WP2%K2%HTcryo 2ος κύκλος 25°C	225,887	41,203	47,51					0,001602
WP2%K2%HTcryo gdl 4°C	454,339							0,0001094
WP2%K2%HTcryo gdl 25°C	66,181	185,426	47,51					0,000774
WP2%K2%NHcryo 1ος κύκλος 4°C	205,002	5341,880	1,15	962,464	22,57	739,645	100	0,00004235
WP2%K2%NHcryo 1ος κύκλος 25°C	121,581	593,120	22,57	108,448	100			0,0001648
WP2%K2%NHcryo 2ος κύκλος 4°C	37,341	204,876	22,57					0,0001141
WP2%K2%NHcryo 2ος κύκλος 25°C	28,727	481,232	2,421					0,004671
WP2%K2%NHcryo gdl 4°C	68,166	1777,778	1,15	368,732	22,57	427,3504	100	0,0001387
WP2%K2%NHcryo gdl 25°C	39,936	1189,061	2,421	152,579	47,51			0,0002441

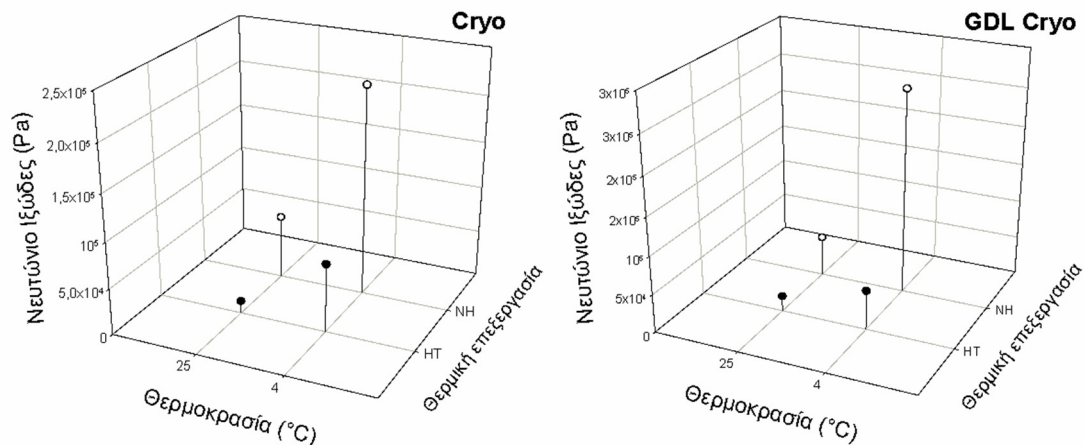
Όπου: G_g συντελεστής στιγμιαίας ελαστικότητας, $G_{1,2,3}$ συντελεστές επιβραδυνόμενης ελαστικότητας, $\tau_{1,2,3}$ χρόνοι επιβράδυνσης, strain η παραμόρφωση.

Αναφορικά με τις τιμές του ιξώδους των συστημάτων πρωτεϊνών ορού– κεφίρανης, τα Σχήματα 4.143, 4.144 και 4.145 δείχνουν ότι ανεξάρτητα από το είδος της κατεργασίας που υπέστησαν τα δείγματα θερμασμένα ή μη δηλ. ένα ή δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης ή οξίνιση, τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 4°C εμφανίζουν τιμές ιξώδους κατά πολύ υψηλότερες από εκείνες των δειγμάτων που μετρήθηκαν στους 25°C . Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της φύσης των δεσμών που επικρατούν που είναι ενθαλπική και οι δεσμοί αυτοί είναι κατά βάση δεσμοί υδρογόνου.

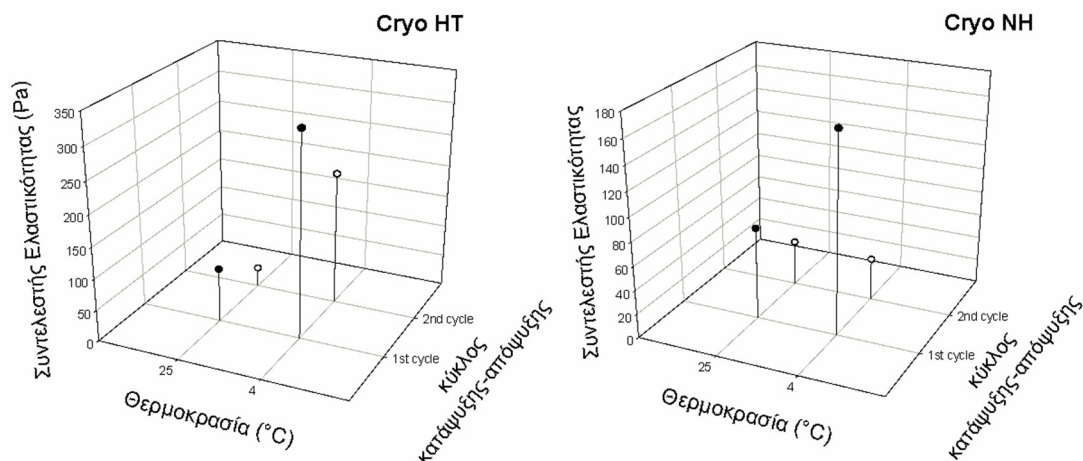
Παρόμοια τάση επικρατεί και στις τιμές του συντελεστή ελαστικότητας όπου τα δείγματα που περιείχαν μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού ανεξάρτητα από την κατεργασία που υπέστησαν, αυτά που μετρήθηκαν στους 4°C εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές από τα ίδια δείγματα που μετρήθηκαν στους 25°C (Σχήματα 4.145 και 4.146).



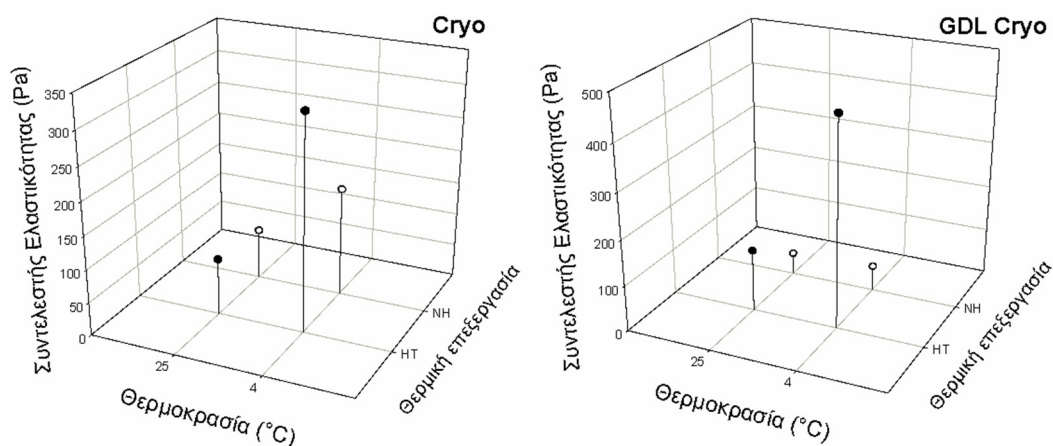
Σχήμα 4.143. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.



Σχήμα 4.144. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.



Σχήμα 4.145. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.



Σχήμα 4.146. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.

4.4.3.3. Συστήματα καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφιράνης

Η επίδραση του είδους της κατεργασίας, που υφίστανται τα συστήματα κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος, στη δομή τους γίνεται ακόμη πιο εμφανής στη περίπτωση συστήματος που περιέχει εκτός από τη κεφιράνη, και καζεϊνικό νάτριο και πρωτεΐνες ορού. Έτσι, τη μεγαλύτερη τιμή του συντελεστή G_g την εμφάνισε δείγμα του οποίου οι πρωτεΐνες ορού ήταν μετουσιωμένες, η τιμή του pH του ήταν 4,4, είχε υποστεί τη διαδικασία κατάψυξης - απόψυξης και είχε μετρηθεί στους 4°C (Πίνακας 4.11). Την επόμενη χαμηλότερη τιμή εμφάνισε το ίδιο δείγμα που μετρήθηκε στους 25°C. Τις αμέσως επόμενες χαμηλότερες τιμές τις εμφάνισε το δείγμα του οποίου οι πρωτεΐνες ορού δεν μετουσιώθηκαν αλλά υπέστη τις κατεργασίες που είχε υποστεί το προηγούμενο δείγμα, και η υψηλότερη τιμή του G_g ήταν αυτή που καταγράφηκε όταν μετρήθηκε στους 4°C σε σχέση με εκείνη που προέκυψε όταν μετρήθηκε στους 25°C. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται αυτό που είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ότι ο πιο καθοριστικός παράγων για την ανάπτυξη ισχυρής δομής στα συστήματα αυτά είναι, οι καζεΐνες να βρίσκονται στο ισο-ηλεκτρικό τους σημείο ώστε να έχουν τη μορφή συσσωματώματος. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα μιας και σε pH 4,4 το καζεϊνικό νάτριο είναι σε κατάσταση συσσωματώματος, οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού έχουν απελευθερωμένες ενεργές ομάδες έτσι η αλληλεπίδραση αυτών των δύο συστατικών δημιουργεί κατά βάση τη δομή του συστήματος. Η ανάπτυξη ισχυρότερης δομής στους 4°C από ότι στους 25°C υποδηλώνει ότι οι δεσμοί που κυριαρχούν στη δομή αυτού του δείγματος είναι οι δεσμοί υδρογόνου. Ανάλογη τάση εμφανίζουν και οι τιμές των συντελεστών επιβραδυνόμενης ελαστικότητας (Πίνακας 4.11).

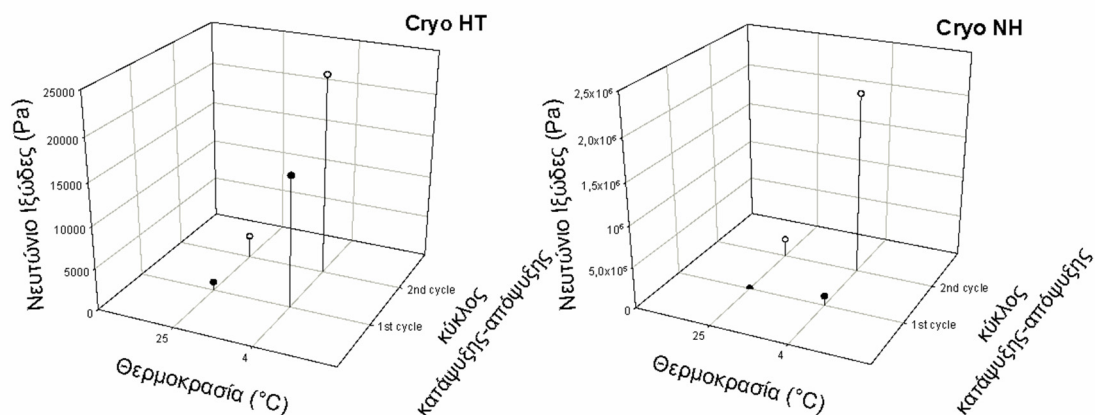
Οι τιμές ιξώδους των συγκεκριμένων δειγμάτων εμφανίζονται στα Σχήματα 4.147, 4.148 και 4.149. Παρατηρείται ότι η διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης είναι αυτή η οποία προκαλεί την μεγαλύτερη αύξηση του ιξώδους σ' όλα τα δείγματα που την έχουν υποστεί, ενώ η οξίνιση που δεν συνοδεύεται από τη διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης αυξάνει επίσης το ιξώδες αλλά σε μικρότερο βαθμό.

Αναφορικά με το συντελεστή ελαστικότητας των δειγμάτων που μελετήθηκαν τα Σχήματα 4.150, 4.151 και 4.152 δείχνουν ότι τη μεγαλύτερη τιμή την εμφανίζει το δείγμα που έχει υποστεί τη διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης και επίσης έχει υποστεί οξίνιση ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία μέτρησης.

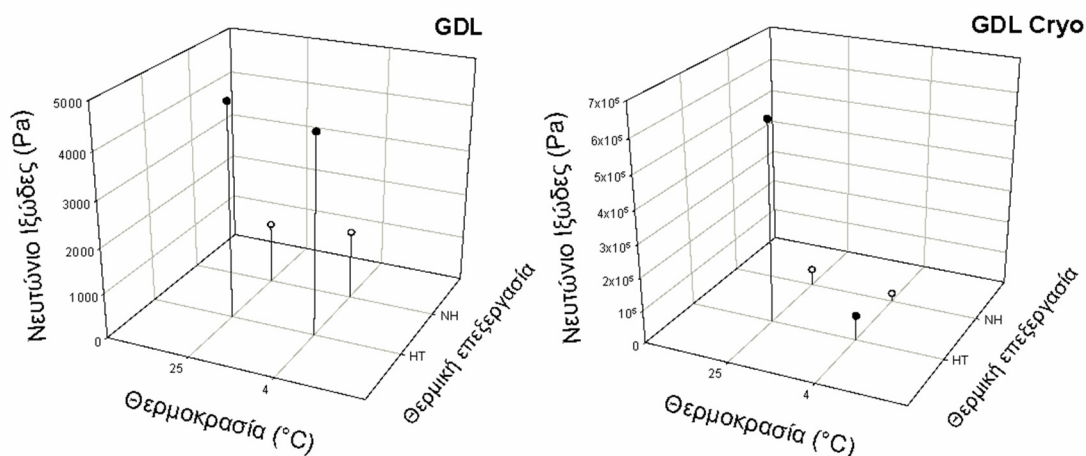
Πίνακας 4.11. Αποτελέσματα ανάλυσης δοκιμής ερπυσμού δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C (Cryo) και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, καθώς επίσης και δειγμάτων με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης με (GDL Cryo) και χωρίς (GDL) την εφαρμογή ενός κύκλου κατάψυξης-απόψυξης και με την εφαρμογή (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας. Οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C και στους 25°C . Η τιμή της τάσης διάτμησης που εφαρμόστηκε ήταν $0,05\text{ Pa}$.

Δείγματα	G_g (Pa)	G_1 (Pa)	τ_1 (s)	G_2 (Pa)	τ_2 (s)	G_3 (Pa)	τ_3 (s)	G_4 (Pa)	τ_4 (s)	strain
SCWP2%K2%HTCryo 1ος κύκλος 4°C	50,556	394,011	2,421	197,006	47,51					0,0006096
SCWP2%K2%HTCryo 1ος κύκλος 25°C	31,596	231,535	0,1233	125,235	2,421					0,01398
SCWP2%K2%HTCryo 2ος κύκλος 4°C	77,459	983,284	5,095	410,509	47,51					0,0007691
SCWP2%K2%HTCryo 2ος κύκλος 25°C	71,378	294,551	0,5464							0,004196
SCWP2%K2%HTCryo gdl 4°C	644,330	3727,171	1,15	4528,986	5,095	1885,014	100			0,00004887
SCWP2%K2%HTCryo gdl 25°C	338,409	1572,327	2,421	695,410	47,51					0,0002641
SCWP2%K2%HT gdl 4°C		29,568	0,1233	117,467	2,421	83,68201	10,72	52,411	47,51	0,003599
SCWP2%K2%HT gdl 25°C		23,952	0,1233	113,122	2,421	117,5641	10,72	34,095	47,51	0,001131
SCWP2%K2%NHcryo 1ος κύκλος 4°C	116,131	752,445	2,421	621,118	47,51					0,0006334
SCWP2%K2%NHcryo 1ος κύκλος 25°C	96,525									0,001954
SCWP2%K2%NHcryo 2ος κύκλος 4°C	50,633	2131,287	1,15	1105,583	10,72	245,459	47,51			0,0003291
SCWP2%K2%NHcryo 2ος κύκλος 25°C	139,295	7704,160	1,15	1101,686	22,57	351,8649	100			0,0001891
SCWP2%K2%NHcryo gdl 4°C	334,896	2047,083	1,15							0,0005389
SCWP2%K2%NHcryo gdl 25°C	195,618	870,322	5,095	485,909	22,57	599,88	100			0,00006582
SCWP2%K2%NH gdl 4°C		7,310	0,2596	14,476	5,095	5,854801	100			0,008867
SCWP2%K2%NH gdl 25°C		6,498	0,2596	19,869	5,095	15,73564	22,57	8,210	100	0,002649

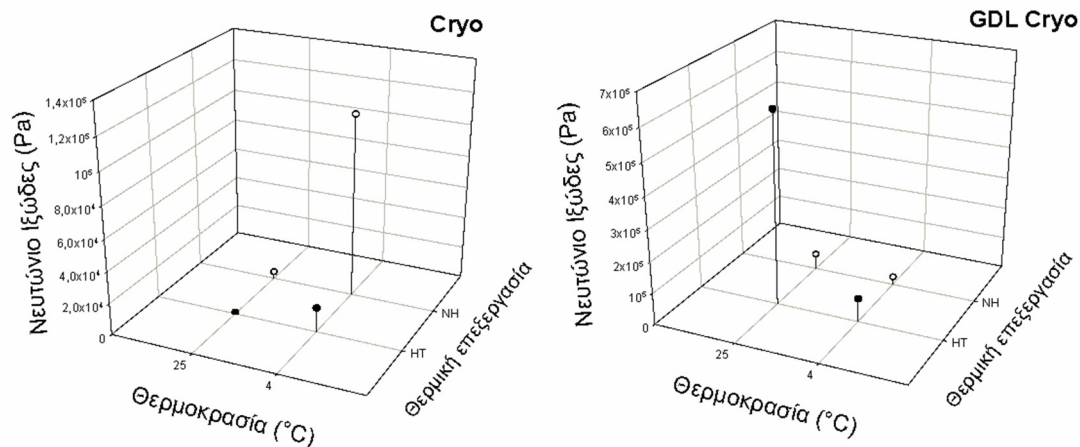
Όπου: G_g συντελεστής στιγμιαίας ελαστικότητας, $G_{1,2,3,4}$ συντελεστές επιβραδυνόμενης ελαστικότητας, $\tau_{1,2,3,4}$ χρόνοι επιβράδυνσης, strain η παραμόρφωση.



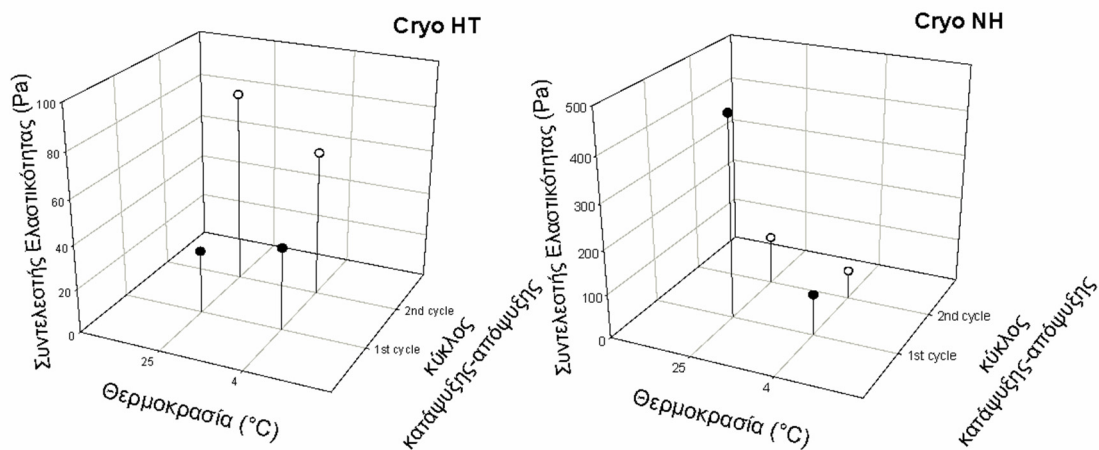
Σχήμα 4.147. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.



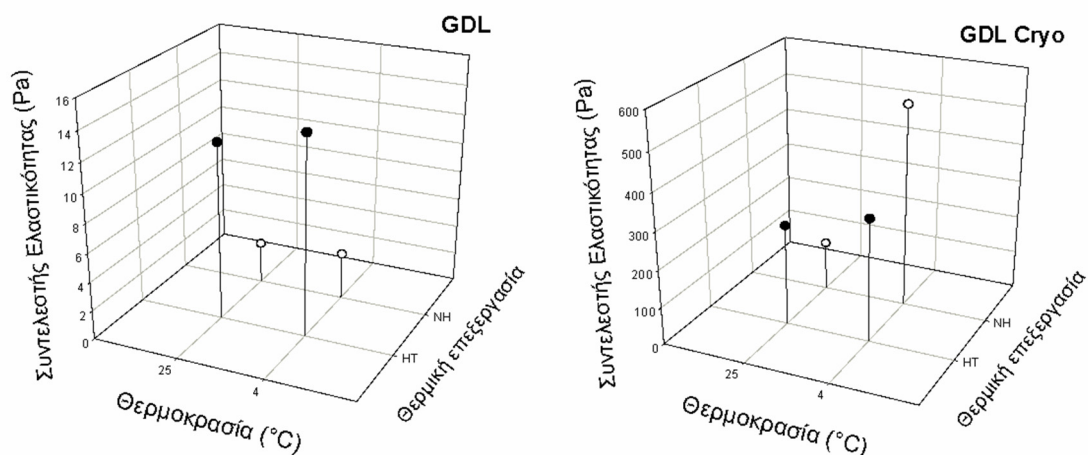
Σχήμα 4.148. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.



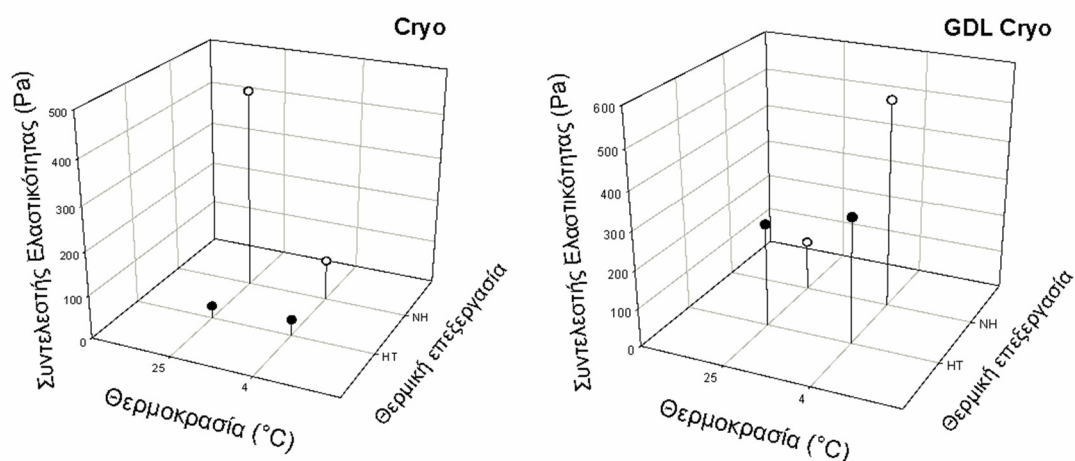
Σχήμα 4.149. Νευτώνειο ιξώδες (σε καθεστώς μηδενικής διάτμησης) δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05 \text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.



Σχήμα 4.150. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C και επανάληψη του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05 \text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και του κύκλου κατάψυξης-απόψυξης, θερμασμένου (HT) και μη θερμασμένου (NH) δείγματος.



Σχήμα 4.151. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης με την προσθήκη γλύκονο-δ-λακτόνης (GDL) και μετά από ένα κύκλο κατάψυξης στους -18°C και απόψυξης στους 4°C (GDL Cryo), μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας.



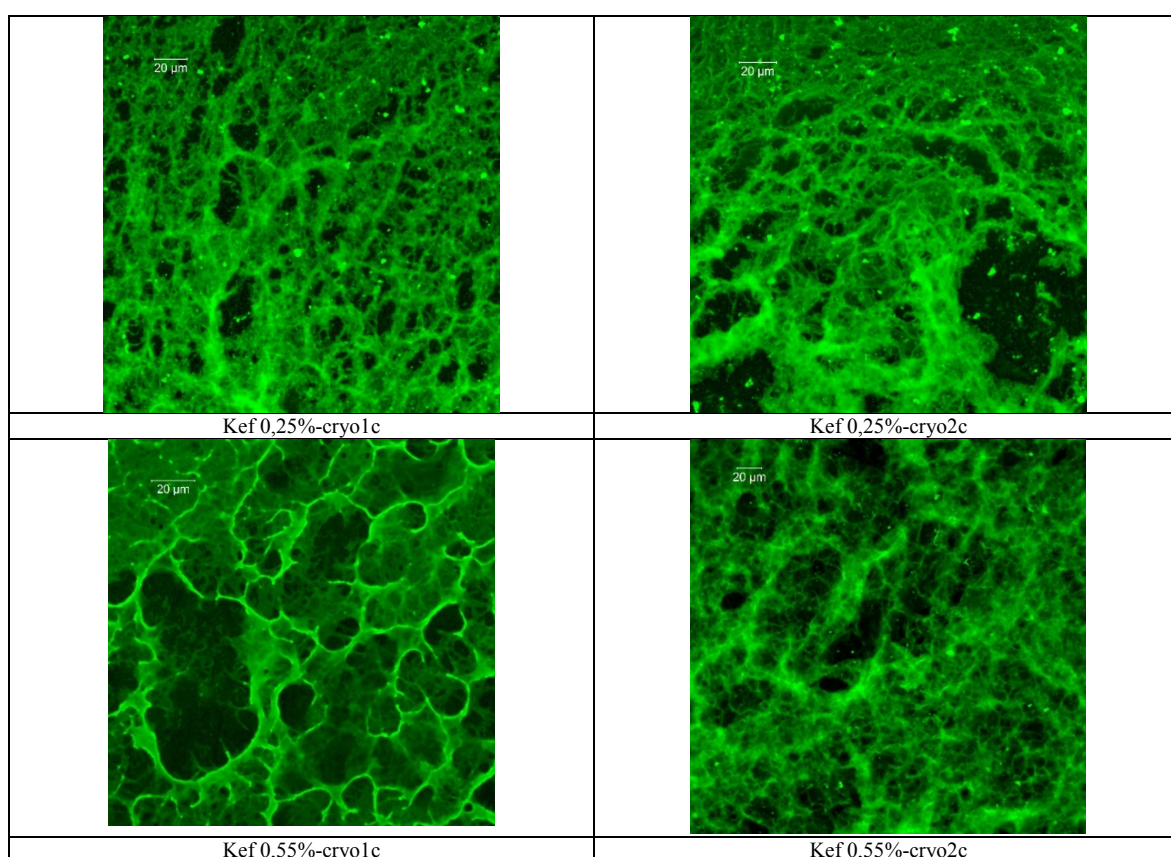
Σχήμα 4.152. Συντελεστής ελαστικότητας δειγμάτων καζεϊνικού νατρίου – πρωτεϊνών ορού – κεφίρανης μετά από κατάψυξη στους -18°C και απόψυξη στους 4°C , μετά από ερπυσμό με διατμητική τάση $0,05\text{ Pa}$, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ερπυσμού και της εφαρμογής (HT) ή μη (NH) θερμικής επεξεργασίας, χωρίς την προσθήκη (Cryo), και με την προσθήκη (GDL Cryo) γλύκονο-δ-λακτόνης.

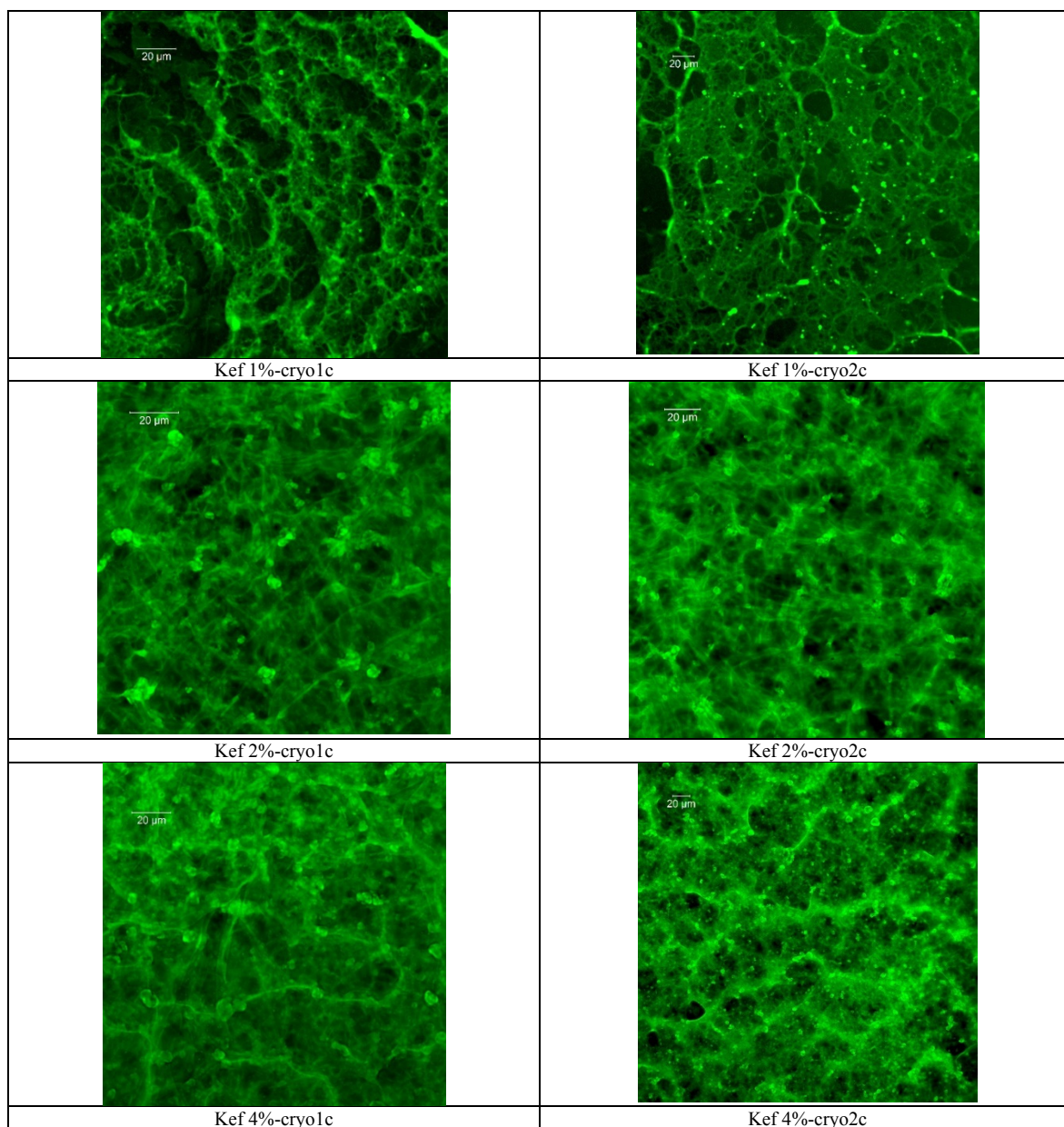
Συμπερασματικά, η κεφίρανη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της υφής προϊόντων που περιέχουν πρωτεΐνες γάλακτος, έχουν χαμηλή τιμή pH και έχουν υποστεί τη διεργασία της κατάψυξης (π.χ. ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα παγωτού).

4.5. Μελέτη της δομής κρυοπηκτών, όξινων πηκτών και όξινων κρυοπηκτών συστημάτων κεφिरάνης-πρωτεϊνών γάλακτος

4.5.1. Κρυοπηκτές κεφिरάνης

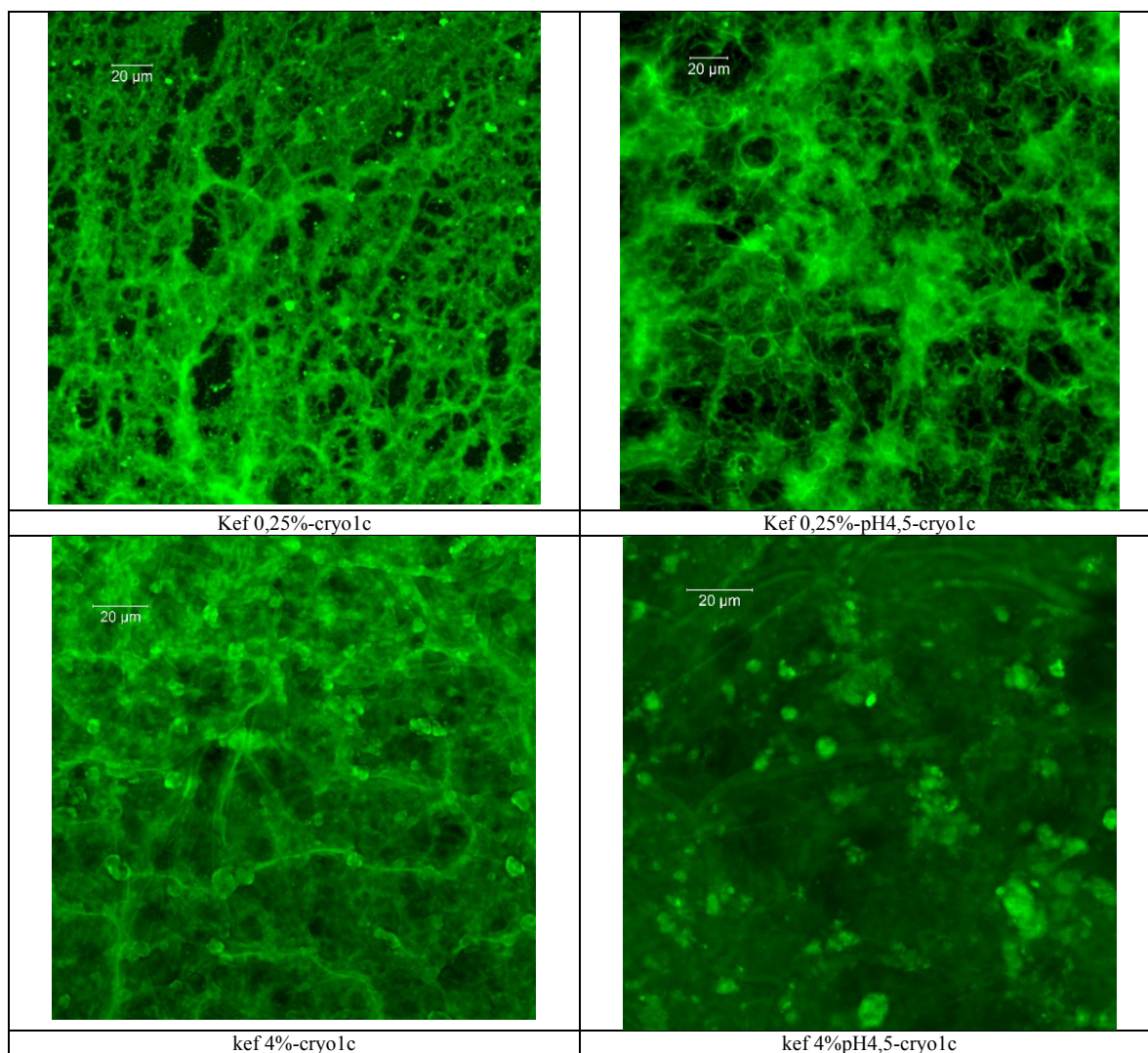
Στο Σχήμα 4.153 φαίνεται η δομή των κρυοπηκτών κεφिरάνης διαφορετικών συγκεντρώσεων. Όπως παρατηρείται οι κρυοπηκτές της κεφिरάνης έχουν τη χαρακτηριστική δομή κρυοπηκτής με μακροπόρους (παράγραφος 1.5). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις το πλέγμα που σχηματίζεται έχει περισσότερους πόρους, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις το πλέγμα είναι πιο πυκνό. Μεταξύ πρώτου και δεύτερου κύκλου κατάψυξης-απόψυξης δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφοροποίηση στη δομή των κρυοπηκτών (πυκνότητα πλέγματος και μέγεθος πόρων) όταν η κεφिरάνη βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε συγκέντρωση 4% παρατηρείται ότι στο δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης το πλέγμα εμφανίζει μεγαλύτερους πόρους σε σχέση με τον πρώτο κύκλο.





Σχήμα 4.153. Δομή κρυοπηκτών κεφιράνης (1^{ος} και 2^{ος} κύκλος κατάψυξης-απόψυξης) συγκεντρώσεων 0,25%, 0,5%, 1%, 2% και 4% σε pH 7.

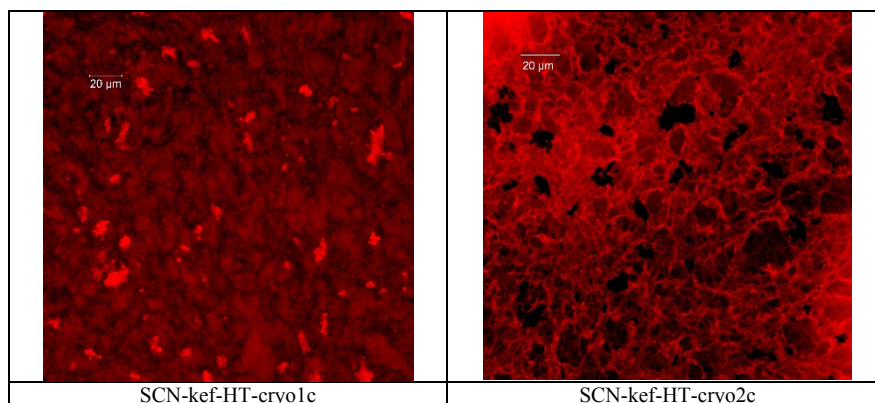
Στο Σχήμα 4.154 φαίνεται η δομή κρυοπηκτών κεφιράνης (1^{ος} κύκλος κατάψυξης-απόψυξης) συγκεντρώσεων 0,25% και 4% σε pH 7 και 4,5. Όπως παρατηρείται στη χαμηλή συγκέντρωση η κρυοπηκτή σε pH 7 εμφανίζει πιο πυκνό πλέγμα από ότι σε pH 4,5. Ωστόσο, σε υψηλή συγκέντρωση (4%) οι πηκτές σε pH 7 και 4,5 εμφανίζουν παρόμοιας πυκνότητας πλέγμα. Τα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση του pH είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από τις ρεολογικές μετρήσεις (παράγραφος 4.3.4.1.)



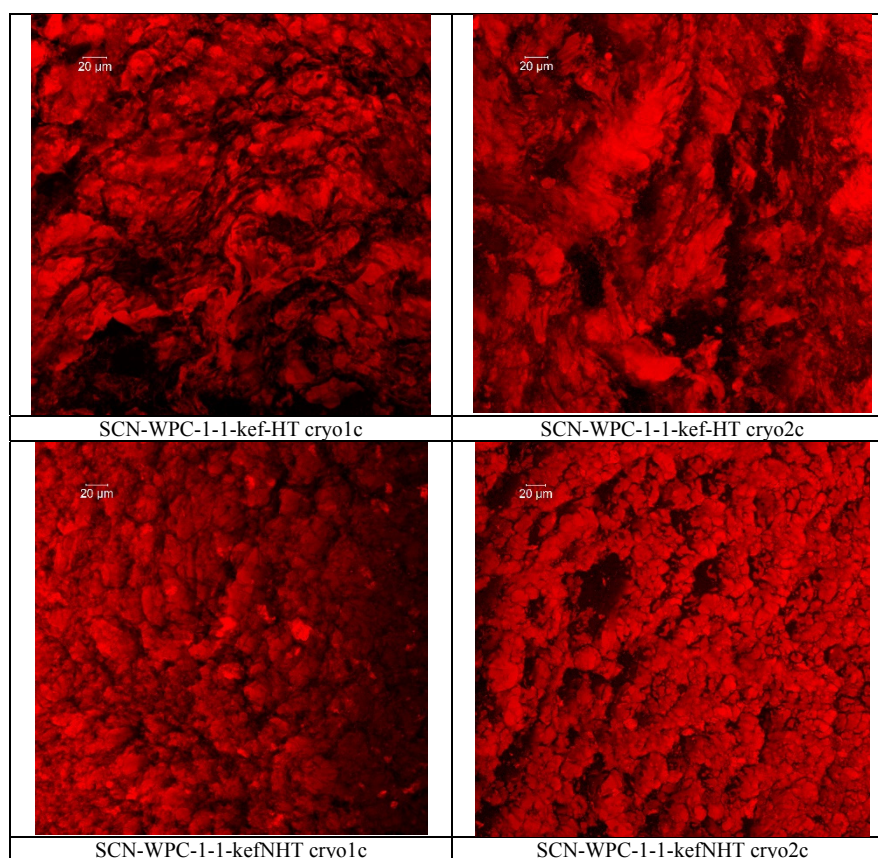
Σχήμα 4.154. Δομή κρυοπηκτών κεφιράνης (1^{ος} κύκλος κατάψυξης-απόψυξης) συγκεντρώσεων 0,25% και 4% σε pH 7 και 4,5.

4.5.2. Κρυοπηκτές κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος

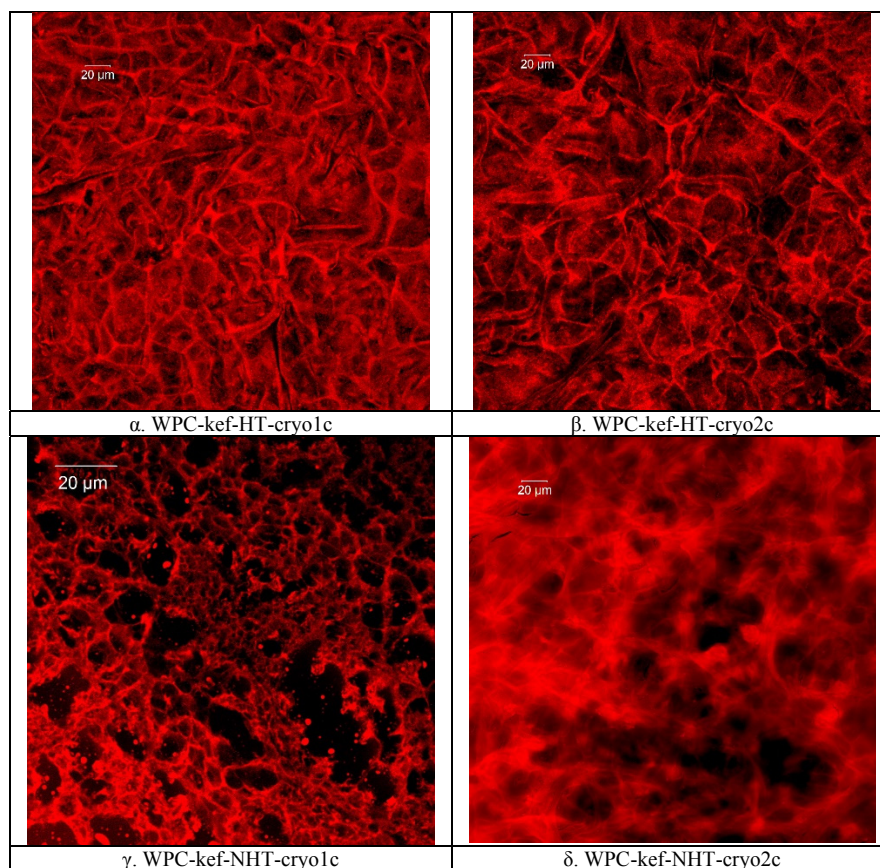
Στα Σχήματα 4.155 έως 4.157 φαίνεται η δομή κρυοπηκτών κεφιράνης - καζεϊνικών αλάτων, κρυοπηκτών κεφιράνης - μίγματος πρωτεϊνών γάλακτος και κρυοπηκτών κεφιράνης - συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού, αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται η κρυοπηκτική κεφιράνης- πρωτεϊνών ορού (Σχήμα 4.157) έχει τη χαρακτηριστική δομή των κρυοπηκτών κεφιράνης (Σχήμα 4.153), ενώ η παρουσία και των καζεϊνικών αλάτων στο σύστημα προσδίδει στις κρυοπηκτές μία κοκκώδη υφή (Σχήματα 4.155 & 4.156). Αυτό προφανώς οφείλεται στην ύπαρξη των καζεϊνικών αλάτων που βρίσκονται υπό τη μορφή συσσωματωμάτων (μικκυλίων), τα οποία έχουν σφαιρικό σχήμα και μεγάλο μέγεθος.



Σχήμα 4.155. Δομή κρυοπηκτών καζεϊνικών αλάτων-κεφίράνης κατά τον 1^ο και 2^ο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.



Σχήμα 4.156. Δομή κρυοπηκτών μίγματος πρωτεϊνών γάλακτος (καζεϊνικών αλάτων και συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας)-κεφίράνης κατά τον 1^ο και 2^ο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.



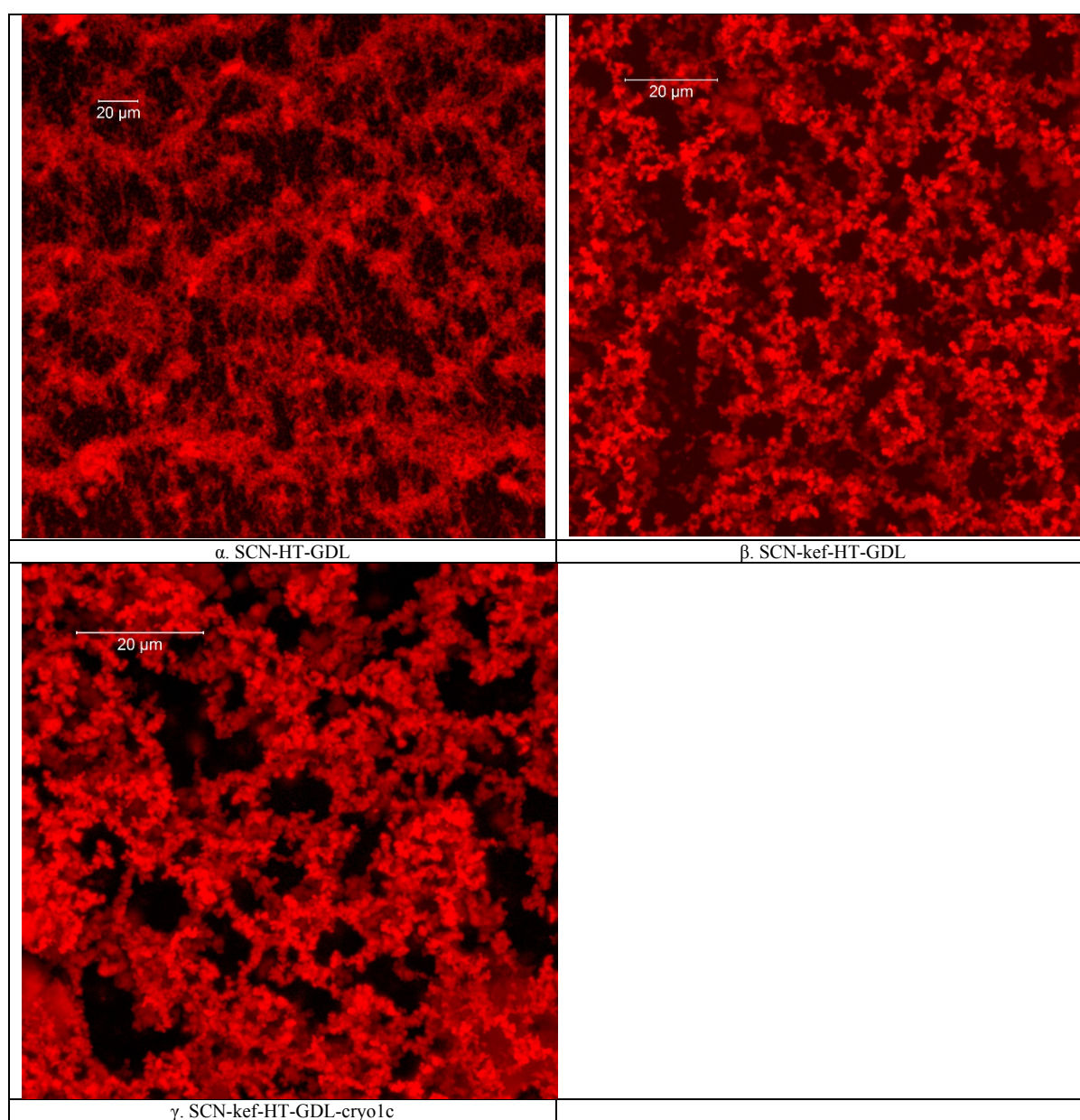
Σχήμα 4.157. Δομή κρυοπηκτών συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού (με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας)-κεφιράνης κατά τον 1^ο και 2^ο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.

Η θερμική επεξεργασία επηρέασε μόνο τη δομή των κρυοπηκτών κεφιράνης-συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού, η οποία εμφανίζεται πιο ανοιχτή και με μεγάλους πόρους στην περίπτωση των μη-μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Σχήμα 4.157γ). Η απελευθέρωση ενεργών ομάδων κατά την μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του πυκνού πλέγματος της κρυοπηκτής κεφιράνης-μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού (Σχήμα 4.157α). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με εκείνα που προέκυψαν από τις ρεολογικές μετρήσεις των αντίστοιχων δειγμάτων (Κεφάλαιο 4.4.).

Όσον αφορά τον πρώτο και το δεύτερο κύκλο κατάψυξης-απόψυξης, οι κρυοπηκτές φαίνεται να σχηματίζουν περισσότερους πόρους και να αποκτούν πιο ανοιχτή δομή, όταν υποστούν για δεύτερη φορά κατάψυξη-απόψυξη. Αυτό σημαίνει ότι επέρχεται μερική κατάρρευση της δομής όπως διαπιστώθηκε και από τις ρεολογικές μετρήσεις. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των κρυοπηκτών κεφιράνης συγκέντρωσης 4% (Σχήμα 4.153).

4.5.3. Όξινες πηκτές και όξινες κρυοπηκτές κεφιράνης-πρωτεϊνών γάλακτος

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.158α η δομή των όξινων πηκτών καζεϊνικών αλάτων αποτελείται από μορφοκλασματικά συσσωματώματα (fractals) (παράγραφος 1.8.5). Μάλιστα η δομή αυτή διατηρείται και παρουσία κεφιράνης τόσο στην περίπτωση της όξινης πηκτής (Σχήμα 4.158β) όσο και στην περίπτωση της όξινης κρυοπηκτής (Σχήμα 4.158γ). Ωστόσο, τα μόρια του πολυσακχαρίτη φαίνεται να παρεμβάλλονται μεταξύ των καζεϊνικών μορίων αφού όταν προστίθενται στο σύστημα το πλέγμα αποκτά πιο ανοικτή δομή (Σχήμα 4.158β) χωρίς την παρουσία ινωδών μορφών (Σχήμα 4.158α).

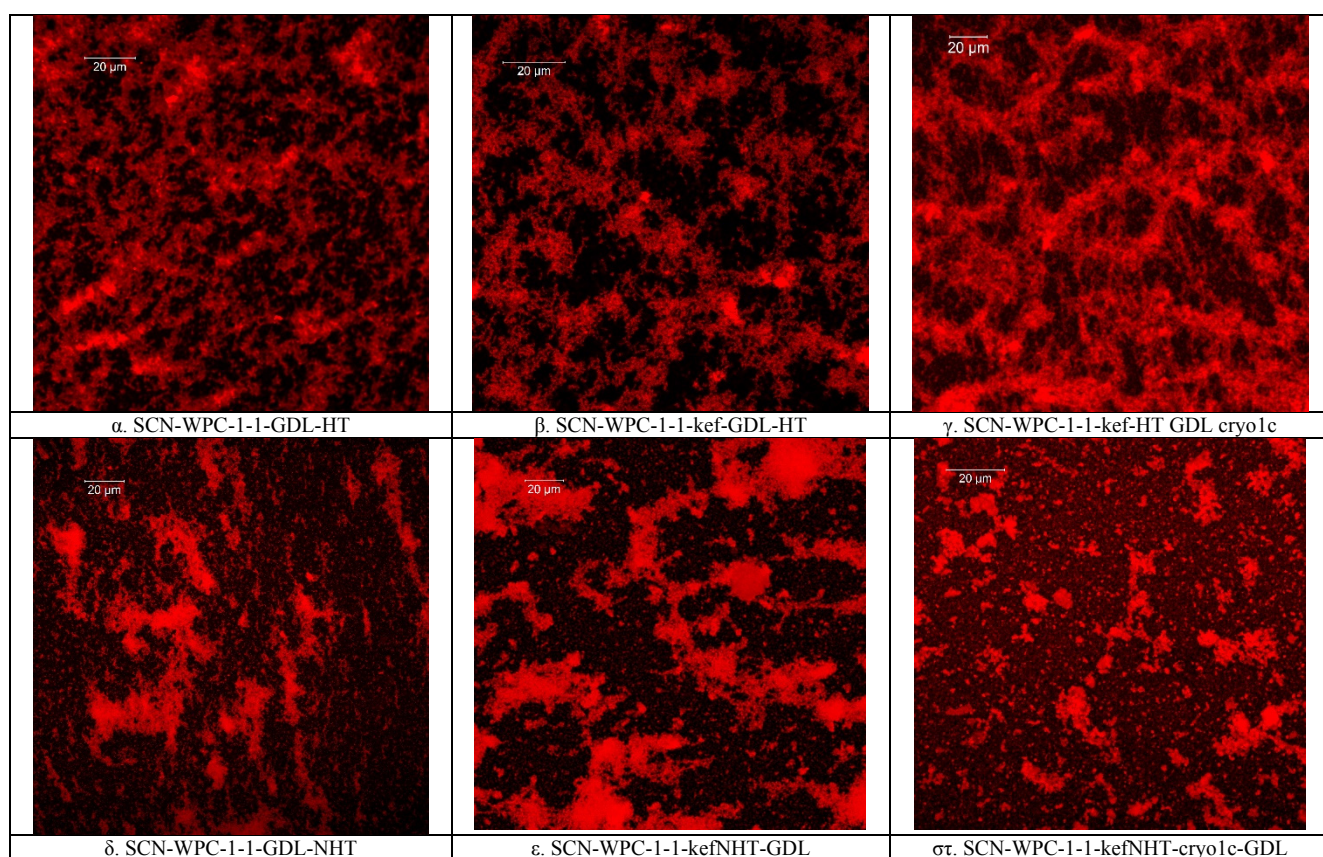


Σχήμα 4.158. Δομή όξινων πηκτών καζεϊνικών αλάτων, καθώς επίσης όξινων πηκτών και όξινων-κρυοπηκτών καζεϊνικών αλάτων-κεφιράνης.

Η δομή της όξινης πηκτής καζεϊνικών αλάτων-κεφιράνης έχει την ίδια μορφή με τη δομή της όξινης κρυσταλλικής (Σχήμα 4.158β και 4.158γ, αντίστοιχα) με τη μόνη διαφορά ότι η κρυσταλλική έχει πιο πυκνό πλέγμα εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων του πολυσακχαρίτη που σχηματίζονται κατά τη διεργασία της κατάψυξης.

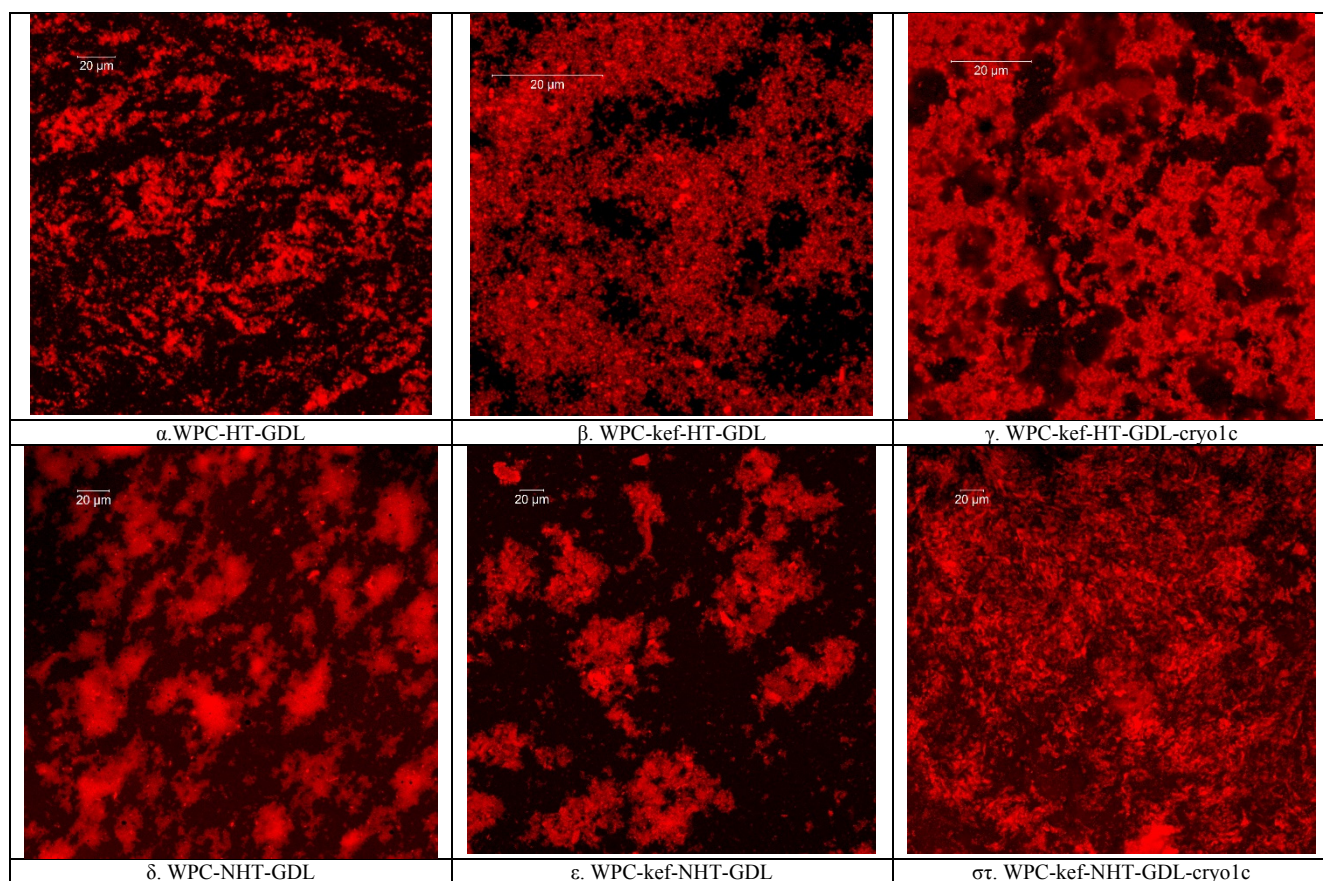
Η ασυμβατότητα του πολυσακχαρίτη με τις πρωτεΐνες φαίνεται τόσο στην περίπτωση των όξινων πηκτών του μίγματος (Σχήμα 4.159α και 4.159β), όπου παρουσία της κεφιράνης το πλέγμα εμφανίζει μεγαλύτερη ασυνέχεια, όσο και στην περίπτωση που οι πρωτεΐνες ορού είναι οι μόνες πρωτεΐνες του συστήματος (Σχήμα 4.160α και 4.160β) και η παρουσία του πολυσακχαρίτη κάνει το πλέγμα πιο ασθενές.

Επίσης στην περίπτωση των όξινων πηκτών, παρουσία των πρωτεϊνών ορού, το σχηματιζόμενο πλέγμα έχει περισσότερους πόρους ή εμφανίζεται πιο ασθενές όταν δεν έχει εφαρμοστεί θερμική επεξεργασία παρουσία (Σχήματα 4.159α, 4.159δ, 4.160α και 4.160δ) ή μη (Σχήματα 4.159β, 4.159ε, 4.160β, και 4.160ε) της κεφιράνης.



Σχήμα 4.159. Δομή όξινων πηκτών μίγματος πρωτεϊνών γάλακτος (καζεϊνικών αλάτων και συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας), καθώς επίσης όξινων πηκτών και όξινων-κρυσταλλικών μίγματος πρωτεϊνών γάλακτος-κεφιράνης.

Η δομή των όξινων κρυοπηκτών τόσο του μίγματος πρωτεϊνών-κεφιράνης (Σχήμα 4.159γ και 4.159στ) όσο και των πρωτεϊνών ορού-κεφιράνης (Σχήμα 4.160γ και 4.160στ) έχει πιο πυκνό πλέγμα από τις αντίστοιχες όξινες πηκτές ανεξάρτητα από το εάν έχει εφαρμοστεί ή όχι θερμική επεξεργασία. Αυτό όπως προαναφέρθηκε οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της κεφιράνης κατά τη διεργασία της κατάψυξης.



Σχήμα 4.160. Δομή όξινων πηκτών συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού (με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας), καθώς επίσης όξινων πηκτών και όξινων-κρυοπηκτών συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού -κεφιράνης.

5.1. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που μπορούν να προκύψουν από την παρούσα διατριβή είναι τα ακόλουθα:

Η κεφίράνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης αποτελούμενος από δύο μονομερή, τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη σε περίπου ισομοριακή αναλογία. Σε στερεή κατάσταση η κεφίράνη έχει ημικρυσταλλική δομή ενώ σε κατάσταση υδατικού διαλύματος η διαμόρφωση της είναι αυτή του περιδινούμενου κουβαριού (random coil).

Το νερό εμφανίζεται να είναι καλός διαλύτης για την κεφίράνη, το μόριο της οποίας είναι ελαφρώς αρνητικά φορτισμένο σε υδατικό διάλυμα. Η διαμόρφωση του μορίου της κεφίράνης δεν επηρεάζεται σημαντικά από τις μεταβολές στην ιονική ισχύ των διαλυμάτων της, το ίδιο ισχύει και από την παρουσία οργανικών οξέων με διαφορετικό αριθμό καρβοξυλίων.

Ο υδροδυναμικός όγκος του μορίου της κεφίράνης μειώνεται όσο αυξάνει το pH των διαλυμάτων της και το ίδιο συμβαίνει σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η παρουσία καζεϊνικών αλάτων και πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε υδατικά συστήματα κεφίράνης δεν επηρεάζουν τη διαμόρφωση των μορίων της.

Η ρεολογική συμπεριφορά υδατικών διαλυμάτων κεφίράνης είναι αυτή του ψευδοπλαστικού ρευστού. Διαλύματα κεφίράνης συγκεντρώσεων έως 4% υπακούουν ρεολογικά στο μοντέλο Herschel-Bulkley.

Διαλύματα κεφίράνης συγκεντρώσεων 1 έως 4% όταν καταψυχθούν και αποψυχθούν εμφανίζουν επίσης ψευδοπλαστική συμπεριφορά αλλά οι τιμές του ιξώδους που εμφανίζουν είναι μεγαλύτερες τουλάχιστο κατά μία τάξη μεγέθους από τα αντίστοιχα δείγματα που δεν έχουν υποστεί το κύκλο κατάψυξης - απόψυξης.

Οι τιμές του εκτατού ιξώδους που εμφανίζουν διαλύματα κεφίράνης συγκεντρώσεων 4 και 7% που έχουν υποστεί τον κύκλο της κατάψυξης - απόψυξης είναι ανάλογες της συγκέντρωσης, ενώ διάλυμα συγκέντρωσης 10% εμφανίζει συμπεριφορά κρυσταλλικής (διατεταγμένης δομής).

Δυναμικές δοκιμές και δοκιμές ερπυσμού έδειξαν ότι τα διαλύματα κεφίράνης συγκεντρώσεων μέχρι 4% που υπέστησαν τον κύκλο κατάψυξης-απόψυξης εμφάνισαν υψηλότερες τιμές μηχανικών ιδιοτήτων σε σχέση με αυτές των ίδιων δειγμάτων που

δεν υπέστησαν αυτή τη διεργασία. Μηχανικά φάσματα θερμοκρασιακής σάρωσης διαλυμάτων κεφίρανης που υπέστησαν ένα ή δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης έδειξαν ότι η δομή των συστημάτων παρέμεινε σταθερή για ένα εύρος θερμοκρασιών από 5 έως 50°C.

Η κεφίρανη δεν επηρεάζει τη δημιουργία πηκτής συστημάτων καζεϊνικών αλάτων-πρωτεϊνών ορού γάλακτος- κεφίρανης.

Δυναμικές δοκιμές και δοκιμές ερπυσμού έδειξαν ότι σε συστήματα καζεϊνικών αλάτων-πρωτεϊνών ορού-κεφίρανης, η κεφίρανη δεν επηρεάζει τις μηχανικές ιδιότητες των συστημάτων αυτών ενώ τις επηρεάζει, εν μέρει, στην περίπτωση δημιουργίας κρυοπηκτών οι οποίες επιδεικνύουν αξιοσημείωτη σταθερότητα της δομής τους κατά τη θερμοκρασιακή σάρωση για ένα εύρος θερμοκρασιών από 5 έως 50°C.

5.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Διερεύνηση τυχόν συνέργειας μεταξύ της κεφίρανης και άλλων υδροκολλοειδών βιοπολυμερών π.χ. κόμμι γκουάρ, κόμμι χαρουπιού, αλγινικά και άλλα, με σκοπό τη χρήση των συστημάτων αυτών ως τροποποιητές υφής για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων.

Διερεύνηση της χρήσης της κεφίρανης σε συνδυασμό με διάφορα συστατικά τροφίμων για την παρασκευή προϊόντων που να έχουν την υφή των κρυοπηκτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham A.G., De Antoni G.L. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*, 66, 327–333.
- Ahmed Z., Wang Y., Anjum N., Ahmad A., Khan S.T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. *Food Hydrocolloids*, 30, 343–350.
- Amatayakul T, Halmos A.L., Sherkat F., Shah N.P. (2006). Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 16 (1), 40-51.
- AOAC (1990). *Official methods of analysis*, 15th Ed. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Botazzi V., Bianchi F. (1980). A note on scanning electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granule. *Journal of Applied Bacteriology*, 48, 265–268.
- Campanella O.H., Peleg M. (1987). Squeezing flow viscosimetry of peanut butter. *Journal of Food Science*, 52, 180–184.
- Chatraei S., Macosko C.W., Winter H.H. (1981). A new biaxial extensional rheometer. *Journal of Rheology*, 25, 433–443.
- Chaplin M. (1982). A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 123 (2), 336–341.
- Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. (2001). Modelling and optimization of environmental conditions for kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 639–646.
- Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. (2003a). Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 100 (1), 43–53.
- Cheirsilp B., Shoji H., Shimizu H., Shioya S. (2003b). Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefir production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 (3), 279–284.

- Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. (2007). Kinetic modelling of kefiran production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 42 (4), 570–579.
- Cheirsilp B., Radchabut S. (2011). Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. *New Biotechnology*, 28 (6), 574–580.
- Cho Y.H., Lucey J.A., Singh H. (1999). Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. *International Dairy Journal*, 9, 537–545.
- Coupland J.N. (2014). *An introduction to the physical chemistry of food*. New York: Springer.
- Dailin D.J., Elsayed E.A., Othman N.Z., Malek R., Phin H.S., Aziz R., Wadaan M., Enshasy H.A. (2016). Bioprocess development for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in semi industrial scale bioreactor. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 495–502.
- de Gennes P.G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. London: Cornell University Press.
- de Kruif C.G., Tuinier R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, 555–563.
- Dealy J.M. (1984). Official nomenclature for material functions describing the response of a viscoelastic fluid to various shearing and extensional deformations. *Journal of Rheology*, 37, 179–191.
- Degeest B., Vaningelgem F., De Vuyst L. (2001). Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11 (9), 747–757.
- Dimitreli G., Antoniou K.D. (2011). Effect of incubation temperature and caseinates on the rheological behaviour of kefir (ICEF11). *Procedia Food Science*, 1, 583–588.
- Doublier J.-L., Garniera C., Renarda D., Sanchez C. (2000). Protein–polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 202–214.

- Duboc P., Mollet B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11 (9), 759–768.
- Engmann J., Servais C., Burbidge A.S. (2005). Squeeze flow theory and applications to rheometry: A review. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 132, 1–27.
- Farnworth E.R. (2005). Kefir – A complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2 (1), 1–17.
- Fennema O.R. (1996). *Food chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Ferry J.D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Frengova G.I., Simova E.D., Beshkova D.M., Simov Z.I. (2002). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57, 805–810.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30, 77–84.
- Garrote, G., Abraham, A., De Antoni, G. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain - milk ratios. *Journal of Dairy Research*, 65, 149–154.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. (2001). Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68, 639–652.
- Gedde U.W. (1995). *Polymer Physics*. London: Chapman & Hall.
- Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A. (2011a). Rheological and structural characterisation of film-forming solutions and biodegradable edible film made from kefir as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49 (4), 814–821.
- Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A., Yarmand M.S. (2011b). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 127 (4), 1496–1502.
- Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A., Yarmand M.S. (2011c). Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on

kefiran and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49 (3), 378–384.

- Ghasemlou M., Khodaiyan F., Jahanbin K., Gharibzahedi S.M.T., Taheri S. (2012). Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefiran production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry*, 133 (2), 383–389.
- Girard, M., Schaffer-Lequart, C. (2007). Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides. *International Dairy Journal*, 17, 666–673.
- Goh K.K.T., Matia-Merino L., Pinder D.N., Saavedra C., Singh H. (2011). Molecular characteristics of a novel water-soluble polysaccharide from the New Zealand black tree fern (*Cyathea medullaris*). *Food Hydrocolloids*, 25 (3), 286–292.
- Grinberg V.Y., Tolstoguzov V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11 (2), 145–158.
- Grosberg A.Y, Khokhlov A.R (2011). *Giant molecules - Here, there, and everywhere*, 2nd Ed. Singapore: World Scientific Publishing
- Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhalevsky S.V. (2013). Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 187–188, 1–46.
- Horne D.S. (2009). Casein micelle structure and stability. In A. Thompson, M. Boland, H. Singh (Eds.) *Milk proteins: from expression to food* (pp.133–157). Amsterdam: Elsevier Inc.
- Kandler O., Kunath P. (1983). *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 286–294.
- Kooiman P. (1968). The chemical structure of kefiran: the water-soluble polysaccharide of kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7, 200–211.
- Koroleva N.S. (1988a). Technology of Kefir and Kumys. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 227, 96–100.
- Koroleva N.S. (1988b). Starters for fermented milks. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 227, 35–40.

- Koyama R. (1959). The second virial coefficient of polymer solutions. *Journal of Polymer Science*, 35, 247–258.
- Kwon O.K., Ahn K.S., Lee M.Y., Kim S.Y., Park B.Y., Kim M.K., Lee I.Y., Ryang S., Lee H.K. (2008). Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Archives of Pharmacal Research*, 31 (12), 1590–1596.
- La Rivière J.W.M., Kooiman P., Schmidt K. (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie*, 59, 269–278.
- Laws A.P., Marshall V.M. (2001). The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 709–721.
- Lee S.J., Peleg M. (1990). Lubricated and nonlubricated squeezing flow of double layered array of two power law liquids. *Rheologica Acta*, 29, 360–365.
- Libudzisz Z., Piatkiewicz A. (1990). Kefir production in Poland. *Dairy Industries International*, 55 (7), 31–32.
- Lopes da Silva J.A., Rao A.M. (1999). Rheological behavior of food gel systems. In A.M. Rao (Ed.) *Rheology of fluid and semisolid foods - Principles and applications* (pp. 319–368). Maryland: Aspen Publishers Inc.
- Lozinsky V.I. (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*, 71 (6), 489–511.
- Lozinsky V.I., Okay O. (2014). Basic principles of cryotropic gelation. In O. Okay (Ed.) *Polymeric cryogels: macroporous gels with remarkable properties* (pp. 49–101). Heidelberg: Springer.
- Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B. (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21 (10), 445–451.
- Lucey J.A. (2004a). Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2-3), 77–84.

- Lucey J.A. (2004b). Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. In P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee (Eds.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology – vol 1: general aspects* (pp.105–122). Amsterdam: Elsevier Ltd.
- Lucey J.A., Singh H. (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30 (7), 529–542.
- Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., Munro P.A. (1998a). A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. *Food Research International*, 31 (2), 147–155.
- Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., Munro P.A. (1998b). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65, 555–567.
- Maeda H., Zhu X., Suzuki S., Suzuki K., Kitamura S. (2004a). Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (17), 5533–5538.
- Maeda H., Zhu X., Mitsuoka T. (2004b). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) from *Lactobacillus kefiranofaciens* on blood glucose in KKAY mice and constipation in SD Rats induced by a low-fiber diet. *Bioscience and Microflora*, 23 (4), 149–153.
- Maeda H., Mizumoto H., Suzuki M., Tsuji K. (2005). Effects of kefiran-feeding on fecal cholesterol excretion, hepatic injury and intestinal histamine concentration in rats. *Bioscience and Microflora*, 24 (2), 35–40.
- Medrano M., Pérez P.F., Abraham A.G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 1–7.
- Mellema M., Walstra P., van Opheusden J.H.J., van Vliet T. (2002). Effect of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98, 25–50.

- Micheli L., Uccelletti D., Palleschi C., Crescenzi V. (1999). Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 69–74.
- Miles M.J., Morris V.J., Ring S.G. (1985). Gelation of amylose. *Carbohydrate Research*, 135, 257–269.
- Morris E.R., Cutler A.N., Ross-Murphy S.B., Rees D.A. (1981). Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers*, 1, 5–21.
- Motedayen A.A., Khodaiyan F., Salehi E.A. (2013). Development and characterisation of composite films made of kefiran and starch. *Food Chemistry*, 136, 1231–1238.
- Mukai T., Toba T., Itoh T., Nimura T. Adachi S. (1990). Carboxymethyl kefiran: preparation and viscometric properties. *Journal of Food Science*, 55 (5), 1483–1484.
- Mukai T., Watanabe N., Toba T., Itoh T., Adachi S. (1991). Gel-forming characteristics and rheological properties of kefiran. *Journal of Food Science*, 55 (5), 1017–1026.
- Otles S., Cadingi O. (2003). Kefir: A Probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 54–59.
- Piermaria J.A., de la Canal M.L., Abraham A.G. (2008). Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22, 1520–1527.
- Piermaria J., Bosch A., Pinotti A., Yantorno O., Garcia M.A., Abraham A.G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25 (5), 1261–1269.
- Plessas S., Nouska C., Mantzourani I., Kourkoutas Y., Alexopoulos A., Bezirtzoglou E. (2017). Microbiological exploration of different types of kefir grains. *Fermentation*, 3, 1–10.

- Rao M.A. (1992). Measurement of viscoelastic properties of fluid and semi-solid foods. In M.A. Rao, J.F. Steffe (Eds.) *Viscoelastic properties of foods* (pp. 207–231). London: Elsevier Applied Science.
- Rao A.M. (1999). Introduction. In A.M. Rao (Ed.) *Rheology of fluid and semisolid foods - Principles and applications* (pp. 1–24). Maryland: Aspen Publishers Inc.
- Rimada P.S., Abraham A.G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68, 653–661.
- Rimada P.S., Abraham A.G. (2003). Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Lait*, 83, 79–87.
- Rimada P.S., Abraham A.G. (2006). Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, 16, 33–39.
- Robinson R.K., Lucey J.A., Tamime A.Y. (2006). Manufacture of yoghurt. In A. Tamime (Ed.) *Fermented milks* (pp. 53–75). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Rodrigues K.L., Caputo L.R.G., Carvalho J.C.T., Evangelista J., Schneedorf J.M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25 (5), 404–408.
- Ross-Murphy S.B. (1995). Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. *Journal of Rheology*, 39 (6), 1451–1463.
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163–171.
- Ruas-Madiedo P., de los Reyes-Gavilan C.G. (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88, 843–856.
- Rubinstein M., Colby R.H. (2003). *Polymer Physics*. New York: Oxford University Press.
- Schmidt D.G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In P.F. Fox (Ed.) *Developments in dairy chemistry* (pp. 61–86). London: Applied Science Publishing.

- Schoevers A., Britz T. J. (2003). Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 183–187.
- Shukla A., Rizvi S.S.H., Bartsch J.A. (1995). Rheological characterization of butter using lubricated squeezing flow. *Journal of Texture Studies*, 26, 313–323.
- Siracusa V., Rocculi P., Romani S., Dalla Rosa M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 634–643.
- Sodini I., Remeuf F., Haddad S., Corrieu G. (2004). The relative effect of milk base starter, and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 113–137.
- Sorrentino A., Gorrasi G., Vittoria V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 84–95.
- Steffe J.F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. East Lansing: Freeman Press.
- Stepaniak L., Fetliński A. (2002). Fermented milks - kefir. In H. Roginski (Ed.) *Encyclopedia of dairy sciences* (pp.1049–1054). Amsterdam: Elsevier Ltd.
- Stribeck N. (2007). *X-ray scattering of soft matter*. Berlin: Springer.
- Tada S., Katakura Y., Ninomiya K., Shioya S. (2007). Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefiranoferiens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefir. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103 (6), 557–562.
- Tadros T.F. (2010). *Rheology of dispersions: principles and applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Tamime A.Y., Robinson R.K. (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt - science and technology*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Teraoka I. (2002). *Polymer solutions: an introduction to physical properties*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Toba T., Arihara K., Adachi S. (1990). Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 219–224.

- van Vliet T. (2014). *Rheology and fracture mechanics of foods*. Boca Raton: CRC Press.
- van Vliet T., Lakemond C.M.M., Visschers R.W. (2004). Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9 (5), 298–304.
- Viljoen B.C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 37–44.
- Walstra P. (2003). *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Walstra P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. (2006). *Dairy science and technology*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Wang Q., Cui S.W. (2005). Understanding the physical properties of food polysaccharides. In S.W. Cui (Ed.) *Food carbohydrates – chemistry, physical properties, and applications* (pp. 160–216). Boca Raton: CRC Press.
- Whorlow R.W. (1992). *Rheological techniques*. New York: Ellis Horwood Limited.
- Witthuhn R.C., Cilliers A., Britz T.J. (2005). Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 72 (1), 125–128.
- Xu Z., Raphaelides S.N. (2005). A dynamic U-tube rheometer of novel design for the study of weak gels and foams. *Rheologica Acta*, 45, 77–82.
- Xu X., Chen P., Wang Y., Zhang L. (2009). Chain conformation and rheological behavior of an extracellular heteropolysaccharide Erwinia gum in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 344 (1), 113–119.
- Yang L., Zhang L.-M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 76 (3), 349–361.
- Yokoi H., Watanabe T., Fujii Y., Toba T., Adachi S. (1990). Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 73, 1684–1689.

- Zajšek K., Goršek A. (2011). Experimental assessment of the impact of cultivation conditions on kefir production by the mixed microflora imbedded in kefir grains. *Chemical Engineering Transactions*, 24, 481–486.
- Zajšek K., Kolar M., Goršek A. (2011). Characterisation of the exopolysaccharide kefir produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 64 (4), 544–548.
- Zajšek K., Goršek A., Kolar M. (2013). Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*, 139, 970–977.
- Zhang H., Zhang F, Wu J. (2013). Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze–thaw technique. *Reactive and Functional Polymers*, 73, 923–928.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- Exarhopoulos, S., Raphaelides, S.N., Kontominas, M.G. (2018). Conformational studies and molecular characterization of the polysaccharide kefiran, *Food Hydrocolloids*, 77, 347–356.
- Exarhopoulos, S., Raphaelides, S.N., Kontominas, M.G. (2018). Flow behavior studies of kefiran systems. *Food Hydrocolloids*, 79, 282–290.