

Софийски Университет “Св. Климент Охридски”
Факултет по Химия и Фармация
Катедра по Инженерна химия и Фармацевтично инженерство

Дилек Фахретин Газолу-Русанова

**Получаване и стабилизиране на емулсии
с модифицирани природни емулгатори**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация, представена за присъждане на образователната и
научна степен “Доктор”

Професионално направление
4.2-Химически науки (Физикохимия – Макрокинетика)

Научни ръководители:
проф. д-р Славка Чолакова
проф. дхн Николай Денков

София, 2021

Дисертационният труд съдържа 120 страници, 56 фигури и илюстрации, 28 уравнения и 11 таблици. Цитирани са 137 литературни източника.

Номерата на разделите, фигурите, уравненията и таблиците в автореферата съвпадат с тези в дисертацията. Списъкът с цитираните литературни източници може да се намери в дисертацията.

Съдържание на автореферата

ГЛАВА I. Увод и цели на изследването	1
ГЛАВА II. Материали и методи	6
ГЛАВА III. Сравнение на адсорбционните свойства и емулгиращите способности на модифициран и немодифициран яйчен жълтък	11
1. Увод и цел на изследването.....	11
2. Влияние на ензимното модифициране върху състава на яйчния жълтък.....	12
3. Електрофоретични и реологични свойства на разтворите на EY и MEY.....	12
4. Влияние на ензимната модификация върху междуфазовото напрежение и повърхностния модул.....	12
5. Поведение на тънки течни филми.....	13
6. Ефект от добавянето на лизофосфатидилхолин и олеинова киселина върху повърхностните свойства на EY.....	16
7. Сравнение на емулгиращата способност на немодифициран и ензимно модифициран яйчен жълтък.....	20
8. Основни заключения.....	20
ГЛАВА IV. Получаване на емулсии, стабилизирани с модифициран яйчен жълтък при ниска обемна част на маслото	22
2. Фактори влияещи върху размера на емулсионните капки.....	22
3. Сравнение на експерименталните резултати с теоретични модели.....	24
4. Основни заключения.....	27
ГЛАВА V. Получаване на наноемулсии с биополимери чрез ротор-статор хомогенизатор	28
1. Увод и цел на изследването.....	28
2. Обемни и междуфазови свойства на изследваните водни фази и масла.....	28
3. Получаване на наноемулсии на TGO-36 с ротор-статор хомогенизатор.....	29
4. Влияние на вискозитета на маслената фаза върху размера на капките.....	31
5. Влияние на масовата част на маслото върху размера на капките в емулсии, стабилизирани с MS.....	32
6. Интерпретация на получените данни и описание с теоретични модели.....	33
7. Основни заключения.....	35
Основни приноси от дисертацията	36
Списък на публикациите по дисертацията и докладвания на научни форуми	37

ГЛАВА I. Увод и цели на изследването.

Обект на изследване на настоящата дисертация са термодинамично нестабилните макро- и наноемулсии. Изследваните емулсии са от типа масло-във-вода (т. нар. прави емулсии, при които неполярната фаза е диспериграна под формата на капки в полярна непрекъсната среда) с обемна част Φ в диапазона от 0.05 до 0.75.

Основните два процеса, които протичат при емулгиране на капките, са разкъсване на капките и коалесценцията между тях. Процесът на разкъсване е свързан с получаването на две или повече капки от една изходна капка в резултат на нейната деформация под действието на силите, които действат от страна на непрекъсната среда върху капката. Процесът на коалесценция е свързан със сливането на две или повече капки в една по-голяма, като този процес зависи както от концентрацията на емулгатора в системата, така и от вискозитета на непрекъсната среда (Walstra 1983, 2005; Tcholakova 2004). В по-голяма част от изследванията в настоящия дисертационен труд използвахме високи концентрации на емулгатора, поради което размерът на капките в емулсиите се определя основно от процеса на тяхното разкъсване.

При отсъствие на коалесценция разпределението на капките по размери се определя от отношението на силите, които действат от страна на непрекъсната среда върху капката и се стремят да я деформират и разкъсат и от силите, които се съпротивляват на тази деформация. Силите, които действат от страна на непрекъснатата среда могат да бъдат инерчни или вискозни. Когато движението на непрекъсната среда се осъществява при големи числа на Рейнолдс, движението е турбулентно, но дали разкъсването на капките ще се осъществи под действието на инерчните сили, които са породени от флукуации в скоростта на движение на средата (Колмогоров 1949; Hinze 1955; Walstra 1983, 2005) или от вискозните сили зависи от това как се отнася размерът на разкъсваната капка спрямо размера на най-малките турбулентни вихри (Колмогоров 1949; Hinze 1955; Walstra 1983, 2005). Ако капката е с размер по-голям от размера на най-малките турбулентни вихри, ($d > \lambda_0$), тогава при турбулентно движение на непрекъсната среда, разкъсването на капката се осъществява под въздействието на инерчните сили в така наречената инерчна подобласт на турбулентното движение. В литературата е показано, че когато разкъсването се извършва в тази подобласт, за да се определи размерът на капките, d_D , които не могат да се разкъсат при дадените хидродинамични условия, трябва да се приравни големината на динамичното налягане, $\langle \Delta P_T(d) \rangle$, породено от флукуациите в скоростта на турбулентно движещата се непрекъсната среда със сумата от капилярното налягане, $P_C = 4\sigma/d$ и вискозното напрежение вътре в капка, τ_D , които се съпротивляват на движението на течността вътре в капката и препятстват нейната деформация (Davies 1985; Calabrese и съавтори 1986а, б; Wang & Calabrese 1986 и Berkman & Calabrese 1988):

$$d_D = A_1 \left(1 + A_2 \frac{\eta_D \varepsilon^{1/3} d_D^{1/3}}{\sigma} \right)^{3/5} \sigma^{3/5} \rho_C^{-3/5} \varepsilon^{-2/5} \quad (1.2)$$

където $A_{1,2}$ са константи, които отчитат съответно относителните приноси на капилярното налягане и на вискозната дисипация вътре в разкъсващата се капка. Големината на τ_D за капка с диаметър d е оценена при допускане за движение на нютонов флуид. Вискозитетът на непрекъснатата фаза е от второстепенно значение при този режим, защото силите деформиращи капката имат инерчен (а не вискозен) произход. В работата на Vankova и съавтори (2007) е показано, че уравнение (1.2) с константи $A_1 = 0.86$ и $A_2 = 0.37$ описва много добре експериментално определените максимални размери по обем, d_{V95} , за голям набор от емулсии.

Ако размерът на капката е по-малък от размера на най-малките турбулентни вихри, $d < \lambda_0$, въпреки че движението на непрекъснатата среда е турбулентно, разкъсването на капката се осъществява под въздействието на вискозните сили, които са доминиращи при тези характерни размери, тъй като локалното число на Рейнолдс е по-малко от 1 (Колмогоров 1949; Hinze 1955; Walstra 1983, 2005) в така наречената вискозна подобласт на турбулентното движение. За определяне на максималния диаметър на капките, d_{KV} , които няма да се разкъсат във вискозната подобласт, се използва приравняване на капилярното налягане и срязващото напрежение, действащо от страна на непрекъснатата среда върху повърхността на капката $\tau_C \sim P_C(d)$, което води до следния израз за максималния диаметър, d_{KV} , във вискозен режим (Cristini и съавтори, 2003; Hinze, 1955; Kolmogorov, 1949):

$$d_{KV} = A_3 \varepsilon^{-1/2} \eta_C^{-1/2} \rho_C^{-1/2} \sigma \quad (1.4)$$

В горното уравнение A_3 е константата, която отчита факта, че капките с по-висок вискозитет ще се разкъсат по-трудно, поради което тя зависи от съотношението на вискозитетите на двете фази, η_D / η_C . Както се вижда от уравнение (1.4), вискозитетът на непрекъснатата фаза играе съществена роля за ефективното разкъсване на капките при вискозния режим. Установено е, че преход от инерчен към вискозен турбулентен режим на емулгиране може да се осъществи при умерено повишаване на вискозитета на водната фаза ($\eta_C > 3$ mPa.s за изследваните системи) и/или чрез увеличаване на обемната част на маслото, $\Phi > 0.6$ (Vankova и съавтори 2007, Tcholakova и съавтори 2007, 2011).

Съставът на водната фаза влияе на междуфазовото напрежение, вискозитета и плътността на непрекъснатата фаза, които играят ключова роля за разкъсването на капките по време на емулгиране. Повърхностно-активните вещества, които се използват в процеса на получаване на емулсии, се наричат емулгатори.

В настоящата дисертация за получаване на емулсиите използвахме природни полимерни емулгатори и протеини, като за емулгирането в нютонови среди използвахме ензимно модифициран яйчен жълтък, MEY, докато за емулгирането в ненютонови среди използвахме дисперсии на арабска гума, GA, и модифицирано нишесте, MS. И трите емулгатора намират широко приложение в хранителната промишленост. Проведохме експерименти също и с нискомолекулния катионен ПАВ цетилтриметиламониев бромид (СТАВ) и синтетичния полимер поливинил алкохол (PVA). В следващите няколко абзаца е дадена по-подробна информация за особеностите на трите основни природни емулгатора – MEY, GA и MS.

Яйчният жълтък (EY) е широко използван за получаване на хранителни емулсии, тъй като може да действа като ефективен емулгатор, коагулиращ и желиращ агент. EY съдържа приблизително 50% вода, 35% липиди и 15% протеини (Mine, 1998). Това е сложна система, както по състав, така и по структура и съдържа голям брой неразтворими полидисперсни частици (гранули), които са диспергирани в бистра жълта течност (плазма). Изследвани са различни методи за модифициране на яйчния жълтък с цел подобряване на неговите характеристики като емулгатор. Установено е, че много ефективна модификация се постига чрез третиране на яйчния жълтък с ензима фосфолипаза A₂ (PLA₂). Тази липаза къса връзката при ациловата група на позиция 2 в молекулите на фосфолипидите и води до тяхната хидролиза и получаване на лизофосфолипиди (Daimig & Kulozik, 2008; Dutilh & Groger, 1981) и мастна киселина. След третиране с PLA₂ полученият модифициран яйчен жълтък (MEY) не желира дори при силна термична обработка, тоест става устойчив на нагряване. Установено е, че ензимното действие причинява структурни промени в яйчния жълтък. Daimig & Kulozik (2008) откриват, че разтворимостта на протеини в яйчния жълтък значително нарастване след ензимна модификация, особено на протеините, които се съдържат в гранулите. За да обяснят получените от тях резултати, авторите предлагат хипотезата, че ензимното действие води до разрушаване на гранулите. Експериментално е установено, че средният размер на гранулите в MEY е значително по-малък в сравнение с размера на гранулите в натуралния жълтък (от 2 µm намалява на 0.9 µm).

В изследванията в настоящата дисертация използвахме ензимно модифициран яйчен жълтък, тъй като той осигурява много добра стабилизация на капките срещу коалесценция по време на емулгиране и нютоново поведение на непрекъснатата среда по време на емулгиране. Детайлно сравнение на адсорбиращата способност на немодифицирания яйчен жълтък и на ензимно модифицирания при концентрации, които се използват при направата на майонези е една от целите на настоящия дисертационен труд и резултатите от това изследване са представени в Глава 3.

Арабската гума (GA) се извлича предимно от акациев дървета, *Acacia Senegal* и *Acacia Seyal* (Montenegro, Boiero, Valle & Borsarelli, 2012) и има сложна химична

структура. Най-общо молекулите в екстракта от GA се състоят от хидрофилни полизахаридни групи (1,3-свързани α -галактопиранозни мономери и 1,6-свързани галактопиранозни странични вериги), които допринасят за около 88% от общата маса на GA. Те са прикрепени към полипептиден скелет – арабиногалактанов протеинов комплекс и гликопротеин (Al-Assaf, Phillips & Williams, 2005; Dickinson, 1992, 2003; Garti & Leser, 2001; Idris, Williams & Phillips, 1998; Islam, Phillips, Sljivo, Snowden & Williams, 1997; Randall, Phillips & Williams, 1988; Renard, Lavenant-Gourgeon, Ralet & Sanchez, 2006). Арабиногалактановият протеинов комплекс е около 11 тегл.%, като около 10-12 тегл.% от него представлява протеин. В състава на GA влиза и около 1 тегл.% гликопротеин. Тези два протеина, които са общо около 2.4 тегл.% от общата маса на GA, се считат за повърхностно активната част в гореспоменатата структура. Както става ясно, съдържанието на протеини е много ниско спрямо общата маса, поради което GA има сравнително нисък афинитет да се адсорбира на междуфазовата граница масло-вода в сравнение с повечето други повърхностно-активни биополимери. Следователно, за образуване на стабилни емулсии с малък размер на капките е необходимо да се работи при сравнително високи концентрации на този емулгатор. Високата концентрация на GA обаче често води до нежелана флокулация вследствие на деплиционни сили на привличане между съседни капки (Chanamai & McClements, 2001).

Природните нишестета имат слаба повърхностна активност поради хидрофилната си природа. За да се увеличи адсорбцията им на междуфазовата граница масло-вода, натуралните нишестета се подлагат на хидрофобна модификация. Една от най-често използваните модификации е добавянето на октенил сукцинат (Chanamai & McClements, 2002). Тази хидрофобна група закрепва молекулите на нишестето към повърхността на маслените капки, докато хидрофилните вериги на нишестето се изпъват във водната фаза и предпазват капките от флокулация чрез стерично отблъскване. Подобно на GA, модифицираното нишесте (MS) има сравнително ниска повърхностна активност в сравнение с конвенционалните ПАВ, но често се адсорбира по-бързо от GA (Erni и съавтори, 2007). Тази по-бърза адсорбция обуславя по-добрата емулгираща способност на MS и спомага за образуването на по-малки капки (Chanamai & McClements, 2002).

Цели, задачи и структура на дисертацията

Основната цел на настоящия дисертационен труд е да се изяснят факторите, които влияят върху процеса на емулгиране, когато се използват разтвори на природни емулгатори. За постигане на тази цел бяха формулирани следните конкретни задачи:

- (1) Детайлно сравнение на адсорбиращите и стабилизиращите способности на разтворите на немодифициран яйчен жълтък, EY, и модифициран яйчен жълтък, MEY, и разкриване на причините за наблюдаваните разлики между тях.

- (2) Установяване влиянието на вискозитета, хидродинамичните условия при емулгиране и междуфазовото напрежение върху размера на капките за емулсии, получени от разтвори на MEY.
- (3) Установяване условията за получаване на стабилни наноемулсии в разтвори на природните емулгатори модифицирано нишесте и арабска гума чрез ротор-статор хомогенизатор.

Дисертацията е структурирана по следния начин:

В Глава 2 са описани използваните материали и експериментални методи.

В Глава 3 са представени експерименталните резултати за изясняване на приликите и разликите в поведението на адсорбционните слоеве от природен (EY) и ензимно модифициран яйчен жълтък (MEY) на граница масло-вода.

Глава 4 е посветена на изследване на влиянието на изучаваните фактори върху средния и максималния размер на капките в емулсии, получени при емулгиране в нютонови среди.

В Глава 5 е представен подход за получаване на стабилни наноемулсии с размери на капките в диапазона между 100 и 500 nm, с помощта на ротор-статор хомогенизатор. При този подход се използват вискозни полимерни разтвори, като са сравнени емулгиращите свойства на Арабска гума (GA) и модифицирано нишесте (MS).

Основните резултати и заключения от всяко конкретно изследване са сумирани в края на съответната глава от дисертацията. Основните приноси са обобщени в края на дисертацията.

ГЛАВА II. Материали и методи.

1. Материали и процедури за приготвяне на разтворите.

Емулгатори. Основните емулгатори, използвани в проведените изследвания, са немодифициран яйчен жълтък (EY); ензимно модифициран яйчен жълтък (MEY), които са продукти на Bouwhuis Enthoven (Raalte, Холандия) и съдържат 8% натриев хлорид, като се съхраняват при 4 °C; Поливинил алкохол 8-88 (PVA, полимер, $\geq 95\%$, Fluka); цетилтриметил амониев бромид (СТАВ, нискомолекулен катионен ПАВ, $\geq 99.0\%$, BDH Chemicals Ltd.); модифицирано нишесте (MS, полимер, Starch sodium octenyl succinate, EmCap™ Starches, Cargill™) и Арабска гума (GA, полимер, TIC Pretested® GumArabic Spray Dry Powder, TIC Gums).

Масла. За характеризиране на повърхностните свойства на EY и MEY (Глава 3) използвахме соево масло (SBO, от магазин за хранителни стоки), пречистено от полярни замърсители чрез многократно преминаване през хроматографска колона, пълна с адсорбент Florisil. Емулсиите с висока обемна част, представени на края на Глава 3, приготвихме със слънчогледово масло (SFO, от магазина за хранителни стоки).

Като дисперсна фаза в емулсиите, получени при емулгиране в нютонови среди (Глава 4) използвахме няколко масла с различен вискозитет при 25 °C: слънчогледово масло (SFO, от магазина за хранителни стоки) с $\eta_D = 54$ mPa.s; хексадекан (C16, Sigma-Aldrich) с $\eta_D = 3$ mPa.s; Heavy минерално масло (HO, Sigma-Aldrich) с $\eta_D = 132$ mPa.s и Light минерално масло (LO, Sigma-Aldrich) с $\eta_D = 25$ mPa.s. За емулгирането в ненютонови среди (Глава 5) използвахме два вида триглицеридни масла (TGO) с различен вискозитет – TGO-36 с вискозитет 36 mPa.s при 30 °C и TGO-19 с вискозитет съответно 19 mPa.s при 30 °C. При повишаването на температурата от 30 до 65 °C (диапазон на изменение на температурата при емулгиране) вискозитетът на маслата намалява приблизително двукратно. Всички изследвани масла имат нютоново поведение (вискозитетът на маслото не зависи от скоростта на деформация) в диапазона от скорости на деформация $1-500\text{ s}^{-1}$, при който се извършват измерванията на вискозитетите.

Други вещества в разтворите на емулгаторите. Към разтворите на EY и MEY добавяхме натриев хлорид ($\geq 99.8\%$ активно вещество, Sigma), захар (от магазина за хранителни стоки) и динатриев етилендиамин тетраацетат дихидрат (EDTA, $\geq 99.0\%$ активно вещество, Sigma) в количества, типични за майонезен тип сосове. Използвахме още 1-палмитоил-2-хидрокси-SN-глицеро-3-фосфохолин (лизо-фосфатидилхолин, LPC, 99,8% активно вещество, NOF corporation) и олеинова киселина (OAc, 85% активно вещество, Токуо Kasei Кogyo), които добавихме в разтвора на немодифициран жълтък. Изследваните концентрации са 0.8 тегл.% LPC (0.485 mmol) и 0.45 тегл.% OAc (0.485 mmol), съответстващи на 64% трансформация на фосфолипида (1-палмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин) до LPC, както и 1 тегл.% LPC (0.604 mmol) и 0.57 тегл.%

ОАс (0.604 mmol), съответстващи на 80% трансформация на фосфолипида. При част от експериментите, рН на изследваните разтвори на ЕУ и МЕУ понижихме до 3.8 чрез добавяне на разтвор на 12 тегл.% оцетна киселина (изпратен от Юниливър).

За повишаване на вискозитета на разтворите използвахме глицерол (99.5% активно вещество; продукт на Теосот, България).

За осигуряване на микробиологична стабилност на получените емулсии в Глава 5 към разтворите на модифицирано нишесте, MS, и Арабска гума, GA, добавяхме натриев бензоат (Sigma) и лимонена киселина (Sigma), като фиксирахме тегловното отношение бензоат/емулгатор и лимонена киселина/емулгатор съответно на 7.1×10^{-3} и 1.1×10^{-3} .

Приготвяне на разтворите. Използваните немодифициран и ензимно модифициран яйчни жълтъци са водни суспензии, които разреждахме с дейонизирана вода и добавяхме необходимите допълнителни компоненти като захар, натриев хлорид и EDTA. Приготвянето на разтворите на GA и MS е по-специфично, понеже включва етап на хидратация. След хомогенизиране на сместа от емулгатор, консерванти и вода, получената водна фаза се прехвърля във водна баня, настроена на определена температура спрямо използвания емулгатор. Температурата и периодът на хидратация на MS е 5 минути на 60 °C, докато за GA е 1 час на 50 °C. След етапа на хидратация разтворът на MS се използва, докато е още топъл, а разтворът на GA се използва след като се изчака да се охлади до 35 °C. Всички разтвори на емулгатори приготвихме с дейонизирана вода, пречистена чрез системата Milli-Q Organex (Millipore, САЩ).

2. Методи и процедури за получаване на емулсиите

2.1. Емулгиране в разтвори на яйчни жълтъци. Процедурата по приготвянето на емулсии в нютонови непрекъснати среди, описани в Глава 4 от дисертацията, включва два етапа. Първият етап е образуването на груба емулсия чрез използване на планетарен миксер (Kenwood Chef Premier КМС 560; 1000 W). Във втория етап използвахме апарата ИКА MagicLab, който беше оборудван с UTL модул с генератор 4М. Грубата емулсия прехвърляхме във фунията на хомогенизатора и я прекарвахме 5 пъти през хомогенизиращия елемент при скорости на ротора 5000, 10 000 и 15 000 rpm (об./мин.). Самият хомогенизатор MagicLab свързвахме към помпа (ISMATEC; MCP-CPF Process IP65; глава на помпа - FM1212 / QP.Q2.CSC / 9004), работеща при постоянна скорост 300 rpm, за да се улесни преминаването на емулсията. Използваният тип ротор (генератор 4М) има сложна геометрия, като размерите на процепа, където се развиват най-високите скорости на деформация са: 15 mm радиус и 200 μm ширина на процепа. Проби за анализ на разпределение на капките по размер вземахме след 5 преминавания на емулсията през UTL. При тази серия от експерименти фиксирахме концентрацията на маслото в крайната емулсия на 5 тегл.%.

Гореописаната процедура използвахме и за приготвяне на емулсии на ЕУ и МЕУ, представени в края на Глава 3 на дисертацията. При тези експерименти фиксирахме съотношение жълтък/масло на около 1:3. Концентрацията на SFO варирахме от 60 до 77.5 тегл.%. Емулсиите приготвихме след 1 и 5 преминавания през UTL при скорости на ротора 5000 и 10000 rpm.

2.2. Емулгиране в разтвори на биополимери. При втората голяма серия от експерименти за емулгиране в разтвори на биополимери, приготвихме грубата емулсия като разбърквахме с лъжица (на ръка). Същинското емулгиране на получената груба емулсия осъществихме с апарат IKA MagicLAB, оборудван с UTL модул с генератор 6F или с хомогенизатор под високо налягане (HPH, GEA Niro Soavi PandaPLUS 2000). MagicLab отново свързахме към помпа, за да улесним преминаването на емулсията през хомогенизатора. Реализирахме по 3 преминавания на емулсиите през хомогенизаторите. При емулгиране с UTL варирахме скоростта на ротора от 15 000 rpm до 25 000 rpm, а скоростта на помпата от 300 до 900 rpm (в зависимост от вискозитет на емулсията, скорост на ротора, повишаване на температурата). Налягането в HPH беше фиксирано на 5000 psi (34.47 MPa). Генератор 6F към UTL има подобна геометрия като генератор 4M, но с три концентрични процепа, вместо с два. Проведохме две основни серии експерименти с UTL – емулсии с фиксирана на 17.9 тегл.% концентрация на масло и емулсии, при които концентрацията на масло варирахме между 16 и 25 тегл.%. Всички емулсии, приготвени с HPH, са с фиксирано съотношение емулгатор-масло: концентрацията на масло в емулсиите е фиксирана на 10 тегл.% , а концентрацията на емулгатора във водната фаза е 15.6 тегл.%.

3. Методи за определяне на размера на емулсионните капки. В зависимост от размерите на капките използвахме два метода за характеризиране на разпределението на капките по размер в получените емулсии. При микронни размери на капките (по-големи от 1 μm) използвахме оптична микроскопия. Разредена проба от всяка емулсия наблюдавахме в преминала светлина с помощта на микроскопа AxioPlan (Zeiss, Германия), оборудван с обектив Epiplan, 50x и свързан CCD камера и видеорекодер. Размерът на капките в наноемулсиите, получени след емулгиране в ненютонови среди (Глава 5) определихме по метода на динамично разсейване на светлината (DLS). Измерванията проведохме на апарат Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) при температура 25 °C, ъгъл на разсейване 173° и 633 nm дължина на вълна на лазера.

4. Определяне на реологичните свойства на изследваните разтвори, маслени фази и емулсии. Използвахме три различни метода за определяне на реологичните свойства на изследваните водни разтвори, масла и получени емулсии. И при трите метода пробите бяха оставени да се термостатират за известно време при определена температура.

За да измерим вискозитета на проби с $\eta < 2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, използвахме капиларен вискозиметър. Вискозитетът на проби с η от 2 до 5 mPa.s измерихме с вискозиметър Brookfield DV II Pro с приставка S00. Реологичните свойства на всички емулсии, масла и на водни фази с $\eta > 5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ определихме посредством ротационен реометър Bohlin Gemini (Malvern Instruments, UK). Използвахме геометрия конус-пластина с диаметър на конуса 60 mm и ъгъл 2° за измерванията с масла и водни фази и с диаметър на конуса 40 mm и ъгъл 4° при измерванията с емулсии. Реологичните тестове провеждахме при срязваща деформация, като скоростта на деформация се увеличава постепенно в логаритмична скала от 0.2 до 1000 s^{-1} (500 s^{-1} за някои системи). Срязващото напрежение и вискозитетът измервахме като функция на скоростта на деформация.

5. Измерване на междуфазово напрежение. Междуфазовото напрежение на граница масло-вода, σ_{ow} , определихме по метода на анализ на формата на капката. За целта използвахме апарата DSA100m (Krüss GmbH, Хамбург, Германия), оборудван с термостатираща клетка, осигуряваща много добър контрол на температурата по време на измерването $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$. При този метод профилът на капка от разтвор на емулгатор в обемна маслена фаза (висяща капка) се описва чрез уравнението на Лаплас и σ_{ow} се определя като свободен параметър от най-доброто напасване. Масовата плътност на изследваните водните разтвори и на маслата измерихме с DMA35 (Anton Paar, Австрия) при съответната температура $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, при точност на измерването $\pm 0.001 \text{ g/cm}^3$.

6. Измерване на повърхностен модул. Повърхностният дилатационен модул измерихме с DSA100m, оборудван с модул за осцилираща капка (ODM модул DS3260 на Krüss GmbH). При този метод се прилага синусоидална деформация върху висяща капка и се измерват резултатните промени в площта и междуфазовото напрежение с помощта на анализ на формата на капката. Общият повърхностен дилатационен модул, G_s , както и модулите на съхранение и на загуби, G_{st} и G_{loss} , се определят по процедурата, описана в работите на Alexandrov и съавтори (2009) и Russev и съавтори (2008). Експериментите, представени в настоящата дисертация, проведохме при амплитуди на деформация между 1 и 5 % и при периоди на осцилациите 2, 5 и 10 s. Осцилиращата деформация прилагвахме 5 минути след образуването на капката.

7. Наблюдение на тънки течни филми в капиларна клетка. Тънки течни филми с диаметър от порядъка на милиметър образувахме и наблюдавахме в отразена светлина в капиларна клетка по метода на Scheludko (1967) с помощта на оптичен микроскоп AxioPlan (Zeiss, Германия), оборудван с обектив Zeiss Epiplan 20x/ 0.40.

8. Определяне на среден размер и електрофоретичната мобилност на агрегатите в разтвори на яйчен жълтък. ζ -потенциалът и размерът на агрегатите във водния разтвор на 0.1 тегл.% EY и MEY, в присъствието на 5 mM NaCl, измерихме чрез Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Изоелектричните точки (IEP) на протеините в

изследваните яйчни жълтъци също бяха определени чрез измерване на ζ -потенциала на водните разтвори от 0.1 тегл.% ЕУ и МЕУ при различни стойности на рН, достигнати с добавяне на оцетна киселина.

9. Химичен анализ на състава на ЕУ и МЕУ. За определяне на протеиновия състав на изследваните жълтъци използвахме стандартен протокол за SDS-PAGE. Идентифицирането на получените протеинови ивици беше извършено с помощта на молекулното тегло на стандарти и литературни данни, предоставени от Guilmineau и съавтори 2005 и Daimer & Kulozik 2010. Липидният профил на изследваните яйчни жълтъци определихме чрез газова хроматография (GC). За да се опрости анализът и неговата интерпретация, жълтъците първо се фракционират на фракции богати на полярни липиди и фракции богати на неполярни липиди чрез модифициране на процедурата от Juneja (1997).

ГЛАВА III. Сравнение на адсорбционните свойства и емулгиращите способности на модифициран и немодифициран яйчен жълтък

1. Увод и цел на изследването.

По-голямата част от проучванията, свързани с междуфазовите свойства на яйчния жълтък, включват измервания на междуфазовото напрежение, определяне на разтворимостта на протеините и количество адсорбирани протеините на повърхността, както и идентифициране на протеините, адсорбирани на границата масло-вода при различни условия – концентрация на протеин, йонна сила и рН (Anton, Beaumal & Gandemer, 2000; Anton & Gandemer, 1997; Daimer & Kulozik, 2008; Daimer & Kulozik, 2010; Le Denmat, Anton & Beaumal, 2000). Повечето цитирани автори почти не разглеждат ролята на лизофосфолипидите върху повърхностните свойства на модифицирания яйчен жълтък и се фокусират върху ролята на протеините.

Сравнението на двата вида яйчен жълтък в работата на Mel'nikov (2002) показва, че междуфазовото напрежение на граница разтвор на ЕУ-масло е по-ниско в сравнение с границата разтвор на МЕУ-масло. В работата на Mel'nikov (2002) са направени следните заключения за свойствата на междуфазовата граница разтвор на МЕУ-масло: (1) междуфазовото напрежение е по-малко чувствително към изменения на рН; (2) повърхностният дилатационен модул е по-нисък и (3) относителният вискозен принос в този модул е по-висок в сравнение с повърхностните свойства на немодифицирания жълтък. Mel'nikov (2002) представя хипотезата, че е по-вероятно лизофосфолипидите да се адсорбират предпочетено на междуфазовата граница и съответно ролята на протеините върху повърхностните свойства на МЕУ да е второстепенно, но не са представени достатъчно убедителни резултати за доказване на тази хипотеза.

Tran Le и съавтори (2007) показват, че агрегацията на млечни протеини при нагриване се потиска в присъствието на лизофосфолипиди, поради взаимодействията им с протеините. Установено е, че лизофосфолипидите стабилизират разгънатото състояние на денатурираните суроватъчни протеини и допълнително свеждат до минимум тяхната агрегацията и взаимодействието им с казеиновите мицели. Подобен ефект се наблюдава и при използване на хидрофилни нискомолекулни повърхностно-активни вещества (Tran Le и съавтори, 2011). Lilbaek и съавтори (2007) изучават повърхностните свойства на млякото и суроватката след ензимна хидролиза на млечните фосфолипиди и наблюдават преход от повърхностни свойства, доминирани от протеини към такива, доминирани от нискомолекулни ПАВ.

Повечето от изследванията, обсъдени дотук, се извършват с опростени системи, като разтвори на яйчен жълтък с ниски концентрации и единични междуфазови граници масло-вода. Изследването на свойствата на ЕУ и МЕУ при условия, по-близки до хранителните емулсии, би било много полезно, за да се изясни дали резултатите от моделните експерименти могат да послужат за обяснение на свойствата на емулсиите.

Основната цел на изследването в тази глава на дисертацията е да се сравнят систематично свойствата на адсорбционните слоеве, образувани от разтвори на немодифициран и ензимно модифициран яйчен жълтък на междуфазовата граница масло-вода. По-конкретно, изследвахме ролята на реакционните продукти от ензимната модификация (лизофосфолипиди и олеинова киселина) върху повърхностните свойства при условия, наподобяващи тези в хранителните емулсии.

2. Влияние на ензимното модифициране върху състава на яйчния жълтък.

Резултатите от електрофоретичния анализ на протеините в ЕУ и МЕУ показаха, че протеиновият състав на двата жълтъка е еднакъв. Резултатите от анализа на липидите в ЕУ и МЕУ с GC показаха, че се наблюдават някои значителни разлики в съдържание на полярни липиди в двата вида жълтък: ЕУ съдържа значително количество фосфолипиди и много малко количество мастни киселини, докато МЕУ съдържа голямо количество олеинова киселина и много по-малко фосфолипиди. Тези разлики отразяват ефекта от ензимната модификация, по време на която фосфолипидите се хидролизират (частично) до лизофосфолипиди и мастни киселини.

3. Електрофоретични и реологични свойства на разтворите на ЕУ и МЕУ.

Не наблюдавахме значителна разлика между реологичните свойства на изходните (неразредени) разтвори на ЕУ и МЕУ при натуралното им рН (и двата разтвора имат нютонново поведение). Резултатите от измерванията с DLS показват, че разреждането на тези разтвори причинява значителни структурни промени и разрушаване на агрегати в МЕУ. Разтворът на ЕУ е със значително по-висок вискозитет и проявява ненютонново поведение при киселинно рН. Микроскопските наблюдения в преминала светлина разкриват наличието на големи агрегати в разтворите на двата яйчни жълтъка при рН 3.8, което би могло да обясни значителното увеличаване на вискозитета на разтвора ЕУ, но тези агрегати не са оказали значително влияние върху реологичното поведение на разтвора на МЕУ.

4. Влияние на ензимната модификация върху междуфазовото напрежение и повърхностния модул.

Наблюдавахме по-бърза адсорбция на междуфазовата граница от разтворите на МЕУ и при двете изследвани стойности на рН в сравнение с ЕУ. При всички изследвани условия разтворите на МЕУ имат значително по-високо междуфазово напрежение в сравнение с разтворите на ЕУ. Този резултат е неочакван, тъй като обикновено нискомолекулни повърхностно активни видове като лизофосфолипидите се очаква да намалят междуфазовото напрежение на разтворите на МЕУ до по-ниски стойности. Както е известно от литературата (Anton, 2013), в случая на немодифициран ЕУ механично здраво и плътни адсорбционни слоеве, съставени от протеини и фосфолипиди, се образуват на междуфазовата граница. Следователно повърхностно активните компоненти в МЕУ може да не образуват толкова плътно покрити

адсорбционни слоеве на междуфазовата граница, което може да доведе до по-високо междуфазово напрежение. По-скоро е възможно лизолипидите да са привлечени и свързани с агрегатите в обема на разтворите на МЕУ, което да води до намаляване на тяхната повърхностна активност. Taylor, Thomas & Penfold (2007) съобщават за подобна конкуренция между агрегирането в обема на разтвора и адсорбцията на повърхностно-активни вещества в разтворите на някои смеси на полимер-ПАВ, което води до по-високо повърхностно напрежение.

Междуфазовото напрежение на разтворите на МЕУ се повишава при намаляване на рН, което е в добро съгласие с резултатите на Mel'nikov (2002). Обратната тенденция се наблюдава за немодифицирания ЕУ. Тази разлика в ефекта на рН за ЕУ и МЕУ вероятно е свързана с факта, че гранулите в МЕУ са вече разрушени поради ензимната модификация, докато рН има силно влияние върху размера на агрегатите и върху реологичните свойства на немодифицирания ЕУ. От сравнението на кривите за немодифициран ЕУ при двете стойности на рН се вижда, че много по-бърза първоначална адсорбция се наблюдава при киселинно рН.

Адсорбционните слоеве от МЕУ имат значително по-нисък повърхностен модул в сравнение с този на ЕУ, независимо от рН на разтвора. Леко понижаване на повърхностния модул на разтвора на ЕУ се наблюдава при намаляване на рН. Такава зависимост на повърхностния модул от рН не се наблюдава за МЕУ, но модулът намалява значително при увеличаване на периода на осцилация. Повърхностният модул на съхранение на немодифицирания ЕУ е значително по-висок от модула на загуби, който е близо до нула. От друга страна, двата модула имат близки стойности, когато адсорбционният слой се образува от разтвор на МЕУ. От тези наблюдения можем да заключим, че адсорбционният слой, образуван от разтвори на ЕУ, има по-изразени еластични свойства и се държи като истински вискоеластичен слой, доминиран от протеини. От друга страна, адсорбционният слой на МЕУ има вискоеластични реологични свойства, наподобяващи тези на нискомолекулни ПАВ, което показва, че доминиращо влияние в междуфазовите му свойства имат лизофосфолипидите и/или олеиновата киселина в тази система.

5. Поведение на тънки течни филми.






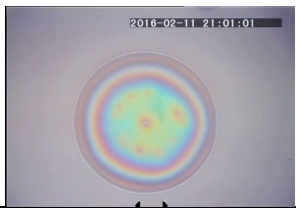


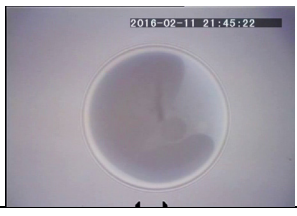
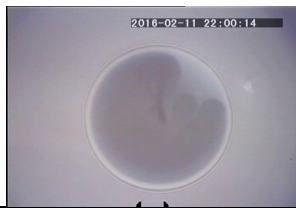
Наблюдаваме значителни разлики в поведението както на емулсионните, така и на пенните филми, стабилизирани с двата жълтъка (таблица 3.3). При натурално рН разтворът на ЕУ стабилизира емулсионни филми, които са нехомогенни по дебелина, със захванати агрегати в тях. Това поведение е типично за повечето емулсионни филми, стабилизирани от протеини (Basheva, Gurkov, Christov & Campbell, 2006; Dimitrova, Leal-Calderon, Gurkov & Campbell, 2004). След около 1 час, емулсионните филми достигат дебелина ≈ 100 nm, като се образуват и няколко черни петна с по-малка дебелина. При разтворите на МЕУ наблюдаваме по-бързо изтъняване на филма. В този

случай също се захващат агрегати във филма, но тези агрегати постепенно се изхвърлят от центъра на филма към областта на менискуса, така че филмът в крайна сметка става по-хомогенен по дебелина. Крайният резултат е образуване на черен емулсионен филм, който е значително по-тънък, в сравнение с този на ЕУ. Следователно, емулсионните филми, стабилизирани с МЕУ, се държат като филми, стабилизирани с нискомолекулни ПАВ, най-вероятно поради доминирането на лизофосфолипидите и олеиновата киселина върху повърхностите на филма.

Всички представени досега резултати свидетелстват за значителна разлика в повърхностните свойства на натуралния и ензимно модифицирания яйчен жълтък. ЕУ има повърхостни свойства и поведение на ТТФ, които са типични за система доминирана от протеини, докато свойствата на МЕУ наподобяват тези на нискомолекулни ПАВ. Разликата в размера на агрегатите може да се обясни с потискането на привличането между протеините в присъствието на лизо-PLs – както е установено от Tran Le и съавтори (2007), топлинно индуцираната агрегация на млечни протеини се потиска поради наличието на lysoPL-протеинови взаимодействия.

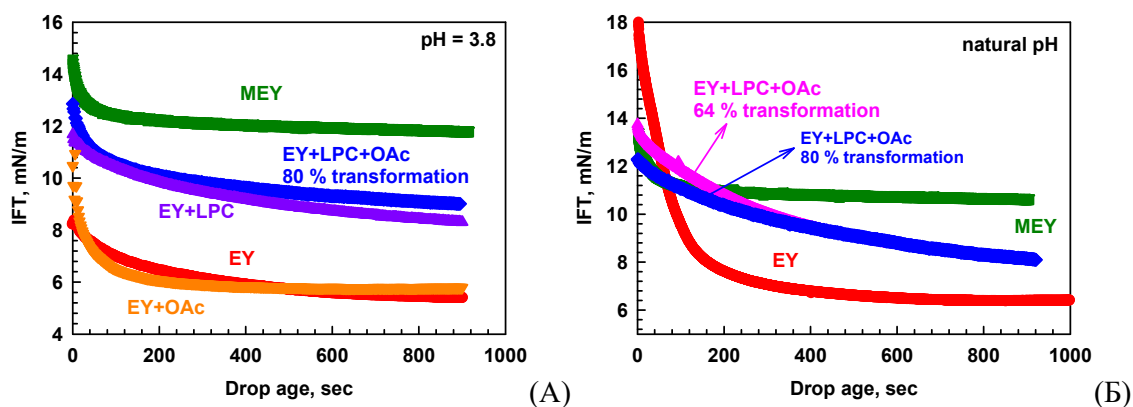
Таблица 3.3. Динамика на изтъняване на ТТФ, образувани от разтвори на ЕУ и МЕУ: (А) емулсионни филми при натурално рН; (В) пенни филми при натурално и киселинно рН. Размерът на скалата е 50 μm .

(А)

Система	Емулсионният филм след образуване	Емулсионният филм след 15 мин	Емулсионният филм след 30 мин	Емулсионният филм след 45 мин	Емулсионният филм след 60 мин
ЕУ					
МЕУ					

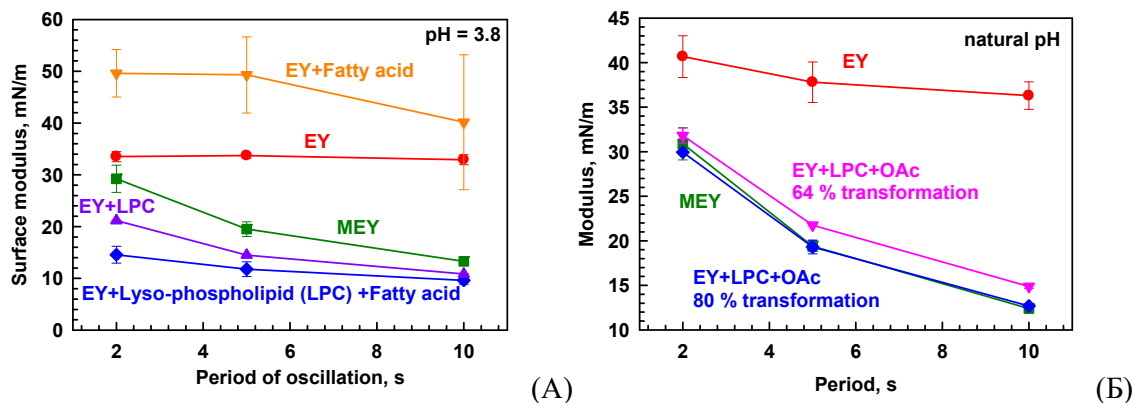
6. Ефект от добавянето на лизофосфатидилхолин и олеинова киселина върху повърхностните свойства на ЕУ.

За да обясним наблюдаваните разлики между двата вида яйчен жълтък, предположихме, че лизофосфолипидите (LPC) или/и масните киселини се адсорбират предпочетено на междуфазовата граница масло-вода, частично измествайки протеините и по този начин играят доминираща роля за повърхностните свойства на МЕУ. За да проверим тази хипотеза, проведохме допълнителни моделни експерименти, при които добавихме LPC и олеинова киселина (двата основни продукта на ензимната реакция) към разтворите на немодифициран ЕУ, с цел да имитираме състава на МЕУ. Изследвахме две различни концентрации на добавките, които съответстват на $\approx 64\%$ и $\approx 80\%$ трансформация на фосфолипидите на ЕУ в лизофосфолипиди и масни киселини.



Фигура. 3.8. Междуфазовото напрежение като функция на времето за разтвори на 22.5 тегл.% ЕУ (червени кръгове), 22.5 тегл.% ЕУ + 1 тегл.% LPC + 0.57 тегл.% ОАс (сини диаманти), 22.5 тегл.% ЕУ + 1 тегл.% LPC (лилави триъгълници нагоре), 22.5 тегл.% ЕУ + 0.57 тегл.% ОАс (оранжеви триъгълници надолу), 22.5 тегл.% ЕУ + 0.8 тегл.% LPC + 0.45 тегл.% ОАс (розови триъгълници) и 22.5 тегл.% МЕУ (зелени квадрати). (А) рН=3.8; (Б) натурално рН.

От фиг. 3.8. се вижда, че добавянето на LPC в разтвора на ЕУ при киселинно рН води до увеличаване на междуфазовото напрежение и то се доближава до това на разтвора на МЕУ. В присъствието само на олеинова киселина междуфазовото напрежение на граница масло-вода е подобно на междуфазовото напрежение на разтвора на немодифициран ЕУ. Резултатите от измерените повърхностни модули (фиг. 3.9) показват, че LPC модифицира повърхностните реологични свойства на разтвора ЕУ, така че те стават подобни на тези на МЕУ. Също така установихме, че модулите на съхранение и загуби, измерени с разтвори на ЕУ + LPC наподобяват модулите на разтворите на МЕУ. Подобни резултати се получават и при натурално рН. Тези резултати показват, че лизолипидите играят ключова роля в междуфазовите свойства на граница масло-вода на изследваните разтвори на яйчни жълтъци.



Фигура. 3.9. Повърхностният модул като функция на периода на деформация за разтвори на 22.5 тегл.% EY (червени кръгове), 22.5 тегл.% EY + 1 тегл.% LPC + 0.57 тегл.% OAc (сини диаманти), 22.5 тегл.% EY + 1 тегл.% LPC (лилави триъгълници нагоре), 22.5 тегл.% EY + 0.57 тегл.% OAc (оранжеви триъгълници надолу), 22.5 тегл.% EY + 0.8 тегл.% LPC + 0.45 тегл.% OAc (розови триъгълници) и 22.5 тегл.% MEY (зелени квадрати). (A) pH=3.8; (Б) натурално pH.

Проверихме влиянието на LPC и олеинова киселина и върху поведението на емулсионните и пенните филми на EY. Съответните изображения са показани в Таблица 3.4 и те показват, че емулсионните филми от разтвори на EY + LPC и OAc, при натурално pH, се държат подобно на филмите, образувани от разтвор на MEY – получават се тънки по дебелина хомогенни филми. Същото важи и за пенните филми на тези системи. Ефектът на LPC и олеинова киселина върху поведението на ТГФ беше изследван и при киселинно pH. Както е показано в таблица 3.4В, когато към разтвора на EY се добави само олеинова киселина, поведението на пенния филм наподобява поведението на филма, образуван от разтвора на MEY – бързо изтъняване на филма и образуване на черен филм. От друга страна, когато в разтвора на EY се добави само LPC, пенният филм изтънява много бавно и (в крайна сметка) се образуват черни петна, но те също се разширяват бавно. Това поведение на филма е много различно от поведението на пенния филм на MEY.

В заключение, от гледна точка на еволюцията на пенните филми, междуфазовите свойства на граница въздух-вода разтвора на MEY се определят предимно от олеиновата киселина. Възможно е лизофосфолипидите и олеиновата киселина да образуват смесени адсорбционни слоеве на границата въздух-вода, но не проведохме допълнителен експеримент, за да докажем тази хипотеза, тъй като основен интерес в изследванията в настоящата дисертация представляват междуфазовите свойства на граница масло-вода. В процеса на работа се сблъскахме с известни експериментални затруднения при образуването на емулсионни филми от изследваните моделни системи при киселинно pH и затова не можем да представим резултати от експерименти с емулсионни филми, проведени при pH 3.8. Независимо от това,

получените резултати за междуфазовото напрежение и повърхностните модули на границата масло-вода потвърждават, че междуфазовите свойства на MEY се определят главно от лизофосфолипидите и олеиновата киселина, образувани в процеса на липолиза.



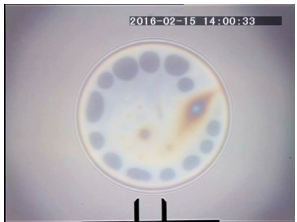

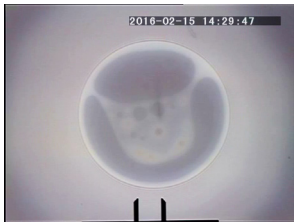
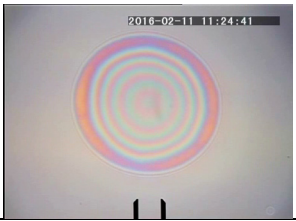
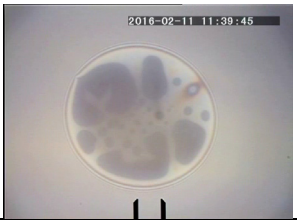



Горните наблюдения показват, че ролята на протеиновите агрегати в междуфазовите свойства е значително отслабена в присъствието на LPC и OAc. Тази тенденция беше изследвана допълнително чрез измерване на ζ -потенциала и размера на протеиновите агрегати в разтвори на EY с добавени LPC и OAc. Подобно на междуфазовите свойства, разтворите на EY + LPC + OAc възпроизвеждат добре резултатите, получени с разтвори на MEY. Едно от възможните обяснения за всички тези резултати е, че лизофосфолипидите и олеиновата киселина стабилизират малките агрегати, образувани след разрушаване на гранулите при високата йонна сила, като по този начин потискат привличането между молекулите на протеините и предотвратяват повторното агрегиране при разреждане на разтворите.

От всички експериментални резултати, представени в тази глава на дисертацията, недвусмислено може да заключим, че лизофосфолипидите и олеиновата киселина, образувани в процеса на ензимна модификация на EY, се превръщат в повърхностно активните компоненти, които доминират на междуфазовата повърхност и определят поведението на тънките течни филми на ензимно модифицирания яйчен жълтък (MEY), докато свойствата на натуралния, немодифициран яйчен жълтък (EY) се определят от протеиново-липидни агрегати.

Таблица 3.4.

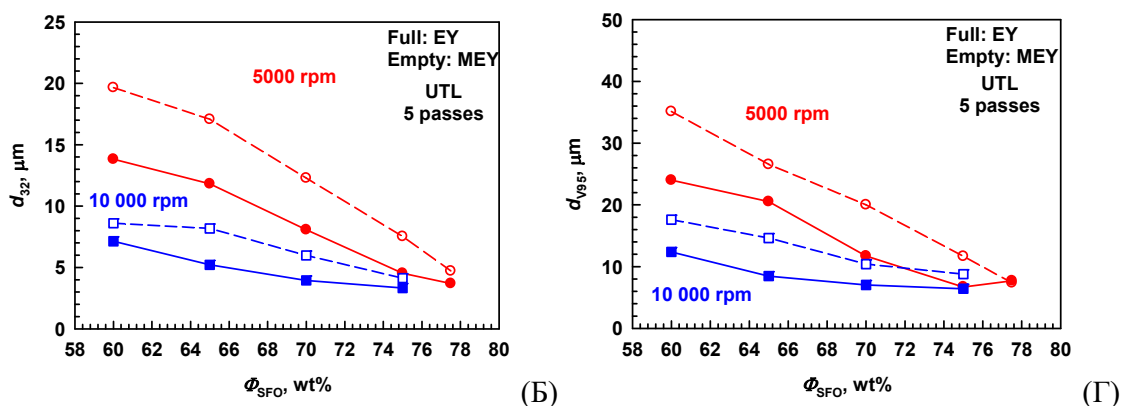
Динамика на изтъняване на ТТФ, образувани от разтвори на ЕУ + LPC + ОАс: (А) емулсионни филми при натурално рН; (Б) пенни филми при натурално рН и (В) пенни филми при рН = 3.8. Размерът на скалата е 50 μm.

(А) Емулсионни филми при натурално рН

Система	Емулсионният филм след образуване	Емулсионният филм след 15 мин	Емулсионният филм след 30 мин	Емулсионният филм след 45 мин	Емулсионният филм след 60 мин
ЕУ+LPC+ОАс 0.8 тегл.% LPC + 0.45 тегл.% ОАс					
ЕУ+LPC+ОАс 1 тегл.% LPC + 0.57 тегл.% ОАс					

7. Сравнение на емулгиращата способност на немодифициран и ензимно модифициран яйчен жълтък.

За да изследваме емулгиращата способност на немодифицирания и ензимно модифицирания яйчен жълтък, приготвихме серия от емулсии със SFO след 1 и 5 преминавания през UTL при скорости на ротора 5000 и 10000 rpm при фиксирано съотношение жълтък/масло около 1:3. Концентрацията на SFO варирахме от 60 до 77.5 тегл.%. От сравнението на получените средни и максимални размери на капките за двата яйчни жълтъка (фигура 3.11) ясно се вижда, че капките са по-големи в емулсиите, стабилизирани с MEY при всички изследвани условия (Φ , скорости на ротора, брой преминавания през UTL). Този резултат най-вероятно се дължи на по-високото междуфазово напрежение на граница масло-вода и по-ниския вискозитет на разтвора на MEY, в сравнение с разтвора на EY, виж Фигури 3.4 и 3.5.



Фигура 3.11. Среден диаметър обем-повърхност, d_{32} (А, Б) и максимален диаметър на капките, d_{v95} (В, Г) като функция на тегловната концентрация на маслото за емулсии на SFO, стабилизирани с EY (пълна символи) и MEY (празни символи) след 1 преминаване (А, В) и 5 преминавания (Б, Г) през UTL при 5000 (червени кръгове) и 10000 rpm (сини квадратчета) скорост на ротора.

8. Основни заключения.

В настоящата глава на дисертацията сравнихме свойствата на адсорбционните слоеве, поведението на пенните и емулсионните филми и емулгиращите способности на разтворите на ензимно модифициран и немодифициран яйчни жълтъци. Получените резултати могат да се обобщят по следния начин:

- (1) Междуфазовото напрежение на граница триглицерид-вода е по-високо, повърхностните дилатационни модули са по-ниски, равновесните пенни и емулсионни филми имат по-малка дебелина и вискозитетът на разтворите е по-нисък, когато се използва ензимно модифициран яйчен жълтък (MEY).
- (2) В резултат на по-високото междуфазово напрежение и по-ниския вискозитет на водната среда, размерът на капките е по-голям в образуваните емулсии от

ензимно модифициран яйчен жълтък. И за двата жълтъка размерът на капките намалява с нарастване на обемната част на маслената фаза.

- (3) Добавянето на лизофосфолипиди и олеинова киселина, които се получават в резултат на ензимната модификация, към разтвора на немодифицирания яйчен жълтък (EY) променят неговото поведение и водят до повишаване на междуфазовото напрежение, намаляване на повърхностния дилатационен модул и образуване на по-тънки и хомогенни филми, което недвусмислено показва, че тези две вещества са основната причина за различното поведение на MEY и EY.

Последното заключение е особено важно от гледна точка на практическото приложение на ензимно модифициран EY като емулгатор и пенообразувател в хранителните системи. Методологията, използвана за анализ на изследваните системи, може да бъде приложена за подобен тип сравнителен анализ на други модифицирани пенообразуватели и емулгатори, като мляко и растителни протеиново-липидни смеси.

ГЛАВА IV. Получаване на емулсии, стабилизирани с модифициран яйчен жълтък при ниска обемна част на маслото

Обектът на изследванията, представени в тази глава на дисертацията, са емулсии на модифициран яйчен жълтък, приготвени чрез ротор-статор хомогенизатор, като фокусът на изследванията е върху основните фактори, влияещи върху размера на капките в такива емулсии. Основните цели на изследването са: (1) Да се изследват и характеризират количествено ефектите от вискозитета на водната и маслената фаза, междуфазовото напрежение, вида на емулгатора и скоростта на ротора върху разпределението на капките по размер в разредени емулсии с нютоново реологично поведение, приготвени в ротор-статор хомогенизатор; (2) Да се въведат и разработят емпирични модели за емулгиране с ротор-статор хомогенизатори, които позволяват предсказване на разпределението на капките по размер като функция на гореспоменатите фактори. За да постигнем целите си, подготвихме емулсии от четири различни масла, стабилизирани с различни емулгатори, осигуряващи различни междуфазови напрежения, използвайки UTL (ultra-turax) хомогенизиращ елемент на апарата MagicLab. Добавихме глицерол, за да увеличим вискозитета на разтвора, покривайки относително голям диапазон от вискозитети (между 1 и 90 mPa.s). Получените експериментални резултати анализирахме, за да определим подходящ теоретичен модел, който може да се използва за предсказване на резултата от емулгирането.

2. Фактори влияещи върху размера на емулсионните капки.

За да изследваме ефекта на вискозитета на маслената фаза върху средния и максималния размер на капките приготвихме емулсии с четири различни масла, имащи вискозитет 3 mPa.s (хексадекан), 25 mPa.s (Light минерално масло), 50 mPa.s (SFO) и 130 mPa.s (Heavy минерално масло). Като водни фази използвахме разтвори на MEY с различна концентрация на глицерол. Междуфазовото напрежение на разтворите на MEY намалява с увеличаване на концентрацията на глицерол при всички изследвани масла, но в различна степен. Като цяло, най-високо е междуфазовото напрежение на границата НО-вода и най-ниско е на границата хексадекан-вода.

Експерименталните резултати показват, че за всички изследвани масла размерът на капките намалява значително с увеличаването на η_C . От друга страна, ефектът на η_D върху размера на капките е много силен при $C_{GLY} < 60$ тегл.% ($\eta_C < 10$ mPa.s) – размерът на капките се увеличава с увеличаването на η_D . Ефектът на η_D намалява с увеличаването на η_C и става по-слабо изразен при $C_{GLY} > 60$ тегл.% ($\eta_C > 10$ mPa.s). Увеличаването на η_C влияе в най-голяма степен върху разпределението на капките по размер по време на емулгиране на вискозни масла, което се съгласува много добре с резултатите на Tcholakova и съавтори (2011).

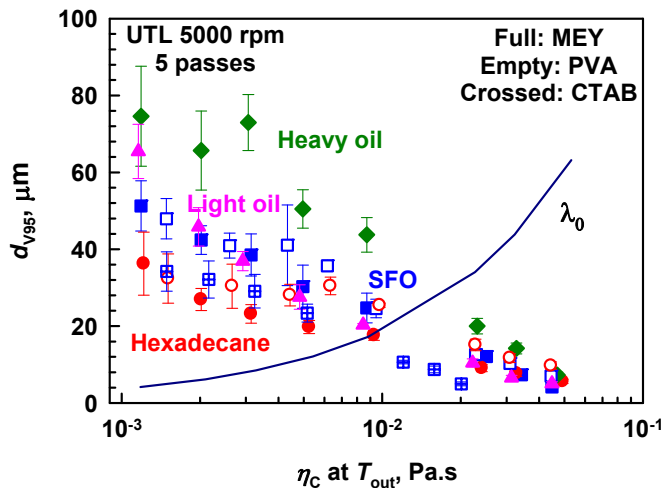
За да изследваме ефекта на междуфазовото напрежение и типа на емулгатора върху размера на емулсионните капки, приготвихме емулсии, стабилизирани с PVA и СТАВ. SFO и хексадекан използвахме като маслени фази. Най-високи са междуфазовите напрежения на границата масло-разтвори на PVA, най-ниско е σ на граница масло-разтвори на СТАВ, а разтворите на MEY имат междинно σ_{ow} . Междуфазовото напрежение на разтворите на PVA и СТАВ леко се увеличава с увеличаване на концентрацията на глицерол, което е противоположно на това, което наблюдаваме за разтворите на MEY. От сравнението на максималните размери, получени след емулгиране, установихме, че PVA и СТАВ възпроизвеждат основните тенденции за зависимостта на размера на капките от η_c и η_D , които наблюдавахме с MEY (виж Фигура 4.8). Както се и очаква, по-малки капки се образуват в емулсиите на СТАВ-SFO, понеже междуфазово напрежение на граница масло-вода за тази система е най-ниско в сравнение с другите емулгатори. Този ефект е много по-слабо изразен при емулсиите със SFO, стабилизирани с PVA и MEY, тъй като разликите в междуфазовите напрежения на техните разтвори са по-малки и съответно размерите на капките са много подобни при дадена концентрация на глицерол. В емулсиите с хексадекан максималните диаметри на капките са по-големи, когато PVA е използван за емулгатор, поради по-високото междуфазово напрежение на граница хексадекан-разтвори на PVA, в сравнение с разтворите на MEY. Като цяло може да заключим, че ефектът от междуфазовото напрежение върху размера на капките е относително слаб – при значителни разлики в σ_{ow} , промяната в размера на капките е сравнително малка.

За да проверим как скоростта на въртене на ротора влияе върху размера на емулсионните капки, проведохме две серии от експерименти. При първата серия използвахме MEY като емулгатор, SFO и хексадекан като маслени фази и приготвихме емулсиите при скорости на въртене на ротора от 5 000 и 10 000 rpm. Във втората серия подготвихме емулсии на SFO, стабилизирани с СТАВ, като използвахме три скорости на ротора на UTL – 5 000, 10 000 и 15 000 rpm. Увеличаването на скоростта на ротора от 5 000 на 10 000 rpm има значителен ефект върху размера на капките при нисък вискозитет на непрекъснатата фаза. От друга страна, с увеличаването на концентрацията на глицерол над 60 тегл.%, влиянието на скоростта на ротора върху размера на капките силно намалява и за двете масла – при високи η_c размерите на капки са много близки при двете скорости на ротора. Зависимостта на $d(\eta_c)$ е по-слаба при 10 000 rpm. Подобно на резултатите, получени с емулсии на MEY, наблюдавахме силна зависимост на размера на капките от скоростта на ротора и за емулсии на SFO, стабилизирани с СТАВ (фигура 4.10). Ефектът от скоростта на ротора върху d_{V95} силно намалява при по-високи η_c и при емулсиите на СТАВ. Изглежда, че при много високи η_c и скорости на ротора системите са близо до състояние, при което разкъсването на капките под определен размер е ограничено и затова при тези условия размерите на капките не се променят значително.

3. Сравнение на експерименталните резултати с теоретични модели.

3.2. Сравнение на експерименталните резултати с модели за емулгиране в инерчен и вискозен турбулентен режим.

В тази част на дисертацията представяме сравнението на получените експериментални максимални размери с предсказаните най-големи стабилни капки при емулгиране в инерчен и вискозен режим на емулгиране съгласно уравнения (1.2) и (1.4). За да постигнем целта си, допуснахме, че разкъсването на капките в UTL се осъществява в турбулентен поток и изчислихме размера на най-малките турбулентни вихри в потока, използвайки уравнение (1.1). При тези сметки отчетохме температурната зависимост на вискозитета на водната фаза, а по отношение на плътността, предположихме, че зависимостта от температурата е пренебрежимо малка и използвахме стойностите на ρ , измерени при 25 °C. Сравнението на експерименталните резултати за d_{v95} с λ_0 може да ни даде информация за режима на емулгиране. В турбулентен поток разкъсването на капките се осъществява под действие на инерчни или вискозни сили. Кой сили доминират зависи от съотношението на размера на капката, на която действат към размера на най-малките турбулентни вихри в потока. От сравнението на d_{v95} с λ_0 , показано на Фигура 4.11, се вижда, че при η_c около 10 mPa.s се осъществява преход от инерчен към вискозен турбулентен режим на емулгиране.

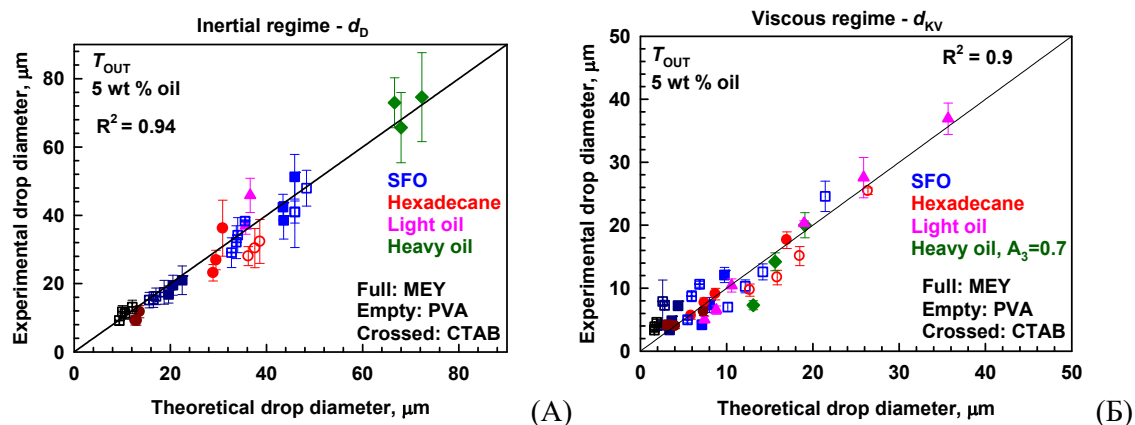


Фигура 4.11. Размер на най-малките турбулентни вихри като функция на η_c в сравнение с експерименталните резултати за максималния диаметър на капките в емулсии на SFO (сини квадрати), хексадекан (червени кръгове), HO (зелени диаманти) и LO (розови триъгълници), образувани в разтвори на MEY + Gly (пълни символи), PVA + Gly (празни символи) и CTAB + Gly (кръстосани символи) след 5 преминавания през UTL при скорост на ротора 5000 rpm. 5 тегл.% масло.

На базата на тези резултати, предположихме, че експерименталните точки под кривата на λ_0 представляват емулсии, получени във вискозен турбулентен режим на емулгиране ($\eta_c \geq 10$ mPa.s), докато точките над тази крива – емулсии, получени в

инерчен режим ($\eta_c < 10$ mPa.s). Експерименталните резултати от всяка група описахме с теоретичните изрази за двата режима, известни от литературата (уравнения 1.2 и 1.4). Ако не е посочено друго, за изчисляването на d_{KV} използвахме $A_3 = 0.4$, а за изчисляването на d_D използвахме $A_1 = 0.86$ и $A_2 = 0.37$ (Vankova и съавтори, 2007).

От направените сравнения на експерименталните резултати за d_{V95} в получените емулсии с теоретичните максимални размери, може да обобщим, че големи разминавания в описанието на експерименталните размери, d_{V95} с d_{KV} при високи η_c се наблюдават при емулсии, получени при високи скорости на ротора и ниски междуфазово напрежение на граница масло-вода. d_{KV} предсказва много по-малки размери при тези условия, докато в реалния случай, максималните диаметри d_{V95} зависят по-слабо от тези два параметъра (N и σ). Получените резултати са обобщени на фигура 4.14, където могат да се видят корелационните графики, показващи сравнението на всички експерименталните максимални диаметри на капки, d_{V95} , с теоретичните диаметри за инерчен и вискозен режим на емулгиране, d_D и d_{KV} (уравнения 1.2 и 1.4). Размерите на капки от преходната зона между двата режима не са включени в графиките, тъй като данните не се описват от нито едно от уравненията.



Фигура 4.14. Корелационна графика между експериментално измерените стойности на максималния диаметър на капките, d_{V95} , и теоретично изчислени стойности на d_{MAX} съгласно: (А) уравнение 1.2 за инерчен режим и (Б) уравнение 1.4 за вискозен режим. MEY (пълни символи), PVA (празни символи), СТАВ (кръстосани символи). Вискозитетите η_c и η_D са определени при T_{OUT} .

Алтернативен начин на описание на данните, получени при високи вискозитети на непрекъснатата среда, е така наречения „Grace plot“, където безразмерното капилярно число, $Ca = \eta_c \dot{\gamma} R / \sigma$, се представя като функция на отношението на вискозитетите на диспергираната и непрекъснатата фаза, η_D / η_c (Фигура 4.15). Зависимости от типа $Ca(\eta_D / \eta_c)$ се използват често за описание на данни за емулгиране в ламинарен поток. Но както се вижда от графиката, скалираните експериментални данни не попадат на една обща крива.

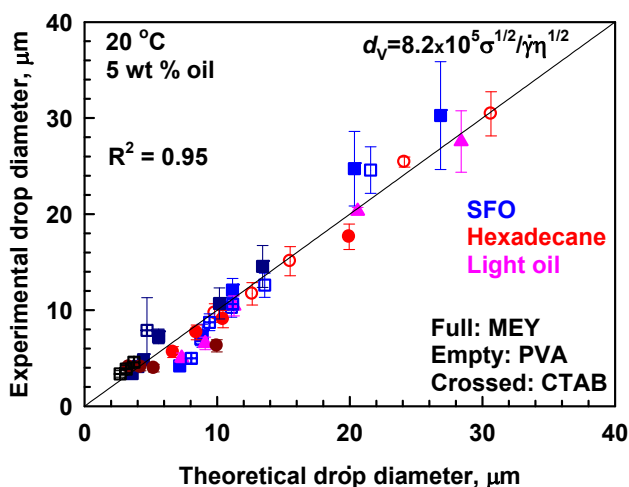
3.3. Въвеждане на ново емпирично уравнение за описание на експерименталните резултати при високи вискозитети на непрекъснатата среда.

За да можем да опишем нашите експериментални данни за емулгиране при високи вискозитети трябва да коригираме степенните показатели на тези два параметъра, така че да се отчете адекватно техният принос върху d_{v95} . За целта нанесохме всички експериментални резултати за SFO, хексадекан и light минерално масло като функция на $\sigma^a \dot{\gamma}^b \eta_c^c$, където варирахме стойностите на степенните показатели a , b и c . Изразът $\dot{\gamma} = 2\pi r N / l$ използвахме за описание на скоростта на деформация при разкъсване на капките по време на емулгиране. Обърнете внимание, че при този анализ използвахме само максималните размери, които попадат под кривата за λ_0 (т.е. емулсии, за които d_{v95} е \leq най-малките турбулентни вихри), понеже емулсиите, получени в инерчен режим, обикновено се описват добре от уравнението на Davies (вж. 1.2), когато се отчита ефектът на температурата върху η_D и η_c .

Получихме отлична корелация и всички експериментални резултати попаднаха на една обща крива при $a=1/2$, $b=-1$ и $c=-1/2$, виж фигура 4.17. Новото емпирично уравнение изглежда по следния начин:

$$d_v = C_1 \sigma^{1/2} / (\dot{\gamma} \eta_c^{1/2}) \quad (4.13)$$

където d_v е максималният диаметър на капките в m, σ е междуфазовото напрежение в N/m, η_c е в Pa.s и $\dot{\gamma}$ е в s^{-1} . Коефициентът на пропорционалност C_1 определихме от най-доброто описание на данните с уравнение 4.13 за два случая – $C_1 = 0.7 \text{ (m/s)}^{0.5}$ при отчитане на ефекта от повишаването на температурата по време на емулгирането върху вискозитета на непрекъснатата фаза и $C_1 = 0.82 \text{ (m/s)}^{0.5}$, когато при анализа използвахме вискозитета на непрекъснатата фаза, измерен при 20 °C. Интересно е, че коефициентът на корелация е по-добър, когато ефектът от температурата не се отчита.



Фигура 4.17. Сравнение между експериментално определените максимални диаметри на капките, d_{v95} , за емулсии, образувани при емулгиране във вискозни непрекъснати среди, и теоретично изчислени стойности на d_v съгласно уравнение 4.13. MEY (пълни символи), PVA (празни символи), CTAB (кръстосани символи). η_c при 20 °C.

Новото уравнение описва много добре максималните размери в емулсиите с високи вискозитети на непрекъснатата фаза при всички изследвани емулгатори и скорости на ротора. За голяма част от системите, уравнение (4.13) успява да опише и размерите в преходната област между двата режима на емулгиране. Изключение правят емулсиите на хексадекан-МЕУ и емулсиите, стабилизирани с СТАВ.

4. Основни заключения.

Проведени са системни експерименти за изследване влиянието на вискозитета на непрекъснатата среда, вискозитета на маслената фаза, междуфазовото напрежение и скоростта на въртене на ротора върху размера на капките в прави емулсии с ниска масова част на маслото ($\Phi_{\text{OIL}} = 0.05$), приготвени с помощта на ротор-статор хомогенизатор. Най-важните заключения от проведените експерименти могат да бъдат обобщени, както следва:

- ❖ Повишаването на вискозитета на водната фаза и на скоростта на ротора води до значително намаляване на размера на капките в получените емулсии за всички изследвани емулгатори и масла.
- ❖ Размерът на капките намалява и с понижаване на междуфазовото напрежение, σ , и вискозитета на маслената фаза, но ефектът от σ е сравнително слаб.

Получените експериментални резултати сравнихме с теоретичните изрази известни от литературата и показахме, че емулгирането се осъществява в турбулентен вискозен режим, когато вискозитетът на водната фаза, η_C , надвиши $\approx 5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, което е в добро съгласие с предишни изследвания. Анализът на резултатите показва, че максималните диаметри на капките, d_{V95} , получени в инерчен режим, се описват добре от класическия модел на Davies (1985), докато моделът на Колмогоров (1949) и Хинце (1955) за емулгиране при вискозен турбулентен режим не е подходящ за описание на максималните диаметри на капките, получени при висок вискозитет на водната фаза. За да получим по-добро описание на тези резултати беше необходимо да анализираме внимателно приносите на η_C , σ и скоростта на ротора върху размерите на капките при $\eta_C \geq 5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. В резултат изведохме прост емпиричен израз, който предсказва: $d_{\text{MAX}} \sim \sigma^{1/2}, N^{-1}, \eta_C^{-1/2}$. Предложеното ново уравнение описва много добре размерите на капките на всички емулсии, получени при високи вискозитети на непрекъснатата фаза.

За момента нямаме ясен отговор на какво се дължат различните степенни показатели на σ и скоростта на ротора в сравнение с модела на Колмогоров и Хинце за емулгиране във вискозен турбулентен режим и трябва да извършим допълнителни експериментални и теоретични изследвания в тази посока.

ГЛАВА V. Получаване на наноемулсии с биополимери чрез ротор-статор хомогенизатор

1. Увод и цел на изследването.

Получаването на наноемулсии изисква внасянето на голямо количество механична енергия в системата и затова тези емулсии обикновено се приготвят чрез високоенергийните хомогенизатори под високо налягане (McClements & Jafari 2018, Jamali, Assadpour & Jafari 2019). Напоследък има нарастващ интерес към получаването на наноемулсии с помощта на ротор-статор хомогенизатори. Тези устройства имат няколко предимства в сравнение с другите техники за приготвяне на емулсии, като: сравнително лесни са за инсталиране и работа; изискват сравнително малки инвестиционни разходи; относително висока производителност; съвместими са с вискозни системи; позволяват приготвяне на емулсии с голям обем и др. Най-често използваните стратегии за намаляване на размера на капките в ротор-статор хомогенизатори са: увеличаване на скоростта на ротора, намаляване на размера на процепа, промяна на конструкцията на ротора, увеличаване на времето на престой на капките в зоната на разкъсване (т.е. дълго време на емулгиране). За да се постигне ефективно разкъсване на капките, предпочетено се използват емулгатори с бърза кинетика на адсорбция и много ниско междуфазово напрежение (Van der Schaaf & Karbstein, 2018).

Основната цел на настоящото изследване е да се намерят условията, при които могат да се получат стабилни емулсии на природни емулгатори с размери на капките в диапазона между 100 и 500 nm за кратко време на емулгиране чрез ротор-статор хомогенизатор. За емулгатори използвахме Арабска гума (GA) и модифицирано нишесте (MS), които играят ролята и на вещества, контролиращи реологичното поведение на разтворите (увеличават вискозитета). За маслени фази използвахме два вида триглицеридни масла. Основното предимство на предложената процедура за образуване на наноемулсии е възможността да се използва по-висока концентрация на масло в сравнение с хомогенизацията под високо налягане, без добавяне на нискомолекулни ПАВ за стабилизиране на капките.

2. Обемни и междуфазови свойства на изследваните водни фази и масла.

Вискозитетът на разтворите на MS и GA се увеличава с увеличаване на концентрацията на биополимер. Всички изследвани разтвори имат почти нютоново поведение. Единственото изключение е разтворът на 35 тегл.% GA, който има поведение на флуид с намаляващ вискозитет при по-ниски скорости на деформация, но достига сравнително постоянен вискозитет над 10 s^{-1} . При една и съща концентрация вискозитетът на разтворите на MS е по-висок от този на разтворите на GA. И двете изследвани масла имат нютоново поведение, като при една и съща температура вискозитетът на TGO-36 е около два пъти по-висок от вискозитета на TGO-19.

Междуфазовите напрежения и на двата биополимера на граница с TGO-19 са малко по-ниски в сравнение с σ_{ow} , измерени на граница с TGO-36. Не се вижда значителна промяна в междуфазовото напрежение и на двата изследвани емулгатора, когато концентрацията им се увеличи от 15.6 тегл.% на 35 тегл.%. Ефектът на температурата върху σ_{ow} също е относително слаб и за двата емулгатора. Съществува обаче съществена разлика в кинетиката на σ_{ow} на двата емулгатора – MS се адсорбира много по-бързо от GA. По-бързата адсорбция на MS, в сравнение с GA, е свързана с факта, че повърхностно активните компоненти в MS имат молекулна маса $<10^5$ g/mol според производителя на MS, докато повърхностно активният протеин в GA има молекулна маса 2.5×10^5 g/mol (Renard и съавтори 2006) и е с относително ниска концентрация. σ_{ow} са значително по-високи и при двата емулгатора в сравнение с σ_{ow} на обичайните нискомолекулни ПАВ, използвани за получаването на наноемулсии.

Има значителна разлика и в поведението на емулсионните филми на двата емулгатора. MS стабилизира по-тънки и хомогенни емулсионни филми, докато филмите, стабилизирани с GA, имат нееднородна дебелина (т.е. филмите съдържат протеинови агрегати) и остават нехомогенни дори 30 минути след образуването си.

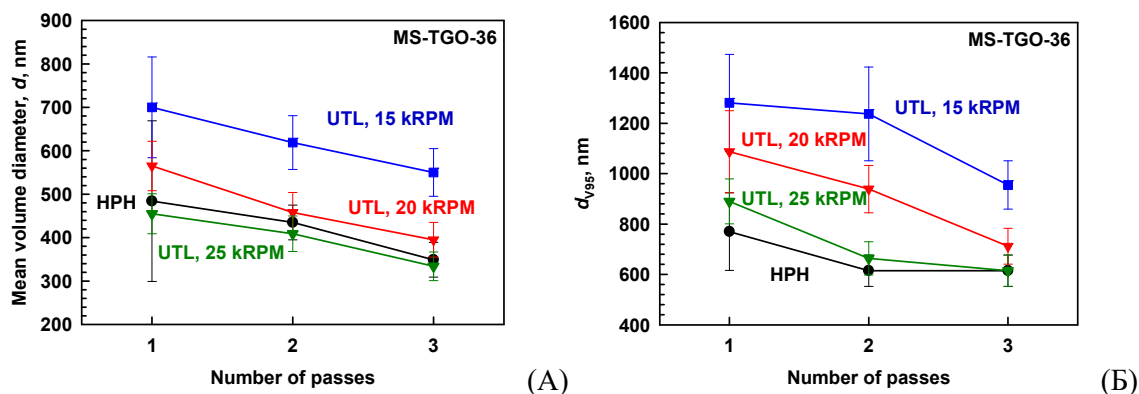
3. Получаване на наноемулсии на TGO-36 с ротор-статор хомогенизатор.

За да изследваме способността на MS и GA да стабилизират наноемулсии, проведохме експерименти с НРН при 5000 psi (34.47 МПа) и хомогенизатор UTL при три скорости на ротора: 15000, 20000 и 25000 rpm. Тъй като експериментите с НРН не ни позволяват да работим при високи вискозитети, поддържахме относително ниска концентрацията на емулгатора и маслото в емулсиите, приготвени с този хомогенизатор – 15.6 тегл.% емулгатор във водната фаза и 10 тегл.% TGO-36 в крайната емулсия. За експериментите с UTL фиксирахме концентрацията на TGO-36 на 17.9 тегл.%, а концентрацията на MS и GA във водните разтвори на 30.4 тегл.%. Масовото съотношение емулгатор/масло е 1.4 и при двата вида формулировки.

Средният, d_{vm} и максимален диаметър на капките, d_{v95} , получени при емулсии, стабилизирани с MS, (фигура 5.7) намаляват с увеличаването на скоростта на ротора и броя на преминаванията през оборудването. Когато емулгирането се извършва при скорост на ротора 25 krpm, характеристиките на получените емулсии са много сходни с тези на емулсиите, приготвени с НРН. Полидисперсността на емулсиите, получени с UTL при 20 и 25 krpm, е по-ниска в сравнение с полидисперсността на емулсиите, приготвени с НРН ($d_{v84}/d_{v50} \approx 1.9$ за емулсии, приготвени с НРН и ≈ 1.6 за емулсии, приготвени с UTL). Тези важни резултати показват, че наноемулсии масло-във-вода могат да се образуват чрез ротор-статор хомогенизатор не само с помощта на бързо адсорбиращи се емулгатори с много ниско σ_{ow} , но и с относително бавно адсорбиращи се полимери, които имат значително по-високо σ_{ow} в сравнение с ПАВ-ове като Tween например – виж фигура 5.18.

Резултатите, получени в тази серия от експерименти, доказват, че с ротор-статор хомогенизатор UTL-MagicLab могат да се получат емулсии с размери на капките толкова малки, колкото в емулсиите, получени с НРН, при подобно съотношение емулгатор/масло. Подобни резултати за сравними размери на капки в емулсии, приготвени с НРН и ART MICRRA D27 ротор-статор система, са докладвани преди това от Scholz & Keck 2015 за 5 % емулсии на средноверижни триглицериди Miglyol 812 във вода, стабилизирана със сместа от ПАВ 5 тегл.% Tween 80 + Span 80, при които междуфазовото напрежение е много по-ниско.

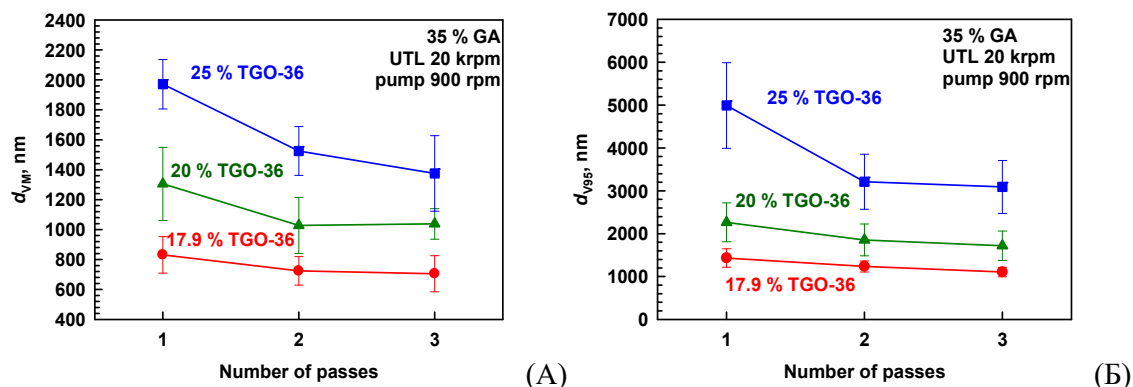
С помощта на GA не можем да получим наноемулсии, когато използваме UTL.



Фигура 5.7. (А) Среден и (Б) Максимален диаметър по обема на емулсионните капки. Емулсиите, получени с UTL съдържат 17.9 тегл.% TGO-36 и 30.4 тегл.% MS, докато емулсиите, получени с НРН съдържат 10 тегл. % TGO-36 и 15.6 тегл.% MS. Скоростите на ротора на UTL са посочени на фигурите.

Формулирахме няколко хипотези за различната ефективност на MS и GA като емулгатори: (1) по-нисък вискозитет на разтвора на GA в сравнение с този на MS и (2) по-бърза адсорбция на MS в сравнение с GA. И двата фактора влияят върху скоростта на коалесценция на капките и водят до по-вероятна коалесценция при емулсиите стабилизирани с GA. За да проверим доколко вискозитетът на средата влияе върху възможността за коалесценция на капките в емулсиите стабилизирани с GA увеличихме концентрацията на GA от 30.4 до 35 тегл.% ($\eta_c = 120$ mPa.s при 65 °C), за да имитираме вискозитета на разтвора на 30.4 тегл.% MS ($\eta_c = 110$ mPa.s при 65 °C), който дава най-малките капки в UTL хомогенизатора. След това използвахме разтвора на 35 тегл.% GA за приготвяне на емулсии с 17.9 тегл.% TGO-36 при 20 kRPM в UTL. Капките, приготвени в присъствието на GA, са много по-големи от тези, получени с MS като емулгатор. Следователно, вискозитетът сам по себе си не е достатъчен, за да обясни големия размер на капките в емулсии на GA (в сравнение с MS), но увеличаването му със сигурност помага за намаляване на размера на капките в тези емулсии (фигури 5.10 и 5.11).

За да проверим дали коалесценцията между капките е основният проблем при емулсиите, приготвени с GA, проведохме експерименти, при които фиксирахме концентрацията на GA и променяхме концентрацията на масло в емулсиите. Увеличаването на масовата част на маслото води до значително увеличаване на средния и максималния диаметър на капките в образуваните емулсии (фигура 5.12). Следователно, размерът на капките в тези емулсии се контролира от съотношението на емулгатора към маслото, поради изчерпване на повърхностно-активния компонент в GA в процеса на емулгиране (т.нар. „surfactant-poor regime“). Поради тази причина за приготвяне на наноемулсии с GA трябва да се намали концентрацията на масло (увеличаване на съотношението GA/масло) или да се използва допълнително бързо адсорбиращо се ко-повърхностно-активно вещество.



Фигура 5.12. (А) d_{VM} и (Б) d_{V50} в емулсии с 17.9% (червени кръгове и линия), 20% (зелени триъгълници и линия) и 25% (сини квадрати и линия) TGO-36, стабилизирани с 35% GA. Емулсии, приготвени с UTL при 20 krpm.

4. Влияние на вискозитета на маслената фаза върху размера на капките.

В сравнение с емулсиите на MS-TGO-36, средният и максималният диаметър на капките са по-малки в емулсиите на MS-TGO-19, приготвени с НРН. По отношение на емулсиите, приготвени с UTL, няма съществен ефект от вискозитета на маслото върху размера на капките и се получават близки резултати и при двете масла при 20 и 25 krpm след 3 преминавания през ротор-статор хомогенизатора. По време на емулгиране с TGO-19 в НРН се образуват по-малки капки в сравнение с UTL. Наблюдаваният ефект на вискозитета на маслото може да се обясни с разсейването на енергията вътре в деформиращите се капки по време на емулгиране с НРН, докато в случая на UTL има достатъчно време, за да се деформира капката. Последното е в добро съгласие с изследването на Tcholakova и съавтори (2011), където авторите показват, че вискозният турбулентен режим, реализиран в хомогенизатори тип ротор-статор, е по-ефективен за разкъсването на капките на вискозни масла.

5. Влияние на масовата част на маслото върху размера на капките в емулсии, стабилизирани с MS.

5.1. Фиксирано съотношение на емулгатор/масло.

За тази серия от експерименти фиксирахме съотношението емулгатор/масло на 1.4. Концентрацията на TGO-36 варирахме от 16.1 до 20 тегл.%. Тези емулсии приготвихме с UTL при 15 krpm и 20 krpm. По този начин изследвахме ефекта на концентрацията на маслото при относително постоянно междуфазово напрежение, но при различни вискозитети на водната фаза. Може да изглежда, че повишаването на концентрацията на масло е малко в тази серия от експерименти. Но както показахме при емулсии на GA дори такива малки промени в концентрацията на масло могат да повлияят значително на размера на капките, когато емулгаторът не е в състояние да стабилизира капките по време на емулгирането.

Размерите на капките намаляват с увеличаването на масовата част на маслото поради увеличаването на вискозитета на водната фаза и на емулсията. Интересното е, че няма значителна промяна в размерите на капките на емулсиите с 17.9 и 20 тегл.% TGO-36. За да разберем защо ефектът от концентрацията на маслото изчезва, проверихме температурите на емулсиите, измерени след преминаване през UTL (виж Таблица 5.4). Много висока температура от 96 °C се достига по време на емулгиране при 20 тегл.% масло, докато температурата на емулсията с 17.9 тегл.% масло е ~ 70 °C. Най-вероятно намаляването на вискозитета на водната фаза, причинено от значителното повишаване на температурата по време на емулгиране, е основната причина за наблюдаваните сходни размери на капките в емулсии със 17.9 и 20% TGO-36.

5.2. Фиксирана концентрация на емулгатор във водната фаза.

В тази част от изследването използвахме разтвор на 30.4 тегл.% MS за приготвяне на емулсиите. TGO-36 и TGO-19 бяха използвани като маслени фази. Изследвани са три концентрации на масло – 17.9, 20 и 25 тегл.%. Приготвихме емулсиите с UTL при 20 krpm. За да намалим температурата по време на емулгиране, използвахме термостат за охлаждане на емулсиите с 20 и 25% масло.

Увеличаването на масовата част на маслото има малък ефект върху средните и максималните диаметри на капките за TGO-19 и практически няма ефект за TGO-36. По-малките капки се образуват с по-малко вискозното масло. Температурите на емулсиите, измерени при трите изследвани концентрации на масло, са сходни (виж Таблица 5.4), което означава, че няма значителна промяна във вискозитета на разтвора на MS по време на емулгиране. Този резултат показва, че основният фактор, определящ разпределението на капките по размер, е вискозитетът на водната и маслената фази.

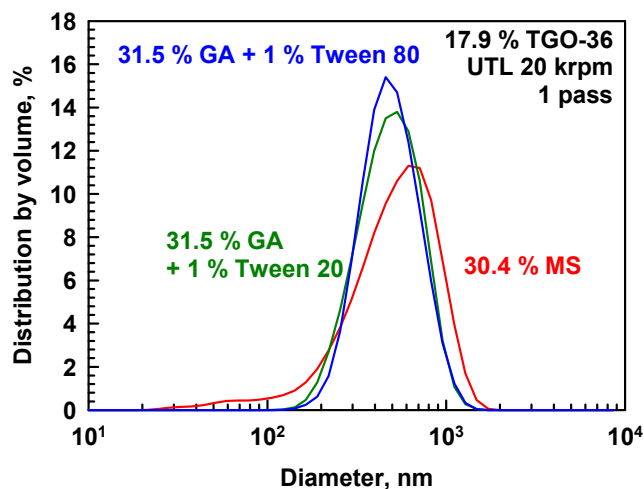
6. Интерпретация на получените данни и описание с теоретични модели.

При извършването на анализа на данните в следващите абзаци е важно да отчетем влиянието на температурата по време емулгиране върху вискозитетите на маслената и водната фаза.

6.1. Емулгиране при наличие на коалесценция. Описание на получените експериментални резултати за Gum Arabic.

По-големият диаметър на капките, измерен при по-високо съдържание на масло, когато GA се използва като емулгатор, може да се дължи на коалесценцията на капките по време на емулгиране или/и на образуването на агрегати, дължащи се флокулация поради от образуване на мостове. Направихме оптични наблюдения на емулсионните капки и открихме, че в емулсиите, стабилизирани с GA, няма видими флокули, докато по-големи капки бяха наблюдавани при по-висока концентрация на масло. Следователно основната причина за по-големия размер на капките при по-висока концентрация на масло в емулсиите на GA се дължи на коалесценцията на капките.

За да проверим заключението, че по-лошото представяне на GA като емулгатор в сравнение с MS, е свързано с коалесценцията на капките по време на емулгиране, извършихме допълнителни експерименти, в които добавихме 1 тегл.% Tween 20 или 1 тегл.% Tween 80 към разтвор на 31.5 тегл.% GA и емулгирахме с UTL модул при 20 krpm. Добавянето на бързо адсорбиращите се Tween 20 и Tween 80 доведе до значително понижаване на междуфазовото напрежение (фигура 5.18) и намаляване на размера на образуваните капки – разпределението на капките по размер на тези емулсии стана много подобно на това в емулсии, стабилизирани с MS дори след 1 преминаване през хомогенизатора, виж фигура 5.19. Тези резултати ясно показват, че основният проблем с GA е коалесценцията на капките по време на емулгиране, която може да бъде преодоляна чрез въвеждане на бързо адсорбиращи се ПАВ.



Фигура 5.19. Разпределение по обем на размерите на капките в емулсии на 17.9% TGO-36, стабилизирани с 30.4% MS (червена крива); 31.5 тегл.% GA + 1 тегл.% Tween 80 (синя крива); или 31.5 тегл.% GA + 1 тегл.% Tween 20 (зелена крива). Емулсиите са приготвени след 1 преминаване през UTL при 20 krpm.

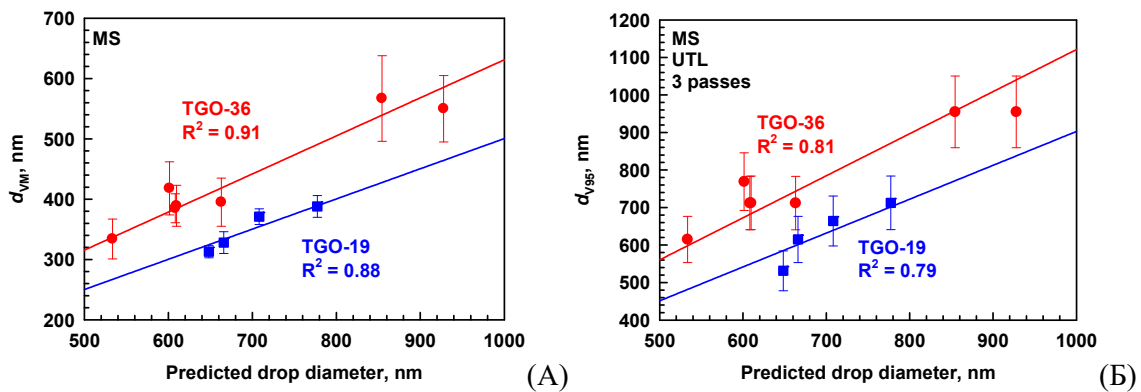
6.2. Емулгиране при липса на коалесценция. Описание на получените експериментални резултати за модифицирано нишесте.

При липса на коалесценция теоретичният модел за емулгиране във вискозен турбулентен режим може да се използва за интерпретация на данните. Наличието на маслени капки води до ненютонови реологични свойства на образуваните емулсии, което влияе на условията по време на емулгиране. По-подходящо е да се използва вискозитета на емулсията, η_{EM} , вместо вискозитета на водната фаза, като контролен параметър, тъй като η_{EM} е много по-висок. За да определим зависимостта на η_{EM} от Φ , използвахме клетъчния модел на Yaron & Gal-Or (1972)

Като следваща стъпка проверихме дали експерименталните данни за размерите на капките могат да бъдат описани, като използваме теоретичния израз за максимален диаметър на капките във вискозен турбулентен режим на емулгиране:

$$d \approx \frac{\sigma}{(\varepsilon \eta_{EM} \rho_{EM})^{1/2}} k \quad (5.4)$$

където k е корелационен коефициент. Както е показано на фигура 5.23 има добро съгласие между експерименталните резултати за d_{VM} и теоретичните предсказания за двете масла, TGO-19 и TGO-36. Понеже тези две масла имат различен вискозитет, те имат различни стойности на k за изчисляване на d_{VM} , които са 0.5 за TGO-19 и 0.63 за TGO-36. За изчисляване на $d_{VM_{MAX}}$ стойностите на k са близки до 1 (0.9 за TGO-19 и 1.14 за TGO-36). Трябва да се отбележи, че тези малки разлики в стойностите на k са свързани с различните съотношения на вискозитетите на водната и маслената фаза.



Фигура 5.23. Сравнение между експериментално измерените стойности на (А) средния диаметър на капките, d_{VM} ; (Б) d_{V95} , и теоретично изчислените диаметри, използвайки уравнение (5.4). Емулсиите са образувани с разтвори на MS след 3 преминавания през UTL при скорости на ротора 15000, 20000 и 25000 rpm. Червените символи представляват резултатите, получени с TGO-36, а сините символи – с TGO-19.

7. Основни заключения.

В това изследване показахме, че наноемулсии с диаметър на капките близък до този в емулсии, получени с хомогенизатор под високо налягане (в диапазона между 100 и 500 nm), могат да бъдат получени чрез ротор-статор хомогенизация за сравнително кратко време на емулгиране, когато се използва модифицирано нишесте (MS) като емулгатор. Основното предимство на MS, в сравнение с нискомолекулните повърхностноактивни вещества, е способността му да увеличава вискозитета на непрекъснатата фаза и по този начин да улеснява разкъсването на капките по време на емулгиране дори при средно висока и висока обемна част на маслото.

Когато се използва Gum Arabic като емулгатор, капки с диаметри по-малки от 1 μm се образуват само когато се използва НРН за емулгиране и при ниски концентрации на масло в емулсиите. Основната причина за по-големите капки, наблюдавани в емулсиите, стабилизирани с GA, в сравнение с MS, е значителната коалесценция на капките в емулсиите на GA, особено при високо съдържание на масло. Възможни начини за постигане на по-малки капки, стабилизирани с GA, могат да бъдат чрез намаляване на концентрацията на маслото или чрез добавяне на съ-емулгатори.

Теоретичният анализ на получените експериментални резултати показва, че размерът на капките в емулсии на GA е силно повлиян от коалесценцията на капките по време на емулгиране, докато такъв ефект не се наблюдава при емулсиите, стабилизирани с MS. Експерименталните резултати за GA могат да бъдат описани при допускането, че има ограничена адсорбция на емулгатора на повърхността на капките, което води до тяхната коалесценция, особено при по-високи концентрации на маслото. Експерименталните резултати за емулсиите, приготвени с разтвори на MS, са добре описани от теоретичния израз за емулгиране в турбулентен вискозен режим, след правилно отчитане на вискозитетите на изследваните емулсии, включително ефектите от повишаването на температурата по време на емулгирането.

Основни приноси от дисертацията

1. Показано е, че лизофосфолипидите и олеиновата киселина, образувани в процеса на ензимна модификация на яйчен жълтък, са причината за различните свойства на адсорбционните слоеве и поведението на тънките течни филми, образувани от разтвори на нетретиран и ензимно модифициран яйчни жълтъци. Добавянето на лизофосфолипиди и олеинова киселина към разтворите на немодифицирания жълтък увеличават междуфазовото напрежение и намаляват вискозитета на разтворите, в резултат на което размерът на капките, получени в емулсиите с ензимно модифициран яйчен жълтък, са по-големи в сравнение с размера на капките в емулсиите, получени от нетретиран яйчен жълтък.

2. Потвърдено е, че при емулгиране с ротор-статор хомогенизатор в нютонови среди (непрекъснати фази и емулсии), се осъществява преход от инерчен към вискозен режим на емулгиране над определена критична стойност на вискозитета на непрекъснатата среда, включително когато се използват по-сложните като състав и структура природни емулгатори. Потвърдено е, че максималните размери на емулсионните капки в инерчния режим се описват добре с изрази известни от литературата, докато теоретичните изрази за емулгиране в турбулентен вискозен режим предсказват много по-силна зависимост на размера на капките от скоростта на въртене на ротора и междуфазовото напрежение от експериментално определените зависимости. Предложено е ново емпирично уравнение, което описва добре получения набор от експериментални данни като отчита приносите на (1) вискозитета на непрекъснатата среда; (2) скоростта на ротора; (3) междуфазовото напрежение.

3. Предложен е алтернативен подход за получаване на умерено концентрирани хранителни наноемулсии с размер на капките между 100 и 500 nm с ротор-статор хомогенизатор и модифицирано нишесте (MS) за емулгатор, който увеличава вискозитета на непрекъснатата фаза и по този начин улеснява разкъсването на капките по време на емулгиране. Получените експериментални резултати за размера на капките се описват сравнително добре с теоретичния израз за емулгиране в турбулентен вискозен режим, след правилно отчитане на вискозитетите на изследваните емулсии, включително ефектите от повишаването на температурата по време на емулгирането.

4. Алтернативният подход за получаване на наноемулсии с ротор-статор хомогенизатор е тестван и с арабска гума (GA), но поради по-бавната адсорбция на протеините от този емулгатор на повърхността на капките, получаването на наноемулсии е възможно само след добавянето на ниско-молекулни ПАВ към разтвора на арабската гума, които осигуряват стабилизация на капките по време на емулгиране.

Списък на публикациите по дисертацията:

1. D. Gazolu-Rusanova, F. Mustan, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, J. W.J. de Folter. Role of Lysophospholipids on The Interfacial and Liquid Film Properties of Enzymatically Modified Egg Yolk Solutions. *Food Hydrocolloids* **99** (2020) 105319; doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105319 (ИФ = 7.053)
2. D. Gazolu-Rusanova, I. Lesov, S. Tcholakova, N. Denkov, B. Ahtchi. Food Grade Nanoemulsions Preparation by Rotor-Stator Homogenization. *Food Hydrocolloids* **102** (2020) 105579; doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105579 (ИФ = 7.053)

Материали по дисертацията са докладвани на:

Дилек Газолу, Славка Чолакова, Николай Денков. „Основни фактори, влияещи върху размера и полидисперсността на капките в емулсии, получени с ротор-статор хомогенизатор“. XIV Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Май 2015, София, България – устен доклад

Дилек Газолу, Славка Чолакова, Николай Денков. „Роля на лизо-фосфолипидите върху повърхностните свойства на ензимно модифициран яйчен жълтък“. XV Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Май 2016, София, България – устен доклад

Бистра Терзиева, Дилек Газолу-Русанова, Славка Чолакова, Николай Денков. „Основни фактори, влияещи върху размера и полидисперсността на капките в емулсии, получени с ротор-статор хомогенизатор“. XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Май 2017, София, България – устен доклад

Дилек Газолу-Русанова, Бистра Терзиева, Славка Чолакова, Николай Денков. „Емулгиране с ротор-статор хомогенизатор. Сравнение на експериментални и теоретично предсказани размери“. XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Май 2017, София, България – устен доклад

Dilek F. Gazolu-Rusanova, Fatmegul Mustan, Zahari Vinarov, Slavka Tcholakova, Nikolai Denkov, Simeon Stoyanov and Julius de Folter. „Role of lysolipids on the surface properties of enzymatically modified egg yolk“, 32nd conference of the European Colloid and Interface Society, Септември 2018, Любляна, Словения – постер

Dilek F. Gazolu-Rusanova, Bistra Terzieva, Slavka Tcholakova, Nikolai Denkov, Simeon Stoyanov and Jo Janssen. „Emulsification by rotor-stator homogenizer: Comparison of experimental and predicted drop sizes“, 32nd conference of the European Colloid and Interface Society, Септември 2018, Любляна, Словения – постер

Dilek F. Gazolu-Rusanova, Fatmegul Mustan, Zahari Vinarov, Slavka Tcholakova, Nikolai Denkov, Simeon Stoyanov and Julius de Folter. „Role of lysolipids on the interfacial and liquid film properties of enzymatically modified egg yolk solutions“, Chemistry Today for Tomorrow, Февруари 2019, София, България – устен доклад

Dilek F. Gazolu-Rusanova, Bistra Terzieva, Slavka Tcholakova, Nikolai Denkov, Simeon Stoyanov and Jo Janssen. „Emulsification by rotor-stator homogenizer: comparison of experimental and predicted drop sizes“, Chemistry Today for Tomorrow, Февруари 2019, София, България – постер

Dilek Gazolu-Rusanova, Ivan Lesov, Slavka Tcholakova, Nikolai Denkov, Badreddine Ahtchi. „Food-grade nanoemulsion preparation by rotor-stator homogenization“. I-ви уъркшоп по Компонент 3 към ННП „Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот“, Май 2019, Пловдив, България – постер