ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
(Μ.Δ.Ε.)

ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

PROTEIN RECOVERY FROM DAIRY WASTE

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΥΡΙΑΚΑΚΗ

Α.Μ. 417

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, 2025

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία (Μ.Δ.Ε.) εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Μ.Σ.) του Διατμηματικού Προγράμματος Σπουδών στην «Χημεία και Τεχνολογία των Υλικών» των Τμημάτων Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Χημείας και Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Το Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Μ.Σ) απονέμεται από το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (ΦΕΚ 1949/01.06.2018 τ. Β').

Εγκρίθηκε την 14η Οκτωβρίου 2025 από την εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΒΑΘΜΙΔΑ

1. Απόστολος Αυγερόπουλος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
2. Νικόλαος Ζαφειρόπουλος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Κωνσταντίνος Σαλμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

Δηλώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κάτω από τους διεθνείς ηθικούς και ακαδημαϊκούς κανόνες δεοντολογίας και προστασίας της πνευματικής ιδιοκτησίας. Σύμφωνα με τους κανόνες αυτούς, δεν έχω προβεί σε ιδιοποίηση ξένου επιστημονικού έργου και έχω πλήρως αναφέρει τις πηγές που χρησιμοποίησα στην εργασία αυτή.

Υπογραφή υποψηφίου

Κυριακάκη Χριστίνα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, κ. Αυγερόπουλο Απόστολο για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας, την καθοδήγηση, καθώς και το γεγονός ότι αποτελεί αρωγός κι εμπνευστής για να ακολουθήσω τον τομέα της επιστήμης των πολυμερών. Ευχαριστώ, επίσης, τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ζαφειρόπουλο Νικόλαο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σαλμά Κωνσταντίνο.

Ευχαριστώ εκ βάθους καρδίας τον μεταδιδάκτορα Καρύδη Ανδρεά για την παρότρυνση να ασχοληθώ να ασχοληθώ με τον συγκεκριμένο επιστημονικό κλάδο, για τη πολύτιμη βοήθεια από την αρχή έως το πέρας της διεξαγωγής των πειραμάτων και για την αστείρευτη συμπαράσταση που έδειξε στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη, την Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Μάνεση Γκρέτη-Μαρία, τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Μοσχόβα Δημήτριο, τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Κατσούρα Αθανάσιο, και όλους τους Υποφήφιους Διδάκτορες του Εργαστηρίου Πολυμερικών Υλικών, Τριανταφύλλου Ελένη, Παπαδόπουλο Γεώργιο, Αρτοποιάδη Κωνσταντίνο, για την συνεργασία, τη βοήθεια αλλά και το φιλικό και ζεστό περιβάλλον που χαρακτηρίζει το Εργαστήριο των Πολυμερικών Υλικών.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την αγάπη, την κατανόηση και την οικονομική βοήθεια που μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια. Αντίστοιχα, ευχαριστώ τους φίλους μου για την ενθάρρυνση και τη στήριξη που μου έχουν επιδείξει.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετά τη δυνατότητα αξιοποίησης γαλακτοκομικών αποβλήτων, όπως ληγμένο γάλα, μέσω της απομόνωσης της πρωτεΐνης καζεΐνης και τη χρήση της ως πρώτη ύλη για την ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών. Το θεωρητικό κομμάτι βασίζεται στη διερεύνηση της γαλακτοβιομηχανίας ως ενός σημαντικού αγροδιατροφικού κλάδου, της χημικής σύστασης γάλακτος και γιαουρτιού, της παραγωγής αποβλήτων και των περιβαλλοντικών τους επιπτώσεων, όπως επίσης και των τεχνολογικών καινοτομιών που εφαρμόζονται για την αξιοποίηση παραπροϊόντων. Μελετάται η δομή, η λειτουργικότητα και η σημασία των πρωτεϊνών του γάλακτος, με έμφαση στην καζεΐνη, τη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης και τον κρίσιμο ρόλο φυσικών προσθέτων όπως η χιτοζάνη και η γλυκερόλη για τη βελτίωση των τελικών υλικών.

Πειραματικά, εφαρμόστηκε μεθοδολογία απομόνωσης καζεΐνης από ληγμένο αγελαδινό γάλα, μέσω καθίζησης στο ισοηλεκτρικό σημείο, με πολλαπλά στάδια πλυσίματος και ξήρανσης για την επίτευξη καθαρού προϊόντος. Η παρασκευασμένη καζεΐνη ενσωματώθηκε σε μίγματα με πολυσακχαρίτες (χιτοζάνη) και πλαστικοποιητές (γλυκερόλη), καθώς και σε μεμβράνες πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE), ώστε να βελτιωθούν τα μηχανικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μεμβρανών.

Οι δοκιμές χαρακτηρισμού (XRD, ATR-FTIR, TGA, DMA, SEM, OTR) ανέδειξαν ότι οι πρωτεϊνικές μεμβράνες που παράχθηκαν από γαλακτοκομικά απόβλητα εμφάνισαν ικανοποιητική θερμική σταθερότητα, μηχανική αντοχή και ιδιότητες φραγμού έναντι της μεταφοράς οξυγόνου, ενώ οι συνδυασμοί με χιτοζάνη και γλυκερόλη προσέφεραν βελτιωμένη ευκαμψία και επιφανειακή μορφολογία. Συγκριτικές δοκιμές με LDPE/καζεΐνη επιβεβαίωσαν τη δυνατότητα λειτουργικής ενίσχυσης συμβατικών πολυμερών με βιοϋλικά, διατηρώντας φιλικά προς το περιβάλλον χαρακτηριστικά.

Συνολικά, το έργο επιβεβαιώνει ότι η μετατροπή ληγμένου γάλακτος σε πρώτη ύλη για βιοαποικοδομήσιμες μεμβράνες συσκευασίας είναι τεχνικά εφικτή, περιβαλλοντικά ωφέλιμη και εμπορικά υποσχόμενη για την προώθηση της κυκλικής οικονομίας και της βιώσιμης ανάπτυξης στη βιομηχανία τροφίμων. Τα συμπεράσματα της εργασίας επιβεβαιώνουν ισχυρές προοπτικές για περαιτέρω ερευνητική και βιομηχανική εφαρμογή της διαδικασίας, ενώ παρατίθενται προτάσεις στη βελτιστοποίηση σύνθεσης και παραγωγής των βιοϋλικών.

ABSTRACT

The present master's thesis investigates the potential utilization of dairy waste, such as expired milk, through the isolation of the milk protein casein and its use as a raw material for the development of environmentally friendly biodegradable membranes. The theoretical part focuses on the dairy industry as a major agri-food sector, the chemical composition of milk and yogurt, the generation of waste and its environmental impact, as well as the technological innovations applied for the valorization of dairy by-products. Particular emphasis is placed on the structure, functionality, and significance of milk proteins, especially casein, the protein isolation process, and the critical role of natural additives such as chitosan and glycerol in improving the properties of the final materials.

Experimentally, a casein isolation methodology was applied using expired cow's milk through precipitation at the isoelectric point, followed by multiple washing and drying stages to obtain a purified product. The isolated casein was then incorporated into blends with polysaccharides (chitosan) and plasticizers (glycerol), as well as into low-density polyethylene (LDPE) membranes, in order to enhance their mechanical and functional properties.

Characterization techniques (XRD, ATR-FTIR, TGA, DMA, SEM, OTR) demonstrated that the protein-based membranes produced from dairy waste exhibited satisfactory thermal stability, mechanical strength, and barrier properties against oxygen transmission. Moreover, the incorporation of chitosan and glycerol improved the flexibility and surface morphology of the membranes. Comparative analyses of LDPE/casein composites confirmed the feasibility of enhancing conventional polymers with bio-based materials while maintaining environmentally friendly characteristics.

Overall, this work confirms that the conversion of expired milk into raw material for biodegradable packaging membranes is technically feasible, environmentally beneficial, and commercially promising for promoting circular economy principles and sustainable development in the food industry. The study's findings highlight strong prospects for further research and industrial application of this process, while also proposing optimization strategies for the formulation and production of bio-based materials.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Συντομογραφία	**Πλήρης Ονομασία**
FAO	Food and Agriculture Organization
COD	Chemical Oxygen Demand
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CMC	Carboxymethyl Cellulose
TDS	Total Dissolved Solids
PAC	Powdered Activated Carbon
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanke
TN / TKN	Total Nitrogen / Total Kjeldahl Nitrogen
AD	Αναερόβια χώνευση (Anaerobic Digestion
CSTR	Continuous Stirred Tank Reacto
MARS	Membrane Anaerobic Reactor System
PHA	Polyhydroxyalkanoates
PHB	Polyhydroxybutyrate
Tg	Glass Transition Temperature
DMTA / DMA	Dynamic Mechanical Thermal Analysis
IR / FTIR	Infrared Spectroscopy / Fourier Transform Infrared
TGA	Thermogravimetric Analysis
SEM	Scanning Electron Microscopy
OTR	Oxygen Transmission Rate
PMO	Polymeric Membrane Oxygen
LDPE	Low Density Polyethylene
CD	Circular Dichroism
XRD	X-ray Diffraction
WVTR	Water Vapor Transmission Rate

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο}: ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1.1 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την απομόνωση πρωτεϊνών από γαλακτοκομικά απόβλητα, όπως ληγμένο γάλα, και την αξιοποίησή τους για την παρασκευή βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών συσκευασίας τροφίμων. Η συγκεκριμένη εργασία συνδυάζει την έννοια της βιώσιμης ανάπτυξης με τη χρήση γαλακτοκομικών αποβλήτων, τα οποία συνήθως καταλήγουν ως ανεπιθύμητα απόβλητα, και την επαναχρησιμοποίηση τους σε καινοτόμες εφαρμογές συσκευασίας, μειώνοντας έτσι τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο της γαλακτοβιομηχανίας. Ο σκοπός της μελέτης είναι διττός. Συνδυάζεται η απομόνωση πρωτεϊνης από γαλακτοκομικά απόβλητα με τη χρήση κατάλληλης τεχνικής διαχωρισμού, με την σύνθεση βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών συσκευασίας τροφίμων που παρασκευάζονται από τις απομονωμένες αυτές πρωτεΐνες, σε συνδυασμό με πρόσθετα, όπως η χιτοζάνη και η γλυκερόλη, ακόμη και ένα βιομηχανικό πολυμερές, προκειμένου να επιτευχθούν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στις εφαρμογές συσκευασίας.

Η συγκεκριμένη έρευνα αυτή εντάσσεται στην ανάγκη για ανάπτυξη νέων και βιώσιμων υλικών συσκευασίας, τα οποία να μπορούν να μειώσουν την εξάρτηση από συμβατικά πλαστικά και άλλες μη βιοδιασπώμενες ύλες. Η αξιοποίηση των γαλακτοκομικών αποβλήτων, ως πρώτης ύλης, για τη σύνθεση μεμβρανών συσκευασίας συμβάλλει τόσο στη μείωση των αποβλήτων, όσο και στην ενίσχυση των πρακτικών κυκλικής οικονομίας. Επιπλέον, η μελέτη αναμένεται να έχει σημαντική εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων, βοηθώντας στη βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων, της διάρκειας ζωής τους και της μείωσης των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούνται από τη συσκευασία.

1.2 Δομή της εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία χωρίζεται σε δύο βασικά μέρη: το θεωρητικό και το πειραματικό.

Στο θεωρητικό μέρος παρουσιάζονται τα επιστημονικά και τεχνολογικά θεμέλια που σχετίζονται με την απομόνωση πρωτεϊνών από γαλακτοκομικά απόβλητα. Αρχικά, στο δεύτερο κεφάλαιο αναλύεται η χημική σύσταση του γάλακτος και του γιαουρτιού, η απελευθέρωση γαλακτοκομικών αποβλήτων και οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον. Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στις πρωτεΐνες του

γάλακτος και του γιαουρτιού, τη δομή, τις ιδιότητες και τη βιομηχανική τους αξία. Στη συνέχεια, το τέταρτο κεφάλαιο επικεντρώνεται στις μεθόδους απομόνωσης και καθαρισμού της πρωτεϊνης καζεϊνης, με έμφαση στον ρόλο φυσικών προσθέτων, όπως η χιτοζάνη και η γλυκερόλη, στη βελτίωση των ιδιοτήτων τους.

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει την παρουσίαση της μεθοδολογίας και των αποτελεσμάτων της έρευνας. Στο πέμπτο κεφάλαιο περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, η σύνθεση μεμβρανών, συμπεριλαμβανομένων των πρόσθετων χιτοζάνη και γλυκερόλη, καθώς και οι τεχνικές χαρακτηρισμού και αξιολόγησης των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν. Στο έκτο κεφάλαιο παρατίθενται τα πειραματικά αποτελέσματα, τόσο για την σύνθεση των μεμβρανών όσο και για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των απομονωμένων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα συζητούνται σε σύγκριση με τη σχετική βιβλιογραφία, με στόχο την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Τέλος, στο έβδομο κεφάλαιο συνοψίζονται τα βασικά συμπεράσματα της μελέτης και διατυπώνονται προτάσεις για μελλοντική έρευνα και εφαρμογές. Η εργασία ολοκληρώνεται με τα παραρτήματα, όπου περιλαμβάνονται αναλυτικοί πίνακες, φασματογραφήματα και τεχνικές λεπτομέρειες, καθώς και με τη βιβλιογραφία που αξιοποιήθηκε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο}: ΓΑΛΑΚΤΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

2.1 Βιομηχανία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων

Η βιομηχανία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στο παγκόσμιο διατροφικό σύστημα, καθώς οι άνθρωποι εκτρέφουν ζώα που παράγουν γάλα σχεδόν σε κάθε χώρα του κόσμου. Πρόκειται για μία δυναμική βιομηχανία με σταθερά αυξανόμενες τάσεις παραγωγής.

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος παρουσιάζει συνεχή αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες. Το 2022 η συνολική παραγωγή ξεπέρασε τους 930 εκατομμύρια τόνους. Η συνεχής ζήτηση έχει οδηγήσει σε διεύρυνση του εύρους και της έντασης του παγκόσμιου εμπορίου γαλακτοκομικών προϊόντων [1].

Πράγματι, τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν αναπόσπαστο μέρος του παγκόσμιου διατροφικού συστήματος, προσφέροντας οικονομικά, διατροφικά και κοινωνικά οφέλη σε σημαντικό ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού.

Οι αναπτυσσόμενες χώρες αναδεικνύονται σε βασικούς παραγωγούς γάλακτος, ενώ η μεταποίηση και διάθεση των προϊόντων συγκεντρώνεται, κυρίως στα ανεπτυγμένα έθνη, τα οποία διαθέτουν τη δυνατότητα εξαγωγής τους παγκοσμίως. Η διαρκής ανάπτυξη του συγκεκριμένου βιομηχανικού κλάδου, υπό το υφιστάμενο εμπορικό καθεστώς, έχει δημιουργήσει νέες ευκαιρίες ανάπτυξης, αλλά και προκλήσεις, καθιστώντας αναγκαία την υιοθέτηση νέων πολιτικών προσεγγίσεων [2].

Η γαλακτοβιομηχανία, λόγω της ιδιαίτερης φύσης της, δεν στηρίζεται σε μια περιορισμένη μερίδα του πληθυσμού, αλλά στο ευρύ κοινό, το οποίο κατέχει ενεργό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, περίπου ένα δισεκατομμύριο άνθρωποι βασίζονται στον τομέα της γαλακτοβιομηχανίας για τα μέσα διαβίωσής τους, συμβάλλοντας στη διατήρηση κοινοτήτων σε κάθε γωνιά του κόσμου [3].

Η Ινδία αποτελεί τον μεγαλύτερο παραγωγό και καταναλωτή γάλακτος παγκοσμίως, αντιπροσωπεύοντας το 17% της συνολικής παραγωγής . Οι νέες προκλήσεις και ευκαιρίες που αναδύονται στον απόηχο της παγκοσμιοποίησης έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες για τον κλάδο.

Η επεξεργασία γαλακτοκομικών προϊόντων συγκαταλέγεται μεταξύ των κορυφαίων βιομηχανικών δραστηριοτήτων και αποτελεί το δεύτερο σημαντικότερο τμήμα στον τομέα της επεξεργασίας τροφίμων. Η διατήρηση της ισορροπία μεταξύ της ανάπτυξης της γαλακτοβιομηχανίας και της ταχείας διάδοσης και αφομοίωσης

καινοτομιών σε παραγωγικό επίπεδο είναι καθοριστικής σημασίας για την βιώσιμη οικονομική ανάπτυξη των χωρών. Ο συγκεκριμένος τομέας της βιομηχανίας παραμένει στρατηγικής σημασίας για την παγκόσμια οικονομία.

Για να χαρακτηριστεί ένα προϊόν ως γαλακτοκομικό, πρέπει να προέρχεται από γάλα ζώων, όπως αγελάδες, κατσίκες ή γενικότερα από το γάλα θηλαστικών. Η σύσταση του γάλακτος διαφέρει ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως η φυλή και το είδος του ζώου, το περιβάλλον διαβίωσης, η ηλικία και η διατροφή του [4].

Το γάλα και τα παράγωγά του αποτελούν βασικές διατροφικές πηγές πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς και απαραίτητων μετάλλων, όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο φώσφορος, το ιώδιο και το κάλιο. Επιπλέον, περιέχουν σημαντικές βιταμίνες, μεταξύ των οποίων οι λιποδιαλυτές A, D, E και K, καθώς και οι υδατοδιαλυτές B1, B3, B6 και B12, που αποτελούν θρεπτικά συστατικά ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη υγεία.

Στη δυτική διατροφή, τα γαλακτοκομικά προϊόντα συμβάλλουν κατά 40% έως και 70% στη συνολική ημερήσια πρόσληψη ασβεστίου, σύμφωνα με τις διατροφικές συστάσεις [5].

Η μελέτη των σύγχρονων τάσεων στην παραγωγή και κατανάλωση γάλακτος σε παγκόσμιο επίπεδο αποτελεί πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την ανάπτυξη του εγχώριου γαλακτοκομικού τομέα. Λαμβάνοντας υπόψη τους πρόσφατους παράγοντες που επηρεάζουν την ανταγωνιστικότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων στην παγκόσμια αγορά, μπορεί να αξιοποιηθεί στο έπακρο το δυναμικό των πόρων του κλάδου.

Η παγκόσμια αγορά γάλακτος έχει υποστεί σημαντικές μεταβολές τα τελευταία χρόνια, λόγω αλλαγών στις καταναλωτικές προτιμήσεις, της πανδημίας COVID-19, της διαφοροποίησης των επιπέδων σωματικής δραστηριότητας του πληθυσμού, των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής, καθώς και των παγκόσμιων δημογραφικών ανισορροπιών.

Η παραγωγή γάλακτος πραγματοποιείται σε όλες τις χώρες της Ευρώπης και αντιπροσωπεύει σημαντικό ποσοστό της συνολικής γεωργικής παραγωγής. Κύριες παραγωγικές δυνάμεις στον ευρωπαϊκό χώρο αποτελούν η Γερμανία, η Γαλλία, η Ολλανδία και η Ιταλία, οι οποίες από κοινού ευθύνονται για περίπου το 70% της συνολικής παραγωγής γάλακτος στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Παρά τη μείωση του συνολικού αριθμού θηλαστικών ζώων τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή διατηρείται σε υψηλά επίπεδα, γεγονός που αποδίδεται στη

βελτίωση της γαλακτοπαραγωγικής απόδοσης ανά ζώο. Ενδεικτικά, το 2020 ο αριθμός των αγελάδων στην Ε.Ε. εκτιμήθηκε στα 20 εκατομμύρια, με τη μέση ετήσια παραγωγή να ανέρχεται περίπου στα 7.300 κιλά γάλα ανά αγελάδα [6].

Το 2022, η παραγωγή ακατέργαστου γάλακτος στις φάρμες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανήλθε περίπου στους 160 εκατομμύρια τόνους. Ωστόσο, καταγράφηκε μείωση της τάξης των 0,3 εκατομμυρίων τόνων σε σύγκριση με το προηγούμενο έτος, γεγονός που διαφοροποιείται από την αυξητική τάση που καταγραφόταν σταθερά από το 2010. Η μεγαλύτερη ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος, περίπου 149,9 εκατομμύρια τόνοι, διοχετεύτηκε στη βιομηχανία τυροκομικών προϊόντων, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή φρέσκων και μεταποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων [7].

Τα κύρια γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται από μια γαλακτοβιομηχανία περιλαμβάνουν το γάλα, το οποίο μπορεί να είναι:

- παστεριωμένο (θερμαίνεται στους72^{o}C για 15 δευτερόλεπτα),
- αποστειρωμένο (θερμαίνεται στους 115^{o}C για 20 λεπτά),
- μακράς διαρκείας γάλα (θερμαίνεται σε 138-150^{o}C για 1-4 δευτερόλεπτα σε πολύ υψηλή θερμοκρασία) [8].

Το γάλα μπορεί επίσης να ταξινομηθεί με βάση την περιεκτικότητά του σε λιπαρά, ως εξής:

- πλήρες γάλα με ποσοστό σε λιπαρά 3,25-3,5%,
- μερικώς αποβουτυρωμένο: 1-2% λιπαρά, γνωστό και ως ελαφρύ γάλα,
- αποβουτυρωμένο γάλα με λιπαρά λιγότερο από 0,1%, με αποτέλεσμα και τη χαμηλότερη θερμιδική του αξία.

Στη συνέχεια, συναντώνται τα φρέσκα προϊόντα γάλακτος όπως τα γαλατούχα ροφήματα, τα οποία είναι έτοιμα προς κατανάλωση και παρασκευάζονται από γάλα με την προσθήκη συστατικών, όπως κακάο ή φρούτα. Στην ίδια κατηγορία περιλαμβάνονται επίσης το βούτυρο, καθώς και τα προϊόντα ζύμωσης, όπως το γιαούρτι, η κρέμα γάλακτος και το βουτυρόγαλα.

Ιδιαίτερη θέση στον τομέα των γαλακτοκομικών προϊόντων καταλαμβάνει το τυρί, το οποίο αποτελεί συμπυκνωμένο προϊόν γάλακτος με στερεή μορφή και βασικά συστατικά τις πρωτεΐνες και ορό γάλακτος.

Τα τυριά μπορούν μεταξύ άλλων να ταξινομηθούν με διάφορα κριτήρια, όπως:

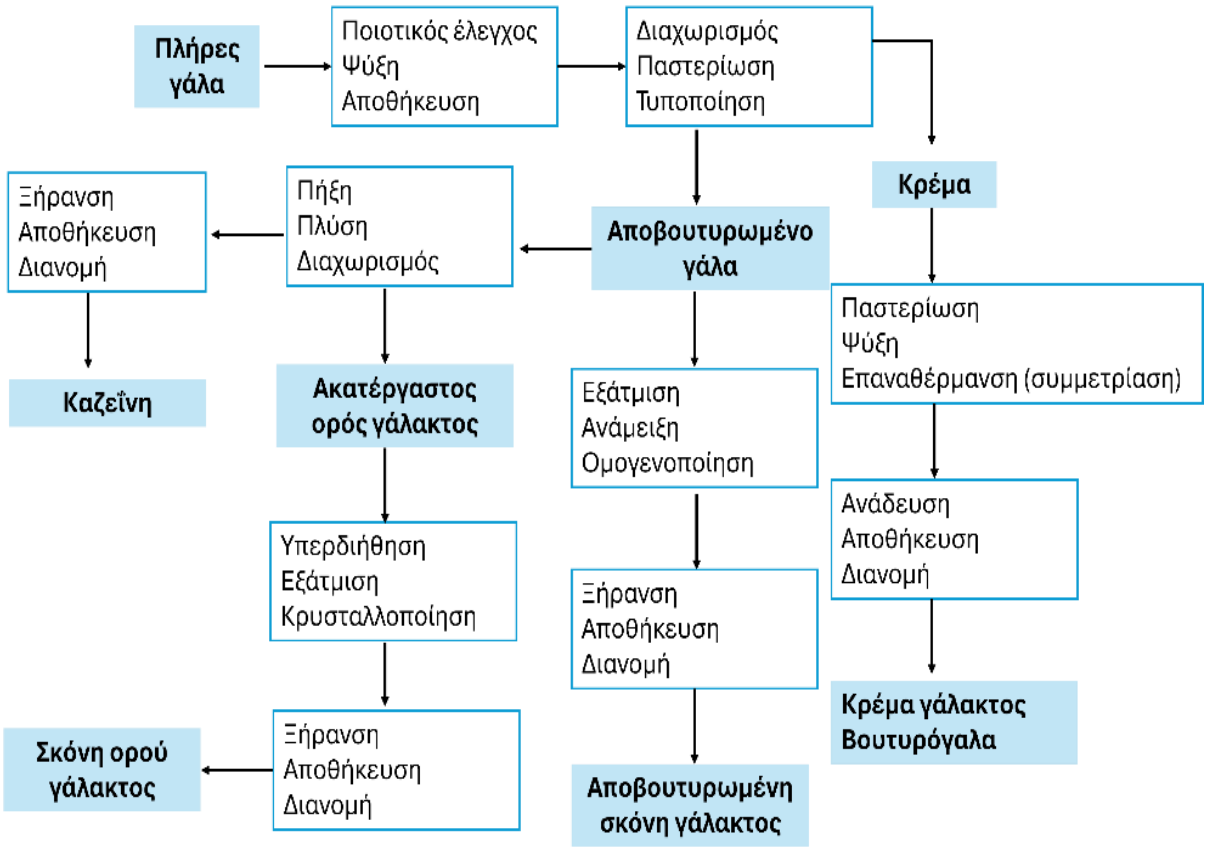
- η περιεκτικότητα σε υγρασία,
- η περιεκτικότητα σε λιπαρά,

- Τα χαρακτηριστικά ωρίμανσης.

Ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής, διακρίνονται σε:

- τυρί από πυτιά, το οποίο παρασκευάζεται απευθείας από γάλα με τη χρήση ενζύμων και οξέος,
- φρέσκο τυρί, το οποίο έχει υψηλό βαθμό οξύτητας και δεν έχει υποστεί πρωτεολυτική ωρίμανση,
- επεξεργασμένο τυρί, το οποίο έχει υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία ώστε να καταστεί κατάλληλο για κατανάλωση και εμπορική διάθεση.

Μια τυπική διαδικασία επεξεργασίας γάλακτος, είτε για την παραγωγή άλλων προϊόντων είτε για άμεση κατανάλωση, παρουσιάζεται παρακάτω:



Εικόνα 1*: Στάδια επεξεργασίας γάλακτος [9].*

2.2 Παραγωγή αποβλήτων / παραπροϊόντων και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Ο βιομηχανικός κλάδος παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί, αδιαμφισβήτητα, ένα ισχυρό μέσο για την επίτευξη οικονομικής ανάπτυξης και επισιτιστικής ασφάλειας., Ωστόσο, ταυτόχρονα, συγκαταλέγεται μεταξύ των μεγαλύτερων πηγών βιομηχανικών αποβλήτων.

Ένα τυπικό ευρωπαϊκό γαλακτοκομείο παράγει, κατά μέσο όρο, περίπου πεντακόσιες χιλιάδες κυβικά λίτρα υγρών αποβλήτων ημερησίως [10]. Τα γαλακτοκομικά απόβλητα περιέχουν κυρίως πρωτεΐνες, άλατα, λιπαρά, λακτόζη, καθώς και υπολείμματα χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται κατά τις διαδικασίες καθαρισμού [11].

Δεδομένου ότι η γαλακτοβιομηχανία παράγει πληθώρα προϊόντων, όπως γάλα, γιαούρτι, βούτυρο, τυρί, συμπυκνωμένο γάλα, σκόνη γάλακτος, παγωτό και διάφορα είδη επιδορπίων, τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ποικίλλουν σημαντικά, ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου προϊόντος, το παραγωγικό σύστημα και τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους επεξεργασίας [12].

Η συνεχής επιβάρυνση του περιβάλλοντος από τη ζωική παραγωγή έχει οδηγήσει στην εντατικοποίηση της έρευνας με στόχο την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ παραγωγής και οικοσυστήματος. Η κατεύθυνση αυτή αποσκοπεί στην αξιολόγηση της οικολογικής βιωσιμότητας των διαφόρων συστημάτων ζωικής εκμετάλλευσης με έναν ολοκληρωμένο τρόπο.

Η επεξεργασία κάθε όγκου γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα την αποβολή 1 έως 3 φορές μεγαλύτερου όγκου υγρών αποβλήτων στο περιβάλλον, το οποίο υπολογίζεται σε 3,739-11,217 εκατομμύρια κυβικά μέτρα ετησίως [13]. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα που καταλήγουν ως απόβλητα κάθε χρόνο στην Ευρώπη εκτιμάται ότι ανέρχονται σε 29 εκατομμύρια τόνους, αποτελώντας σοβαρή απειλή για τη βιοποικιλότητα. Οι μεγάλες αυτές ποσότητες οφείλονται, μεταξύ άλλων, σε τυχαία περιστατικά που μπορεί να συμβούν στις φάρμες, όπως διαρροές κατά τη συλλογή για ανάλυση ή ατυχήματα στη μεταφορά, π.χ. κατεστραμμένες συσκευασίες.

Λόγω της σύστασής τους και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λίπος και οργανικές ουσίες, τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας είναι στην επεξεργασία τους ως απορρίμματα. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που

προκαλεί η άμεση απόρριψη ανεπεξέργαστων υγρών λυμάτων στο περιβάλλον είναι η εξάντληση του διαθέσιμου οξυγόνου. Στην περίπτωση των λιπαρών λυμάτων, όπως του λαδιού και του λίπους, σχηματίζεται ένα φιλμ στην επιφάνεια του νερού, το οποίο εμποδίζει τη μεταφορά οξυγόνου και οδηγεί στη δημιουργία μη φυσιολογικών συνθηκών για την επιβίωση της υδρόβιας ζωής. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν εναλλακτικές βιοτεχνολογικές χρήσεις αυτών των αποβλήτων [14].

Εικόνα 2*: Η ιεράρχηση της διαχείρισης των αποβλήτων βάσει της Οδηγία 2018/851/ΕΚ [15].*

Η Οδηγία (ΕΕ) 2018/851 ορίζει το πλαίσιο για τη διαχείριση των αποβλήτων στα κράτη μέλη, συμπεριλαμβανομένης της αρχής της «διευρυμένης ευθύνης των παραγωγών». Δίνει προτεραιότητα στην πρόληψη της δημιουργίας αποβλήτων ως τη βέλτιστη επιλογή, ενώ ακολουθούν η προετοιμασία για επαναχρησιμοποίηση, η ανακύκλωση, η ανάκτηση και, τέλος, η διάθεση (Οδηγία 2018/851/ΕΚ ΕΕ L 150 της 14.06.2018). Η ιεράρχηση της διαχείρισης των αποβλήτων καθορίζεται στο άρθρο 4 της Οδηγίας 2008/98/ΕΚ όπως αυτή τροποποιήθηκε και αποδίδεται σχηματικά στην Εικόνα 2 [15].

Ως απόβλητο (waste) ορίζεται κάθε ουσία ή αντικείμενο το οποίο ο κάτοχός του απορρίπτει ή προτίθεται ή υποχρεούται να απορρίψει (Οδηγία 2008/98/ΕΚ ΕΕ L 312 της 22.11.2008). Αντίθετα, ως υποπροϊόν (by-product) νοείται μια ουσία ή ένα αντικείμενο που προκύπτει από μια διαδικασία παραγωγής, ο πρωταρχικός σκοπός της οποίας δεν είναι η παραγωγή της εν λόγω ουσίας ή του εν λόγω αντικειμένου. Εφόσον πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις, η ουσία αυτή δεν θεωρείται απόβλητο, αλλά υποπροϊόν.

***Εικόνα 3**: Δενδροδιάγραμμα βάσει του οποίου κρίνεται κατά πόσον ένα υλικό θα ταξινομηθεί στα απόβλητα ή στα υποπροϊόντα [15].*

2.3 Αξιοποίηση παραπροϊόντων γαλακτοβιομηχανίας

Από τη εποχή της Βιομηχανικής Επανάστασης και έως σήμερα, οι ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν εξελιχθεί σε έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν το φυσικό περιβάλλον και τα οικοσυστήματα της Γης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της επίδρασης αποτελούν η ανθρωπογενής κλιματική αλλαγή και οι σοβαρές επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα. Η περίοδος αυτή προτείνεται (αν και δεν έχει ακόμα επίσημα οριστεί) να ονομαστεί Ανθρωπόκαινος εποχή (ή Ανθρωπόκαινο). Η παραγωγή αποβλήτων και ανεπιθύμητων παραπροϊόντων αποτελεί αναπόφευκτη συνέπεια των περισσότερων βιομηχανικών, οικονομικών και κοινωνικών

δραστηριοτήτων. Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι παράγονται περίπου 7 έως 9 δισεκατομμύρια τόνοι αποβλήτων κάθε χρόνο [16].

Σημαντική επιβάρυνση στο πρόβλημα των Αστικών Στερεών Αποβλήτων έχει επιφέρει η πανδημία COVID-19. Συγκεκριμένα, έχει ήδη αρχίσει να διαφαίνεται ότι η ραγδαία αύξηση πλαστικών μιας χρήσης, όπως γαντιών και υγειονομικών μασκών –σε μια περίοδο κατά την οποία στην Ευρωπαϊκή Ένωση είχαν αρχίσει να εφαρμόζονται σημαντικά μέτρα μείωσής τους– αναμένεται να αποτελέσει πρόκληση για τα επόμενα χρόνια, όσον αφορά τη συλλογή και τη διαχείρισή τους στο τέλος του κύκλου ζωής τους [17]. Μελέτη που δημοσιεύτηκε πρόσφατα έδειξε ότι παραπάνω από 8 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών αποβλήτων παρήχθησαν λόγω της πανδημικής κρίσης, εκ των οποίων περισσότεροι από 25.000 τόνοι κατέληξαν στον υδροφόρο ορίζοντα και τους ωκεανούς.

Η αύξηση της ζήτησης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων σε αρκετές χώρες έχει οδηγήσει στην τεράστια ανάπτυξη του γαλακτοκομικού τομέα στον κόσμο. Ωστόσο, η ταχεία βιομηχανική ανάπτυξη δεν αυξάνει μόνο την παραγωγικότητα, αλλά οδηγεί επίσης σε αυξημένη απελευθέρωση τοξικών ουσιών στη γη ή τις δεξαμενές νερού. Αυτή η απελευθέρωση έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του περιβάλλοντος και γίνεται λόγος για σοβαρούς κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου. Λόγω του υψηλού οργανικού περιεχομένου, τα απόβλητα από τις γαλακτοβιομηχανίες αποτελούν πραγματική απειλή για το περιβάλλον [18]. Η διάθεση της σημαντικής ποσότητας λυμάτων αποτελεί πραγματική πρόκληση. Γενικά, τα λύματα των γαλακτοκομικών προϊόντων επεξεργάζονται με φυσικοχημικές και βιολογικές μεθόδους. Οι βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας προτιμώνται, καθώς παρουσιάζουν χαμηλότερο κόστος σε σχέση με τα αντιδραστήρια και της περιορισμένης ικανότητας απομάκρυνσης του COD με τις φυσικοχημικές μεθόδους. Ο αυξανόμενος αριθμός μελετών που εστιάζουν στα γαλακτοκομικά λύματα και στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων τους, επιβεβαιώνει τη σημασία της έρευνας στον τομέα αυτό [19]. Τα συγκεκριμένα απόβλητα μπορούν να αξιοποιηθούν αποτελεσματικά ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων βιομηχανικών προϊόντων ή για την παραγωγή ενέργειας.

Οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία γαλακτοκομικών λυμάτων έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές εναλλακτικές λύσεις [18]. Στο πλαίσιο της αναζήτησης λύσεων για περιβαλλοντικά προβλήματα, αυτές οι μέθοδοι μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση του οργανικού φορτίου των

γαλακτοκομικών αποβλήτων. Λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την αξιοποίηση των απορριμμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων με στόχο τη μείωση της ρύπανσης, είναι απαραίτητο να εξεταστεί η σύνθεσή τους, να πραγματοποιηθεί ο χαρακτηρισμός τους και να διευρυνθούν οι δυνατότητες αξιοποίησή τους. Η παρούσα ανασκόπηση εξετάζει τον τύπο και τη σύνθεση των αποβλήτων που παράγονται από τις γαλακτοβιομηχανίες, την επεξεργασία τους και τη σωστή αξιοποίηση. Ειδικά, εστιάζει σε βιοτεχνολογικές εναλλακτικές για την αξιοποίησή του.

2.3.1 Είδος αποβλήτων που παράγονται κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων

Τα λύματα της γαλακτοβιομηχανίας παράγονται σε μεγάλες ποσότητες — περίπου 6 έως 10 λίτρα ανά λίτρο επεξεργασμένου γάλακτος — και προέρχονται κυρίως από τα στάδια παραγωγής, καθαρισμού και υγιεινής. Χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές BOD (40 – 48.000 mg/L) και COD (80 – 95.000 mg/L), γεγονός που υποδηλώνει μεγάλη περιεκτικότητα σε οργανική ύλη [20]. Περιέχουν κυρίως λακτόζη, λίπη, πρωτεΐνες, καζεΐνη, άζωτο και φώσφορο, καθώς και υπολείμματα απορρυπαντικών και απολυμαντικών. Το pH τους κυμαίνεται από 4,7 έως 11, ενώ η συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών φτάνει τα 100 – 1000 mg/L. Οι κύριες πηγές ρύπανσης προέρχονται από την παραγωγή τυριού, βουτύρου και ορού γάλακτος.

2.3.2 Διεργασίες και διάθεση γαλακτοκομικών αποβλήτων

Αν και σε πολλές χώρες τα γαλακτοκομικά απόβλητα απορρίπτονται απευθείας στο υδάτινο περιβάλλον, αυτή η πρακτική δεν συνίσταται, λόγω των συνεπειών που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Επομένως, υπάρχουν εναλλακτικές μέθοδοι επεξεργασίας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε φυσικοχημικές και βιολογικές επεξεργασίες [21].

Α. <u>Φυσικο-χημικές διεργασίες</u>

Η καταστροφή και η μείωση του λίπους του γάλακτος καθώς και των πρωτεϊνικών κολλοειδών στα λύματα των γαλακτοκομικών βιομηχανιών μπορούν να επιτευχθούν μέσω φυσικοχημικών επεξεργασιών. Ένα από τα σημαντικότερα στάδια της φυσικοχημικής επεξεργασίας είναι η πήξη (κροκίδωση), η οποία συμβάλλει στην επεξεργασία των βιομηχανικών λυμάτων. Το στάδιο αυτό μειώνει τα αιωρούμενα και κολλοειδή σωματίδια που ευθύνονται για τη θολότητα του νερού και συμβάλλει στη μείωση των οργανικών ουσιών που καθορίζουν το περιεχόμενο του COD και του BOD.

Η προσθήκη πηκτικού παράγοντα οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της σωματιδιακής ύλης των λυμάτων, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση των σωματιδίων και τον σχηματισμό κροκίδων, που στη συνέχεια επιπλέουν ή καθιζάνουν.

Η φυσική πήξη στα λύματα γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση συγκεκριμένων βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Τα βακτήρια αυτά ζυμώνουν τη λακτόζη, μετατρέποντάς τη σε γαλακτικό οξύ, το οποίο προκαλεί μετουσίωση της πρωτεΐνης γάλακτος στα λύματα. Ο συνδυασμός με χιτοζάνη οδήγησε σε μείωση της COD κατά 49-82%, ενώ η χρήση CMC (καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη), επιτυγχάνει μείωση της COD κατά 65-78% [22]. Σε σύγκριση με το κοινό πηκτικό, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ακόμη χαμηλότερη δόση (10 mgL^{-1}) χιτοζάνης (χρησιμοποιώντας ως πηκτικό) οδήγησε σε σημαντικά μειωμένες τιμές COD και TDS.

Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η επεξεργασία με ενεργό άνθρακα σε σκόνη (PAC) μετά από επεξεργασία χιτοζάνης είναι πολύ χρήσιμη για την αφαίρεση πλήρους χρώματος και οσμής από τα λύματα.

Β. Βιολογικές διεργασίες

Ο βιολογικός καθαρισμός αποτελεί την πιο προτιμώμενη μέθοδο επεξεργασίας των λυμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων. Περιλαμβάνει διεργασίες όπως φίλτρα ροής, αεριζόμενες λιμνοθάλασσες, ενεργοποιημένη ιλύ, κάλυμμα αναερόβιας ιλύος ανοδικής ροής (UASB), αναερόβια φίλτρα, αντιδραστήρα διαδοχικής παρτίδας (SBR) κ.α. [23]. Πρόκειται για την πιο αποτελεσματική και πολλά υποσχόμενη μέθοδο απομάκρυνσης των οργανικών υλικών από τα γαλακτοκομικά απόβλητα.

Ωστόσο, ο σχηματισμός ιλύος κατά τη διάρκεια της αερόβιας βιοαποικοδόμησης μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα διάθεσης, τα οποία είναι και δαπανηρά, καθώς περιλαμβάνουν την επεξεργασία της παραγόμενης ιλύος λυμάτων. Η ικανότητα της ιλύος να προσροφά οργανικά υλικά αλλά και τοξικά βαρέα μέταλλα, μπορεί επίσης να αποτελέσει ένα σημαντικό πρόβλημα. Παρ' όλα αυτά, το βιολογικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να μετασχηματίζει μικροβιολογικά πολύπλοκες οργανικές ενώσεις και ακόμη να προσροφά βαρέα μέταλλα, εφόσον υπάρχουν κατάλληλοι μικροοργανισμοί.

Με βάση τις ανάγκες σε οξυγόνο, η βιολογική επεξεργασία διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: αερόβιες και αναερόβιες μεθόδους. Η αερόβια μέθοδος εφαρμόζεται στις περισσότερες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων, ωστόσο παρουσιάζει μειωμένη απόδοση, κυρίως λόγω της ταχείας οξίνισης και της

νηματοειδούς ανάπτυξης, που οφείλονται στη χαμηλή ρυθμιστική ικανότητα νερού και το υψηλό επίπεδο λακτόζης, αντίστοιχα.

Η αερόβια βιολογική επεξεργασία βασίζεται στη δράση μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο και οξειδώνουν τις οργανικές ενώσεις σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό και κυτταρικό υλικό. Το άζωτο από την αμμωνία (NH_3) αποικοδομείται εύκολα με αυτή τη μέθοδο, ενώ η αποτελεσματικότητα είναι αρκετά μειωμένη σε περίπτωση απομάκρυνσης του φωσφόρου και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε σύγκριση με τα αναερόβια βακτήρια, τα αερόβια είναι λιγότερο αποδοτικά.

Οι διεργασίες πλήρους ανάμειξης είναι πιο ευαίσθητες στο πρόβλημα υψηλού οργανικού φορτίου, όπως η διόγκωση της ιλύος, και επομένως, είναι λιγότερο αποτελεσματικές από τα συστήματα ροής βύσματος [24]. Σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας, η επεξεργασία συνθετικών λυμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να επιτύχει καλά αποτελέσματα σε αερόβιο βιολογικό σύστημα, με πάνω από 96% αποικοδόμηση επιτυγχάνεται και με τιμές COD, ολικού αζώτου Kjeldhal (TKN) και pH ίσες με 4 gL^{-1}, 1gL^{-1} και 11,5, αντίστοιχα.

Οι αναερόβιες μέθοδοι επεξεργασίας θεωρούνται πιο κατάλληλες από τα αερόβια σύστημα, κυρίως λόγω της οικονομικής τους αποδοτικότητας. Πολλοί ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι οι αναερόβιες διεργασίες αποτελούν ουσιαστικά τη μοναδική βιώσιμη μέθοδος επεξεργασίας λυμάτων με υψηλό οργανικό φορτίο, όπως αυτά που προέρχονται από την τυροκομία. Ορισμένα παραδείγματα τεχνικών αναερόβιας επεξεργασίας είναι τα εξής: αναερόβια χώνευση (AD), UASB, αναερόβιο φίλτρο ανόδου, πλήρως αναδευόμενο αντιδραστήρα δεξαμενής (CSTR), διαδικασία αναερόβιας επαφής, χωνευτές διογκωμένης κλίνης ή/και ρευστοποιημένης κλίνης, σύστημα αναερόβιου αντιδραστήρα μεμβράνης (MARS) και χωνευτές σταθερής κλίνης.

2.3.3 Βιοτεχνολογικές μέθοδοι για απόβλητα βιομηχανίας γάλακτος

Ως βιοαποδομήσιμα υλικά, τα βιοπλαστικά — και ιδιαίτερα τα πολυϋδροξυαλκανοϊκά (PHA) — έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση στα πλαστικά που προέρχονται από ιδιαίτερα ρυπογόνα έλαια. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή PHA από ορό γάλακτος. Οι Marangoni, Furigo και de Aragão (2002) παρήγαγαν PHA από υδρολυμένο ορό γάλακτος με διαπέρασμα με *Ralstonia eutropha* DSM545.

Τα πολυυδροξυβουτυρικά (PHB) αποτελούν τον πιο κοινό τύπος PHA και μπορούν να παραχθούν από το *Bacillus megaterium* SRKP-3. Τα απόβλητα της γαλακτοβιομηχανίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα, επιτυγχάνοντας μέγιστη απόδοση παραγωγής PHB (11,32 gL^{-1}) έπειτα από 36 ώρες καλλιέργειας σε βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο [25].

Το *Brevibacterium casei* SRKP2 έχει επίσης τη δυνατότητα να αξιοποιεί τα βιομηχανικά απόβλητα γάλακτος ως πηγή άνθρακα, οδηγώντας στην παραγωγή PHB. Σε μια βυθισμένη καλλιέργεια, το βακτήριο αυτό μπορεί να παράγει PHB (2,940 gL^{-1}) σε 48 ώρες στους 37 °C [26].

Επιπλέον, το *Pseudomonas hydrogenovora* ήταν ικανό να συν-μεταβολίζει τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη από το διήθημα ορού γάλακτος υδρολυμένο με λακτόζη και να παράγει PHB [27]. Το συγκεκριμένο βιοπλαστικό είναι φιλικό προς το περιβάλλον και παρουσιάζει σημαντικές εφαρμογές στον ιατρικό τομέα. Παράλληλα, μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή νανοσωματιδίων, με στόχο τη διευκόλυνση της μεταφοράς φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό.

2.4 Παραγωγή καινοτόμων υλικών

Η αξιοποίηση των απορριμμάτων τροφίμων εντάσσεται στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας και αποσκοπεί στη μετατροπή τους σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, όπως βιοκαύσιμα, βιολιπάσματα, ζωοτροφές και βιοπολυμερή. Τα αγροδιατροφικά απόβλητα, πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις και φυσικά πολυμερή, αποτελούν εναλλακτικές πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαποδομήσιμων υλικών συσκευασίας, μειώνοντας ταυτόχρονα τη ρύπανση και τη σπατάλη πόρων [28]. Ο πρόσφατος ευρωπαϊκός κανονισμός για τη μείωση των συνθετικών πλαστικών ενισχύει την ανάπτυξη βιοπολυμερών από ανανεώσιμες πηγές, συμβάλλοντας στη βιώσιμη διαχείριση των αποβλήτων. Παρά τις σημαντικές ερευνητικές προόδους, η εμπορική εφαρμογή των βιολογικών υλικών παραμένει περιορισμένη λόγω τεχνικών, οικονομικών και νομοθετικών προκλήσεων [29]. Η περαιτέρω ανάπτυξη βιώσιμων τεχνολογιών, η επένδυση σε καινοτόμες διαδικασίες και η ενίσχυση της κοινωνικής αποδοχής αποτελούν κρίσιμες προϋποθέσεις για την επιτυχή μετάβαση προς μια πλήρως κυκλική και περιβαλλοντικά υπεύθυνη βιοοικονομία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο}: ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

3.1 Δομή και φορτίο πρωτεϊνικών μορίων

Οι πρωτεΐνες είναι από τα πιο άφθονα οργανικά μόρια και διαθέτουν το ευρύτερο φάσμα λειτουργιών σε σχέση με όλα τα άλλα μακρομόρια. Κάθε κύτταρο ενός ζωντανού οργανισμού μπορεί να περιέχει χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες, η κάθε μία από τις οποίες επιτελεί μία μοναδική λειτουργία [30].

Οι πρωτεΐνες σχηματίζονται με πολυμερισμό αμινοξέων και απαντώνται σε ποικίλα μεγέθη και σχήματα. Η δομή τους, όπως και οι λειτουργίες τους, ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό.

Κατά κανόνα, η σύστασή τους περιλαμβάνει άτομα άνθρακα (C) σε ποσοστό 50-55%, μόρια υδρογόνου (H_2) σε ποσοστό 6-7%, μόρια οξυγόνου (O_2) 20-23%, μόρια αζώτου (N_2) 12-19% και άτομα θείου 0,2-03%.

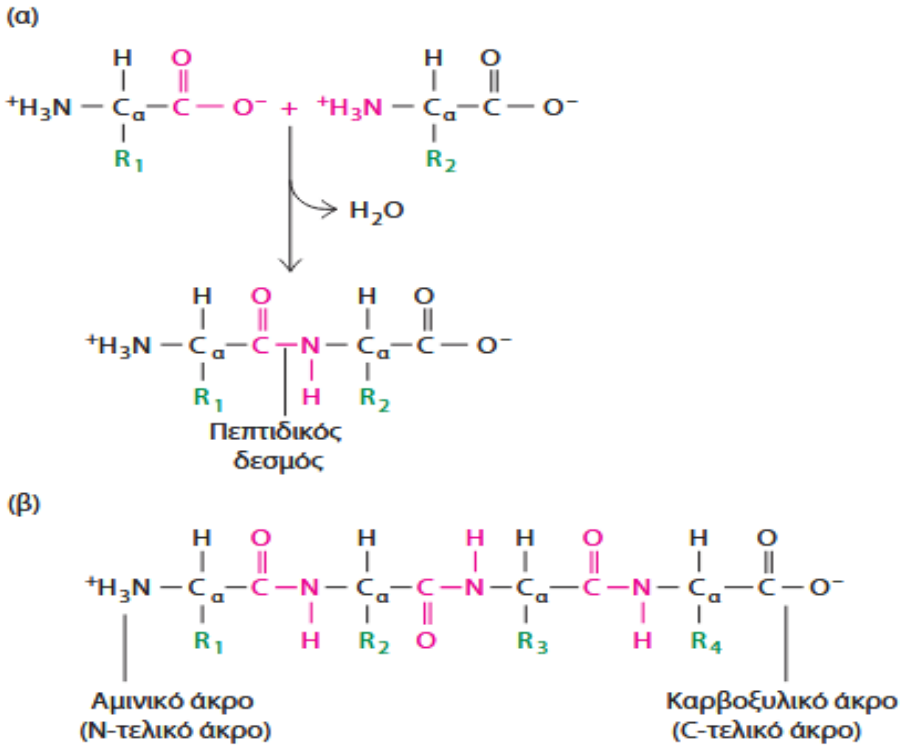
Όλες, ωστόσο, οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή αμινοξέων, των οποίων οι δομικές μονάδες είναι τα ίδια τα αμινοξέα. Αυτά συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς, οι οποίοι είναι χημικοί, ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ ενός ατόμου άνθρακα (C) και ενός ατόμου αζώτου (N). Ο δεσμός αυτός συνδέει την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) ενός αμινοξέος με την αμινική ομάδα (-NH_2) ενός γειτονικού αμινοξέος, με ταυτόχρονη έκλυση ενός μορίου νερού.

Στα άκρα των μακρομοριακών αλυσίδων των πρωτεϊνών βρίσκονται δύο τελικά αμινοξέα. Το ένα άκρο φέρει μία ελεύθερη αμινομάδα (N-τελικό αμινοξύ) και το άλλο φέρει ένα καρβοξύλιο (C-τελικό αμινοξύ).

Κάθε πρωτεΐνη συμπεριφέρεται σαν αμφότερο μόριο, δηλαδή αποτελείται από μία ομάδα που συμπεριφέρεται σα βάση και μία ομάδα που συμπεριφέρεται σαν οξύ. Τα συγκεκριμένα οργανικά μόρια έχουν ιδιότητα αμφολύτη.

Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες εμφανίζουν ένα ισοηλεκτρικό σημείο (pI), στο οποίο η πρωτεΐνη έχει συνολικό ηλεκτρικό φορτίο μηδέν, δηλαδή ο αριθμός των θετικών και των αρνητικών φορτίων είναι ίσος. Το pH του περιβάλλοντος παίζει καθοριστικό ρόλο στο είδος του φορτίου που φέρει η πρωτεΐνη.

Όταν το pH είναι όξινο, δηλαδή η τιμή είναι μικρότερη από εκείνη του ισοηλεκρικού σημείου, τότε οι αμινομάδες φέρουν θετικό φορτίο (-NH_3^+) Αντίθετα, όταν η τιμή του pH είναι υψηλότερη από την τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου (αλκαλικό pH), οι καρβονυλομάδες φέρουν αρνητικό φορτίο ($COOH^-$) [32].



***Εικόνα 4**: (α) Τα μεμονωμένα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζονται μέσω αντιδράσεων που οδηγούν στην απομάκρυνση νερού (αφυδάτωση). Τα R 1, R2, κ.λπ., αντιπροσωπεύουν τις πλευρικές ομάδες ("ομάδες R") των αμινοξέων. (β) Τα γραμμικά πολυμερή των αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς ονομάζονται πολυπεπτίδια και έχουν ένα ελεύθερο αμινο-τελικό άκρο (N-τελικό) και ένα ελεύθερο καρβοξυ-τελικό άκρο (C-τελικό). [31]*

$R-C(H)(NH_3^+)-COOH$	$R-C(H)(NH_3^+)-COO^-$	$R-C(H)(NH_2)-COO^-$
μορφή II	διπολικό ιόν μορφή I	μορφή III
pH < pI	pH = pI	pH > pI
Το αμινοξύ εμφανίζεται φορτισμένο θετικά.	Το αμινοξύ έχει συνολικό φορτίο μηδέν.	Το αμινοξύ εμφανίζεται φορτισμένο αρνητικά.

***Εικόνα 5**: Είδος μοριακού φορτίου ανάλογα με τη τιμή pH, βάσει του ισοηλεκρικού σημείου. [33]*

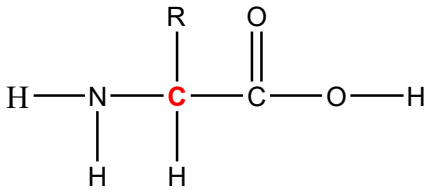
Τόσο στο όξινο όσο και σε αλκαλικό περιβάλλον, τα μόρια φέρουν ένα μόνο είδος φορτίου, με αποτέλεσμα να ασκούνται μεταξύ τους σημαντικές ηλεκτροστατικές απώσεις.

Οι πρωτεΐνες διαθέτουν διαφορετικά ισοηλεκτρικά σημεία, λόγω των διαφορών στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, και έτσι μπορούν να διαχωριστούν με τη ρύθμιση του pH ενός διαλύματος. Όταν το pH ρυθμιστεί στο ισοηλεκτρικό σημείο pI μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αυτή καταβυθίζεται, ενώ οι υπόλοιπες παραμένουν στο διάλυμα. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή ο σχηματισμός συσσωματωμάτων και η επακόλουθη καταβύθιση, ονομάζεται κροκίδωση και οφείλεται στις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μακρομορίων.

3.1.1 Δομή άλφα αμινοξέων

Τα κύρια δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών, όπως προαναφέρθηκε, ονομάζονται α αμινοξέα. Όπως δηλώνει το όνομα τους, περιέχουν μία λειτουργική ομάδα καρβοξυλικού οξέος και μια λειτουργική ομάδα αμίνης. Η ονομασία άλφα χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει ότι αυτές οι δύο ομάδες διαχωρίζονται μεταξύ τους με ένα άτομο άνθρακα. Εκτός από την αμίνη και το καρβονύλιο, ο άνθρακας α συνδέεται, επίσης, με ένα άτομο υδρογόνου και μία επιπλέον ομάδα που μπορεί να ποικίλλει σε μέγεθος και σε μήκος. Η τελευταία ομάδα χαρακτηρίζεται ως R ομάδα. Στη φύση συναντώνται είκοσι (20) διαφορετικά αμινοξέα που χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία πρωτεϊνών, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στη θέση και στο είδος της ομάδας R [34].

Η βασική δομή ενός αμινοξέος παρουσιάζεται παρακάτω:



Υπάρχουν, συνολικά, είκοσι (20) άλφα αμινοξέα, τα οποία συνήθως ενσωματώνονται σε πρωτεϊνικές δομές. Οι διαφορετικές R πλευρικές ομάδες παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, βάσει της φύσης των ατόμων που τις απαρτίζουν. Υπάρχουν ομάδες R που περιέχουν κυρίως άτομα άνθρακα και υδρογόνου και είναι μη πολικές ή υδρόφοβες. Άλλες περιέχουν πολικά, μη φορτισμένα μόρια, όπως αλκοόλες, αμίδια ή θειόλες. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα, έχουν την ικανότητα να

σχηματίζουν φορτία και μπορεί να εμφανίσουν ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Κάθε αμινοξύ μπορεί να εκφραστεί, χρησιμοποιώντας έναν μοναδικό κωδικό τριών (3) γραμμάτων [30].

Μη πολικά υδρόφοβα αμινοξέα

Τα μη πολικά αμινοξέα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο ειδικότερες κατηγορίες, τα αλειφατικά και τα αρωματικά. Τα αλειφατικά (γλυκίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, προλίνη) περιέχουν, συνήθως, διακλαδισμένες αλυσίδες υδρογονανθράκων, με τη γλυκίνη να εμφανίζει την απλούστερη δομή. Στη δεύτερη υποκατηγορία, τα αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη), όπως υποδηλώνει το όνομα τους, περιέχουν αρωματικές ομάδες στη δομή τους, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε άτομα άνθρακα και υδρογόνου. Κάθε ένα από τα αμινοξέα μπορεί να φέρει διαφορετικές χημικές και φυσικές ιδιότητες, ανάλογα με τη δομή.

Πολικά (υδρόφιλα) αμινοξέα

Με τη σειρά τους, τα πολικά αμονοξέα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, τις πολικές μη φορτισμένες δραστικές ομάδες, τις βασικές και τις όξινες. Στην κατηγορία των πολικών, μη φορτισμένων, οι πλευρικές αλυσίδες φέρουν ετεροάτομα (οξυγόνο, θείο, άζωτο), τα οποία είναι ικανά να σχηματίσουν μόνιμα δίπολα, εντός της ομάδας R. Πολλά από τα αμινοξέα με υδρόφιλες ομάδες R μπορούν να συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Πιο αναλυτικά, το ενεργό κέντρο είναι το τμήμα του ενζύμου που συνδέεται άμεσα με ένα «υπόστρωμα» και εκεί λαμβάνει χώρα η εκάστοτε αντίδραση. Τα ένζυμα, τα οποία προέρχονται από πρωτεΐνες, εμφανίζουν πλευρικές ομάδες που αποτελούνται από ομάδες R αμινοξέων, προάγοντας τον σχηματισμό ή την αποικοδόμηση χημικών δεσμών.

3.2 Χημική σύσταση γάλακτος και γιαουρτιού

Χημική σύσταση γάλακτος

Το γάλα αποτελεί μία από τις πιο πλήρεις και θρεπτικές πρώτες ύλες της ανθρώπινης διατροφής, καθώς περιέχει ένα πολύπλοκο μίγμα θρεπτικών συστατικών. Η σύστασή του ποικίλλει ανάλογα με το είδος του ζώου, τη διατροφή, την εποχή, αλλά και τις συνθήκες συντήρησης.

Το αγελαδινό γάλα, που είναι και το πιο ευρέως καταναλώσιμο, παγκοσμίως, παρουσιάζει κατά μέσο όρο την εξής χημική σύσταση: νερό (≈ 87%), υδατάνθρακες

(≈ 4,5–5%), λίπος (≈ 3,5–4%), πρωτεΐνες (≈ 3,2–3,5%), ανόργανα άλατα και ιχνοστοιχεία (≈ 0,7%), καθώς και βιταμίνες σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Αναλυτικότερα, ο κύριος υδατάνθρακας του γάλακτος είναι η λακτόζη, η οποία αποτελεί περίπου το 98% των συνολικών σακχάρων. Η λακτόζη διασπάται ενζυμικά από τη λακτάση, παρέχοντας γλυκόζη και γαλακτόζη. Εκτός από τη συμβολή της στην ενεργειακή πρόσληψη, η λακτόζη συμμετέχει και στη ρύθμιση της απορρόφησης ασβεστίου [5].

Τα λιπίδια του γάλακτος απαντώνται κυρίως υπό μορφή γαλακτικών σφαιριδίων, πλούσιων σε τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και στερόλες. Το γάλα περιέχει σημαντικό αριθμό κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι εύκολα απορροφήσιμα και παρουσιάζουν βιολογικές δράσεις. Τα λιπίδια συμβάλλουν στην ενεργειακή αξία, στην υφή και στη γεύση του γάλακτος.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις καζεΐνες (≈ 80%) και τις πρωτεΐνες του ορού (≈ 20%). Οι καζεΐνες σχηματίζουν μικκύλια και είναι πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα, αποτελώντας σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών. Το pH του αγελαδινού γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ 6,7-6,8, και οι φωσφορικές ομάδες απαντώνται σε ιόντα, συγκεκριμένα σε ανιόντα. Οι πρωτεΐνες του ορού (whey proteins), όπως η β-λακταλβουλίνη και η α-λακταλβουμίνη, διαθέτουν υψηλή βιολογική αξία και παρουσιάζουν ιδιαίτερες ιδιότητες, συμβάλλοντας στον σχηματισμό γαλακτωμάτων. Η σύσταση του γάλακτος σε πρωτεΐνες είναι καθοριστικής σημασίας τόσο για τη διατροφική του αξία όσο και για τις τεχνολογικές του εφαρμογές (π.χ. παραγωγή τυριών, γιαουρτιού).

Τέλος, το γάλα αποτελεί σημαντική πηγή ανόργανων στοιχείων, με κυριότερο το ασβέστιο, το οποίο βρίσκεται συνδεδεμένο με τις καζεΐνες. Επίσης περιέχει φώσφορο, μαγνήσιο, κάλιο και ιχνοστοιχεία, όπως ψευδάργυρο και σελήνιο. Ιδιαίτερη σημασία έχει και η παρουσία λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K), καθώς και υδατοδιαλυτών βιταμινών (του συμπλέγματος B και βιταμίνη C). [4]

Χημική σύσταση του γιαουρτιού

Το γιαούρτι προκύπτει από τη ζύμωση του γάλακτος με τη δράση ειδικών γαλακτικών βακτηρίων. Κατά τη διαδικασία αυτή, η λακτόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, το pH μειώνεται και οι πρωτεΐνες (κυρίως οι καζεΐνες) πήζουν, δημιουργώντας την χαρακτηριστική υφή του προϊόντος.

Η χημική σύσταση του γιαουρτιού εξαρτάται από το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιείται, τον τρόπο επεξεργασίας και το είδος των καλλιεργειών. Κατά μέσο όρο περιέχει: νερό (≈ 85%), υδατάνθρακες (≈ 4%), λίπος (≈ 3,5–10%, ανάλογα με τον τύπο), πρωτεΐνες (≈ 4–5%) και ανόργανα άλατα (≈ 1%).

Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης σημειώνονται ορισμένες μεταβολές. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της λακτόζης μειώνεται λόγω μετατροπής της σε γαλακτικό οξύ, το χαμηλό pH (≈ 4–4,6) οδηγεί σε καταβύθιση των καζεϊνών και σταθεροποίηση του πήγματος ενώ οι πρωτεΐνες υφίστανται μερική υδρόλυση, απελευθερώνοντας πεπτίδια με ευεργετικές ιδιότητες.

Όσον αφορά τη διατροφική του αξία, η υδρόλυση των πρωτεϊνών και η μείωση της λακτόζης καθιστούν το γιαούρτι πιο εύπεπτο σε σχέση με το γάλα. Επιπλέον, λόγω των βακτηρίων που συμμετέχουν στη ζύμωση, το γιαούρτι είναι πλούσιο σε προβιοτικά, τα οποία συνδέονται με ευεργετικές δράσεις στη γαστρεντερική υγεία του καταναλωτή.

Συνοπτικά, τόσο το γάλα όσο και το γιαούρτι αποτελούν πλούσιες πηγές θρεπτικών και απαραίτητων συστατικών για την υγεία του ανθρώπου, με τις πρωτεΐνες τους να αποτελούν το κύριο αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, καθώς επιδιώκεται η απομόνωσή τους από γαλακτοκομικά απόβλητα.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η τυπική σύσταση του γάλακτος και του γιαουρτιού, με πρώτη ύλη το αγελαδινό γάλα.

Πίνακας 1: Τυπική χημική σύσταση αγελαδινού γάλακτος και γιαουρτιού.

Συστατικό	**Γάλα (g/100 mL)**	**Γιαούρτι (g/100 g)**
Νερό	86 – 88	82 – 85
Λακτόζη	4,5 – 5,0	3,0 – 4,0
Λίπος	3,2 – 4,0	3,5 – 10,0*
Πρωτεΐνες (σύνολο)	3,2 – 3,6	4,0 – 5,0
• Καζεΐνες	~2,6	~3,2 – 3,5
• Whey proteins	~0,6	~0,7 – 1,0
Τέφρα (ανόργανα)	0,7	0,9 – 1,0
Ασβέστιο (Ca)	120 mg	150 – 180 mg
Φώσφορος (P)	90 mg	110 – 140 mg
Κάλιο (K)	150 mg	220 mg
Νάτριο (Na)	50 mg	60 – 80 mg
Βιταμίνες	A, D, E, K, B2, B12, C	A, D, E, B2, B12
pH	6,6 – 6,8	4,0 – 4,6

Αν και η παραγωγή των δύο συγκεκριμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, βασίζεται σε κοινή πρώτη ύλη, εμφανίζουν ορισμένες σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, οι οποίες αξίζει να αναφερθούν.

Παρατηρείται ότι το γάλα αποτελείται κυρίως από νερό (περίπου 87%), ενώ τα κύρια στερεά συστατικά του είναι η λακτόζη, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια.

Στο γιαούρτι, η περιεκτικότητα σε νερό είναι ελαφρώς μειωμένη, λόγω της πήξης των καζεϊνών και της μετατροπής μέρους της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες εμφανίζεται αυξημένη (4–5 g/100 g), γεγονός που οφείλεται τόσο στη συμπύκνωση του πήγματος όσο και στη μερική υδρόλυση των πρωτεϊνών από τα βακτήρια της καλλιέργειας.

Αξιοσημείωτη είναι και η διαφορά στο pH: το γάλα παρουσιάζει σχεδόν ουδέτερο pH (6,6–6,8), ενώ το γιαούρτι έχει όξινο pH (4,0–4,6). Η διαφορά αυτή οφείλεται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, η οποία συμβάλλει στη σταθεροποίηση του πήγματος και στην αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, στο γιαούρτι παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων ανόργανων στοιχείων, κυρίως ασβεστίου και φωσφόρου, γεγονός που ενισχύει τη θρεπτική του αξία.

Η διαφοροποίηση της χημικής σύστασης μεταξύ γάλακτος και γιαουρτιού δεν έχει μόνο διατροφική, αλλά και τεχνολογική σημασία, καθώς επηρεάζει τις μεθόδους απομόνωσης και καθαρισμού των πρωτεϊνών. Η υψηλότερη περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε πρωτεΐνες, σε συνδυασμό με το χαμηλό pH και τις διαφορές στη σύσταση των υδαταναθράκων, καθιστούν το συγκεκριμένο προϊόν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα πρώτη ύλη για εφαρμογές όπως η απομόνωση πρωτεϊνών.

3.3 Πρωτεΐνη: Καζεΐνη

Το γάλα αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα γαλακτώματος, έλαιο σε νερό (oil-in-water). Το λίπος του γάλακτος βρίσκεται σε καλή διασπορά στον ορό. Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το γάλα αποτελείται κυρίως από δύο ομάδες πρωτεϊνών, τις καζεΐνες και τον ορό του γάλακτος. Από αυτές, οι καζεΐνες είναι φωσφοπρωτείνες και θωρούνται γενικά ως το πρωτεϊνικό σύστημα με τη μεγαλύτερη εμπορική αξία, κυρίως λόγω της χρήσης τους στην παρασκευή τυριού ως μέρος του τυροπήγματος. Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος παλαιότερα απορρίπτονταν, ωστόσο σήμερα χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων και μη τροφίμων προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των συμπληρωμάτων διατροφής, των ενεργειακών ποτών και των γαλακτωμάτων [36].

Χαρακτηριστικά, οι καζεΐνες είναι η πιο άφθονη ομάδα πρωτεϊνών στο γάλα βοοειδών, αποτελώντας περίπου το 80% της συνολικής πρωτεΐνης, και έχουν αρκετές

ιδιότητες που τις καθιστούν ιδανικές για την παραγωγή βιοϋλικών. Οι καζεΐνες των βοοειδών αποτελούνται από τέσσερις κύριες πρωτεΐνες, τις καζεΐνες a_{s1}-, a_{s2}-, b- και k- που κυμαίνονται σε μέγεθος από 19 έως 25 kD. Πιο αναλυτικά, η a_{s1} καζεΐνη αποτελείται από 199 αμινοξέα, τρεις (3) υδρόφοβες περιοχές και είναι ένα αμφίφυλο μόριο, με το N- άκρο να είναι υδρόφιλο και το C-άκρο να είναι υδρόφοβο. Η a_{s2}-καζεΐνη σχηματίζεται από 207 αμινοξέα είναι το πιο υδρόφιλο κλάσμα καζεΐνης και το C-άκρο παρουσιάζει υψηλή υδροφοβικότητα. Με τη σειρά της, η β-καζεΐνη απαρτίζεται από 209 αμινοξέα και παρουσιάζει την υψηλότερη υδροφοβικότητα από όλα τα κλάσματα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Τέλος, η κ-καζεΐνη αποτελείται από 169 δομικές μονάδες, είναι ένα αμφίφυλο μόριο, διαλυτή σε συγκεντώσεις ασβεστίου (Ca) και συμβάλλει ενεργά στην σταθεροποίηση του καζεΐνικού μικκυλίου. Τα μικκύλια αποτελούνται κατά 93% από καζεΐνες και το υπόλοιπο ποσοστό είναι ανόργανη ύλη (φώσφορος και ασβέστιο). Η ανόργανη ύλη συμβάλλει σημαντικά στον σχηματισμό και στη διατήρηση του σχήματος των μικκυλίων.

Οι καζεΐνες υφίστανται, επίσης, διάφορα επίπεδα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, κυρίως φωσφορυλίωση και γλυκοζυλίωση [37]. Οι καζεΐνες μπορούν να απομονωθούν από το γάλα είτε με τη χρήση πυτιάς, η οποία διασπά το υδρόφιλο άκρο της κ-καζεΐνης για τη παρασκευή πηγμένου γάλακτος, είτε με τη μείωση του pH του διαλύματος στο ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης βοοειδών (pH 4,6), οδηγώντας στον σχηματισμό κατακρημνισμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, με τη προσθήκη οξέος στο γάλα, οι φωσφορικές ομάδες πρωτονιώνονται, το άλας του καζειϊνικού ασβεστίου καταστρέφεται, κι έτσι διαταράσσεται η ισορροπία των μορίων της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ελκτικών δυνάμεων και την εμφάνιση του φαινομένου της κροκίδωσης.

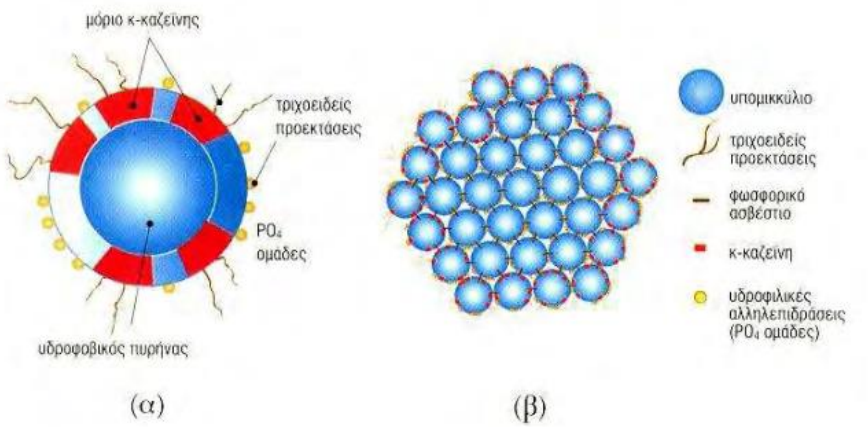
Οι πρωτεΐνες καζεΐνης παρουσιάζουν περιορισμένη δευτεροταγή δομή (ο σχηματισμός α-έλικας είναι δύσκολος)- αντίθετα, αποτελούνται κυρίως από τυχαία και άτακτα κατανεμημένες έλικες. Το χαρακτηριστικό αυτό οφείλεται, εν μέρει, στην υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη, η οποία προσδίδει έναν υψηλό βαθμό ευκαμψίας στη δομή και επιτρέπει τον σχηματισμό φιλμ και επικαλύψεων.

Η παρουσία φωσφορυλιωμένων καταλοίπων σερίνης, κυρίως στις α- και β-καζεΐνες, επιτρέπει τη δέσμευση φωσφορικού ασβεστίου και τον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των α- και β-καζεϊνών, οδηγώντας στον σχηματισμό καζεϊνικού ασβεστίου με τα ιόντα ασβεστίου που υπάρχουν στο γάλα.

Η παρουσία των φορτίων στα φωσφορικά ανιόντα, σε συνδυασμό με τη μορφή της κ-καζεϊνης, προκαλεί τον σχηματισμό μικκυλίων, χάρη στα οποία οι καζεϊνες παραμένουν διαλυτές, γεγονός που εξηγεί γιατί το γάλα δεν περιέχει ίζημα.

Η αμφίφιλη φύση των καζεϊνών οδηγεί στο σχηματισμό δομών που μοιάζουν με μικροκύτταρα, οι οποίες σταθεροποιούνται από τις αλληλεπιδράσεις του φωσφορικού ασβεστίου με την υδρόφοβη β-καζεΐνη στο εσωτερικό τους. Η κ-καζεΐνη σχηματίζει ένα εξωτερικό στρώμα στο μικκύλιο, με την υδρόφιλη C-τελικό της άκρο να σχηματίζει ένα "τριχωτό" περίβλημα στην επιφάνεια του μικκυλίου, όπως παρατηρείται μικροσκοπικά [37].

Οι διττές ιδιότητες των καζεϊνών είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, αφρών και πηκτωμάτων. Τέτοια προϊόντα έχουν παρουσιάσει πιθανές εφαρμογές στις βιομηχανίες καλλυντικών και προσωπικής φροντίδας.



***Εικόνα 6**: Δομή (α) υπομικκυλίου και (β) μικκυλίου καζεϊνης [37].*

Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος (20% των συνολικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στο γάλα βοοειδών) περιλαμβάνουν τη β-λακτοσφαιρίνη, την α-λακταλβουμίνη, τη λευκωματίνη ορού, την ανοσοσφαιρίνη, τη λυσοζύμη και τη λακτοφερρίνη, με τη β-λακτοσφαιρίνη να είναι η πιο άφθονη (60% των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος). Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι σφαιρικές με υψηλά επίπεδα δευτεροταγών και τριτοταγών δομών, καθώς και δισουλφιδικούς δεσμούς που παρέχουν δομική σταθερότητα. Συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, όπως η σύνθεση γλουταθειόνης, η σύνθεση λακτόζης και η μεταφορά προβιταμίνης Α.

3.4 Παρασκευή υλικών συσκευασίας από καζεΐνη, πολυσακχαρίτη και πλαστικοποιητή

3.4.1 Πρωτεΐνη καζεΐνη

Η δυνατότητα χρήσης ακατέργαστων καζεϊνών ως βιοϋλικών έχει διερευνηθεί εκτενώς στο πέρασμα του χρόνου. Μία από τις πρώτες τεκμηριωμένες μη διατροφικές εφαρμογές καζεϊνών ήταν η χρήση τους ως σταθεροποιητικό χρωστικών από τους αρχαίους Αιγυπτίους, γύρω στο 1200 π.Χ., με σκοπό την επιτάχυνση της διαδικασίας σκλήρυνσης του χρώματος, την αύξηση της πρόσφυσης στην επιφάνεια και την ενίσχυση της ανθεκτικότητά τους. Το γεγονός ότι πολλές από αυτές τις χρωστικές ουσίες παραμένουν ορατές μέχρι και σήμερα υποδηλώνει την υψηλή ανθεκτικότητα και τη μακροβιότητα ενός τέτοιου σκευάσματος.

Μια ακόμη πρώιμη χρήση των καζεϊνών ήταν η παραγωγή ισχυρών αδιάβροχων συγκολλητικών ουσιών στις αρχές του 19ου αιώνα, οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν ως μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών συγκολλητικών ουσιών που περιέχουν φορμαλδεΰδη.

Τέτοιες κόλλες περιλαμβάνουν νερό, ενυδατωμένο ασβέστη, υδροξείδιο του νατρίου και καζεΐνη. Οι καζεϊνούχες κόλλες έχουν βρει εφαρμογή στην κατεργασία ξύλου και ως κόλλες ετικετών, ενώ η υψηλή αντοχή τους σε αυξημένες θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την εξαιρετική τους απόδοση ως συγκολλητικά υλικά για ξύλινες πόρτες πυρασφάλειας.

Έχει αποδειχθεί ότι τα φιλμ που κατασκευάζονται από απομονωμένη βοοειδή as1-καζεΐνη διασυνδεδεμένη με τρανσγλουταμινάση είναι αδιάλυτα στο νερό και έχουν υψηλή μηχανική αντοχή (εφελκυσμός) [40]. Η καθαρή β-καζεΐνη έχει αποδειχθεί ότι παράγει τα καλύτερα γαλακτώματα και τον ισχυρότερο φραγμό υδρατμών σε σύγκριση με άλλες μεμονωμένες καζεΐνες ή μείγματα καζεϊνών. Αυτή η χαρακτηριστική ιδιότητα παρουσιάζεται λόγω της υψηλής υδρόφοβης φύση της β-καζεΐνης.

Οι απομονωμένες καθαρές καζεΐνες έχουν επίσης βρει εφαρμογές σε βιοϊατρικά και θεραπευτικά πεδία υψηλής αξίας. Μια υδρογέλη καζεΐνης, διασταυρωμένη με γενιπίνη, έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα ως σύστημα χορήγησης πρωτεϊνικών φαρμάκων στο έντερο, καθώς επέτρεψε τη διάχυση του φαρμάκου σε pH 7,4, αλλά όχι σε pH 1,2.

Οι καζεΐνες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία βιοσύνθετων με φάρμακα χαμηλής διαλυτότητας, όπως η χλωροθειαζίδη, η υδροχλωροθειαζίδη και η

δικλοφενάκη, καθώς και για την επικάλυψη του υδροχλωρικού οξέος της διλτιαζέμης σε σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης, ενός φαρμάκου που συνήθως μεταβολίζεται ταχέως [41].

Αν και οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν ότι οι καζεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοϋλικών υψηλής αξίας και χαμηλού όγκου, είναι μάλλον απίθανο ένα απόβλητο προϊόν της γαλακτοβιομηχανίας να είναι κατάλληλο για τέτοιου είδους εφαρμογές.

3.4.2 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν ευρέως διαθέσιμα υλικά για την παρασκευή μεμβρανών. Από αυτούς, χρησιμοποιούνται κυρίως η κυτταρίνη, η χιτοζάνη, τα παράγωγα του αμύλου, τα παράγωγα πηκτίνης, εκχυλίσματα φυκιών, καθώς και τα φυτικά κόμμεα και τα κόμμεα που παράγονται μέσω μικροβιακής ζύμωσης [42,53]. Οι πολυσακχαρίτες δεν είναι τοξικά συστατικά και δεν προκαλούν αλλεργιογόνες αντιδράσεις, ενώ διαλύονται συνήθως στο νερό και παρουσιάζουν συχνά υψηλές μηχανικές ιδιότητες [47-50]. Ένα αξιοσημείωτο πλεονέκτημα των πολυσακχαριτών είναι η συγκεκριμένη χημική δομή των επιμέρους συστατικών τμημάτων τους. Αυτό επιτρέπει την πρόβλεψη και τον έλεγχο των ιδιοτήτων των δημιουργούμενων επικαλύψεων. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις παρέχουν χαμηλό φραγμό έναντι της υγρασίας [51-52]. Είναι επίσης επιλεκτικά διαπερατοί από το οξυγόνο (O_2) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και επομένως περιορίζουν τη διαθεσιμότητα του O_2 και καθυστερούν την αναπνοή και την ωρίμανση πολλών φρούτων και λαχανικών [54].

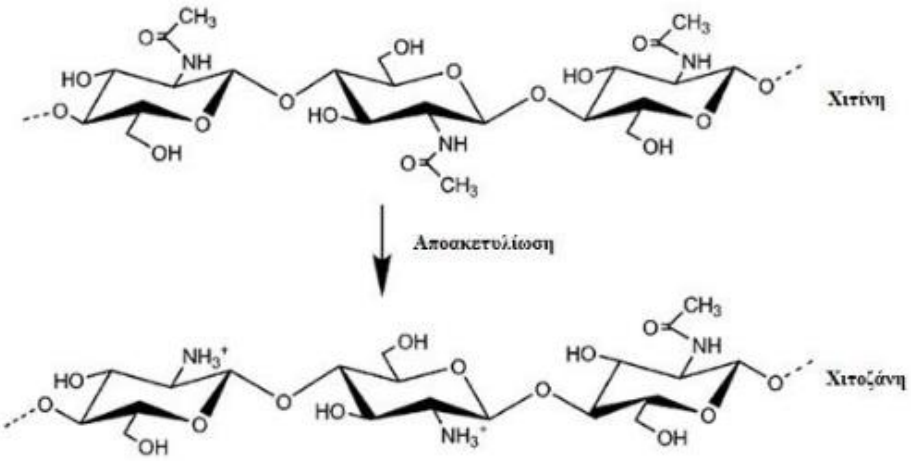
Η χιτοζάνη, της οποίας η χημική δομή παρουσιάζεται στην Εικόνα 5, είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από τυχαίο καταμερισμό β-συνδεδεμένης D-γλυκοζαμίνης και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης. Παράγεται με αλκαλική N-αποακετυλίωση της χιτίνης, της οποίας η χημική δομή φαίνεται επίσης στην Εικόνα 5.

Η χιτίνη απαντάται στον εξωσκελετό των καρκινοειδών και πολλών εντόμων και αποτελεί τον δεύτερο σε αφθονία πολυσακχαρίτη στη φύση, μετά την κυτταρίνη. Συνεπώς, η χιτοζάνη διατίθεται εμπορικά από άφθονες ανανεώσιμες πηγές, κυρίως απόβλητα της βιομηχανίας οστρακοειδών [54].

Ως ανανεώσιμος πόρος που προέρχεται γενικά από τα υποπροϊόντα της επεξεργασίας των καρκινοειδών (π.χ. γαρίδων, αστακών και καβουριών), η χιτοζάνη παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως αντιβακτηριακή δράση, βιοσυμβατότητα και ικανότητα σχηματισμού μεμβρανών [55].

Η χιτοζάνη μπορεί να σχηματίσει ημιπερατές επικαλύψεις, οι οποίες μειώνουν τους ρυθμούς αναπνοής και επιβραδύνουν την ωρίμανση των φρούτων και των λαχανικών. Ξεχωρίζει για τη μη τοξικότητά της, τη βιοδιασπασιμότητα, τη συμβατότητά της με άλλες ουσίες, καθώς και για την ικανότητά της να προσκολλάται εύκολα στα προϊόντα.

Οι μεμβράνες από χιτοζάνη είναι διαυγείς, ανθεκτικές, εύκαμπτες και αποτελούν αποτελεσματικούς φραγμούς για τα αέρια O_2 και CO_2. Ωστόσο, το γεγονός ότι οι μεμβράνες χιτοζάνης είναι εξαιρετικά διαπερατές στους υδρατμούς αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα που περιορίζει τη χρήση τους, καθώς ο αποτελεσματικός έλεγχος της μεταφοράς υγρασίας είναι επιθυμητή ιδιότητα για τα περισσότερα τρόφιμα, ιδίως σε υγρά περιβάλλοντα.



***Εικόνα** 7: Χημική δομή χιτίνης (επάνω) και χιτοζάνης (κάτω).*

3.4.3 Πλαστικοποιητές

Οι μεμβράνες πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών είναι εύθραυστες, της λόγω ύπαρξης εκτεταμένων διαμοριακών δυνάμεων, όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου. Οι πλαστικοποιητές προστίθενται συχνά στα διαλύματα από τα οποία σχηματίζονται οι μεμβράνες, προκειμένου να μειώσουν την ευθραυστότητα και να αυξήσουν την ευκαμψία και την ελαστικότητά τους.

Μεταξύ των πιο διαδεδομένων πλαστικοποιητών που επιτρέπεται να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα, περιλαμβάνονται η σορβιτόλη, η γλυκερόλη, και οι γλυκόλες (π.χ. PEG). Το νερό είναι αναμφισβήτητα ο σημαντικότερος, αλλά και ο πιο

άφθονος πλαστικοποιητής των πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών, λόγω της ιδιαίτερα υδρόφιλης φύσης τους [56].

Μια από τις συνέπειες της πλαστικοποίησης των υδροκολλοειδών από το νερό και τις πολυόλες είναι η σημαντική μείωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης (μετάπτωσης) του πολυμερούς (Tg), με την αύξηση της συγκέντρωσης νερού ή/και πολυόλης. Το μικρό μέγεθος των μορίων των πολυολών τους επιτρέπει να τοποθετούνται ανάμεσα στις αλυσίδες του πολυμερούς και να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόριά τους, μειώνοντας έτσι, τις διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων και αυξάνοντας την κινητικότητά τους. Η πλαστικοποιητική δράση του νερού ή/και των πολυολών στα βιοπολυμερή έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών [57-58].

Πρόσφατες μελέτες διερεύνησαν την πλαστικοποίηση των πολυσακχαριτών με νερό ή με σάκχαρα χαμηλού μοριακού βάρους συνδυάζοντας την φασματοσκοπία εκμηδένισης διάρκειας ζωής ποζιτρονίων (Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy, PALS) με θερμοδυναμική μηχανική ανάλυση (DMTA). Η τεχνική PALS αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό του μεγέθους των κενών (voids) μεταξύ των πολυμερών αλυσίδων στα υλικά.

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έχουν δείξει ότι τόσο ο μέσος όγκος των κενών μεταξύ των αλυσίδων του πολυσακχαρίτη, όσο και η πυκνότητα του πολυμερούς αυξάνονται με την αύξηση της περιεκτικότητας του συστήματος σε νερό στη υαλώδη κατάσταση. Σε πολυσακχαρίτες με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, η αλληλεπίδραση του νερού με το υαλώδες βιοπολυμερές λαμβάνει χώρα σε πολύ μικρές κλίμακες μήκους, δηλαδή, το νερό βρίσκεται ισχυρά συνδεμένο με τις αλυσίδες του πολυμερούς.

Παρεμβαίνοντας στους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων των πολυσακχαριτών, το προσροφημένο νερό αυξάνει το βαθμό ελευθερίας τους και επιτρέπει τη χαλάρωση του μακρομορίου στην υαλώδη και πλαστική κατάσταση, οδηγώντας σε μακροσκοπική διόγκωση του πολυμερούς [59-60].

Ένας διαφορετικός μηχανισμός έχει προταθεί για την πλαστικοποίηση των πολυσακχαριτών με σάκχαρα χαμηλού μοριακού βάρους. Οι ενώσεις αυτές φαίνεται να μην τροποποιούν σημαντικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων πολυσακχαριτών, αλλά λόγω του μικρού τους μεγέθους, μειώνουν το μέσο αριθμό σύζευξης των πολυμερικών αλυσίδων και επιτρέπουν έτσι τις μοριακές αναδιατάξεις

υπό συνθήκες όπου οι αλυσίδες από μόνες τους θα είχαν ήδη «ακινητοποιηθεί» στην υαλώδη κατάσταση.

Το μέγεθος του μορίου, η διαμόρφωση και ο συνολικός αριθμός λειτουργικών ομάδων του πλαστικοποιητή, καθώς επίσης και η συμβατότητά του με το πολυμερές, επηρεάζουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα των πλαστικοποιητών.

Η σορβιτόλη για παράδειγμα, έχει βρεθεί να είναι πιο αποτελεσματικός πλαστικοποιητής από τη γλυκερόλη, καθώς μεμβράνες πρωτεϊνών ορού γάλακτος ίσης επιμήκυνσης, αντοχής στον εφελκυσμό, και συντελεστή ελαστικότητας (Young modulus) παρουσίασαν χαμηλότερη διαπερατότητα στο οξυγόνο, όταν χρησιμοποιήθηκε σορβιτόλη ως πλαστικοποιητής. Η διαφορά στην απόδοση του πλαστικοποιητή αποδόθηκε στο διαφορετικό μοριακό μέγεθος της σορβιτόλης και της γλυκερόλης [61].

Επιπλέον, οι μεμβράνες αμυλόζης που πλαστικοποιήθηκαν με σορβιτόλη παρουσίασαν χαμηλότερη διαπερατότητα σε αέρια (O_2 και CO_2) από τις πλαστικοποιημένες με γλυκερόλη μεμβράνες αμύλου αραβοσίτου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο}: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

4.1 Περίθλαση ακτινών Χ

Η περίθλαση ακτίνων Χ (XRD) είναι ένας μη καταστροφικός έλεγχος για τον χαρακτηρισμό υλικών. [62] Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των κρυσταλλικών φάσεων που υπάρχουν σε υλικά, τα οποία μπορεί να έχουν κρυσταλλικές, ημικρυσταλλικές ή/και άμορφες περιοχές. Κάθε στερεό υλικό παρουσιάζει ένα και μοναδικό μοτίβο περίθλασης ακτίνων Χ, οπότε η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τόσο των φάσεων, όσο και των συστατικών που το απαρτίζουν. Η ανάλυση XRD παρέχει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με δομές, φάσεις, κρυσταλλικούς προσανατολισμούς (υφή), καθώς και τις δομικές ιδιότητες αυτών των φάσεων, όπως είναι το μέγεθος των κόκκων, τα κρυσταλλικά ελαττώματα, τον προσδιορισμό της κρυσταλλικότητας (σε σχέση με ένα υλικό αναφοράς), και την παρουσία περισσότερων από μία φάσεων (για παράδειγμα, για μίγματα πολυμερών) [63]. Η περίθλαση ακτίνων Χ βασίζεται στην ενισχυτική συμβολή μονοχρωματικών ακτίνων Χ και ενός κρυσταλλικού δείγματος. Αυτές οι ακτίνες Χ παράγονται από μια λυχνία καθοδικών ακτίνων, φιλτράρονται για να παράγουν μονοχρωματική ακτινοβολία, συγκεντρώνται και κατευθύνονται προς το δείγμα. Η αλληλεπίδραση των προσπίπτουσων ακτίνων με το δείγμα παράγει ενισχυτική συμβολή (και μια διαθλώμενη ακτίνα) όταν οι συνθήκες ικανοποιούν το νόμο του Bragg:

$$n*\lambda=2*dhkl*\sin\theta_B \qquad (1)$$

όπου, θ_B η γωνία Bragg (η γωνία πρόσπτωσης για την οποία ικανοποιείται η συνθήκη του Bragg) και n θετικός ακέραιος. Ο νόμος του Bragg ικανοποιείται όταν η διαφορά πορείας που ακολουθεί η ακτινοβολία, μεταξύ δύο διαδοχικών πλεγματικών επιπέδων, είναι ίση με ακέραιο αριθμό μηκών κύματος της ακτινοβολίας. Ο συγκεκριμένος νόμος συνδέει το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη γωνία περίθλασης και την απόσταση πλέγματος σε ένα κρυσταλλικό δείγμα. Οι περιθλώμενες ακτίνες Χ ανιχνεύονται στη συνέχεια, επεξεργάζονται και καταμετρώνται.

Στο υλικό, το οποίο μελετάται, εφαρμόζεται τάση, μέσω των ηλεκτρονίων που παράγονται σε έναν καθοδικό σωλήνα με θέρμανση ενός νήματος. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνουν προς τον στόχο και προσπίπτουν στο υλικό-στόχος. Όταν τα ηλεκτρόνια έχουν επαρκή ενέργεια για να εκτοπίσουν τα ηλεκτρόνια του υλικού στόχου,

παράγονται χαρακτηριστικά φάσματα ακτίνων Χ, με το δείγμα και τον ανιχνευτής να περιστρέφονται, η ένταση των ανακλώμενων ακτίνων-Χ καταγράφεται. Όταν η γεωμετρία των προσπίπτοντων ακτίνων-Χ στο δείγμα ικανοποιεί το νόμο του Bragg, επιτυχάνεται ενισχυτική συμβολή και εμφανίζεται μια κορυφή στην ένταση. Οι κατευθύνσεις στις οποίες παρατηρείται ενισχυτική συμβολή είναι συνάρτηση του μοτίβου της κρυσταλλικής δομής και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ακτίνων-Χ που χρησιμοποιείται σε πειράματα περίθλασης είναι γνωστό και καθορίζεται από τη χρησιμοποιούμενη πηγή ακτίνων-Χ. Επομένως, μετρώντας με τη βοήθεια ανιχνευτών ακτίνων-Χ τις κατευθύνσεις και τις εντάσεις της περιθλώμενης ακτινοβολίας, προσδιορίζονται δομικά χαρακτηριστικά του υλικού.

Ειδικότερα, οι γωνίες στις οποίες εμφανίζεται ενισχυτική συμβολή εξαρτώνται από το σχήμα και το μέγεθος του μοτίβου (μοναδιαία κυψελίδα του υλικού). Οι εντάσεις των γραμμών περίθλασης είναι συνάρτηση των χαρακτηριστικών της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος, καθώς και της θέσης και του ατομικού αριθμού των ατόμων στην μοναδιαία κυψελίδα. Ένας ανιχνευτής καταγράφει και επεξεργάζεται αυτό το σήμα ακτίνων-Χ και το μετατρέπει σε ένα ρυθμό καταμέτρησης, ο οποίος στη συνέχεια εξάγεται σε μια συσκευή εξόδου (πχ ηλεκτρονικός υπολογιστής) [64].

Στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, η κρυσταλλικότητα των δειγμάτων εξετάστηκε με τη χρήση περιθλασίμετρου PANalytical X'PertPRO (Enigma Business Park, Grovewood Rd, Malvern WR14 1XZ, Ηνωμένο Βασίλειο) με χρήση ακτινοβολίας Cu/Kα. Το περιθλασίμετρο είναι εξοπλισμένο με ανιχνευτή X'Celerator που λειτουργεί σε τάση 40 kV και ρεύμα 40 mA.
Οι μεμβράνες υποβλήθηκαν σε σάρωση εντός του εύρους 2θ από 2° έως 60°.

4.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση

Η μέθοδος της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR-FTIR), χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των χημικών δομών των δειγμάτων σε διάφορες μορφές. Οι χημικοί δεσμοί, οι αντιστοιχίσεις τους και οι διάφορες μοριακές δομές μπορούν να προσδιοριστούν μέσω της ανάλυσης των φασμάτων IR [65]. Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,7 μm έως 300 μm. Το άπω υπέρυθρο (FIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 25 μm έως 300 μm αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 400-10 cm-1. Η περιοχή αυτή

παρέχει πληροφορίες τόσο για τις μοριακές περιστροφές και τις δονήσεις βαρέων ατόμων, όσο του κρυσταλλικού πλέγματος (δονήσεις υποκαταστάτη-μετάλλου).

Οι μοριακές δονήσεις έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της διπολικής ροπής του δεσμού, ως συνέπεια της μεταβολής της κατανομής των ηλεκτρονίων στους δεσμούς. Είναι δυνατή η διέγερση των μορίων σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής με την αλληλεπίδραση με ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κατάλληλης συχνότητας. Όταν το δονητικό δίπολο βρίσκεται σε φάση (συχνότητα συντονισμού) με το ηλεκτρικό διάνυσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, οι δονήσεις ενισχύονται και υπάρχει μεταφορά ενέργειας από την προσπίπτουσα ακτινοβολία στο μόριο. Η ανίχνευση αυτής της απορρόφησης ενέργειας συνιστά την υπέρυθρη φασματοσκοπία [65]. Το φάσμα απόκρισης IR καταγράφεται με τη διέλευση υπέρυθρου φωτός μέσω του δείγματος. Η ταύτιση της συχνότητας IR με τη δονητική συχνότητα του χημικού δεσμού/συνόλου δεσμών οδηγεί σε απορρόφηση. Η μέτρηση του διερχόμενου φωτός φανερώνει πόση ενέργεια απορροφήθηκε σε κάθε μήκος κύματος (συχνότητα). Το φάσμα απορρόφησης υπερύθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και παρέχει πολύτιμες πληροφορίες, κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και για την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης. Ακόμη, δίνονται χρήσιμές πληροφορίες για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο, καθώς και τη διάταξή τους στον χώρο.

Η ένταση μίας απορρόφησης στο IR φάσμα εξαρτάται, κατά κύριο λόγο, από τη μεταβολή της διπολικής ροπής του μορίου που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της δόνησης. Ως εκ τούτου, οι δονήσεις που προκαλούν μεγάλη μεταβολή στη διπολική ροπή του μορίου (π.χ. δονήσεις τάσης C = O) έχουν σαν αποτέλεσμα την απορρόφηση μεγαλύτερης ποσότητας υπέρυθρης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κι έτσι, εμφανίζονται ταινίες απορρόφησης υψηλότερης έντασης. Η τιμή της διπολικής ροπής ενός μορίου εξαρτάται από την πολικότητα του δεσμού μεταξύ των ατόμων, που σημαίνει ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά των τιμών ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των ατόμων, τόσο πιο έντονη θα είναι και η αντίστοιχη απορρόφηση.

Σε ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο FTIR με συμβολόμετρο Michelson (Michelson interferometer) διακρίνονται τα εξής τρία βασικά μέρη. Η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο και ο ανιχνευτή υπερύθρου. Το συμβολόμετρο, αποτελείται από δύο κάτοπτρα M1 και M2, εκ των οποίων το ένα παραμένει σταθερό (fixed mirror), ενώ το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα, είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα (moving mirror). Τα επίπεδα των δύο κάτοπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους, ενώ ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο

κάτοπτρο υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης 50/50 (beam splitter). Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο, το οποίο αποτελείται από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθρη περιοχή, με ποσοστό ανακλαστικότηταςς και διαπερατότητας 50%, αντίστοιχα.

Η υπέρυθρη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται στον διαχωριστή δέσμης, όπου διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, εκ των οποίων η μία προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο, ενώ η άλλη στο κινητό. Στη συνέχεια, αφού αντανακλαστούν, επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά τη συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στον θάλαμο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρόλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές. Το συμβολογράφημα αποτελεί ένα φάσμα στον χώρο του χρόνου (time domain spectrum) που καταγράφει τις μεταβολές της απόκρισης του ανιχνευτή (ένταση), συναρτήσει του χρόνου κατά την κατοπτρική σάρωση, και παρέχει πληροφορίες για όλη την υπέρυθρη φασματική περιοχή στην οποία αποκρίνεται ο ανιχνευτής. Το συμβολογράφημα υπόκειται σε μαθηματική επεξεργασία με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, όπου τελικά μετατρέπεται στο ληφθέν φάσμα IR, το οποίο αναπαριστά την ένταση σε συνάρτηση με τη συχνότητας (frequency domain spectrum).

Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάκλασης που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως από τα φασματοφωτόμετρα FTIR, κυρίως για επιφανειακές αναλύσεις, είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (attenuated total reflectance, ATR). Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection), το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n1) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n_2). Το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται όσο μεγαλώνει η γωνίας πρόσπτωσης της ακτινοβολίας. Όταν η γωνία πρόσπτωσης είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία, όλες οι προσπίπτουσες ακτινοβολίες ανακλώνται πλήρως στη διεπιφάνεια των δύο μέσων, με αποτέλεσμα να συμβαίνει ολική εσωτερική ανάκλαση. Στα ATR εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (internal reflection element, IRE) ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία 45^o) υφίσταται πολλαπλές, ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο,

με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάτε. Η εσωτερική ολική ανάκλαση της ακτινοβολίας, στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μέσων με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης, έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή ενός φθίνοντος κύματος (evanescent wave), το οποίο διεισδύει κι εκτείνεται στο μέσο με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης (δείγμα) και εξασθενεί (attenuates) στις περιοχές του υπέρυθρου ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια. Η ένταση του κύματος αυτού μειώνεται εκθετικά με την απόσταση από την επιφάνεια του κρυστάλλου σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$I(z) = I_0\, e^{-z/d_p} \quad (2)$$

όπου, z η απόσταση κάθετα στην οπτική διεπιφάνεια, Io η ένταση στο σημείο z=0 και d το βάθος διείσδυσης

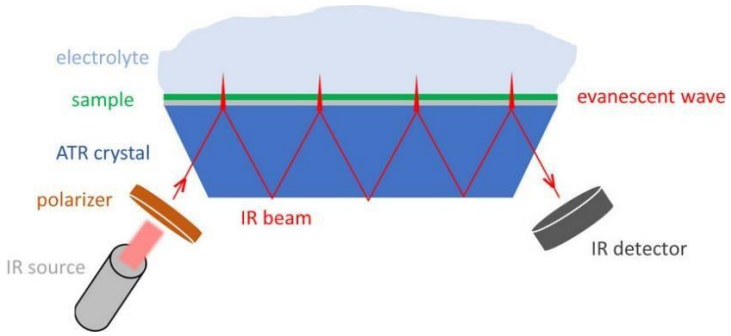
Έτσι λοιπόν, ένα φάσμα μπορεί να προκύψει μέσω της μέτρησης της αλληλεπίδρασης του φθίνοντος κύματος με το δείγμα. Όταν ένα απορροφητικό υλικό τοποθετηθεί σε επαφή με τον ATR κρύσταλλο, το φθίνον κύμα θα απορροφηθεί από το δείγμα και η ένταση του θα εξασθενήσει (attenuates) στις περιοχές μήκους κύματος του IR φάσματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια. Αυτό φέρει σαν αποτέλεσμα, η ανάκλαση να είναι χαμηλότερης έντασης (attenuated total reflection). Η μέτρηση και καταγραφή της προκύπτουσας αποσβένουσας ακτινοβολίας συναρτήσει του μήκους κύματος παράγει ένα IR φάσμα που παρουσιάζει ομοιότητα με ένα συμβατικό φάσμα απορρόφησης. Ωστόσο, διαφοροποιείται ως προς την ένταση των ταινιών απορρόφησης σε υψηλότερα μήκη κύματος. Αυτό οφείλεται στην εξάρτηση του βάθους διείσδυσης από το μήκος κύματος:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\, n_1 \sqrt{\sin^2\theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (3)$$

όπου, d_p το βάθος διείσδυσης, λ το μήκος κύματος, n_1 δείκτη διάθλασης κρυστάλλου, n_1 δείκτη διάθλασης δείγματος, γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας ως προς την κάθετο στην επιφάνεια του κρυστάλλου θ.

Σε υψηλοτέρα μήκη κύματος, το φθίνον κύμα διεισδύει βαθύτερα στο δείγμα, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχες ταινίες απορρόφησης να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση, σε σχέση με αυτές σε χαμηλότερα μήκη κύματος. Τα τυπικά βάθη διείσδυσης στην τεχνική ATR είναι της τάξης των μερικών μm (συνήθως μέχρι 10 μm) και ως εκ τούτου είναι προφανές ότι ένα φάσμα μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την

επιφάνεια ενός δείγματος. Το βασικό πλεονέκτημα της ATR-FTIR μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτεί οποιαδήποτε επεξεργασία του δείγματος ή ομογενοποίηση για τον σχηματισμό δισκίου του δείγματος με σκόνη KBr, παρά μόνο μία απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο, στην κατάσταση που βρίσκεται.



***Εικόνα 8**: Γενική αρχή φασματοσκοπίας ATR-FTIR [66].*

Στη παρούσα μελέτη, η ανάλυση ATR-FTIR πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier SHIMADZU IRSpirit (1, Nishinokyo Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan). Ο αντικειμενικός φακός ATR διέθετε πρίσμα ZnSe με επιφάνεια επαφής 250 μm στα υπό μελέτη δείγματα. Το πρίσμα επέτρεπε βάθος διείσδυσης περίπου 2,0 μm (@1000 cm^{-1}) και επέτρεπε μετρήσεις που ξεκινούσαν από τα 650 cm^{-1}.

4.3 Δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA)

Η δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA) είναι μια τεχνική στην οποία η ελαστική και ιξώδης απόκριση ενός δείγματος υπό ημιτονοειδή ταλαντούμενη τάση, παρακολουθείται σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, το χρόνο ή τη συχνότητα (Groenewoud, 2001). Η τυπική απόκριση του δείγματος για αυτή τη διέγερση παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά του δείγματος που εξαρτάται από την δυσκαμψία του [67].

Η απόκριση ενός πολυμερικού υλικού σε μια εφαρμοζόμενη τάση παρουσιάζει τόσο μια ελαστική, όσο και μια ιξώδη συνιστώσα, δηλαδή ένα πολυμερές συμπεριφέρεται ιξωδοελαστικά. Οι μετρήσεις DMA χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση των μεταβάσεων στην άμορφη φάση των πολυμερών [68]. Εάν το υλικό έχει μια εντός φάσης απόκριση, έχει ελαστικές ιδιότητες, εάν η απόκριση είναι εκτός φάσης, παρουσιάζονται ιξώδεις ιδιότητες. Τα φάσματα DMA παρέχουν χαρακτηριστικά των υλικών, όπως το μέτρο αποθήκευσης (ή μέτρο ελαστικότητας), το μέτρο ιξώδους (ή μέτρο απωλειών), την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Tg), την κρυσταλλικότητα, τον συντελεστή απόσβεσης και τον διαχωρισμό φάσεων. Τα

αποτελέσματα έχουν συνήθως τη μορφή γραφικής παράστασης των E΄(μέτρο αποθήκευσης), E΄΄(μέτρο απωλειών) και tanδ (συντελεστής απόσβεσης) ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή της παραμόρφωσης [69].

Το μέτρο αποθήκευσης, είτε E' είτε G', είναι το μέτρο της ελαστικής συμπεριφοράς του δείγματος. Ο λόγος των απωλειών προς το μέτρο αποθήκευσης είναι το tanδ και συχνά ονομάζεται απόσβεση και αποτελεί ένα μέτρο της ενέργειας ενός υλικού. Στο δείγμα εφαρμόζεται μια περιοδικά μεταβαλλόμενη μηχανική φόρτιση (συνήθως ημιτονοειδής) και υολογίζεται η τάση και η παραμόρφωση στο δοκίμιο (γνωστής μορφολογίας), καθώς και η διαφορά φάσης ανάμεσά τους. Το επιβαλλόμενο φορτίο μπορεί να ασκείται είτε στο μέσο του δοκιμίου, εξαναγκάζοντάς το σε κάμψη, είτε στο άκρο του, εξαναγκάζοντάς το σε εφελκυσμό.

Για τη συλλογή των απαραίτητων δεδομένων, η μέτρηση μιας χρονικά εξαρτώμενης μεταβλητής γίνεται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι καμπύλες μετατοπίζονται μαθηματικά κατά μήκος του άξονα του χρόνου μέχρι να εμφανιστεί κάποια επικάλυψη και να προκύψει μια συνεχής καμπύλη που καλύπτει αρκετά διαστήματα χρόνου. Η καμπύλη αυτή ονομάζεται κύρια καμπύλη. Η κύρια καμπύλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της χρονοεξαρτώμενης ιδιότητας ως συνάρτηση της θερμοκρασίας.

Για το συγκεκριμένο πείραμα η δυναμική μηχανική συμπεριφορά των μεμβρανών εξετάστηκε με τη χρήση δυναμικού μηχανικού αναλυτή (DMA Q800, TA Instruments, 159 Lukens Drive New Castle, DE 19720, USA) σε λειτουργία τάσης μεμβρανών. Για την αξιολόγηση του μέτρου αποθήκευσης (E′) και του συντελεστή απωλειών (tan δ), εφαρμόστηκε ένα εύρος θερμοκρασιών από -70 °C έως 120 °C, με ρυθμό 3 K/min, σε 1 Hz.

4.4 Θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA)

Η θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA) είναι μια ισχυρή τεχνική για την μέτρηση της θερμικής σταθερότητας των υλικών, συμπεριλαμβανομένων των πολυμερών [69]. Αποτελεί ένα είδος τεχνικής θερμικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μεταβολής των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των υλικών. Η μέτρηση TGA πραγματοποιείται συνήθως είτε ως συνάρτηση της αύξησης της θερμοκρασίας με σταθερό ρυθμό θέρμανσης, είτε ως συνάρτηση του χρόνου θεωρώντας την απώλεια μάζας και θερμοκρασία σταθερές [70].

Σε αυτή την μέθοδο, μελετάται μεταβολή της μάζας ενός δείγματος, σα συνάρτηση αύξησης της θερμοκρασίας. Η υγρασία και η περιεκτικότητα ενός

δείγματος σε πτητικές ουσίες μπορούν να μετρηθούν με την τεχνική TGA. Η συσκευή αποτελείται από μια εξαιρετικά ευαίσθητη ζυγαριά και έναν κλίβανο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του δείγματος, καθώς και τον έλεγχο της ατμόσφαιρας. Τα δεδομένα μεταφέρονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου συλλέγονται και αναλύονται. Η ζυγαριά βρίσκεται πάνω από τον κλίβανο και είναι θερμικά απομονωμένη. Ένα σύρμα υψηλής ακρίβειας συνδέεται από τη ζυγαριά προς τα κάτω στον κλίβανο. Στο άκρο του σύρματος ανάρτησης βρίσκεται το δείγμα, η θέση του οποίου πρέπει να μπορεί να επαναληφθεί. Ο ζυγός πρέπει να απομονώνεται από τις θερμικές επιδράσεις (π.χ. με τη χρήση θερμοστατικού θαλάμου) για να μεγιστοποιηθεί η ευαισθησία, η ακρίβεια και η ακρίβεια της ζύγισης. Η προσθήκη ενός φασματόμετρου υπέρυθρου στην TGA επιτρέπει την ανάλυση και την ταυτοποίηση των αερίων που παράγονται από την αποικοδόμηση του δείγματος [69]. Μέσω της εκτέλεσης της TGA, τα φυσικά φαινόμενα, όπως οι μεταβάσεις φάσης δεύτερης τάξης, η εξάτμιση, η εκρόφηση κ.λπ. και χημικά φαινόμενα μπορούν να προσδιοριστούν με ευκολία. Επιπλέον, η θερμική σταθερότητα των υλικών όσον αφορά την αντίσταση που έναντι της θερμικής αποσύνθεσης ή υποβάθμισης μπορούν επίσης να μετρηθούν χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες διαδικασίες δοκιμών TGA.

Η ανάλυση TGA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αναλυτή TGA, TG-DSC και TGDTA της Setsys Evolution-Setaram (7, rue de l'Oratoire 69300 Caluire-et-Cuire France). Η διαδικασία περιελάμβανε την τοποθέτηση περίπου 30 mg του δείγματος σε χωνευτήρι λευκόχρυσου, τη ρύθμιση των ρυθμών θέρμανσης και ροής αζώτου (N2) και, στη συνέχεια, τη διεξαγωγή της δοκιμής. Σε όλα τα πειράματα, ο ρυθμός θέρμανσης παρέμεινε σταθερός στα 10 K/min και ο ρυθμός ροής N2 στα 25 ml/min εντός του εύρους θερμοκρασιών από θερμοκρασία δωματίου έως 700 °C.

4.5 Δοκιμή εφελκυσμού

Η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στον τομέα των βιοπολυμερών, διότι οι μηχανικές ιδιότητες καθορίζουν γενικά τους περιορισμούς και τη συμπεριφορά του βιοπολυμερούς. Ακόμη και αν έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων των βιοπολυμερών, δεν επιτυγχάνουν την ίδια αποτελεσματικότητα με τα συνθετικά πολυμερή. Στις μεμβράνες και τα φιλμ βιοπολυμερών, οι μηχανικές ιδιότητες αξιολογούνται κυρίως με δοκιμές εφελκυσμού.

Οι ιδιότητες εφελκυσμού είναι οι μηχανικές ιδιότητες που προκαλούνται από τις δυνάμεις που εφαρμόζονται στο δείγμα. Η εφελκυστική ικανότητα ενός βιοπολυμερούς χαρακτηρίζεται από μια σχέση τάσης-παραμόρφωσης, η οποία δίνει

βασικές ιδιότητες του υλικού, όπως η παραμόρφωση (επιμήκυνση), το μέτρο ελαστικότητας του Young και η αντοχή σε εφελκυσμό [67].

Στην δοκιμή αυτή ένα φορτίο του οποίου η τιμή αυξάνεται αργά και βαθμιαία με το πέρασμα του χρόνου, εφαρμόζεται κάθετα στην επιφάνεια και κατά μήκος του μεγαλύτερου άξονα του εξεταζόμενου υλικού. Το δοκίμιο, υφίσταται εφελκυστική καταπόνηση κατά την διάρκεια της οποίας καταγράφεται η προκαλούμενη επιμήκυνση Δl. Η μηχανή εφελκυσμού είναι κατασκευασμένη έτσι ώστε να προκαλεί την επιμήκυνση του υλικού κάτω από καθορισμένες συνθήκες (σταθερός ρυθμός παραμόρφωσης, σταθερός ρυθμός μεταβολής φορτίου κλπ). Η δοκιμή εφελκυσμού είναι καταστρεπτική, καθώς το δοκίμιο παραμορφώνεται μόνιμα και συνήθως καταστρέφεταιι. Ο προσδιορισμός των μηχανικών ιδιοτήτων πρέπει να ακολουθεί τυποποιημένες μεθόδους για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών υλικών και πηγών βιοπολυμερών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι μέθοδοι διεξάγονται από την Αμερικανική Εταιρεία Δοκιμών και Υλικών (ASTM). Η ASTM D882 περιγράφει λεπτομερώς την πρότυπη δοκιμή για τις ιδιότητες εφελκυσμού λεπτών πλαστικών φύλλων, η οποία χρησιμοποιείται για ταινίες με πάχος έως 0,25 mm. Τα πολυμερή υλικά με πάχος μεγαλύτερο από 1,0mm πρέπει να προσδιορίζονται σύμφωνα με την ASTM D 638 "Test Method for Tensile Properties of Plastics". Η δοκιμή εφελκυσμού αποτελεί βασικό εργαλείο για την αξιολόγηση των βιοπολυμερικών φιλμ για την χρήση στην επιθυμητή εφαρμογή. Η ενσωμάτωση ενώσεων ενδέχεται να αλλάξει τις μηχανικές ιδιότητες των βιοπολυμερών μεμβρανών επηρεάζοντας τη χημική σύνθεση [67].

Η τάση δίνεται από την σχέση:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (4)$$

όπου, F εφελκυστική δύναμη που ασκείται στο υλικό, Α το αρχικό εμβαδόν της επιφάνειας πριν ασκηθεί το φορτίο.

Παραμόρφωση που ορίζεται ως το πηλίκο της επιμήκυνσης προς το αρχικό μήκος του υλικού:

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (5)$$

Το εφαρμοζόμενο φορτίο και η αντίστοιχη επιμήκυνση καταγράφονται και αφού μετατραπούν σε τάση και παραμόρφωση, σχεδιάζεται η καμπύλη τάσης παραμόρφωσης. Από την καμπύλη αυτή και ανάλογα την συμπεριφορά του υλικού (ψαθυρή ή όλκιμη) μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για τα: Μέτρο ελαστικότητας, Όριο διαρροής, Όριο αναλογίας, Αντοχή εφελκυσμού, Ολκιμότητα, Λόγος Poisson ν, Ανάπαλση, Δυσθραυστότητα. Τα χαρακτηριστικά εφελκυσμού των μεμβρανών αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τα πρότυπα ASTM D638, χρησιμοποιώντας ένα προσαρμοσμένο οριζόντιο στάδιο δοκιμών εφελκυσμού που κατασκευάστηκε από την AD-MET (51 Morgan Drive | Norwood, MA 02062, ΗΠΑ). Παρασκευάστηκαν δοκίμια σε σχήμα αλτήρα τύπου V και υποβλήθηκαν σε δοκιμή με ρυθμό παραμόρφωσης 0,1 min-1 μέχρι αστοχίας. Κάθε τύπος μεμβράνης υποβλήθηκε σε δοκιμή τουλάχιστον τρεις φορές με την κατασκευή των απαιτούμενων δοκιμίων σε σχήμα αλτήρα τύπου V. Η επιμήκυνση αυτών των δοκιμίων παρακολουθήθηκε με τη χρήση γραμμικού μεταβλητού διαφορικού μετασχηματιστή (LVDT), ενώ το φορτίο μετρήθηκε μέσω κυψέλης φορτίου 44,5 N (ή κυψέλης φορτίου 445 N για τα καθαρά δοκίμια). Οι τιμές της επιμήκυνσης μετατράπηκαν σε μηχανική παραμόρφωση διαιρώντας το αρχικό πραγματικό μήκος κάθε δοκιμίου, ενώ οι τιμές του φορτίου μετατράπηκαν σε μηχανική τάση διαιρώντας με την επιφάνεια διατομής του δοκιμίου.

4.6 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) είναι μια από τις πιο ευέλικτες και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανάλυσης επιφανειών, καθώς επιτρέπει την μελέτη τόσο της επιφανειακής μορφολογίας. Όταν η πηγή διέγερσης προσκρούει στο δείγμα, λαμβάνουν χώρα διάφοροι τύποι αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα την εκπομπή διαφορετικών σημάτων. Όταν τα σήματα εκπέμπονται από την αντίθετη πλευρά από εκείνη στην οποία προσπίπτει η πηγή διέγερσης του δείγματος, αναφέρονται ως διερχόμενα σήματα. Η τεχνική της ηλεκτρονιακής μικροσκοπία σάρωσης βασίζεται στη σύλληψη των διερχόμενων σημάτων [71]. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται απεικόνιση των μορφολογιών των υλικών με χωρική ανάλυση κάτω του 1 nm. Η χωρική ανάλυση του SEM εξαρτάται όχι μόνο από τη συσσωμάτωση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων αλλά και από την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με την επιφάνεια των δειγμάτων. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια εκπέμπονται καθώς λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση μεταξύ των ηλεκτρονίων με την επιφάνεια των δειγμάτων. Η ενέργεια των δευτερογενών ηλεκτρονίων είναι συνήθως κάτω από 50 eV. Η απόδοση

της εκπομπής εξαρτάται σημαντικά από τη γεωμετρία και τη στοιχειακή σύνθεση της επιφάνειας των δειγμάτων [72].

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) αποτελείται από δύο κύρια μέρη, τη στήλη και το θάλαμο. Η στήλη είναι η προέκταση την οποία διασχίζουν τα ηλεκτρόνια από την εκπομπή τους μέχρι να φθάσουν στο δείγμα, όπου οι εγκατεστημένοι ανιχνευτές θα καταγράψουν τα σήματα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ των ηλεκτρονίων και του δείγματος. Οι ανιχνευτές είναι μετατροπείς ενέργειας που μετατρέπουν ένα είδος σήματος σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο αποστέλλεται στο θάλαμο ελέγχου. Ο θάλαμος ελέγχου διαθέτει ηλεκτρονικά συστήματα ικανά να ποσοτικοποιούν τα ηλεκτρικά σήματα που αποστέλλονται από τους ανιχνευτές και να τα μετατρέψουν σε πληροφορίες όπως εικόνες και γραφήματα.

Οι ανιχνευτές ηλεκτρονίων παρέχουν δύο τύπους αντίθεσης, την τοπογραφική αντίθεση και τη συνδυαστική αντίθεση (αντίθεση ατομικού αριθμού). Ο ανιχνευτής των δευτερευόντων ηλεκτρονίων, είναι ευαίσθητος στα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια και στα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια επιταχύνονται με την βοήθεια ενός θετικά φορτισμένου συλλέκτη συρμάτινου πλέγματος έως ότου φθάσουν στον ανιχνευτή/σπινθηριστή, παράγοντας φως. Αυτό το φως, μετά από ενίσχυση σε ένα σωλήνα φωτοπολλαπλασιαστή, παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα, το οποίο θα διαμορφώνει τη φωτεινότητα στην οθόνη που εμφανίζει την εικόνα. Ο ανιχνευτής οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων πραγματοποιεί την απεικόνιση οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (BSEI), η οποία παρέχει την αντίθεση του ατομικού αριθμού. Οι περιοχές με υψηλό μέσο ατομικό αριθμό εμφανίζονται φωτεινότερες από τις περιοχές με χαμηλότερο μέσο ατομικό αριθμό [73].

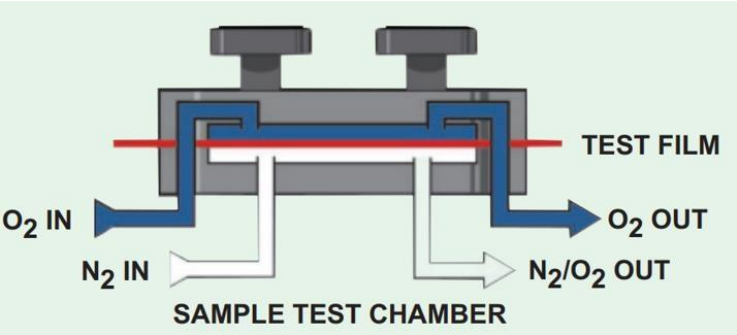
Ωστόσο για την παρατήρηση με SEM, το δείγμα πρέπει να ξηρανθεί που μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για κάποια δείγματα. Επιπλέον, τα δείγματα πρέπει να είναι αγώγιμα. Επομένως, για τα βιοπολυμερή που είναι μη αγώγιμα, είναι απαραίτητη η επικάλυψη ενός λεπτού στρώματος μετάλλου για την ανάλυση SEM. Τα πιο συνηθισμένα μέταλλα για το σχηματισμό επικάλυψης είναι ο χρυσός, ο χρυσός-παλλάδιο, πλατίνα και χρώμιο [67].

Για το συγκεκριμένο πείραμα, η μορφολογία της επιφάνειας των δειγμάτων παρατηρήθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου JEOL JSM-6510 LV SEM (Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία), εξοπλισμένο με ανιχνευτή X-Act EDS της Oxford Instruments, Abingdon, Oxford shire,UK (εφαρμόστηκε τάση επιτάχυνσης 20 kV) με δυνατότητα λειτουργίας σε συνθήκες χαμηλού κενού. Πριν από την εξέταση, όλες οι μεμβράνες επικαλύφθηκαν

με λεπτό στρώμα χρυσού/παλλαδιου, ώστε να αποφευχθεί η φόρτιση του δείγματος κατά την παρατήρηση με SEM.

4.7 Ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου

Τα υλικά συσκευασίας τροφίμων και φαρμάκων πρέπει να σχεδιάζονται με υψηλές ιδιότητες φραγμού έναντι αερίων όπως το οξυγόνο για να αυξηθεί η διάρκεια μεταφοράς και η διάρκεια ζωής του συσκευασμένου περιεχομένου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, [74] ο ρυθμός μετάδοσης οξυγόνου (OTR) που απαιτείται για τα περισσότερα τρόφιμα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 30 cm^3/m^2 ημέρα (υποθέτοντας συνθήκες STP), ανάλογα με την ευαισθησία στο οξυγόνο του συσκευασμένου τροφίμου. Δύο κύριοι παράγοντες καθορίζουν τον ρυθμό μεταφοράς οξυγόνου, το πάχος του πολυμερούς και η χημεία του πολυμερούς, η οποία υπαγορεύει τη διαχυτικότητα (D) και τη διαλυτότητα (S) [και, ως εκ τούτου, τη διαπερατότητα (P = D × S)] των διεισδυτικών μορίων μέσω μιας πυκνής πολυμερικής μήτρας [75].



Εικόνα 9*: Αρχή λειτουργίας για την μέτρηση ρυθμού μεταφοράς οξυγόνου.*

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9 τα δείγματα είναι στερεωμένα ή προσαρτώνται σε θάλαμο διάχυσης και υπάρχει αισθητήρας μέτρησης ρυθμού μεταφοράς οξυγόνου. Καθαρό οξυγόνο (99,9%) εισάγεται στη συνέχεια στο άνω μισό του θαλάμου, ενώ ένα αέριο-φορέας χωρίς οξυγόνο ρέει στο κάτω μισό. Τα μόρια του οξυγόνου που διαχέονται μέσω του δείγματος στον κάτω θάλαμο μεταφέρονται στον αισθητήρα μέσω του φέροντος αερίου. Αυτό επιτρέπει την άμεση μέτρηση του οξυγόνου. Ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου του δείγματος δοκιμής εμφανίζεται είτε ως cc/m^2/ημέρα ή $cc/100in^2$/ημέρα.

Η διαπερατότητα των αερίων μέσω πολυμερών μπορεί να εκφραστεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, [76] ως εξής:

$$\frac{J}{A} = Pe_{gas} \cdot \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (6)$$

Όπου J/A (mol.cm^{-2}.s^{-1}) να είναι ο ειδικός μοριακός ρυθμός του αερίου που διαπερνά την μεμβράνη, Pegas (cm^2.s^{-1}) είναι ο συντελεστής διαπερατότητας του αερίου, ΔC (mol.cm^{-3} STP) είναι η διαβάθμιση της συγκέντρωσης μεταξύ των δύο αντίθετων πλευρών της μεμβράνης και Δx (cm) είναι το πάχος της μεμβράνης.

Αναδιατάσσοντας την εξίσωση (5) μπορούμε να εκφράσουμε τον συντελεστή διαπερατότητας ως εξής:

$$Pe_{gas} = \frac{J}{A \cdot \Delta C} \cdot \Delta x \quad (7)$$

Πραγματοποιώντας διαστατική ανάλυση, ο όρος J/(A*ΔC) (cm^3 STP. cm-2. s-1) είναι ανάλογο με τις μετρήσεις ρυθμού μετάδοσης οξυγόνου (PMO). Έτσι για την περίπτωση του αέριου οξυγόνου:

$$Pe_{O_2} = OTR \cdot \Delta x \quad (8)$$

Όπου PeO_2(cm^2.s^{-1}) είναι ο συντελεστής διαπερατότητας οξυγόνου, PMO (cm^3 STP. cm^2. s^{-1}) είναι η πειραματικά μετρημένη από το όργανο τιμή για τον ρυθμό μεταφοράς οξυγόνου και Δx (cm) είναι το μέσο πάχος της μεμβράνης.

Οι τιμές του ρυθμού μετάδοσης οξυγόνου (PMO) (cc O_2/m_2/ημέρα) για κάθε μεμβράνη αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τα πρότυπα ASTM D 3985 (23 °C και 0% RH). Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε αναλυτής διαπερατότητας οξυγόνου (O.P.A., 8001, Systech Illinois Instruments Co., Johnsburg, IL, USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{Ο}: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1 Εξαγωγή καζεΐνης από ληγμένο γάλα

Για την εξαγωγή της καζεΐνης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

500 mL ληγμένο πλήρες γάλα

500 mL διάλυμα οξικού οξέος 10%

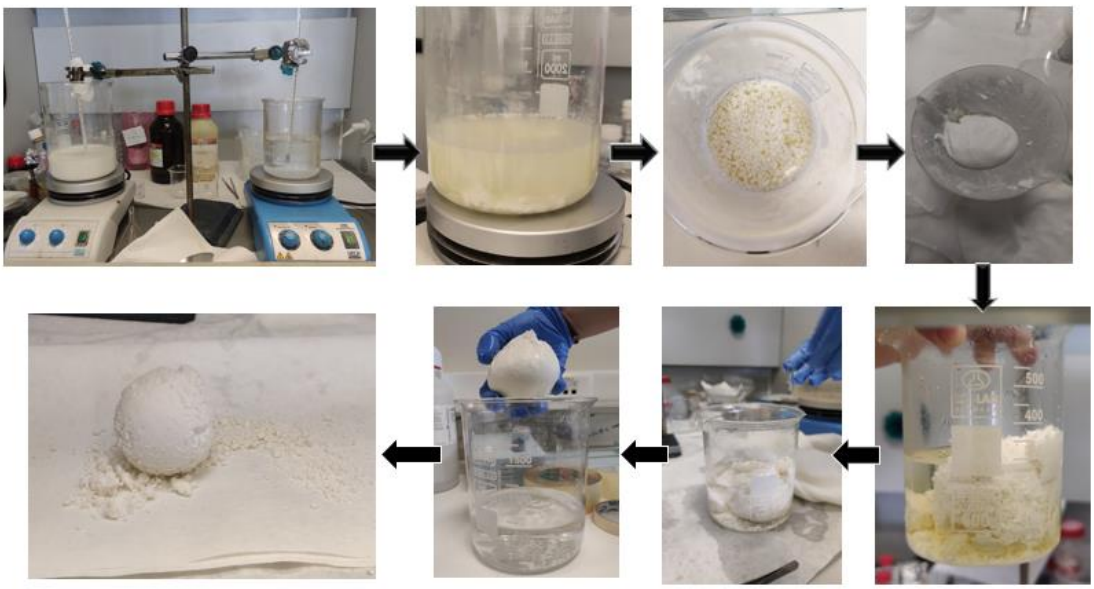
250 mL διάλυμα αιθανόλη/διαιθυλαιθέρα (αναλογία 1:1)

250 mL αιθανόλη

100 mL διαιθυλαιθέρα

Για την εξαγωγή της καζεΐνης από το ληγμένο γάλα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Αρχικά, τοποθετήθηκε η ζυγισθείσα ποσότητα του γάλακτος σε ένα ποτήρι ζέσεως 1 λίτρου και θερμάνθηκε στους 55^{o}C. Ταυτόχρονα, σε ένα άλλο ποτήρι ζέσεως των 500ml θερμάνθηκε διάλυμα που αποτελούνταν από 450 mL νερό μαζί με 50 mL οξικό οξύ (10% v/v) στους 55 ^{o}C. Κατά την θέρμανση του γάλακτος, σχηματίστηκε αφρός στα τοιχώματα του ποτηριού, ο οποίος απομακρύνθηκε με τη χρήση μία μεταλλικής σπάτουλας. Όταν το γάλα και το διάλυμα οξέος έφτασαν στην επιθυμητή θερμοκρασία, μεταφέρθηκε το δεύτερο, στάγδην με την βοήθεια σταγονόμετρου, στο ποτήρι ζέσεως, όπου περιέχονταν το γάλα. Στη συνέχεια ακολούθησε έλεγχος του pH, με την επιθυμητή τιμή να είναι 4,6, όπου είναι το ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης που αποσταθεροποιείται μέσω καθίζησης και απομακρύνεται από τα υπόλοιπα συστατικά. Ακολούθησε η διήθηση του μίγματος, μέσω πορώδους υφάσματος (π.χ. τούλι), ώστε να διαχωριστεί η στερεή καζεΐνης από τον ορό. Σε επόμενο βήμα, έγινε έκπλυση της καζεΐνης με απιονισμένο νερό με σκοπό τον καθαρισμό της. Για επιπλέον απομάκρυνση και καθαρισμό της καζεΐνης, τοποθετήθηκε σε ένα ποτήρι ζέσεως των 500ml μαζί με 250 mL αιθανόλης, ώστε να είναι πλήρως καλυμμένη και αφέθηκε για 15 λεπτά. Επαναλήφθηκε η διήθηση μέσω του πορώδους υφάσματος για να την συγκέντρωση του στερεού ιζήματος. Στην συνέχεια, για την επίτευξη όσο το δυνατόν μεγαλύτερου ποσοστού καθαρότητας της πρωτεΐνης, έγινε έκπλυση του δείγματος με διάλυμα που αποτελούταν από 250 mL αιθανόλης/διαιθυλαιθέρα σε αναλογία 1:1 και μετέπειτα εκπλύθηκε άλλη μια φορά με 100 mL διαιθυλαιθέρα. Τοποθετήθηκε η καζεΐνη που λήφθηκε σε γυάλινο τριβείο όπου και αφέθηκε για να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται η διαδικασία για την εξαγωγή της καζεΐνης.



***Εικόνα 10**: Πειραματική διαδικασία απομόνωσης καζεϊνης από γαλακτοκομικό προϊόν.*

5.2 Ανάπτυξη μεμβρανών Καζεΐνης/Πολυσακχαρίτη/Πλαστικοποιητή

Οι μεμβράνες που συντέθηκαν, με αναλογία κατά βάρος, ήταν οι εξής:

Α) Καθαρή Χιτοζάνη

Β) $Χι_{50}Κα_{50}$

Γ) $Χι_{33}Κα_{67}$

Δ) $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$

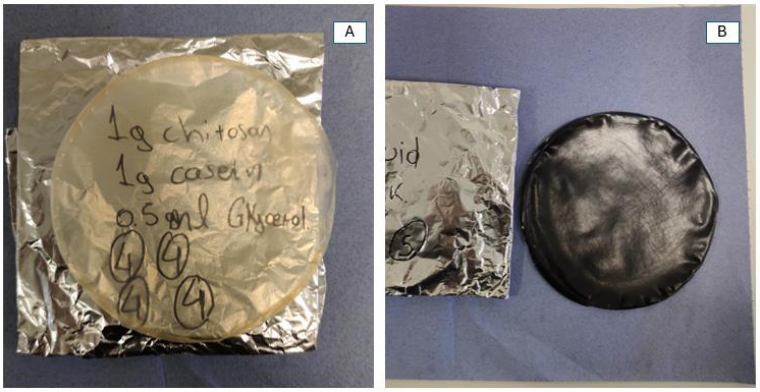
ΣΤ) $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$

όπου Χι: Χιτοζάνη, Κα: Καζεΐνη, Γλυ: Γλυκερόλη, Μελ: Μελάνι καλαμαριού

Για την σύνθεση των μεμβρανών $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ και $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιείχε 50mL απιονισμένο νερό προστέθηκαν 2% (w/v) καζεΐνη και 0,4% (w/v) υδροξείδιο του νατρίου, ώστε να επιτευχθεί βασικό pH και να διαλυθεί η καζεΐνη. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε παγόλουτρο και υποβλήθηκε σε κατεργασία με υπερήχους (UP100H, 100W, 30kHz, Hielscher Ultrasonics) για 5 λεπτά και στη συνέχεια αφέθηκε να αναδευτεί έως ότου διαλυθεί πλήρως. Όσο αναδεύονταν, προστέθηκαν 2% (w/v) χιτοζάνης στο διάλυμα και στην συνέχεια 2% (v/v) οξικό οξύ. Έπειτα, το μείγμα αφέθηκε για ανάδευση για περίπου 10 λεπτά. Στο ίδιο ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκαν και 0,5mL γλυκερόλης (1,26%(w/v)) και επιπλέον για την μεμβράνη με το μελάνι καλαμαριού προστέθηκε 1% (w/v) μελάνι (το βήμα της προσθήκης του μελανιού παραλήφθηκε για την μεμβράνη $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$). Το τελικό αυτό διάλυμα περιέχει 1 g (2%w/v) καζεΐνη, 1 g (2%w/v) χιτοζάνη, 0,63 g (1,26 %w/v) γλυκερόλη και 0,5 g (1 % w/v) μελάνι καλαμαριού. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε τρυβλία

πολυστυρενίου ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και να σχηματιστούν οι μεμβράνες. Αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 18 ώρες.



***Εικόνα 11**: (Α) Μεμβράνη $X_1K_1Γ_{0,5}$ και (Β) Μεμβράνη $X_1K_1Γ_{0,5}M_{0,5}$.*

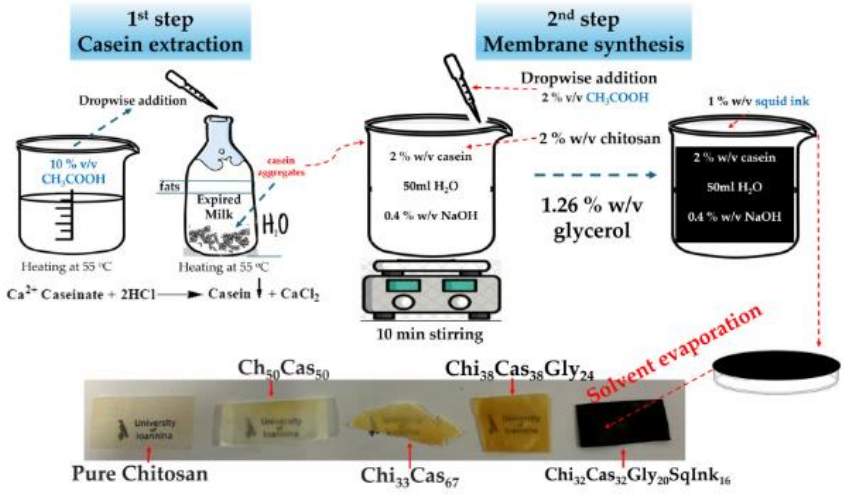
Αντίστοιχα για τις μεμβράνες $Χι_{33}Κα_{67}$ και $Χι_{50}Κα_{50}$ ακολουθήθηκε η ανάλογη διαδικασία, χωρίς την προσθήκη γλυκερόλης και μελανιού. Επιπλέον για την μεμβράνη $Χι_{33}Κα_{67}$ προστέθηκε διαφορετική ποσότητα καζεΐνης ίση με 4% (w/v) όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

***Εικόνα 12**: (Α) Μεμβράνη X_1K_1, (Β) Μεμβράνη X_1K_2 και (Γ) $X_1K_1Γ_{0,5}$.*

Το μελάνι καλαμαριού χρησιμοποιήθηκε για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, προστατεύοντας το συσκευαζόμενο προϊόν και ενισχύοντας την διάρκεια ζωής του, διατηρώντας ταυτόχρονα την ποιότητά του. Επιπλέον το μελάνι καλαμαριού έχει αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά, τα οποία ενισχύουν την χρήση του στον τομέα συσκευασίας τροφίμων. Αυτές οι βιοδραστικές ιδιότητες συμβάλλουν προστασία του συσκευασμένου προϊόντος από μικροβιακή μόλυνση, εξασφαλίζοντας περαιτέρω την ασφάλεια και τη μακροζωία του [77].

Πίνακας 2: Αναλογίες κατά βάρος και αντίστοιχες ποσότητες συστατικών για την ανάπτυξη των μεμβρανών.

	Χιτοζάνη (Χι) (w/v %)	**Καζεΐνη (Κα)(w/v%)**	**Γλυκερόλη (Γλυ) (w/v %)**	**Μελάνι σουπιάς (Μελ)(w/v %)**
Καθαρή Καζεΐνη (σκόνη)	-	100	-	-
Καθαρή Χιτοζάνη (%wt:100)	2	-	-	-
$Χι_{50}Κα_{50}$ (%wt:50/50)	2	2	-	-
$Χι_{33}Κα_{67}$ (%wt:33/67)	2	4	-	-
$Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ (%wt:38/38/24)	2	2	1.26	-
$Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ (%wt:32/32/20/16)	2	2	1.26	1



***Εικόνα 13**: Συνοπτική διαδικασία ανάπτυξης μεμβρανών.*

5.3 Ανάπτυξη μεμβρανών πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE) – καζεΐνης

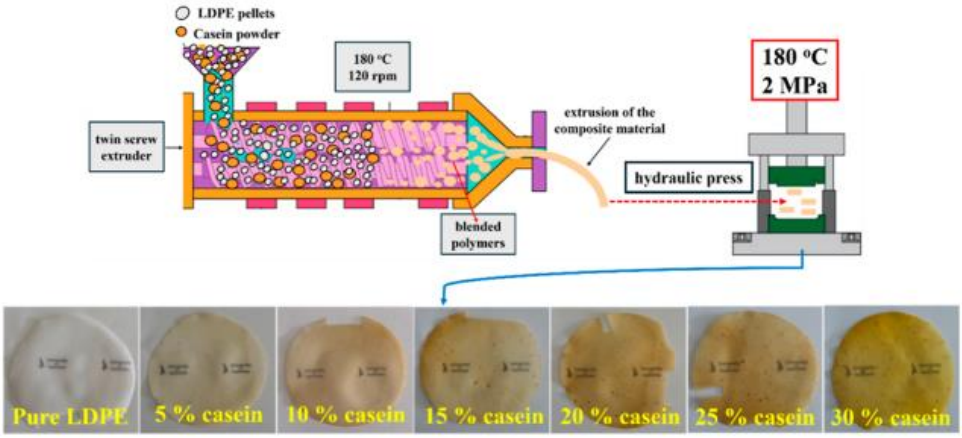
Για την παρασκευή των μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ο διπλός κοχλιοφόρος εξωθητήρας Mini Lab II (Thermo Scientific, ANTISEL S.A., Αθήνα, Ελλάδα). Η διεργασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 180 °C και ταχύτητα περιστροφής των κοχλιών 120 rpm, για το χρονικό διάστημα των 5 λεπτών. Στον εξωθητήρα τροφοδοτήθηκαν κατάλληλες ποσότητες πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE) και καζεΐνης (CS) σε μορφή σκόνης, σύμφωνα με τις αναλογίες που παρουσιάζονται

στον Πίνακα 3, ώστε να προκύψουν οι συνθέσεις: LDPE/$CS_{5\%}$, LDPE/$CS_{10\%}$, LDPE/$CS_{15\%}$, LDPE/$CS_{20\%}$, LDPE/$CS_{25\%}$ και LDPE/$CS_{30\%}$.

Πίνακας 3:Αναλογίες συστατικών LDPE/casein της κάθε παραγόμενης μεμβράνης.

Δείγμα	LDPE (g)	Casein (g)
Pure LDPE	5	0
LDPE/$CS_{5\%}$	4.75	0.25
LDPE/$CS_{10\%}$	4.5	0.5
LDPE/$CS_{15\%}$	4.25	0.75
LDPE/$CS_{20\%}$	4	1
LDPE/$CS_{25\%}$	3.75	1.25
LDPE/$CS_{30\%}$	3.5	1.5

Παράλληλα, για λόγους σύγκρισης, παρασκευάστηκε και δείγμα καθαρού LDPE, υπό τις ίδιες συνθήκες εξώθησης. Το υλικό που προέκυψε από τη διεργασία εξώθησης συλλέχθηκε και στη συνέχεια μετατράπηκε σε λεπτές μεμβράνες μέσω θερμομηχανικής κατεργασίας. Συγκεκριμένα, περίπου 1,5 g από το κάθε σύνθετο υλικό τοποθετήθηκε σε υδραυλική πρέσα με θερμαινόμενες πλάκες, όπου υποβλήθηκε σε θέρμανση και συμπίεση. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 110°C και πίεση 2 MPa, ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός ομοιόμορφων φιλμ, με διάμετρο περίπου 10 cm.



Εικόνα 14: *Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής της μεμβράνης με χρήση δίκλωνου εκβολέα (twin-screw extruder). [78]*

Η παραπάνω διαδικασία εξασφάλισε την ομοιογενή κατανομή της καζεΐνης μέσα στη μήτρα του LDPE, επιτρέποντας τη μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του βιοπολυμερούς στις μηχανικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των παραγόμενων μεμβρανών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

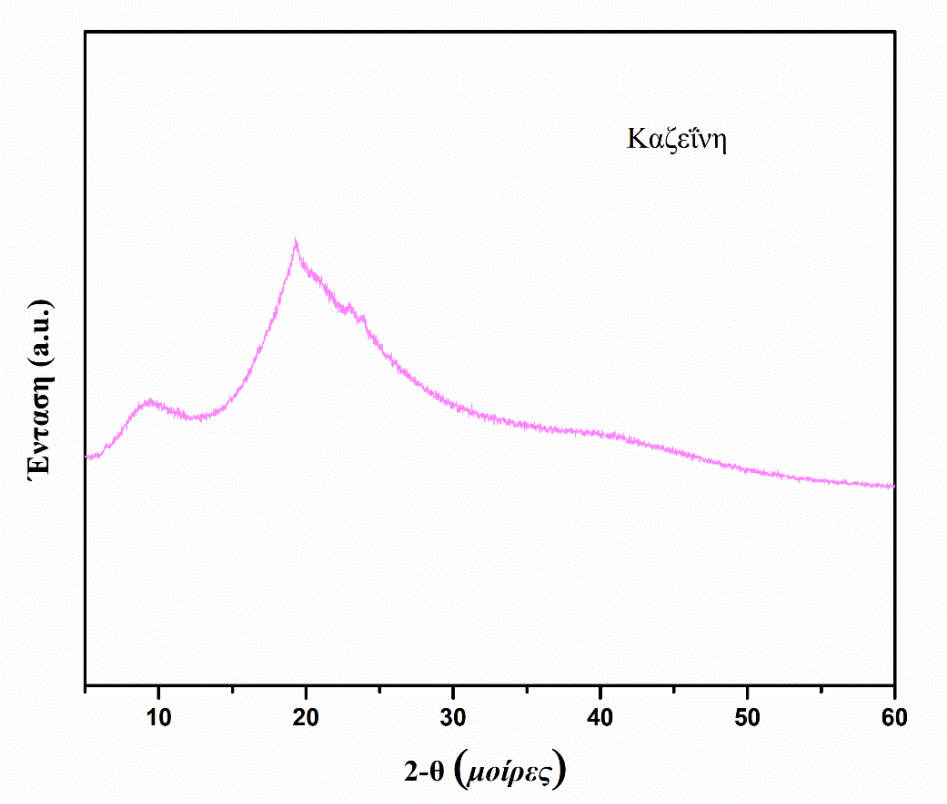
6.1 Χαρακτηρισμός καζεΐνης

6.1.1 XRD καζεΐνης

Οι πρωτεΐνες, γενικά, δεν εμφανίζουν κρυσταλλική δομή, και, κατά συνέπεια, τα τυπικά κρυσταλλικά φαινόμενα δεν καταγράφονται όταν υποβάλλονται σε ανάλυση περίθλασης ακτίνων Χ. Η καζεΐνη δεν είναι ινώδης πρωτεΐνη, αλλά συναντάται σε μικρά σωματίδια, σχεδόν σφαιρικού σχήματος και έτσι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για τον προσδιορισμό δομή [79]. Το μοτίβο περίθλασης που λαμβάνεται από την καζεΐνη είναι χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών μη ινώδους μορφής, οι οποίες δεν έχουν επαρκή προσανατολισμό ή αριθμό παρεμβολών που να επιτρέπουν την ακριβή ανάλυση, με αποτέλεσμα να μην έχει αναπτυχθεί ικανοποιητική ανάλυση της δομής [80].

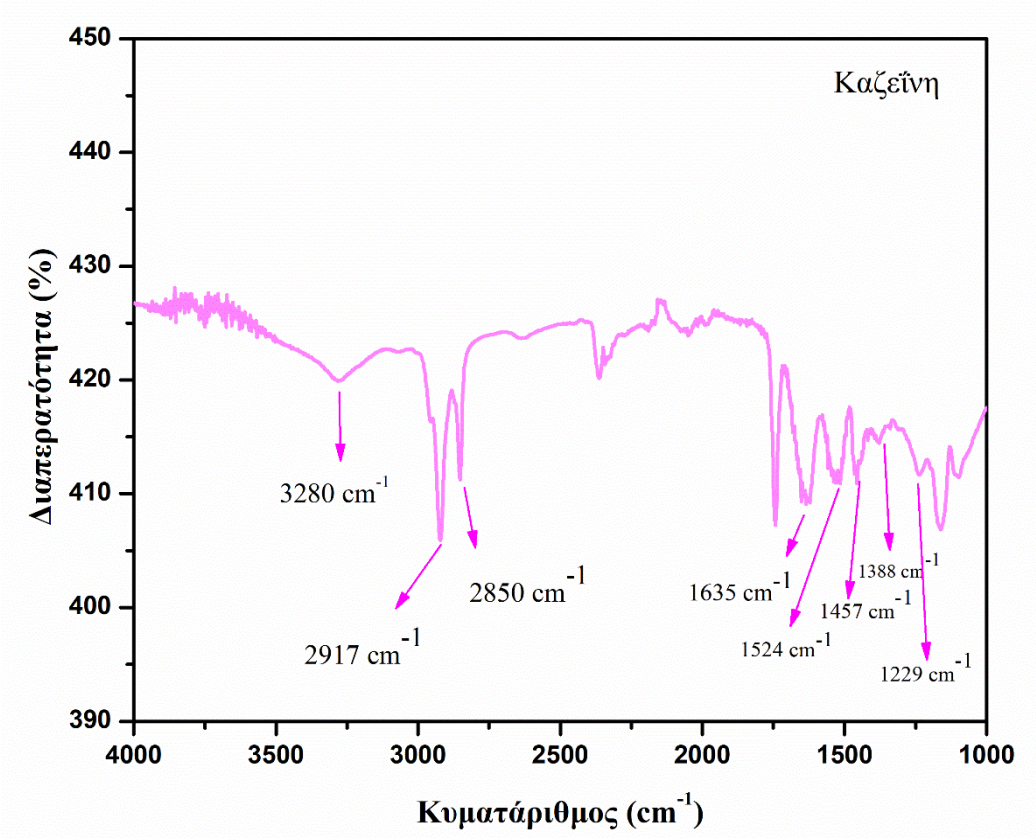
Η πιθανή εξήγηση της έλλειψης δομικής οργάνωσης στην καζεΐνη και σε άλλες πρωτεΐνες παρόμοιας φύσης, οφείλεται στην αμοιβαία έλξη του μεγάλου αριθμού πολικών ομάδων που πιθανώς εμφανίζονται σε μια πολύπλοκη πρωτεϊνική δομή [81]. Οι πολικές ομάδες είναι κατανεμημένες σε ακανόνιστα διαστήματα τόσο στις πλευρικές αλυσίδες, όσο και κατά μήκος των κύριων αλυσίδων, οπότε η δομική μορφή δεν είναι ένα κανονικό γεωμετρικό πρότυπο, αλλά οφείλεται στη χημική φύση του υλικού. Οι δευτερογενείς δυνάμεις θεωρούνται ότι είναι υπεύθυνες για τη συγκράτηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων στο πρωτεϊνικό πλέγμα [80].

Η άμορφη αυτή δομή της καζεΐνης επιβεβαιώνεται και από την ύπαρξη των δύο κορυφών στις 2θ=9,5 και 19,3^{ο} αντίστοιχα (Σχήμα 1). Οι κορυφές εμφανίζονται ευρείες κάτι το οποίο επιβεβαιώνει ότι το δείγμα χαρακτηρίζεται από έλλειψη κρυσταλλικότητας.



***Σχήμα 1**: Διάγραμμα XRD καθαρής καζεΐνης.*

6.1.2 Χαρακτηρισμός καζεΐνης με ATR-FTIR



***Σχήμα 2**: Διάγραμμα ATR-FTIR καθαρής καζεΐνης.*

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2, που αντιστοιχεί στο διάγραμμα ATR-FTIR για το δείγμα της καθαρής καζεΐνης, παρατηρούνται δονήσεις, οι οποίες αναλύονται παρακάτω. Οι δονήσεις στα 3280 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης N-H και O-H (οι κορυφές επικαλύπτονται). Οι κορυφές στους κυματάριθμους 2923cm^{-1} και 2856cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης δεσμών C-H. Οι κορυφές στους κυματάριθμους 1635 cm^{-1} οφείλονται στο αμίδιο I, κυρίως λόγω των δονήσεων έκτασης των δεσμών C=O. Αντίστοιχα για τις κορυφές στα 1524 cm^{-1} οφείλονται οι δεσμοί του αμιδίου II και πιο συγκεκριμένα δονήσεις κάμψης N-H. Για τους κυματάριθμους 1457 cm^{-1} και 1388 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις κάμψης -CH. Στα 1229 cm^{-1} αντιστοιχεί το αμίδιο III και πιο συγκεκριμένα σε δονήσεις κάμψης -NH [82-83].

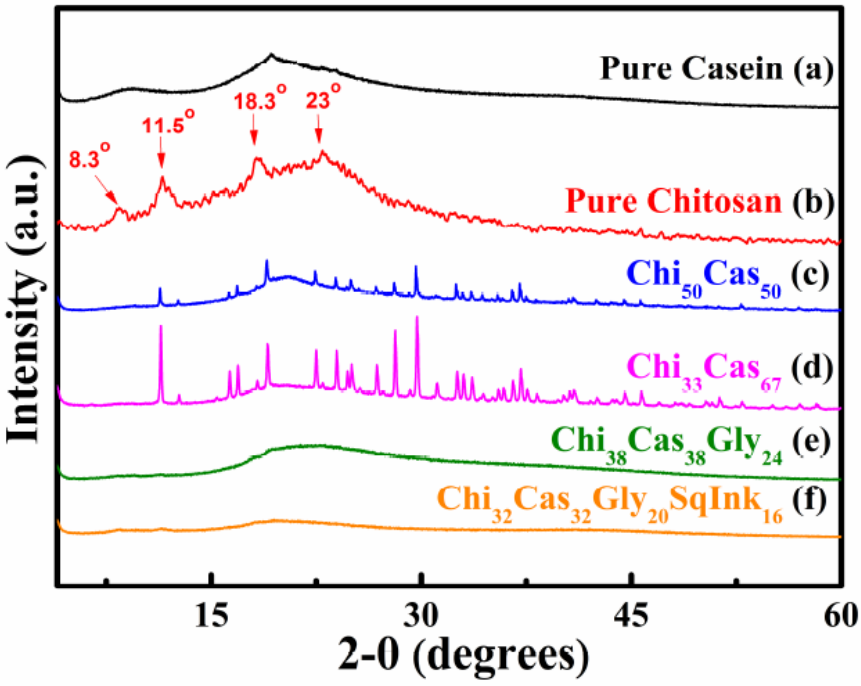
Για τους κυματάριθμους 1745 cm^{-1} η απορρόφηση οφείλεται στην παρουσία υγρασίας, κατά την διεξαγωγή της μέτρησης. Και αντίστοιχα στα 2365 cm^{-1} αντιστοιχεί σε ασύμμετρη δόνηση του CO_2, οπότε το αποτέλεσμα επηρεάστηκε από τον ατμοσφαιρικό αέρα ή αποθηκευμένο διοξείδιο του άνθρακα στο δείγμα [84-85].

6.2 Χαρακτηρισμός μεμβρανών υδροπηκτών από χιτοζάνη και καζεΐνη

6.2.1 Χαρακτηρισμός μεμβρανών με την μέθοδο XRD

Οι κορυφές περίθλασης της μεμβράνης χιτοζάνης (Σχήμα 3β) δείχνουν την ημικρυσταλλική φάση της και παρατηρούνται στις 2θ= 8,3°, 11,5° και 18,3°, ενώ η ευρεία κορυφή γύρω από τις 23° είναι χαρακτηριστική της άμορφης φάσης.

Οι μεμβράνες οι οποίες περιείχαν καζεΐνη και χιτοζάνη σε διαφορετικές αναλογίες $Χι_{50}Κα_{50}$ και $Χι_{33}Κα_{67}$, αντίστοιχα, εμφανίζουν καινούριες κορυφές επιβεβαιώνοντας τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ χιτοζάνης και καζεΐνης (Σχήμα 3γ και 3δ). Οι μεμβράνες που περιέχουν την γλυκερόλη $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ και $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ (Σχήμα 3ε και 3στ), αντίστοιχα, εμφανίζονται με ευρείες κορυφές δείχνοντας την άμορφη φάση τους, λόγω των υψηλών ποσοστών πλαστικοποιητή (γλυκερόλη), ο οποίος μειώνει την κρυσταλλικότητα του μείγματος.



***Σχήμα 3**: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X (XRD) των: (a) καθαρής καζεΐνης, (b) καθαρής χιτοζάνης, (c) $Chi_{50}Cas_{50}$, (d) $Chi_{33}Cas_{67}$, (e) $Chi_{38}Cas_{38}Gly_{24}$ και (f) $Chi_{32}Cas_{32}Gly_{20}SqInk_{16}$.*

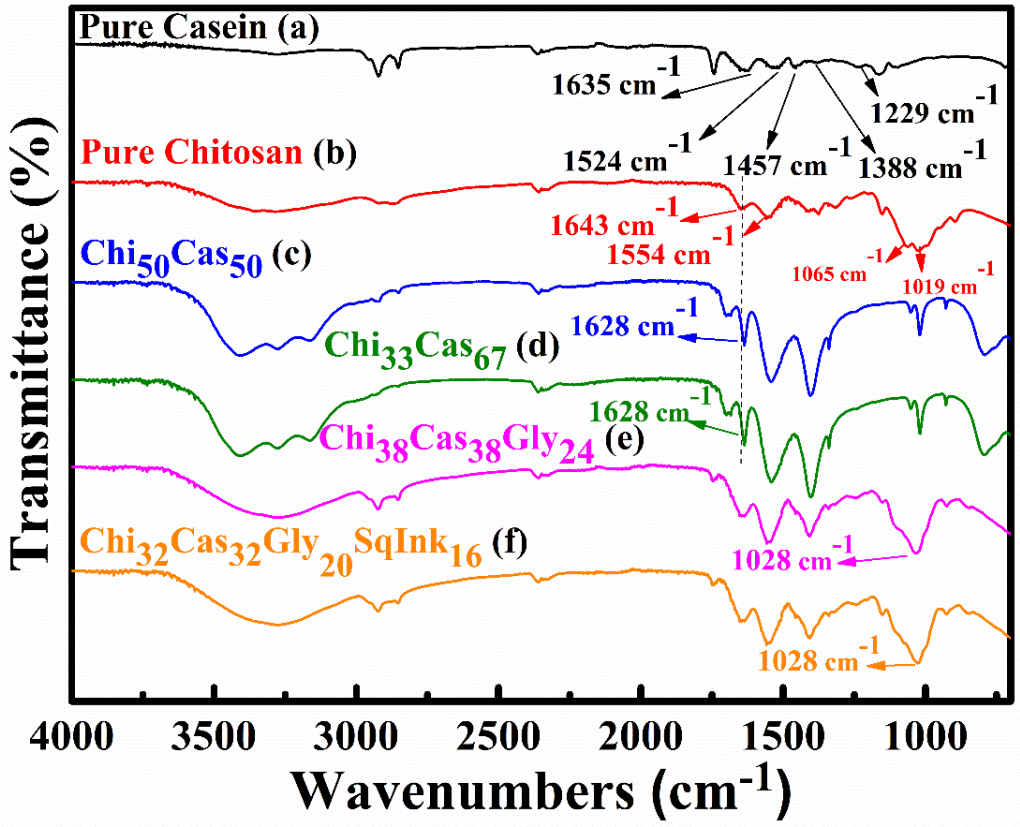
6.2.2 Χαρακτηρισμός μεμβρανών με την μέθοδο ATR-FTIR

Η καθαρή μεμβράνη χιτοζάνης (Σχήμα 4) παρουσιάζει μια ευρεία κορυφή μεταξύ 3500-3000 cm^{-1} όπου οφείλεται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων -OH και-NH-, οι οποίες επικαλύπτονται. Οι κορυφές στους κυματάριθμους στα 2923 και 2856 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης των δεσμών -CH-. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1643 cm^{-1} οφείλεται σε δονήσεις έκτασης του διπλού δεσμού C=O, η κορυφή στα 1554 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις κάμψης του δεσμού -NH- και οι κορυφές στα 1065 και 1019 cm^{-1} οφείλονται και οι δύο σε δονήσεις έκτασης του διπλού δεσμού C=O.

Ότι αφορά τα φάσματα των μεμβρανών οι οποίες αποτελούνται από χιτοζάνη και καζεΐνη σε αναλογίες $Χι_{50}Κα_{50}$ και $Χι_{33}Κα_{67}$ αντίστοιχα, συγκρίνονται με τα φάσματα της καθαρής καζεΐνης (Σχήμα 4α) και χιτοζάνης (Σχήμα 4β). Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα η ανάμειξη και η δημιουργία μεμβρανών χιτοζάνης-καζεΐνης δεν άλλαξε πολύ τα διαγράμματα. Ωστόσο, η κορυφή στα 1643 cm^{-1} (που παρατηρήθηκε στο σχήμα β της καθαρής χιτοζάνης) και αντιστοιχεί στο αμίδιο I, όπως προαναφέρθηκε, μετατοπίστηκε στα 1628 cm^{-1} και επιπλέον αυξήθηκε το ποσοστό διαπερατότητας, υποδεικνύοντας δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ συστατικών του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η επίδραση είναι ενδεικτική της

αλληλεπίδρασης των αμινομάδων της χιτοζάνης με τις αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλοομάδες της καζεΐνης στην τελική μεβράνη.

Όπως φαίνεται στην Σχήμα 4δ (μεμβράνη με σύσταση $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$) η κορυφή στα 1028 cm^{-1} αποδίδεται στην προσθήκη γλυκερόλης και υποδηλώνει την επιτυχή ενσωμάτωσή της στο μείγμα. Το τελευταίο φάσμα Σχήμα 4στ ($Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$) δεν παρουσιάζει καμία αξιοσημείωτη αλλαγή, κάτι που υποδηλώνει ότι το μελάνι καλαμαριού δεν επηρέασε το φάσμα FTIR.

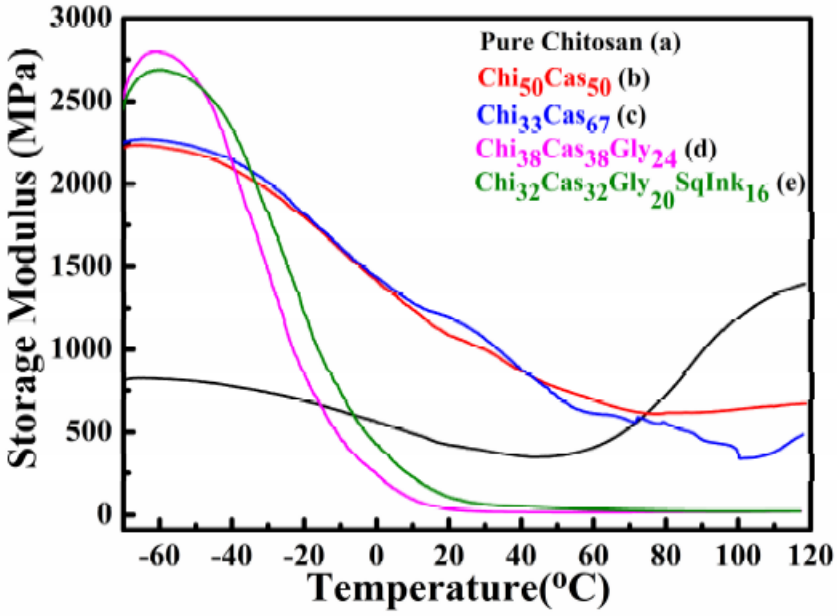


***Σχήμα 4**: Φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (FTIR) των μεμβρανών: (a) καθαρής καζεΐνης, (b) καθαρής χιτοζάνης, (c) $Chi_{50}Cas_{50}$, (d) $Chi_{33}Cas_{67}$, (e) $Chi_{38}Cas_{38}Gly_{24}$ και (f) $Chi_{32}Cas_{32}Gly_{20}SqInk_{16}$.*

6.2.3 Χαρακτηρισμός μεμβρανών με την μέθοδο DMA

Μέσω δυναμικής μηχανικής ανάλυσης εξετάστηκαν οι θερμομηχανικές ιδιότητες των μεμβρανών, σε ένα εύρος θερμοκρασιών -70 μέχρι 120 °C. Αρχικά όσον αφορά το μέτρο αποθήκευσης, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 5, η προσθήκη καζεΐνης ($Χι_{50}Κα_{50}$ Σχήμα 5β και $Χι_{33}Κα_{67}$ Σχήμα 5γ), σε σχέση με την καθαρή χιτοζάνη Σχήμα 5α, αύξησε κατά πολύ το μέτρο αποθήκευσης και άρα την ικανότητά του να αποθηκεύει ελαστική ενέργεια. Η συγκεκριμένη αύξηση μπορεί να οφείλεται

στην ψαθυρή φύση της καζεΐνης που ενισχύει την δυσκαμψία του υλικού. Η προσθήκη γλυκερόλης στις μεμβράνες $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ και $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί το μέτρο αποθήκευσης ενέργειας, εξαιτίας της δράσης της ως πλαστικοποιητής, αυξάνοντας έτσι την κίνηση μεταξύ των αλυσίδων. Το μελάνι καλαμαριού δεν επηρέασε τις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης, πιθανότατα λόγω της μικρής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε.

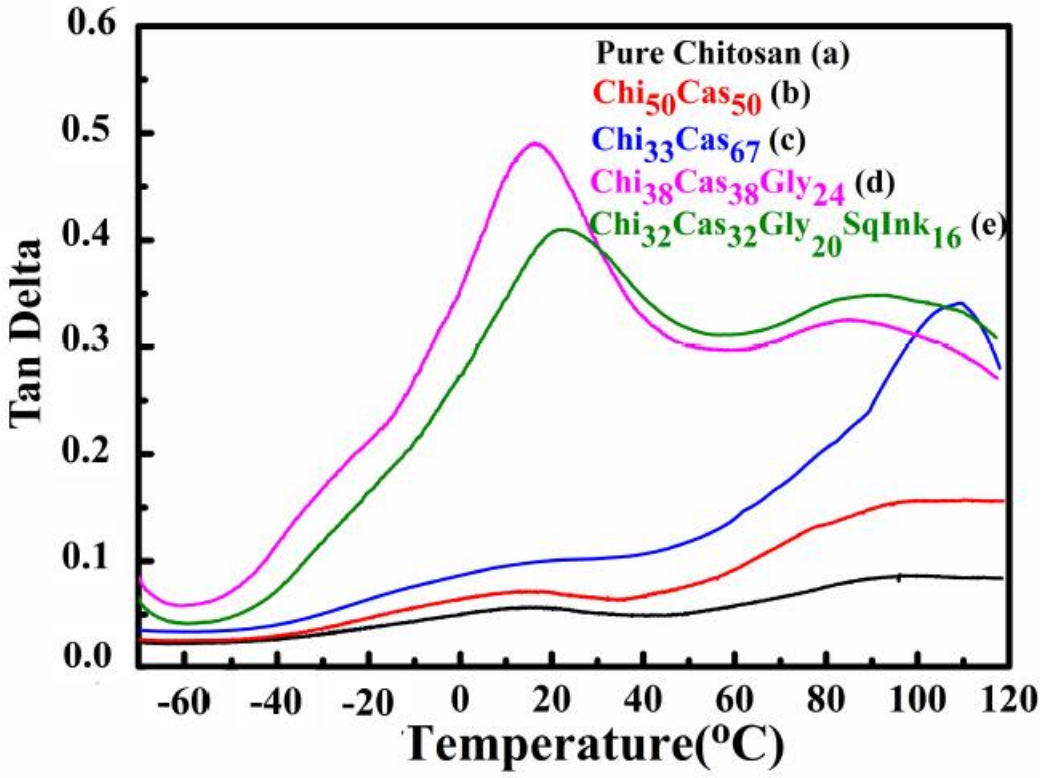


Σχήμα 5*: Καμπύλες του μέτρου αποθήκευσης (storage modulus) για μεμβράνες: (a) καθαρή χιτοζάνη, (b) $Chi_{50}Cas_{50}$, (c) $Chi_{50}Cas_{50}$, (d) $Chi_{33}Cas_{67}$, (e) $Chi_{38}Cas_{38}Gly_{24}$ και (f) $Chi_{32}Cas_{32}Gly_{20}SqInk_{16}$.*

Το διάγραμμα tanδ-θερμοκρασία (Σχήμα 6) δίνει πληροφορίες για την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), Αναφορικά, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης είναι η θερμοκρασία μετάπτωσης από την ιξωδοελαστική κατάσταση (τμήματα αλυσίδων κινούνται ενώ, η συνολική αλυσίδα δεν κινείται) στην υαλώδη κατάσταση (μακρομοριακές αλυσίδες παραμένουν απόλυτα ακίνητες).

Η T_g για την μεμβράνη καθαρής χιτοζάνης παρατηρήθηκε στους ~90°C (Σχήμα 6α). Μετά την προσθήκη της καζεΐνης, σχήμα με αναλογία $Χι_{50}Κα_{50}$, σχήμα και $Χι_{33}Κα_{67}$, φάνηκε ότι T_g εμφάνισε αύξηση στους 98°C (Σχήμα 6β) και 108°C (Σχήμα 6γ), αντίστοιχα. Η αυξημένη T_g στα μείγματα μπορεί να αποδοθεί στην τιμή T_g της καζεΐνης, η οποία είναι υψηλότερη από εκείνη της χιτοζάνης (Bengoechea et al., 2007) και από 1/1 αναλογία χιτοζάνης/καζεΐνης στο πρώτο μείγμα αυξήθηκε σε 1/2 στη δεύτερη περίπτωση, εξηγώντας την αύξηση κατά 10°C. Η προσθήκη γλυκερόλης στις

μεμβράνες $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ (Σχήμα 6δ) και $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ (Σχήμα 6ε) επέφερε μείωση στο T_g με τιμές 16°C και 22°C, αντίστοιχα. Υψηλότερες συγκεντρώσεις πλαστικοποιητή οδηγούν στην αλλαγή της φυσικής δομής των μεμβρανών με μείωση των διαμοριακών δυνάμεων μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, αυξάνοντας τον ελεύθερο όγκο, και κατά συνέπεια αύξηση της κινητικότητας των αλυσίδων του πολυμερούς. Σαν αποτέλεσμα εμφανίζονται χαμηλότερες τιμές της T_g (Treenate et al., 2015). Η προσθήκη του μελανιού από καλαμάρι οδήγησε σε μείωση του ποσοστού του πλαστικοποιητή (γλυκερόλη) και επομένως σε μια αύξηση της T_g κατά 6 °C.



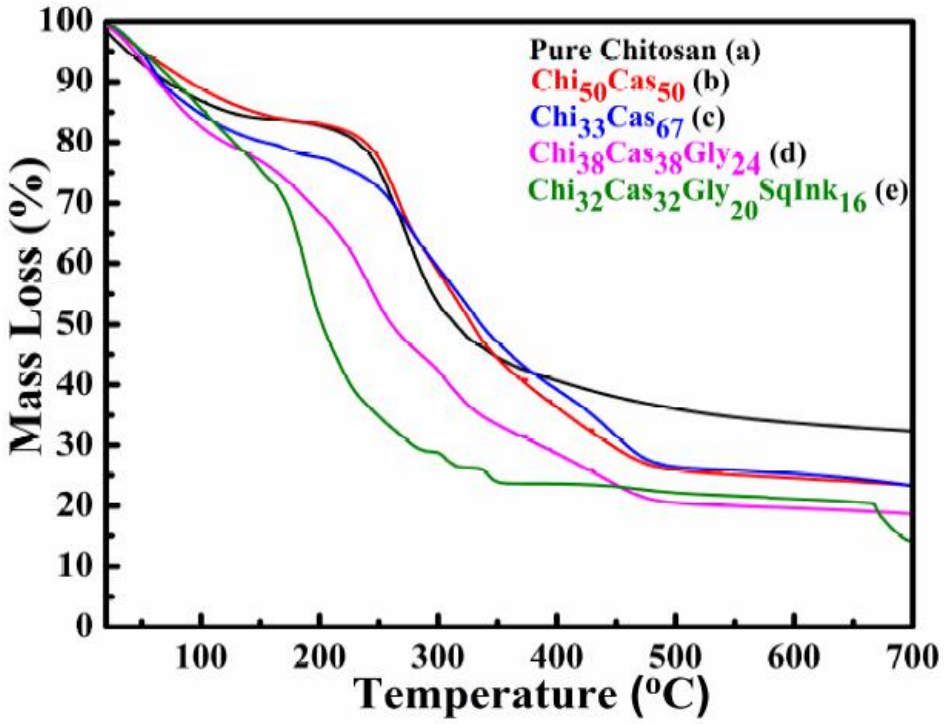
Σχήμα 6*: Καμπύλες του συντελεστή απόσβεσης (tan δ) για: (a) καθαρή χιτοζάνη, (b) $Chi_{50}Cas_{50}$, (c) $Chi_{50}Cas_{50}$, (d) $Chi_{33}Cas_{67}$, (e) $Chi_{38}Cas_{38}Gly_{24}$ και (f) $Chi_{32}Cas_{32}Gly_{20}SqInk_{16}$.*

6.2.4 Χαρακτηρισμός μεμβρανών με την μέθοδο TGA

Από την παρακάτω Σχήμα 7, μπορεί να ερμηνευτεί ο τρόπος με τον οποίο αντιδρούν οι μεμβράνες κατά την μεταβολή της θερμοκρασίας από 20 σε 700°C. Η αρχική μείωση της μάζας που παρατηρείται σε όλες τις μεμβράνες μεταξύ των θερμοκρασιών 80-120°C οφείλεται, πιθανώς, στην εξάτμιση του νερού που περιέχεται στις μεμβράνες. Η προσθήκη της καζεΐνης στο μείγμα $Χι_{50}Κα_{50}$ (Σχήμα 7β) δεν επηρέασε την θερμική σταθερότητα των μεμβρανών. Η αύξηση όμως της συγκέντρωσης της καζεΐνης στο δείγμα όπως φαίνεται αποσταθεροποιεί το δείγμα σε

θερμοκρασία ~180 °C (Σχήμα 7γ). Η έντονη μείωση στο βάρος που παρατηρείται μεταξύ των θερμοκρασιών 220-480°C στα δείγματα της καθαρής χιτοζάνης, $Χι_{50}Κα_{50}$ και $Χι_{33}Κα_{67}$ οφείλεται στην διάσπαση των δομικών μονάδων των υλικών.

Αντίστοιχα, η έντονη μείωση στις μεμβράνες που περιέχουν γλυκερόλη $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ και $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ (Σχήμα 7δ και 7ε), αρχίζει σε μικρότερες θερμοκρασίες, κάτι που σημαίνει ότι μειώνεται η θερμική σταθερότητα του υλικού. Η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων πλαστικοποιητών οδηγεί σε μείωση των τιμών των θερμοκρασιακών μετάβασης. Το υπόλοιπο ~20-30% της μάζας αποδίδεται σε εναπομείνασα τέφρα που έχει υποστεί οξείδωση και δεν μπορεί να αποσυντεθεί περαιτέρω.



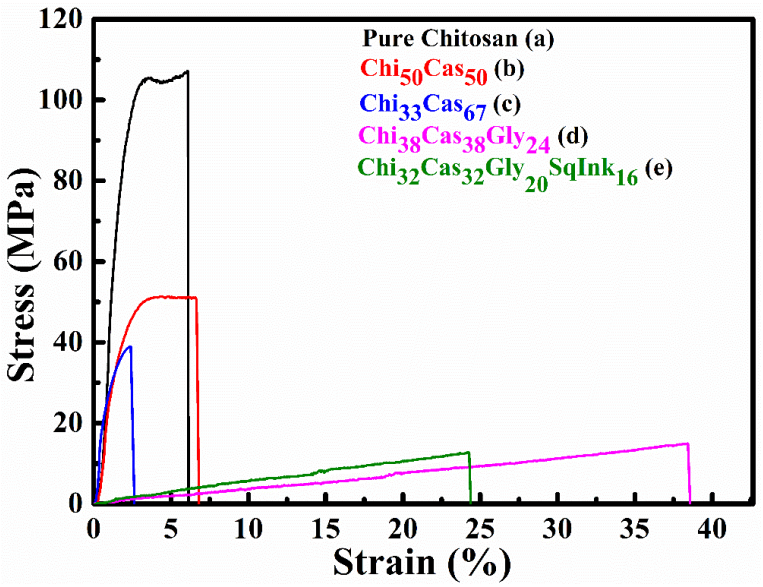
***Σχήμα** 7: Θερμογράφημα θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) των: (a) καθαρής χιτοζάνης, (b) $Chi_{50}Cas_{50}$, (c) $Chi_{33}Cas_{67}$, (e) $Chi_{38}Cas_{38}Gly_{24}$ και (f) $Chi_{32}Cas_{32}Gly_{20}SqInk_{16}$.*

6.2.5 Χαρακτηρισμός μηχανικών ιδιοτήτων μεμβρανών

Οι εφελκυστικές ιδιότητες των μεμβρανών μελετήθηκαν και απεικονίζονται στο διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης της Σχήμα 8, και οι μέσες τιμές τάσης και παραμόρφωσης για όλα τα δείγματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4. Η καθαρή χιτοζάνη παρουσίασε την υψηλότερη αντοχή ίση με 102,82 MPa με μέση παραμόρφωση 6,8%. Η προσθήκη καζεΐνης στη μεμβράνη σε αναλογία 50% ($Χι_{50}Κα_{50}$ Σχήμα 8β) προκάλεσε μείωση της αντοχής κατά 49,8% και μικρή αύξηση της παραμόρφωσης κατά 13,2%,

ενώ η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας καζεΐνης 67% ($Χι_{33}Κα_{67}$ Σχήμα 8γ) οδήγησε σε περαιτέρω ευθραυστότητα των δοκιμίων με μειώσεις τόσο των τιμών της αντοχής όσο και της παραμόρφωσης κατά 64,2% και 61,5%, αντίστοιχα, συγκριτικά με την καθαρή χιτοζάνη. Στην μεμβράνη $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ προκλήθηκε σημαντική μείωση της αντοχής κατά 85,1% με παράλληλη σημαντική αύξηση της παραμόρφωσης κατά 467,5% σε σύγκριση με την καθαρή χιτοζάνη. Τέλος, όταν η χιτοζάνη αναμίχθηκε με καζεΐνη, γλυκερόλη και μελάνι καλαμαριού, $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ η προκύπτουσα αντοχή μειώθηκε σημαντικά κατά 88,2%, αλλά ταυτόχρονα η παραμόρφωση αυξήθηκε κατά 250,7% σε σύγκριση με τα καθαρά δείγματα χιτοζάνης.

Η μειωμένη αντοχή που παρατηρήθηκε μετά την ενσωμάτωση της καζεΐνης στη μεμβράνη υδροπηκτής μπορεί να αποδοθεί στην κακή αναμιξιμότητα μεταξύ των συστατικών του μείγματος. Ειδικά στην περίπτωση του υλικού $Χι_{33}Κα_{67}$, στην Σχήμα 8γ, παρατηρείται ένα φαινόμενο διαχωρισμού φάσεων (δύο διαφορετικές Tg). Η ενσωμάτωση της γλυκερόλης μείωσε περαιτέρω την αντοχή λόγω της δράσης της ως πλαστικοποιητής που προκαλεί σημαντικά αυξημένη παραμόρφωση.



***Σχήμα 8**: Διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης των μεμβρανών: (a) καθαρής χιτοζάνης, (b) $Chi_{50}Cas_{50}$, (c) $Chi_{33}Cas_{67}$, (e) $Chi_{38}Cas_{38}Gly_{24}$ και (f) $Chi_{32}Cas_{32}Gly_{20}SqInk_{16}$.*

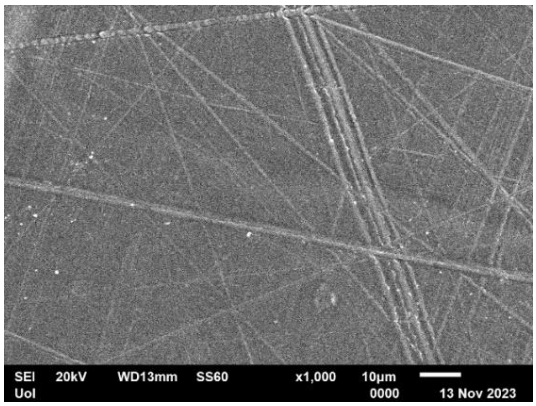
Οι μεταβολές στην τάση και την παραμόρφωση υπολογίστηκαν με βάση το σύστημα αναφοράς της καθαρής χιτοζάνης.

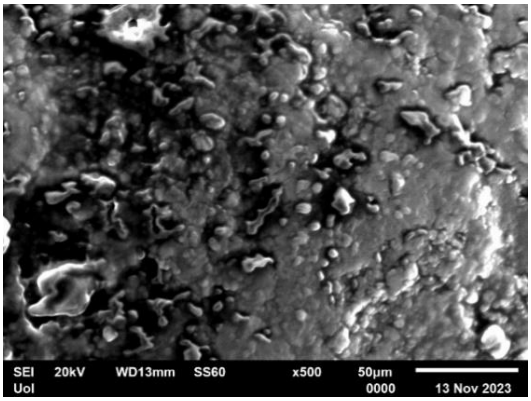
Πίνακας 4: Τιμές τάσης και παραμόρφωσης καθώς και οι % μεταβολές αυτών, σχετικά με την καθαρή χιτοζάνη, για τις διάφορες μεμβράνες.

Μεμβράνη	**Τάση (MPa)**	**Παραμόρφωση (%)**	**% μεταβολή τάσης**	**%μεταβολή παραμόρφωσης***
Καθαρή Χιτοζάνη *Σύστημα αναφοράς*	102.82 ± 6.97	6.77 ± 3.01	Σύστημα αναφοράς	
$Χι_{50}Κα_{50}$	51.60 ± 2.00	7.66 ± 1.70	-49.82	+13.15
$Χι_{33}Κα_{67}$	36.84 ± 2.02	2.61 ± 0.07	-64.17	-61.45
$Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$	15.36 ± 0.63	38.42 ± 0.22	-85.06	+467.50
$Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$	12.18 ± 1.85	23.74 ± 3.56	-88.15	+250.66

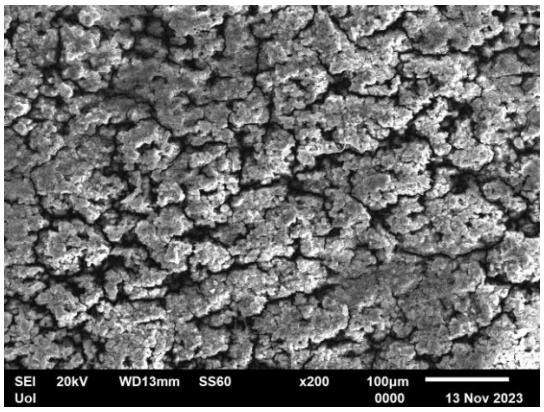
6.2.6 Ανάλυση μεμβρανών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

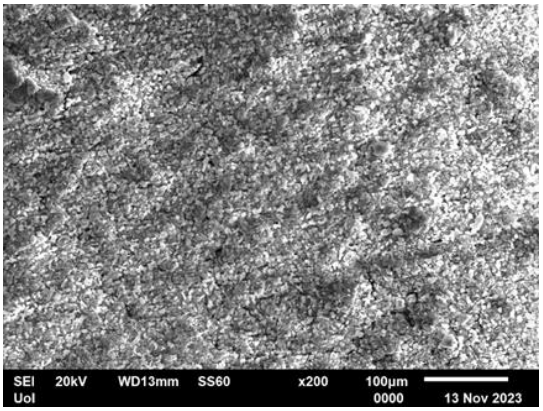
Η ανάλυση SEM χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η τοπική μορφολογία των μεμβρανών. Στην Εικόνα 15 (δεξιά) όπου είναι καθαρή καζεΐνη, είναι εμφανής ο σχηματισμός ενός πυκνού δικτύου που αποτελείται από συσσωματώματα καζεΐνης, ενώ στην Εικόνα 15 (αριστερά) όπου είναι καθαρή μεμβράνη χιτοζάνης φαίνεται επίσης η πυκνή μορφολογία της. Στην περίπτωση της μεμβράνης $Χι_{50}Κα_{50}$ (Εικόνα 16 αριστερά), παρατηρείται μια τραχιά επιφάνεια με κενά, ενώ στην περίπτωση της μεμβράνης $Χι_{33}Κα_{67}$ (Εικόνα 16 δεξιά), η επιφάνεια παραμένει τραχιά, αλλά τα κενά μειώθηκαν σημαντικά. Η μορφολογία αυτή μπορεί να οφείλεται στην κακή αναμιξιμότητα που έχουν η καζεΐνη με την χιτοζάνη όπως και προαναφέρθηκε. Η γλυκρόλη που λειτουργεί ως πλαστικοποιητής μείωσε τα κενά στις επιφάνειες των αντίστοιχων μεμβρανών $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ και $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$, υποδηλώνοντας ότι ο πλαστικοποιητής ενισχύει την αναμιξιμότητα (Εικόνα 17 αριστερά και δεξιά αντίστοιχα). Στην δεύτερη μεμβράνη με το μελάνι καλαμαριού (Εικόνα 17 δεξιά) μειώθηκαν ακόμα παραπάνω τα κενά όπως φαίνεται και στο σχήμα διαμορφώνοντας έτσι μια πιο πυκνή, ομαλή και συνεχή μορφολογία της επιφάνειας.



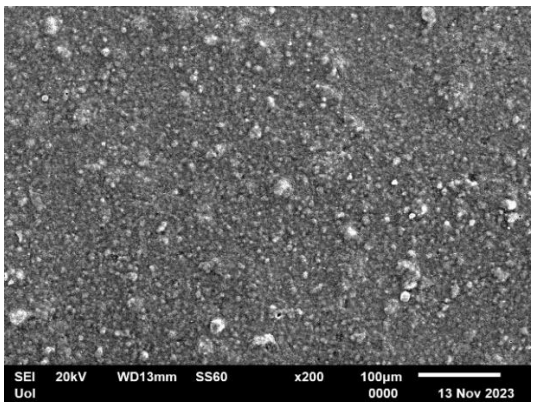


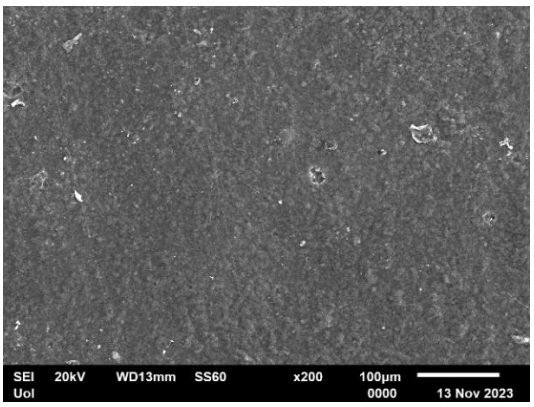
***Εικόνα 15**: Ανάλυση SEM για την μεμβράνη καθαρής χιτοζάνης (αριστερά) και καθαρή καζεΐνη (δεξιά).*





***Εικόνα 16**: Ανάλυση SEM για την μεμβράνη $Χι_{50}Κα_{50}$ (αριστερά) και $Χι_{33}Κα_{67}$ (δεξιά).*





***Εικόνα 17**: Ανάλυση SEM για την μεμβράνη $Χι_{38}Κα_{38}Γλυ_{24}$ (αριστερά) και $Χι_{32}Κα_{32}Γλυ_{20}Μελ_{16}$ (δεξιά).*

6.2.7 Ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου

Πίνακας 5: Μέσο πάχος και αποτελέσματα μέτρησης ρυθμού μεταφοράς οξυγόνου για τις διάφορες μεμβράνες

Δείγμα	**Μέσο Δx (mm)**	**PMO(ml.m^{-2}.day^{-1})**	**Pe$_{O2}$ (cm^2/s)**
Καθαρή Χιτοζάνη	0.06±0.01	<0.5*	Αδιαπέραστη
Χι$_{50}$Κα$_{50}$	0.13±0.01	<0.5*	Αδιαπέραστη
Χι$_{33}$Κα$_{67}$	0.27±0.01	<0.5*	Αδιαπέραστη
Χι$_{38}$Κα$_{38}$Γλυ$_{24}$	0.17±0.01	<0.5*	Αδιαπέραστη
Χι$_{32}$Κα$_{32}$Γλυ$_{20}$Μελ$_{16}$	0.22±0.01	<0.5*	Αδιαπέραστη

* Σύμφωνα με τις απαιτήσεις των οργάνων, η τιμή PMO βαθμονόμησης είναι 0,5-0,6. Οι καταγεγραμμένες τιμές χαμηλότερες από 0,5 ml.m^{-2} .day^{-1} θεωρούνται μηδενικές (αριθμός επαναλήψεων, n = 3).

Οι μελέτες διαπερατότητας οξυγόνου αποκάλυψαν ότι όλες οι παρασκευασμένες μεμβράνες παρουσίασαν μηδενική διαπερατότητα οξυγόνου, η οποία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τα υλικά συσκευασίας. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει σημαντικά την αρχική υπόθεση ότι τα υλικά αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά συσκευασίας τροφίμων. Η κατανομή των πολικών αμινοξέων σε όλη την πρωτεϊνική αλυσίδα προσδίδει τις μεμβράνες υδροπηκτής καζεΐνης με μοναδικά χαρακτηριστικά φραγμού που εμποδίζουν το οξυγόνο και το άλλα μη πολικά μόρια από το να διεισδύσουν στη μεμβράνη [86].

6.3 Χαρακτηρισμός μεμβρανών από LDPE και καζεΐνη

Το πρόδρομο πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE), η καζεΐνη, καθώς και οι τελικές παραγόμενες μεμβράνες, χαρακτηρίστηκαν και αναλύθηκαν με τη χρήση συγκεκριμένων μεθόδων. Οι τεχνικές χαρακτηρισμού και οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι εξής:

(a) Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με απορρόφηση ολικής ανάκλασης (ATR-FTIR)

(b) Περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)

(c) Δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA)

(d) Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM)

(e) Μέτρηση ρυθμού διαπερατότητας οξυγόνου (OTR) και υπολογισμός της διαπερατότητας οξυγόνου των μεμβρανών LDPE/$CS_{X\%}$

(f) Μέτρηση ρυθμού διαπερατότητας υδρατμών (WVTR) και υπολογισμός του συντελεστή διάχυσης υδρατμών των μεμβρανών LDPE/$CS_{X\%}$

(g) Στατιστική ανάλυση

6.3.1 Μηχανικές Ιδιότητες

Η αξιολόγηση των μηχανικών ιδιοτήτων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω δοκιμών εφελκυσμού, με σκοπό τη διερεύνηση της μηχανικής συμπεριφοράς των παραγόμενων μεμβρανών. Η διαδικασία ακολούθησε τη μεθοδολογία που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα της παρούσας εργασίας, βασισμένη στο διεθνές πρότυπο ASTM D638.

Οι δοκιμές εφελκυσμού εκτελέστηκαν με τη χρήση της συσκευής Shimadzu AG-X, με μέγιστη δυνατότητα φόρτισης 5 kN. Η εφαρμοζόμενη δύναμη μετρήθηκε μέσω της κυψέλης που ανήκει στην οργανολογία του εξοπλισμού, για όλα τα δοκίμια, ενώ ο ρυθμός παραμόρφωσης κατά τη διάρκεια των δοκιμών ορίστηκε στα 10 mm/min.

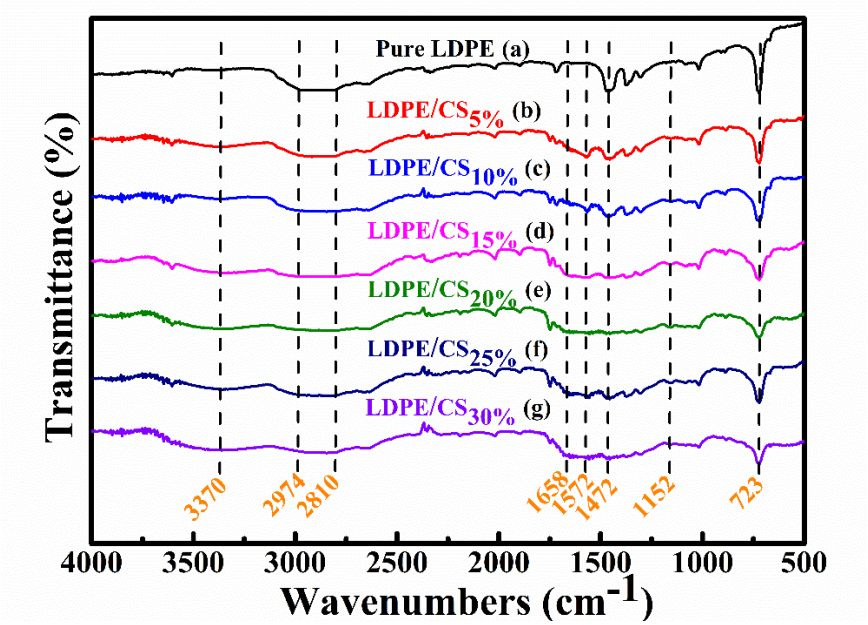
Για κάθε τύπο μεμβράνης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε τρία δοκίμια, ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Η μηχανική παραμόρφωση (engineering strain) κάθε δοκιμίου υπολογίστηκε ως ο λόγος της επιμήκυνσης προς το αρχικό ενεργό μήκος, ενώ η αντίστοιχη μηχανική τάση (engineering stress) προέκυψε από τη διαίρεση της εφαρμοζόμενης δύναμης με την επιφάνεια της αρχικής διατομής του δοκιμίου. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των χαρακτηριστικών μηχανικών παραμέτρων κάθε τύπου μεμβράνης.

6.3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Απορρόφηση Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR)

Στο Σχήμα 9 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR, τα οποία καταγράφηκαν σε λειτουργία διαπερατότητας (%T), για το καθαρό LDPE και για τις σύνθετες δομές αυτού που περιέχουν 5, 10, 15, 20, 25 και 30 w.t. (%) καζεΐνης. Στα φάσματα του καθαρού LDPE παρατηρούνται χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης που αντιστοιχούν στις δονήσεις των ατόμων των ομάδων $-CH_2-$ και $-CH_3$, εμφανιζόμενες στις περιοχές 2974 και 2810 cm^{-1}. Επιπλέον, οι κορυφές στις 1470 και 723 cm^{-1} αποδίδονται αντίστοιχα στις συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις τάσης (stretching)

των ομάδων CH_2, καθώς και στις δονήσεις κάμψης (bending) και ταλάντωσης (rocking) των ίδιων ομάδων.



***Σχήμα 9**: Φάσματα ATR-FTIR των μεμβρανών: (a) καθαρό LDPE, (b) LDPE/$CS_{5\%}$, (c) LDPE/$CS_{10\%}$, (d) LDPE/$CS_{15\%}$, (e) LDPE/$CS_{20\%}$, (f) LDPE/$CS_{25\%}$ και (g) LDPE/$CS_{30\%}$.*

Όλα τα φάσματα των σύνθετων δομών LDPE−$CS_{X\%}$ παρουσιάζουν τις ίδιες βασικές κορυφές απορρόφησης με εκείνες του καθαρού LDPE, ωστόσο εμφανίζουν και πρόσθετα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τις ομάδες αμιδίου I και αμιδίου II των μορίων της καζεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, οι ζώνες εμφανίζονται στις 1658, 1572 και 1152 cm^{-1}, οι οποίες αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του δεσμού C=O, στη δόνηση παραμόρφωσης του N−H (καθώς και στη δόνηση τάσης του C−N), και στη δόνηση του δεσμού C−O, αντίστοιχα, χαρακτηριστικές των δομικών μονάδων της καζεΐνης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή απορρόφησης μεταξύ 1100 και 1700 cm^{-1} παρουσιάζει αύξηση της περιεκτικότητας σε καζεΐνη, γεγονός που υποδηλώνει την αυξανόμενη συμμετοχή των πρωτεϊνικών δεσμών στη δομή του σύνθετου υλικού.

Επιπλέον, η χαρακτηριστική ζώνη στα 1470 cm^{-1} του πολυμερούς LDPE εξασθενεί σημαντικά ή επικαλύπτεται στις μεμβράνες με τη μέγιστη περιεκτικότητα (30% w.t) καζεΐνης, γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο φάσεων του υλικού. Η παρατηρούμενη διεύρυνση της περιοχής αυτής μπορεί πιθανότατα να αποδοθεί στις μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της καζεΐνης και του LDPE. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συγκεκριμένη περιοχή στα φάσματα FT-IR έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη διεύρυνση σε συστήματα

καζεΐνης/πολυπεπτιδίων, καζεΐνης/ζελατίνης, βοοειδούς καζεΐνης/ασβεστίου (Ca), καθώς και EPS/καζεΐνης, συγκριτικά με τα φάσματα των ελεύθερων μορίων καζεΐνης.

Το φαινόμενο αυτό έχει ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επιμέρους συζευγμένων μορίων στα σύνθετα αυτά συστήματα.

Επιπλέον, η ευρεία κορυφή που παρατηρείται γύρω στα 3370 cm^{-1} σε όλα τα φάσματα των δομών LDPE−CS $_{X\%}$, η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις των ατόμων των ομάδων $-NH_2$, ενδέχεται να περιλαμβάνει συνεισφορές και από τις ομάδες NH και OH της καζεΐνης. Στο φάσμα FT-IR των ελεύθερων μορίων καζεΐνης, οι αντίστοιχες ζώνες εμφανίζονται στις 3471, 3132 και 3230 cm^{-1}, γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία των παραπάνω λειτουργικών ομάδων. Η χαρακτηριστική αυτή διεύρυνση του σήματος μπορεί, επίσης, να αποδοθεί στην ύπαρξη δεσμών υδρογόνου στις δομές LDPE−CS $_{X\%}$.

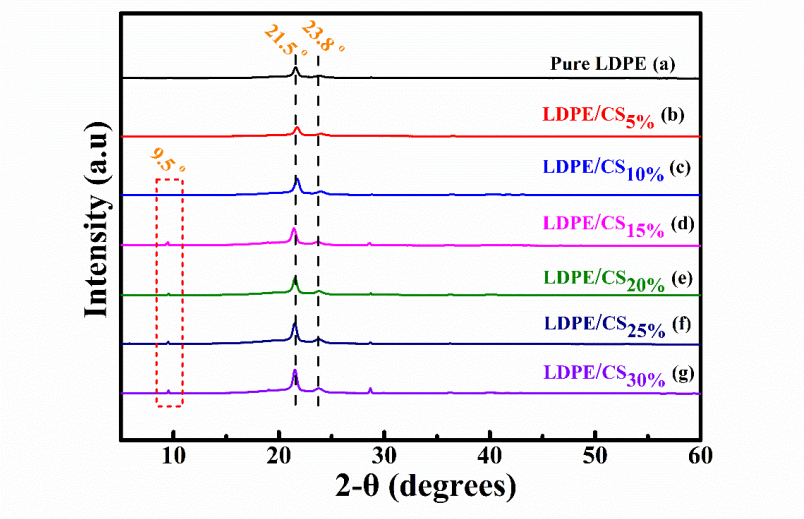
Το φαινόμενο αυτό έχει συνδεθεί, σε προηγούμενες μελέτες, με τον σχηματισμό διαμοριακών δεσμών υδρογόνου και με τους δονήσεις τάσης των δεσμών O−H στα σύνθετα πολυμερικά συστήματα. Συνολικά, από την ανάλυση FT-IR μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η παρουσία των χαρακτηριστικών ζωνών της καζεΐνης σε όλα τα φάσματα LDPE/CS αποδεικνύει την επιτυχή ενσωμάτωση των μορίων καζεΐνης στη μήτρα του LDPE, ενώ η διεύρυνση των δύο χαρακτηριστικών περιοχών απορρόφησης υποδηλώνει την ύπαρξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο συστατικών.

6.3.3 Περίθλαση Ακτίνων X (X-ray Diffraction, XRD)

Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X (XRD) για: (a) καθαρό LDPE, (b) LDPE/$CS_{5\%}$, (c) LDPE/$CS_{10\%}$, (d) LDPE/$CS_{15\%}$, (e) LDPE/$CS_{20\%}$, (f) LDPE/$CS_{25\%}$ και (g) LDPE/$CS_{30\%}$ μεμβράνες.

Το φάσμα του καθαρού LDPE (Σχήμα 10a) εμφανίζει δύο χαρακτηριστικές κορυφές σε τιμές 2θ = 21,5° και 23,8°, οι οποίες αντιστοιχούν, στη κρυσταλλική φάση του πολυμερούς και στη πλατιά κορυφή της άμορφης φάσης. Στα Σχήματα 10b–g παρουσιάζονται τα διαγράμματα των σύνθετων υλικών LDPE/$CS_{X\%}$, με περιεκτικότητες καζεΐνης 5, 10, 15, 20, 25 και 30 % w.t..

Το φάσμα της καθαρής καζεΐνης, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα της παρούσας εργασία, είναι χαρακτηριστικό πρωτεϊνών μη ινώδους δομής. Το διάγραμμα XRD της καζεΐνης παρουσιάζει δύο ευρείες κορυφές στις περιοχές περίπου 9,5° και 19,3°, επιβεβαιώνοντας τον άμορφο χαρακτήρα της πρωτεΐνης.



***Σχήμα 10**: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X (XRD) των: (a) καθαρό LDPE, (b) LDPE/CS$_{5\%}$, (c) LDPE/CS$_{10\%}$, (d) LDPE/CS$_{15\%}$, (e) LDPE/CS$_{20\%}$, (f) LDPE/CS$_{25\%}$ και (g) LDPE/CS$_{30\%}$ μεμβράνες.*

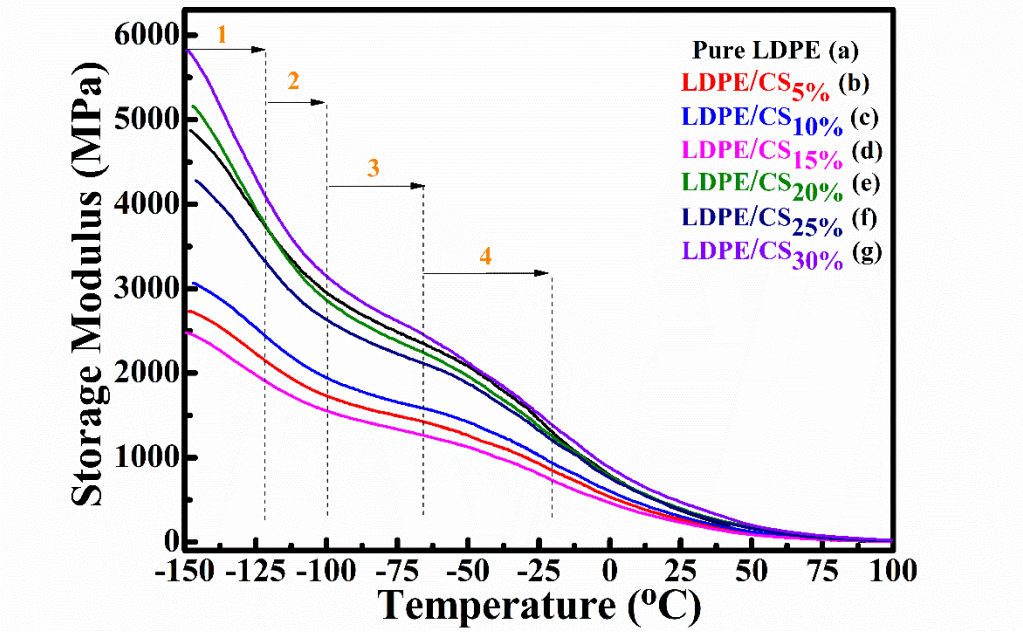
Η απουσία κρυσταλλικής δομικής στην καζεΐνη, καθώς και σε παρόμοιες πρωτεΐνες, αποδίδεται στις ισχυρές ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των πολικών ομάδων, οι οποίες πιθανότατα συνυπάρχουν μέσα σε ένα πολύπλοκο πρωτεϊνικό πλέγμα.

Η αύξηση της έντασης που παρατηρείται στα διαγράμματα των σύνθετων δομών (Σχήματα 10b–g) στην περιοχή 23,8° (άμορφη φάση) και η εμφάνιση της κορυφής γύρω στα 9,5° (ιδίως στα δείγματα με υψηλότερη περιεκτικότητα, (Σχήματα 10c–g) υποδηλώνουν την επιτυχή ανάμιξη των δύο συστατικών και επιβεβαιώνουν την υπόθεση ύπαρξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ του LDPE και της καζεΐνης.

Τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων X, σε συνδυασμό με τα δεδομένα της FT-IR ανάλυσης, ενισχύουν την υπόθεση ότι η καζεΐνη έχει ενσωματωθεί αποτελεσματικά στη μήτρα του LDPE, τροποποιώντας τη μορφολογία και τη δομική οργάνωση του πολυμερούς υλικού.

6.3.4 Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (Dynamic Mechanical Analysis, DMA)

Στο Σχήμα 11 παρουσιάζονται οι καμπύλες του μέτρου αποθήκευσης (storage modulus) για όλα τα παρασκευασμένα δείγματα, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Από τα διαγράμματα αυτά καθίσταται εμφανής η μεταβολή της μηχανικής συμπεριφοράς μεταξύ του καθαρού LDPE και των σύνθετων μεμβρανών LDPE/CS$_{X\%}$.



***Σχήμα 11**: Αποτελέσματα του μέτρου αποθήκευσης (storage modulus) για τις μεμβράνες: (a) καθαρό LDPE, (b) LDPE/CS5%, (c) LDPE/CS10%, (d) LDPE/CS15%, (e) LDPE/CS20%, (f) LDPE/CS25% και (g) LDPE/CS30%.*

Οι τιμές υπολογίστηκαν με Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA) σε εύρος θερμοκρασίας T = −150 έως 100°C και συχνότητα 1 Hz.

Η ενσωμάτωση καζεΐνης στις σύνθετες δομές με περιεκτικότητα 5%, 10% και 15% w.t. είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών του μέτρου αποθήκευσης, γεγονός που υποδεικνύει χαμηλότερη ελαστική απόκριση των υλικών σε αυτή την περιοχή συγκεντρώσεων. Αντίθετα, τα δείγματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις καζεΐνης (20–30% w.t) παρουσίασαν αύξηση των τιμών του μέτρου αποθήκευσης σε σχέση με τη μεμβράνη καθαρού LDPE, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην ανάπτυξη ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο φάσεων του σύνθετου υλικού.

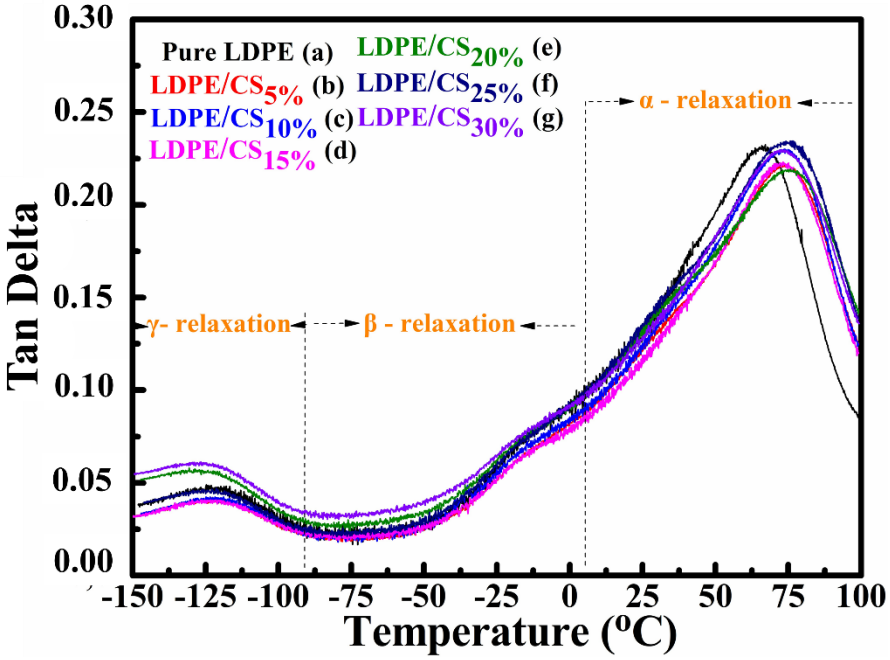
Οι τιμές του μέτρου αποθήκευσης κυμαίνονται από περίπου 2460 MPa (για το δείγμα LDPE/CS15%) έως περίπου 5800 MPa (για το LDPE/CS30%), γεγονός που επιβεβαιώνει την επίδραση της αυξημένης περιεκτικότητας καζεΐνης στη μηχανική ακαμψία των μεμβρανών.

Όλες οι καμπύλες του μέτρου αποθήκευσης παρουσιάζουν τέσσερις διακριτές ελαστικές περιοχές (Σχήμα 11): 1. υαλώδης περιοχή (glassy region) για θερμοκρασίες $T < -120\ °C$, 2. μεταβατική περιοχή (transition region) για $-120\ °C < T \leq -100\ °C$, 3. ελαστική περιοχή (rubbery region) για $-100\ °C < T \leq -65\ °C$ και 4. δευτερεύουσα μεταβατική περιοχή (secondary transition region) για $-65\ °C < T \leq -20\ °C$.

Παρατηρείται ότι δεν υφίσταται συγκεκριμένο ή απόλυτα σταθερό πρότυπο συμπεριφοράς των υλικών με την αύξηση της συγκέντρωσης καζεΐνης. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί σε μερική ή μη ομοιογενή ανάμιξη των συστατικών κατά την παρασκευή των σύνθετων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές DMA.

Σε συνδυασμό με τα ευρήματα της FT-IR και της XRD ανάλυσης, τα αποτελέσματα της DMA υποδηλώνουν ότι, παρότι η καζεΐνη ενσωματώνεται επιτυχώς στη μήτρα του LDPE, ο βαθμός ανάμειξης και η μικροδομή των σύνθετων υλικών επηρεάζουν σημαντικά τη δυναμική μηχανική τους απόκριση.

Στο Σχήμα 12 παρουσιάζονται οι καμπύλες του συντελεστή απόσβεσης (tan δ) για όλα τα παρασκευασμένα υλικά. Οι τιμές του tan δ αντικατοπτρίζουν τη συμπεριφορά απόσβεσης, δηλαδή τις μηχανικές απώλειες ενέργειας των δειγμάτων μετά την ενσωμάτωση της καζεΐνης σε διάφορες συγκεντρώσεις.



***Σχήμα 12**: Καμπύλες του συντελεστή απόσβεσης (tan δ) για τις μεμβράνες εκβολής: (a) καθαρό LDPE, (b) LDPE/CS$_{5\%}$, (c) LDPE/CS$_{10\%}$, (d) LDPE/CS$_{15\%}$, (e) LDPE/CS$_{20\%}$, (f) LDPE/CS$_{25\%}$ και (g) LDPE/CS$_{30\%}$.*

Οι τιμές υπολογίστηκαν με Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA) σε εύρος θερμοκρασίας T = −150 έως 100°C και συχνότητα 1 Hz.

Οι καμπύλες tan δ παρουσιάζουν τρεις διακριτές περιοχές απορρόφησης ενέργειας, οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικές μεταπτώσεις του πολυμερούς. Κάθε περιοχή χαρακτηρίζεται από ανεξάρτητο μηχανισμό χαλάρωσης, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- γ-χαλάρωση (γ-relaxation) για θερμοκρασίες $-150\ °C \leq T_\gamma \leq -90\ °C$,
- β-χαλάρωση (β-relaxation) για θερμοκρασίες $-92\ °C \leq T_\beta \approx 5\ °C$,
- α-χαλάρωση (α-relaxation) για θερμοκρασίες $5\ °C \leq T_\alpha \approx 100\ °C$.

Οι περιοχές β και γ σχετίζονται με την κίνηση των μοριακών αλυσίδων στη άμορφη φάση του πολυμερούς, ενώ η περιοχή α αποδίδεται στις κινήσεις των αλυσίδων εντός της κρυσταλλικής φάσης.

Η περιοχή γ-χαλάρωσης χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης (Tg). Όλες οι παρασκευασμένες μεμβράνες παρουσίασαν γ-χαλάρωση στους −120 °C, γεγονός που υποδεικνύει ότι διαθέτουν παρόμοιες θερμοκρασίες υαλώδους μετάβασης.

Η β-χαλάρωση αποδίδεται στην κίνηση των διακλαδώσεων των αλυσίδων (τόσο κατά μήκος του κύριου κορμού όσο και στους πλευρικούς κλάδους) στην άμορφη φάση, γεγονός που εκδηλώνεται ως βαθμιαία αύξηση των αποσβεστικών ιδιοτήτων των δειγμάτων. Αντίθετα, η α-χαλάρωση σχετίζεται με τις κινήσεις των αλυσίδων στα όρια μεταξύ της κρυσταλλικής και της άμορφης φάσης, υποδεικνύοντας τη σύνθετη φύση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων στα σύνθετα πολυμερή συστήματα LDPE/CS.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης tan δ, σε συνδυασμό με εκείνα του μέτρου αποθήκευσης (storage modulus), παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για τη δυναμική συμπεριφορά των μεμβρανών και επιβεβαιώνουν ότι η ενσωμάτωση της καζεΐνης επηρεάζει τόσο τις μηχανικές απώλειες ενέργειας, όσο και τις διεργασίες χαλάρωσης του πολυμερικού δικτύου.

Η γ-χαλάρωση αντιστοιχεί στη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης (Tg), η οποία αποδίδεται στην κίνηση των μοριακών αλυσίδων στην άμορφη φάση, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην παρούσα εργασία. Η συγκεκριμένη μετάβαση επηρεάζει άμεσα τη μηχανική ευκαμψία και τη θερμική σταθερότητα των υλικών που είναι παράμετροι ιδιαίτερα κρίσιμες για εφαρμογές συσκευασίας, όπου τα υλικά υπόκεινται σε μηχανικές καταπονήσεις κατά τη διαχείριση, τη σφράγιση και την αποθήκευση.

6.3.5 Εφελκυστικές Ιδιότητες

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τιμές του μέτρου ελαστικότητας (E), της μέγιστης αντοχής σε εφελκυσμό (σ_{uts}) και της παραμόρφωσης στη θραύση (%ε) για τις μεμβράνες καθαρού LDPE και τις σύνθετες μεμβράνες $LDPE/CS_{X\%}$. Παράλληλα, το

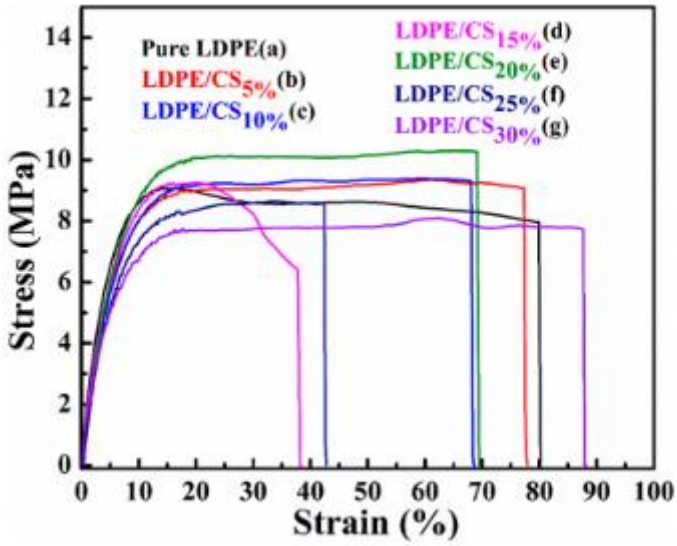
Σχήμα 13 απεικονίζει τη σύγκριση των καμπυλών τάσης–παραμόρφωσης των εξεταζόμενων μεμβρανών.

Πίνακας 6: Τιμές του μέτρου ελαστικότητας (E), της οριακής αντοχής σε εφελκυσμό (σ_{uts}) και της επιμήκυνσης κατά τη θραύση (%ε) για τις μεμβράνες καθαρού LDPE και LDPE/$CS_{X\%}$.

Specimen	Elastic Modulus	σ_{uts} (MPa)	Elongation (%)
LDPE	209,48 ± 15,50	8,98 ± 1,67	107,28 ± 58,86
LDPE_3Cas	178,46 ± 31,05	10,45 ± 1,06	166,69 ± 72,38
LDPE_5Cas	163,47 ± 14,89	8,99 ± 0,57	77,27 ± 16,64
LDPE_10Cas	166,62 ± 8,31	9,17 ± 0,32	68,12 ± 39,57
LDPE_15Cas	153,51 ± 4,81	9,22 ± 0,24	37,80 ± 11,69
LDPE_20Cas	164,99 ± 10,81	10,12 ± 0,51	69,12 ± 21,32
LDPE_25Cas	141,37 ± 25,49	8,54 ± 1,49	42,42 ± 23,69
LDPE_30Cas	140,41 ± 13,55	7,69 ± 1,13	87,69 ± 74,01
LDPE_50Cas	164,55 ± 31,44	8,03 ± 0,96	11,67 ± 3,95

Τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον παραπάνω πίνακα δείχνουν ότι η μέγιστη εφελκυστική αντοχή του καθαρού LDPE διατηρείται στις μεμβράνες που περιέχουν καζεΐνη έως και 20% w.t.. Αντίθετα, για υψηλότερες συγκεντρώσεις καζεΐνης (25% και 30% w.t..) παρατηρείται μείωση της αντίστοιχης τιμής, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπερβολική προσθήκη καζεΐνης ενδέχεται να επηρεάζει αρνητικά τη μηχανική αντοχή του πολυμερικού πλέγματος.

Σε πιο λεπτομερή ανάλυση, παρατηρείται μια ήπια μείωση της μέγιστης παραμόρφωσης στις μεμβράνες LDPE/$CS_{5\%}$, LDPE/$CS_{10\%}$ και LDPE/$CS_{20\%}$, ενώ οι μεμβράνες LDPE/$CS_{15\%}$ και LDPE/$CS_{25\%}$ εμφανίζουν εντονότερη μείωση των τιμών τους προς χαμηλότερα επίπεδα. Αντίθετα, η μεμβράνη LDPE/$CS_{30\%}$ παρουσίασε μεγαλύτερη τιμή παραμόρφωσης σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες, ακόμη και σε σχέση με το καθαρό LDPE.



***Σχήμα 13**: Ενδεικτικές καμπύλες τάσης–παραμόρφωσης για: (a) καθαρό LDPE, (b) LDPE/CS$_{5\%}$, (c) LDPE/CS$_{10\%}$, (d) LDPE/CS$_{15\%}$, (e) LDPE/CS$_{20\%}$, (f) LDPE/CS$_{25\%}$ και (g) LDPE/CS$_{30\%}$.*

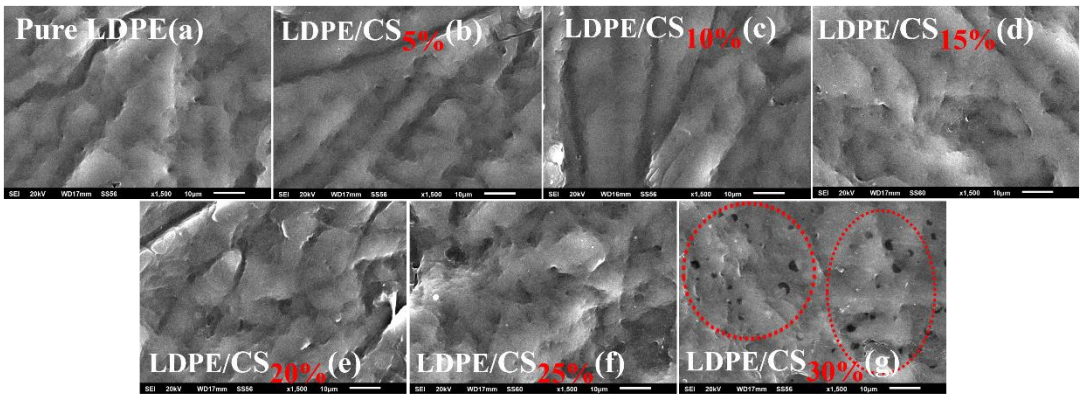
Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η προσθήκη καζεΐνης σε διάφορα ποσοστά στη μήτρα του LDPE δεν μεταβάλλει ουσιαστικά την ολκιμότητα των μεμβρανών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία της καζεΐνης, ακόμη και σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, δεν επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα του πολυμερούς να παραμορφώνεται πριν τη θραύση, διατηρώντας έτσι ικανοποιητική μηχανική ευκαμψία, στοιχείο κρίσιμο για εφαρμογές συσκευασίας.

6.3.6 Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Η τεχνική SEM χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της μορφολογίας της επιφάνειας τόσο του καθαρού LDPE, όσο και των σύνθετων μεμβρανών LDPE/CS$_{X\%}$. Το καθαρό LDPE, όπως και τα σύνθετα υλικά, παρουσίασαν μια συνεχή και συμπαγή δομή (Εικόνα 18a), χωρίς την παρουσία κενών, γεγονός που υποδηλώνει επαρκή διασπορά των συσσωματωμάτων καζεΐνης στη μήτρα του LDPE.

Η αύξηση της περιεκτικότητας καζεΐνης στα μίγματα οδήγησε σε επιφάνεια τραχύτερης μορφολογίας (Εικόνα 18b–f), ωστόσο η συνολική δομή των μεμβρανών παρέμεινε πυκνή και ομοιογενής. Μόνο στην περίπτωση της μεμβράνης LDPE/CS$_{30\%}$ (Εικόνα 18g) παρατηρήθηκαν μικροκενά (microvoids), επισημασμένα με κόκκινο χρώμα), τα οποία πιθανότατα αποδίδονται σε μη πλήρη διασπορά της καζεΐνης στη μήτρα του LDPE, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσής της (~30% w.t) στο μίγμα.

Η μορφολογική αυτή διαφοροποίηση υποδεικνύει ότι, ενώ χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις καζεΐνης ενσωματώνονται ομοιογενώς στο υπόστρωμα του πολυμερούς, υπερβολικά υψηλά ποσοστά ενδέχεται να προκαλούν φαινομενική ασυνέχεια στη δομή, πιθανώς επηρεάζοντας την μηχανική αντοχή και την διαπερατότητα των μεμβρανών.



Εικόνα 18: *Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) των: (a) καθαρού LDPE, (b) LDPE/CS$_{5\%}$, (c) LDPE/CS$_{10\%}$, (d) LDPE/CS$_{15\%}$, (e) LDPE/CS$_{20\%}$, (f) LDPE/CS$_{25\%}$ και (g) LDPE/CS$_{30\%}$ μεμβρανών (μεγέθυνση ×1500).*

6.3.7 Ρυθμός Μετάδοσης Υδρατμών και Οξυγόνου (WVTR − OTR)

Η μορφολογία και η ομοιογένεια των σύνθετων μεμβρανών, όπως επιβεβαιώθηκαν μέσω της ανάλυσης SEM, αναμένεται να επηρεάζουν καθοριστικά τις ιδιότητες φραγμού, έναντι της διάχυσης αερίων και υδρατμών. Για τον λόγο αυτό, υπολογίστηκαν ο συντελεστής διάχυσης υδρατμών και η διαπερατότητα οξυγόνου για τις μεμβράνες: (a) καθαρό LDPE, (b) LDPE/CS$_{5\%}$, (c) LDPE/CS$_{10\%}$, (d) LDPE/CS$_{15\%}$, (e) LDPE/CS$_{20\%}$, (f) LDPE/CS$_{25\%}$ και (g) LDPE/CS$_{30\%}$, με στόχο τη συγκριτική αξιολόγηση των φραγμών μεταφοράς. Τα υπολογισμένα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Τιμές του συντελεστή διάχυσης υδρατμών και της διαπερατότητας οξυγόνου για τις μεμβράνες καθαρού LDPE και LDPE/CS$_{X\%}$.

samples	D_{wv} ($\times 10^{-4}$ cm^2/s)	Pe ($\times 10^{-8}$ cm^2/g)
pure LDPE	1.615 ± 0.3065	2.610 ± 0.0544
LDPE/CS$_{5\%}$	2.492 ± 0.3721	2.421 ± 0.0121
LDPE/CS$_{10\%}$	3.401 ± 0.3798	2.315 ± 0.008
LDPE/CS$_{15\%}$	2.229 ± 0.3978	2.246 ± 0.0188
LDPE/CS$_{20\%}$	1.774 ± 0.0788	2.476 ± 0.0309
LDPE/CS$_{25\%}$	2.909 ± 0.3999	3.375 ± 0.0701
LDPE/CS$_{30\%}$	2.093 ± 0.2271	3.797 ± 0.1184

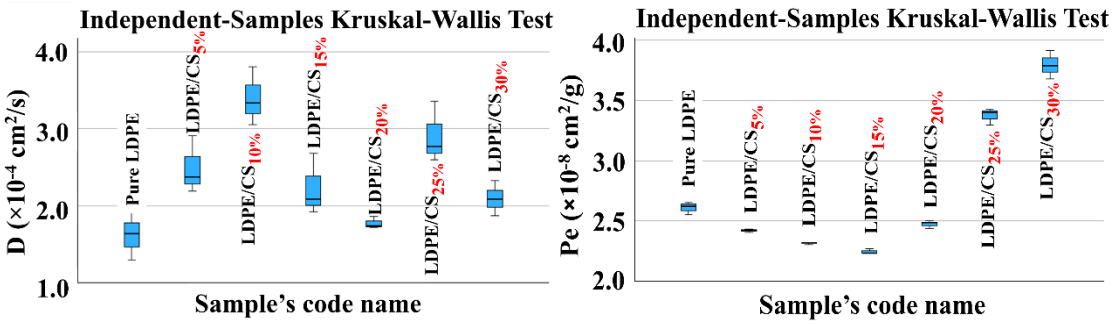
Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του πίνακα, η μεμβράνη LDPE/$CS_{20\%}$ παρουσιάζει τις καλύτερες ιδιότητες φραγμού έναντι της υγρασίας, σε σύγκριση, με όλα τα υπόλοιπα σύνθετα δείγματα.

Όσον αφορά τον φραγμό οξυγόνου, όλες οι σύνθετες μεμβράνες εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές διαπερατότητας οξυγόνου σε σχέση με το καθαρό φιλμ LDPE, με εξαίρεση τα δείγματα LDPE/$CS_{25\%}$ και LDPE/$CS_{30\%}$, στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση της διαπερατότητας. Το εύρημα αυτό πιθανότατα σχετίζεται με τη μη ομοιόμορφη διασπορά της καζεΐνης στις υψηλές συγκεντρώσεις, όπως είχε ήδη διαπιστωθεί από την ανάλυση SEM, οδηγώντας στον σχηματισμό μικροκενών που ευνοούν τη διέλευση αερίων μορίων.

Οι υψηλότερες τιμές διαπερατότητας οξυγόνου, που παρατηρήθηκαν για τις μεμβράνες LDPE/$CS_{25\%}$ και LDPE/$CS_{30\%}$, οι οποίες ενδέχεται να υποδηλώνουν ανεπαρκή διασπορά των συσσωματωμάτων καζεΐνης στο μίγμα και τον σχηματισμό μικροκενών, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18g.

Σύμφωνα με αναφορές της διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας, η ενσωμάτωση καζεΐνης στα πολυμερή συστήματα έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τις ιδιότητες φραγμού έναντι του οξυγόνου. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι για την επίτευξη αυτής της βελτίωσης απαιτείται η κατάλληλη και βέλτιστη συγκέντρωση καζεΐνης στο μίγμα.

Η ενσωμάτωση της καζεΐνης στις μεμβράνες οδήγησε, επίσης, σε αυξημένες τιμές του συντελεστή διάχυσης υδρατμών (D_{wv}), γεγονός που αποδίδεται στις ενισχυμένες ικανότητες δέσμευσης νερού της καζεΐνης. Το αποτέλεσμα αυτό καταδεικνύει ότι η παρουσία της πρωτεΐνης συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με τα μόρια του νερού,αυξάνοντας τη συνολική υγροσκοπικότητα του σύνθετου συστήματος.



***Σχήμα 14**: Γραφική απεικόνιση των στατιστικών τιμών του Πίνακα 7.*

Στο Σχήμα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων WVTR και OTR, τα οποία επιβεβαιώνουν τις παραπάνω παρατηρήσεις και αναδεικνύουν τη συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας καζεΐνης, της μορφολογίας της επιφάνειας και των ιδιοτήτων φραγμού των σύνθετων μεμβρανών LDPE/CS.

Συνοψίζοντας, η ανάλυση των ιδιοτήτων φραγμού των σύνθετων μεμβρανών LDPE/$CS_{X\%}$ καταδεικνύει ότι η ενσωμάτωση της καζεΐνης στη μήτρα του LDPE επιδρά σημαντικά στη διαπερατότητα υδρατμών και οξυγόνου, με την επίδραση αυτή να εξαρτάται έντονα από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι μέτρια ποσοστά καζεΐνης (περίπου 20% w.t.) οδηγούν σε βελτιωμένες ιδιότητες φραγμού, πιθανότατα λόγω ομοιογενούς διασποράς της πρωτεΐνης στη πολυμερική μήτρα και του σχηματισμού πιο συνεκτικής μικροδομής.

Αντίθετα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (>25% w.t.), η ανεπαρκής διασπορά και η εμφάνιση μικροκενών (όπως επιβεβαιώθηκε με SEM) οδηγούν σε αύξηση της διαπερατότητας και μείωση της αποτελεσματικότητας του φραγμού.

Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία της βελτιστοποίησης της περιεκτικότητας καζεΐνης στα σύνθετα συστήματα LDPE/CS, προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ μηχανικής αντοχής, μορφολογικής ομοιογένειας και ιδιοτήτων φραγμού. Συνεπώς, η καζεΐνη μπορεί να θεωρηθεί ως λειτουργικό πρόσθετο με δυνατότητα βελτίωσης της απόδοσης των πολυμερικών μεμβρανών συσκευασίας, εφόσον η περιεκτικότητά της ρυθμιστεί εντός του κατάλληλου εύρους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^{Ο}: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

7.1 Συμπεράσματα

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η κατασκευή μεμβρανών από καζεΐνη και χιτοζάνη και στην συνέχεια προσθήκη ενός πλαστικοποιητή (γλυκερόλη) και μελάνι καλαμαριού. Ο σχεδιασμός των μεμβρανών αυτών είχε τελικό σκοπό την εφαρμογή τους ως υλικά συσκευασίας για τρόφιμα. Στην συνέχεια, έγινε αξιολόγηση των παραχθείσθαντων μεμβρανών με διάφορες μεθόδους. Μέσω των μεθόδων ATR-FTIR και XRD, φάνηκε ότι τα συστατικά της χιτοζάνης και της καζεΐνης αλληλοεπιδρούν επιτυχώς με δευτερογενείς δυνάμεις και ο πλαστικοποιητής γλυκερόλη ενσωματώνεται επιτυχώς στο δείγμα. Μέσω των μηχανικών μεθόδων φάνηκε ότι η προσθήκη καζεΐνης στην περίπτωση του $Χι_{50}Κα_{50}$ οδήγησε σε ενίσχυση της παραμόρφωσης κατά 13,2%, ενώ η ενσωμάτωση της γλυκερόλης βελτίωσε περαιτέρω την ιδιότητα παραμόρφωσης των μεμβρανών κατά 467,5%, σε σχέση με τις καθαρές μεμβράνες χιτοζάνης. Αυτή η σημαντική βελτίωση της τιμής της παραμόρφωσης καθιστά το υλικό εύχρηστο σε αντίθεση με τα υλικά χωρίς γλυκερόλη, τα οποία είναι εύθραυστα. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης μετά την προσθήκη γλυκερόλης, όπως αποδείχθηκε από την μέθοδο DMA είναι χαμηλή (~18 °C), χαμηλότερη δηλαδή από την θερμοκρασία περιβάλλοντος και άρα βρίσκονται στην ιξωδοελαστική κατάσταση και είναι εύκολα επεξεργάσιμες οι μεμβράνες. Μέσω της μέτρησης διαπερατότητας οξυγόνου, όπου οι τιμές υπολογίστηκαν μηδενικές, ταυτοποιήθηκε η δυνατότητα χρήσης των συγκεκριμένων μεμβρανών για συσκευασίες τροφίμων.

Επιπρόσθετα, η παρούσα μελέτη παρουσιάζει μια καινοτόμο και βιώσιμη προσέγγιση για την ανάπτυξη υλικών συσκευασίας τροφίμων μέσω της ενσωμάτωσης καζεΐνης, σε μήτρα πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE) με τη χρήση της μεθόδου της εκβολής (*extrusion*). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων ATR-FTIR και XRD επιβεβαίωσαν την επιτυχή ανάμιξη της καζεΐνης με το LDPE, καθώς και την ύπαρξη πιθανών δευτερογενών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο πολυμερών [78]. Οι μεμβράνες που περιείχαν 20–30% w.t. καζεΐνης παρουσίασαν υψηλότερες τιμές ελαστικότητας (*storage modulus*), σε σύγκριση με την μεμβράνη καθαρού LDPE, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές στη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης (T_g).

Οι δοκιμές εφελκυσμού έδειξαν ότι η μέγιστη αντοχή σε εφελκυσμό της μεμβράνης καθαρού LDPE διατηρείται στα δείγματα που περιέχουν έως και 20% w.t.

καζεΐνης [78]. Η μορφολογική ανάλυση μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) αποκάλυψε πυκνή και ομοιογενή δομή για τα περισσότερα σύνθετα υλικά, γεγονός που υποδηλώνει ικανοποιητική διασπορά των συστατικών. Ωστόσο, στην περίπτωση της μεμβράνης LDPE/$CS_{30\%}$ παρατηρήθηκαν ορισμένες μικρές κοιλότητες, πιθανώς λόγω ατελούς ανάμιξης των συσσωματωμάτων καζεΐνης στη μήτρα LDPE. Η μη συνεκτική επιφανειακή μορφολογία του συγκεκριμένου δείγματος φαίνεται να ευθύνεται για τη μειωμένη φραγή στο οξυγόνο (3.797 ± 0.1184), όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Η μεμβράνη LDPE/$CS_{20\%}$ εμφάνισε τη βέλτιστη φραγή έναντι της υγρασίας, με τον συντελεστή διάχυσης υδρατμών (D_{wv}) να υπολογίζεται σε 1.774 ± 0.0788. Η περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών παρασκευής, καθώς και η διερεύνηση της δυνατότητας κλιμάκωσης της διαδικασίας, δύνανται να υποστηρίξουν την ευρύτερη βιομηχανική εφαρμογή των προτεινόμενων υλικών.

Δεδομένου ότι η μέθοδος εκβολής χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία συσκευασίας και λαμβάνοντας υπόψη τη διεξοδική μελέτη των βέλτιστων αναλογιών μίξης, δεν αναμένονται σημαντικά τεχνικά προβλήματα κατά τη μετάβαση σε βιομηχανική κλίμακα. Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συμβάλλουν ουσιαστικά στην ανάπτυξη νέων, φιλικών προς το περιβάλλον σύνθετων υλικών, με υψηλές μηχανικές και φραγές ιδιότητες και προοπτική εφαρμογής στη βιώσιμη συσκευασία τροφίμων, επιβεβαιώνοντας την αρχική ιδέα ότι είναι ικανά ώνα επιτελέσουν τον αρχικό στόχο τους ως μεμβράνες τροφίμων.

7.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η παρούσα εργασία απέδειξε ότι η αξιοποίηση των πρωτεϊνών του γάλακτος, και ειδικότερα της καζεΐνης, για την ανάπτυξη μεμβρανών κατάλληλων για εφαρμογές συσκευασίας είναι εφικτή, καθώς οι παραγόμενες μεμβράνες παρουσίασαν ικανοποιητικά φυσικοχημικά και μηχανικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, για την περαιτέρω τεκμηρίωση και βελτίωση των αποτελεσμάτων, προτείνονται ορισμένες κατευθύνσεις για μελλοντική έρευνα.

Αρχικά, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η διενέργεια in vivo μελετών που θα εξετάζουν τη συμπεριφορά των μεμβρανών σε πραγματικές συνθήκες χρήσης, δηλαδή σε συνδυασμό με συγκεκριμένα συσκευάσιμα προϊόντα (π.χ. τρόφιμα υψηλής υγρασίας ή λιπαρότητας). Μέσω τέτοιων μελετών θα μπορούσε να αξιολογηθεί η

αλληλεπίδραση των μεμβρανών με το προϊόν, η πιθανή μεταφορά ουσιών, καθώς και η επίδραση στη διατήρηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής του τροφίμου.

Επιπλέον, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της μακροπρόθεσμης σταθερότητας και ανθεκτικότητας των μεμβρανών. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η ακτινοβολία UV και ο μηχανικός καταπονησμός μπορούν να επηρεάσουν τη δομή και τις ιδιότητες των σύνθετων υλικών. Η εκτίμηση αυτών των παραμέτρων είναι καθοριστική για την αξιολόγηση της πρακτικής εφαρμογής των μεμβρανών σε συνθήκες πραγματικής χρήσης και αποθήκευσης.

Ένας ακόμη τομέας που αξίζει περαιτέρω διερεύνηση είναι η εκτίμηση των πιθανών ωφελειών για την ανθρώπινη υγεία που μπορεί να προσφέρουν τέτοιου είδους βιοβασισμένες μεμβράνες. Η καζεΐνη, ως φυσική πρωτεΐνη, ενδέχεται να συμβάλει στη μείωση της χρήσης τοξικών ή μη βιοαποδομήσιμων πολυμερών, γεγονός που θα μπορούσε να μειώσει τη συνολική έκθεση του ανθρώπου σε επιβλαβείς ουσίες μέσω της συσκευασίας.

Τέλος, μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση του κύκλου ζωής (Life Cycle Assessment, LCA) των παραγόμενων μεμβρανών θα μπορούσε να προσφέρει πολύτιμα δεδομένα σχετικά με το συνολικό τους περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Η ανάλυση αυτή θα συνέβαλε στη σύγκριση των βιοσυνθέτων με τις συμβατικές πετροχημικές μεμβράνες, αναδεικνύοντας τον βαθμό συμβολής τους στη μείωση των αποβλήτων, στην ενίσχυση της κυκλικής οικονομίας και στη βιώσιμη ανάπτυξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2023. *FAO dairy market review*. Rome: FAO.
2. Ohlan, R. (2014). *Globalization and dairy industry*. New Delhi, India: Studium Press (India) Pvt. Ltd.
3. https://globaldiaryplatform.com/development. *Driving development and self-reliant inclusive economies*, visited on 01/12/2024.
4. Jenkins, T. C., & McGuire, M. A. (2006). *Major advances in nutrition: Impact on milk composition*. Elsevier
5. Burke, L. M., Woolf, K., & Larson-Meyer, D. E. (2018). Assessment of nutrient status in athletes and the need for supplementation. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, 28*(2), 135–158. https://doi.org/10.1123/ijsnem.2017-0338.
6. Ventura, J. and Díaz, F., 2020. Evolution of the environmental impact of dairy production. *Journal of Dairy Science*, 103(8), pp.1–12. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17854
7. Eurostat, 2023. Milk production growth comes to a standstill in 2022. [online] European Commission. Available at: https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/w/ddn-20231120-3, visited on 14/09/2025.
8. Ramírez, C. A., Patel, M., & Blok, K. (2006). From fluid milk to milk powder: Energy use and energy efficiency in the European dairy industry. *Energy, 31*(12), 1984–2004. https://doi.org/10.1016/j.energy.2005.10.014
9. Burke, N., Zacharski, K. A., Southern, M., Hogan, P., Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2018). The Dairy Industry: Process, Monitoring, Standards, and Quality. In A. V. Díaz & R. M. García-Gimeno (Eds.), Descriptive Food Science (p. Ch. 1). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.80398.
10. Wheatley, A. (1990). *Anaerobic digestion: A waste treatment technology*. London: Elsevier Applied Science.
11. Thassitou, P. K., & Arvanitoyannis, I. S. (2001). Bioremediation: A novel approach to food waste management. *Trends in Food Science & Technology, 12*(5–6), 185–196. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00079-4.
12. Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R., & Lema, J. M. (2000). Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology, 74*(3), 231–239. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00020-8.
13. Asmani, Z., Sharma, M., Gupta, P., Karpichev, Y., Kumar, V., Raj, T., ... & Thakur, V. K. (2022). Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. *Bioresource Technology, 346*, 126606. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126606.
14. Harirchi, S., Ramezani, M., Bulkan, G., Yesilcimen Akbas, M., Pandey, A., Taherzadeh, M. J., & Sar, T. (2022). Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): A review. *Bioengineered, 13*(3), 6521–6557. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2036333.
15. Βαλτά, Α. Α. (2019). *Αξιοποίηση οικιακών διατροφικών απορριμμάτων και οργανικών αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας* [Διδακτορική διατριβή]. Αθήνα.
16. Μαθιουδάκης. (2022). *Ανάπτυξη και σύγκριση εναλλακτικών διεργασιών αξιοποίησης αποβλήτων τροφίμων* [Διδακτορική διατριβή]. Αθήνα.
17. Udourioh, G. A. (2024). *A review of the valorization of dairy industry wastes through thermochemical, biological, and integrated processes for value-added products.* Korean Journal for Food Science of Animal Resources.

18. Ahmad, T., Aadil, R. M., et al. (2019). *Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. Trends in Food Science & Technology, 88,* 361–372. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.025.
19. Slavov, A. K. (2017). *General characteristics and treatment possibilities of dairy wastewater—A review. Food Technology and Biotechnology, 55*(1), 14–28. https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4520.
20. Sar, T., Harirchi, S., Ramezani, M., Bulkan, G., Akbas, M. Y., Pandey, A., & Taherzadeh, M. J. (2022). *Potential utilization of dairy industries by-products and wastes through microbial processes: A critical review.* Science of the Total Environment, 810, 152253.
21. Γάλλου, Π. (2018). *Διαχείριση αποβλήτων σε βιομηχανίες γαλακτοκομικών και τυροκομικών προϊόντων.* Πάτρα.
22. Dyrset, N., Lystad, K. Q., & Levine, D. W. (1997). *Development of a fermentation process for production of a κ-carrageenase from Pseudomonas carrageenovora. Enzyme and Microbial Technology, 20*(6), 418–423.
23. Yonar, T., Sivrioğlu, Ö., & Özengin, N. (2018). *Physico-chemical treatment of dairy industry wastewaters: A review.* In *Technological approaches for novel applications in dairy processing.* IntechOpen.
24. Rosenwinkel, K. H., & Meyer, H. (1999). *Anaerobic treatment of slaughterhouse residues in municipal digesters. Water Science and Technology, 40*(1), 101–111.
25. Marangoni, C., Furigo, A. Jr., & de Aragão, G. M. F. (2002). *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Ralstonia eutropha in whey and inverted sugar with propionic acid feeding.* Process Biochemistry, 38(2), 137–141.
26. Krishna Prasad, S. and Karthikeyan, R., 2010. *Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by Bacillus megaterium SRKP-3. Bioresource Technology,* 101(2), pp.705–711.
27. Kothari, R., Pathak, V. V., Kumar, V., & Singh, D. P. (2012). *Experimental study for growth potential of unicellular alga Chlorella pyrenoidosa on dairy wastewater: An integrated approach for treatment and biofuel production. Bioresource Technology, 116,* 466–470.
28. Tomasula, P. M., et al. (2023). *Whey turned into biodegradable products.* All About Feed. Retrieved from https://www.allaboutfeed.net.
29. Singh, A. B., et al. (2024). *Environmental sustainability of milk production. Frontiers in Sustainability.*
30. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J. Jr., & Stryer, L. (2017). Βιοχημεία (μτφ. Η. Κουβέλας, Α. Αλέτρας, Γ. Παπαδόπουλος Κ., Δ. Δραΐνας). Πάτρα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. ISBN 978-960-524-495-8.
31. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Κεφάλαιο 2 *Δομή και λειτουργία πρωτεϊνών*, σελίδες 30-69.
32. O'Kennedy, B. T. (2011). 2—Caseins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), Handbook of Food Proteins (pp. 13– 29). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9780857093639.13.
33. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (2023). *Βιοχημεία* [Πανεπιστημιακές σημειώσεις].Λάρισα.
34. Καλαϊτζάκης, Δ., 2013. *Αμινοξέα – Πρωτεΐνες.* Σημειώσεις μαθήματος «Εισαγωγή στη Χημεία Τροφίμων», ακαδημαϊκό έτος 2012–2013.
35. White, R. R., & Gleason, C. B. (2023). Global contributions of milk to nutrient supplies and greenhouse gas emissions. Journal of Dairy Science, 106(5), 3287–3300. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22508.

36. Simona, P., et al. (2021). *Preparation and characterization of protein-based edible films for food packaging applications. Materials Today: Proceedings, 47*, 847–851. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.173.
37. Petrova, S. Y., Khlgatian, S. V., Emelyanova, O. Y., Pishulina, L. A., & Berzhets, V. M. (2022). *Structure and biological functions of milk caseins. International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive, 11*(2).
38. Ανυφαντάκης, Ε. (2004). *Τυροκομία: Χημεία, φυσικοχημεία, μικροβιολογία* (2η έκδ.). Εκδόσεις Σταμούλη. ISBN: 960-351-515-9.
39. Bhat, M. Y. (2016, September). *Casein proteins: Structural and functional aspects.*
40. Cazon, P., Velazquez, G., Ramirez, R., & Vazquez, M. (2017). *Milk protein-based edible films and coatings: A review. Food Hydrocolloids, 68*, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.001.
41. El-Bakry, M., & Mehta, B. M. (2024). *Casein: Types, applications and gastric digestion.* In *Casein: Structural properties, uses, health benefits and nutraceutical applications* (pp. 1–13). Elsevier.
42. Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: Characteristics and properties. International Food Research Journal, 15(3), 237–248.
43. Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2010). Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44*(4), 223–237. https://doi.org/10.1080/10408690490464276
44. Jancikova, S., Dordevic, D., Jamroz, E., Behalova, H., & Tremlova, B. (2020). Edible films and coatings—Sources, properties and applications: A review. *Foods, 9*(9), 1349. https://doi.org/10.3390/foods9091349.
45. Mohamed, S. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A. M. (2020). Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydrate Polymers, 238*, 116178. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178.
46. Simona, P., et al. (2021). Preparation and characterization of protein-based edible films for food packaging applications. *Materials Today: Proceedings, 47*, 847–851. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.173.
47. Cazon, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vazquez, M. (2017). Milk protein-based edible films and coatings: A review. *Food Hydrocolloids, 68*, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.001.
48. Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein-based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules, 109*, 1095–1107. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097.
49. Kong, X., Degraeve, P., & Pui, A. (2022). Protein-based biodegradable packaging materials: A review on recent advances and applications. *Food Packaging and Shelf Life, 33*, 100902. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100902.
50. Zhao, Y., Liu, J., Deng, L., Zhang, J., & Wang, H. (2021). Edible films and coatings from proteins: A review on formation, properties and applications. *Trends in Food Science & Technology, 112*, 163–174. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.015.
51. Arnon-Rips, H., & Poverenov, E. (2018). Improving food products' quality and storability by using layer-by-layer edible coatings. *Trends in Food Science & Technology, 75*, 81–92. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.007.
52. Babaei-Ghazvini, A.; Acharya, B.; Korber, D.R. Antimicrobial Biodegradable Food Packaging Based on Chitosan and Metal/Metal-Oxide Bio-Nanocomposites: A Review. Polymers 2021, 13, 2790.

53. Arnon-Rips, H., & Poverenov, E. (2018). Improving food products' quality and storability by using layer-by-layer edible coatings. *Trends in Food Science & Technology, 75*, 81–92. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.007.
54. Cazon, P., Velazquez, G., Ramírez, R., & Vázquez, M. (2017). Milk protein-based edible films and coatings: A review. *Food Hydrocolloids, 68*, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.001.
55. Kumar, S., Ye, F., Dobretsov, S., & Dutta, J. (2019). Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. *Applied Sciences, 9*(12), 2409. https://doi.org/10.3390/app9122409.
56. Slade, L., & Levine, H. (1991). Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 30*(2–3), 115–360. https://doi.org/10.1080/10408399109527543.
57. Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2002). Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films. *Carbohydrate Polymers, 48*(2), 179–190. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00225-3.
58. Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Micha-Screttas, M., & Steele, B. R. (2003). A comparative study on the structural characteristics and physicochemical properties of glucans from eight cereal sources. *Food Hydrocolloids, 17*(5), 693–712. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00095-1.
59. Kilburn, D., Claude, J., Vergelati, C., Wilson, R. H., & Doucet, J. (2004). Structural information from FTIR spectroscopy of oriented β-sheet poly(L-alanine) and poly(L-alanine)/poly(ethylene oxide) blends. *Biopolymers, 73*(2), 237–248. https://doi.org/10.1002/bip.10541.
60. Kilburn, D., Claude, J., Wilson, R. H., & Doucet, J. (2005). Protein secondary structure analysis from infrared spectroscopy: Correlation between solution and solid-state FTIR spectra of β-lactoglobulin. *Biopolymers, 78*(6), 268–276. https://doi.org/10.1002/bip.20276.
61. McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994a). Water vapor permeability properties of edible whey protein–lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 71*(3), 307–312. https://doi.org/10.1007/BF02540534.
62. Bunaciu, A. A., Udriştioiu, E. G., & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 45(4), 289–299. https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616.
63. Tomoda, B. T., Yassue-Cordeiro, P. H., Ernesto, J. V., Lopes, P. S., Péres, L. O., Da Silva, C. F., & De Moraes, M. A. (2020). Characterization of biopolymer membranes and films: Physicochemical, mechanical, barrier, and biological properties. In Biopolymer Membranes and Films (pp. 67–95). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818134-8.00003-1.
64. Bunaciu, A. A., Udriştioiu, E. G., & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 45(4), 289–299. https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616.
65. Verma, G. (2023). Characterization techniques. In Nanostructures (pp. 97–141). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-8200483.00011-5.
66. Bieberle-Hütter, A., Bronneberg, A., George, K., & Sanden, M. (2021). Operando Attenuated Total Reflection Fourier-transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy for water splitting. Journal of Physics D: Applied Physics, 54. https://doi.org/10.1088/1361-6463/abd435.
67. Tomoda, B. T., Yassue-Cordeiro, P. H., Ernesto, J. V., Lopes, P. S., Péres, L. O., Da Silva, C. F., & De Moraes, M. A. (2020). Characterization of biopolymer membranes and films: Physicochemical, mechanical, barrier, and biological properties. In Biopolymer Membranes and Films (pp. 67–95). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818134-8.00003-1.

68. Groenewoud, W. M. (2001). DYNAMIC MECHANICAL ANALYSIS. In Characterisation of Polymers by Thermal Analysis (pp. 94–122). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-044450604-7/50005-4.
69. Ebnesajjad, S. (2011). Surface and Material Characterization Techniques. In Handbook of Adhesives and Surface Preparation (pp. 31–48). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-4461-3.10004-5.
70. Parameshwaran, R., Sarı, A., Jalaiah, N., & Karunakaran, R. (2018). Applications of Thermal Analysis to the Study of Phase-Change Materials. In Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry (Vol. 6, pp. 519–572). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64062-8.00005-X.
71. Szynkowska, M. I. (2005). MICROSCOPY TECHNIQUES | Scanning Electron Microscopy. In Encyclopedia of Analytical Science (pp. 134–143). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00385-X.
72. Cai, Z., Li, F., Rong, M., Lin, L., Yao, Q., Huang, Y., Chen, X., & Wang, X. (2019). Introduction. In Novel Nanomaterials for Biomedical, Environmental and Energy Applications (pp. 1–36). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814497-8.00001-1.
73. De Assumpção Pereira-da-Silva, M., & Ferri, F. A. (2017). Scanning Electron Microscopy. In Nanocharacterization Techniques (pp. 1–35). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49778-7.00001-1.
74. Hanika, M., Langowski, H. -C., Moosheimer, U., & Peukert, W. (2003). Inorganic Layers on Polymeric Films – Influence of Defects and Morphology on Barrier Properties. Chemical Engineering & Technology, 26(5), 605–614. https://doi.org/10.1002/ceat.200390093.
75. Soltani, I., & Spontak, R. J. (2017). Nanotechnological strategies yielding high-barrier plastic food packaging. In Food Packaging (pp. 1–43). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804302-8.00001-7.
76. Giannakas, A. E., Salmas, C. E., Moschovas, D., Zaharioudakis, K., Georgopoulos, S., Asimakopoulos, G., Aktypis, A., Proestos, C., Karakassides, A., Avgeropoulos, A., Zafeiropoulos, N. E., & Nychas, G.-J. (2022). The Increase of Soft Cheese Shelf-Life Packaged with Edible Films Based on Novel Hybrid Nanostructures. Gels, 8(9), 539. https://doi.org/10.3390/gels8090539.
77. Khandelwal, S., Devi, N. R., Subramaniyan, M., & Pappu, S. (2023). Physicochemical characterization and therapeutic potential of ink from squid, Sepioteuthis lessoniana. 3 Biotech, 13(12), 418. https://doi.org/10.1007/s13205023-03830-6.
78. Moschovas, D., Karydis-Messinis, A., Triantafyllou, E., Kechagias, A., Baikousi, M., Leontiou, A., Giannakas, A. E., Salmas, C. E., & Avgeropoulos, A. (2025). Incorporation of LDPE with casein for the development of packaging materials with optimized properties. Polymers, 15(15), 3243. https://doi.org/10.3390/polym15153243.
79. Svedberg, T., Carpenter, L. M., & Carpenter, D. C. (1930). THE MOLECULAR WEIGHT OF CASEIN. I 1. Journal of the American Chemical Society, 52(1), 241–252. https://doi.org/10.1021/ja01364a036.
80. Tuckey, S. L., Ruehe, H. A., & Clark, G. L. (1938). An X-Ray Diffraction Analysis of Casein. Journal of Dairy Science, 21(12), 767–775. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(38)95644-9.
81. Clark, G. L., & Schaad, J. A. (1936). X-ray Diffraction Studies of Tendon and Intestinal Wall Collagen. Radiology, 27(3), 339–356. https://doi.org/10.1148/27.3.339.

82. Celli, G. B., Ravanfar, R., Kaliappan, S., Kapoor, R., & Abbaspourrad, A. (2018). Annatto-entrapped casein-chitosan complexes improve whey color quality after acid coagulation of milk. Food Chemistry, 255, 268–274. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.071.
83. Chakrapani, V., Behlol Ayaz, K., Vadivel, V. K., Veerappan, G., Anthony, S., & Veerappan, A. (2014). A facile route to synthesize casein capped copper nanoparticles: An effective antibacterial agent and selective colorimetric sensor for mercury and tryptophan. RSC Adv., 4. https://doi.org/10.1039/C4RA03086A.
84. Abu Diak, O., Bani-Jaber, A., Amro, B., Jones, D., & Andrews, G. P. (2007). The Manufacture and Characterization of Casein Films as Novel Tablet Coatings. Food and Bioproducts Processing, 85(3), 284–290. https://doi.org/10.1205/fbp07030.
85. Socrates, G. (2001). Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts. 3rd ed (3rd ed.). John Wiley and Sons, LTD. https://doi.org/10.1021/ja0153520.
86. Chevalier, E., Assezat, G., Prochazka, F., & Oulahal, N. (2018). Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration. Food Hydrocolloids, 75, 182–191. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028