



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (IV) Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών

Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

«Νανογαλακτώματα ελαίου σε νερό  
με χρήση φυσικών γαλακτωματοποιητών  
και ενσωμάτωση βιοδραστικού συστατικού τροφίμων»

---

*Διπλωματική Εργασία*

Ελένη Τσαμαντά

Επιβλέπουσα  
Κωνσταντίνα Τζιά  
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019



## *Ευχαριστίες*

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της κας Κωνσταντίνας Τζιά, Καθηγήτριας του Ε.Μ.Π.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω την κα Τζιά για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Οι συμβουλές, η καθοδήγηση και η εμπιστοσύνη της αποτέλεσαν καταλυτικούς παράγοντες για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες στην Μαρία Κατσούλη, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων Ε.Μ.Π. για την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθειά της στην επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος κι αν αντιμετώπισα κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Βιργινία Γιάννου, τους υποψήφιους διδάκτορες Τζίνα Φρακολάκη και Τρύφωνα Κεκέ, καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τις εταιρίες MINEPBA και ION, για την παροχή πρώτων υλών, τα εργαστήρια της Οργανικής και Ανόργανης Χημείας της Σχολής μας και το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, για την παραχώρηση των απαραίτητων οργάνων για την εκπόνηση των πειραμάτων μου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υπομονή και τη συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019

Ελένη Τσαμαντά



## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως αντικείμενο την παρασκευή και τη μελέτη νανογαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό (o/w) με λιπαρή φάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO). Ως γαλακτωματοποιητές, χρησιμοποιήθηκαν ένας μη ιοντικός, το Tween 20, και δύο φυσικοί, η καζεΐνη σε μορφή καζεϊνικού νατρίου και η λεκιθίνη. Οι περιεκτικότητες των γαλακτωματοποιητών ήταν 3% και 5% κ.β. για τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β. και 8% και 10% κ.β. για τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β. Επιπλέον τούτων, δοκιμάστηκε η χρήση μιγμάτων χημικού και φυσικού γαλακτωματοποιητή, δηλαδή του Tween 20 με το καζεϊνικό νάτριο και του Tween 20 με τη λεκιθίνη, σε αναλογία 1:1. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων o/w που εξετάστηκαν την ημέρα της παρασκευής των δειγμάτων ήταν: το ιζώδες, η θολότητα, ο δείκτης διάθλασης, η μέση διάμετρος των σταγονιδίων (MDD), ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων κατά τη διατήρησή τους σε δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης, περιβάλλον (25 °C) και ψύξη (4 °C), για διάστημα 8 εβδομάδων. Συγκεκριμένα, σε εβδομαδιαία βάση προσδιορίζονταν: η μέση διάμετρος των σταγονιδίων (MDD), ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI), το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) και ο δείκτης σταθερότητας (ESI). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, επιλέχθηκαν τα βέλτιστα συστήματα (είδος και περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή) για κάθε περιεκτικότητα εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου. Τούτα παρασκευάστηκαν εκ νέου και εμπλουτίστηκαν με το βιοδραστικό συστατικό, το συνένζυμο Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>), το οποίο παρουσιάζει πολλαπλά οφέλη για την υγεία ως εξαιρετικό αντιοξειδωτικό και είναι θεμελιώδες για την παροχή ενέργειας στον άνθρωπο μέσω της παραγωγής ATP. Ωστόσο, η χαμηλή υδατοδιαλυτότητά του καθιστά επιτακτική την ανάγκη χρήσης νανογαλακτωμάτων ελαίου σε νερό για την υψηλή προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση του CoQ<sub>10</sub>. Στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα o/w, προσδιορίστηκαν εκ νέου οι προαναφερθείσες ιδιότητες, ενώ αυτά διατηρήθηκαν για διάστημα 40 ημερών στο περιβάλλον και σε ψύξη για τον προσδιορισμό της σταθερότητάς τους. Επιπλέον, μετρήθηκε η διατηρησιμότητα του συνένζυμου Q<sub>10</sub>. Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα παρασκευής διπλών γαλακτωμάτων o<sub>1</sub>/w/o<sub>2</sub> με τη χρήση Tween 20, λεκιθίνης, καζεϊνικού νατρίου και μίγματα αυτών των γαλακτωματοποιητών.

Η παρασκευή σταθερών νανογαλακτωμάτων o/w με βάση το EVOO, χρησιμοποιώντας φυσικούς γαλακτωματοποιητές και μίγματα φυσικών και χημικών γαλακτωματοποιητών, ήταν εφικτή. Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα, προέκυψε ότι το καζεϊνικό νάτριο ως γαλακτωματοποιητής δεν συμβάλλει ιδιαίτερα στη σταθερότητά τους. Αντίθετα, η χρήση της λεκιθίνης ως γαλακτωματοποιητή έδωσε εξίσου καλά αποτελέσματα με το Tween 20 κατά τη διατήρηση των δειγμάτων. Επιπλέον, αν η περιεκτικότητα του ελαίου είναι 5% και 10%, τότε η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή πρέπει να είναι 3% και 8%, αντίστοιχα, για την παρασκευή διαυγών νανογαλακτωμάτων με μεγάλη σταθερότητα και μέση διάμετρο σταγονιδίων μικρότερη των 300 nm. Γενικά, από τους

γαλακτωματοποιητές που δοκιμάστηκαν, το μίγμα Tween 20 και λειθίνης ήταν το καλύτερο σύστημα, με τις μεγαλύτερες απόλυτες τιμές ζ-Δυναμικού. Όσον αφορά τη θερμοκρασία αποθήκευσης, διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα υπό ψύξη είχαν υψηλές τιμές δείκτη πολυδιασποράς ( $ESI > 90\%$ ) και διατήρησαν τις αρχικές μέσες διαμέτρους των σταγονιδίων τους ( $MDD < 500\text{ nm}$ ) κατά τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης. Ακόμα και στην περίπτωση του καζεϊνικού νατρίου ως γαλακτωματοποιητή, η ψύξη αποδείχθηκε ικανή να διατηρήσει τα παρασκευασθέντα νανογαλακτώματα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Από τα νανογαλακτώματα που επιλέχθηκαν για εμπλουτισμό, εκείνο με περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λειθίνης σε περιεκτικότητα 5% κ.β. είχε μικρή τιμή ιζώδους, θολότητας, μέσης διαμέτρου σταγονιδίων και δείκτη πολυδιασποράς. Παράλληλα, η χημική του σταθερότητα ( $RCoQ_{10}\%$ ) ήταν υψηλή και ίση με 85% στις 40 ημέρες αποθήκευσης, ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας διατήρησης (25 °C, 4 °C).

Για την παρασκευή των διπλών γαλακτωμάτων, το νανογαλάκτωμα που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερική φάση ήταν ένα ο<sub>1</sub>/w νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λειθίνης σε περιεκτικότητα 5% κ.β. Όλα τα παρασκευασθέντα διπλά γαλακτώματα ελέγχθηκαν μέσω ενός συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης, καθώς οι περισσότερες από τις αναλυτικές μεθόδους, όπως η περίθλαση με λέιζερ και η δυναμική σκέδαση φωτός, δεν είναι κατάλληλες για τον χαρακτηρισμό πολλαπλών γαλακτωμάτων. Για την απεικόνιση των μεταβολών της μικροδομής στα διάφορα συστήματα, χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό ανάστροφο μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ και οι απεικονίσεις CLSM έδειξαν ότι τόσο η υδατική όσο και η λιπαρή φάση μπορούν να διαφοροποιηθούν με έναν ικανοποιητικό λόγο σήματος προς θόρυβο. Από όλους τους γαλακτωματοποιητές που δοκιμάστηκαν, μόνο το Tween 20 συνέβαλε στο σχηματισμό διπλού γαλακτώματος, απουσία ιζήματος γαλακτωματοποιητή και με καλοσχηματισμένα σταγονίδια.

## *Abstract*

The scope of the present diploma thesis is to investigate and compare the effect of food grade nonionic emulsifier or natural emulsifiers on the formation of extra virgin olive oil-in-water (o/w) nanoemulsions. For comparative purposes Tween 20, sodium caseinate, lecithin and their mixture (Tween 20: sodium caseinate, Tween 20: lecithin, ratio of 1:1) were selected. Their concentration varied from 3% to 10% w/w depending on the dispersed volume fraction of the final nanoemulsion. Initially, it was studied and analyzed the alteration on the physicochemical properties of the samples (mean droplet diameter (MDD), polydispersity index (PDI), zeta potential, viscosity, turbidity and refractive index) as a function of o/w nanoemulsion composition. Moreover, it was investigated and evaluated the effect of environment (25 °C) and refrigerated (4 °C) storage conditions on the nanoemulsion stability during 8 weeks by the measurement of MDD, PDI, zeta potential and emulsion stability index (ESI), on a weekly basis. Based on the above results, the optimum conditions (type and concentration of emulsifier, dispersed volume fraction) were determined in order to produced nanoemulsions fortified with the bioactive compound, Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>). CoQ<sub>10</sub> presents multiple health benefits as an essential molecule for every cell and as an excellent antioxidant compound. However, its oral intake is challenging due to its low water solubility. Thus, oil-in-water (o/w) nanoemulsions are considered excellent delivery systems for CoQ<sub>10</sub>, offering high protection and controlled release of the bioactive compound. The same physicochemical properties of the fortified nanoemulsions were evaluated, after storage either at 25 °C and at 4 °C, during 40 days. In addition, the chemical stability of incorporated CoQ<sub>10</sub> (RCoQ<sub>10</sub>%) was measured. Finally, the study focused on the preparation of oil-in-water-in-oil (o<sub>1</sub>/w/o<sub>2</sub>)-type double emulsions, stabilized using Tween 20, sodium caseinate, lecithin and their mixtures.

The results demonstrated that it is possible to form fine o/w nanoemulsions based on EVOO, using naturals and mixtures of natural and chemical emulsifiers. Statistical analysis of the data revealed that nanoemulsions prepared with sodium caseinate were unstable and phase separation rapidly occurred. However, both lecithin and Tween 20 appeared to form fine nanoemulsions with high kinetic stability during storage. Furthermore, the emulsifiers' concentration must be lower than the dispersed phase concentration, in order to prepare nanoemulsions with high optical clarity, high stability and mean droplet diameter less than 300 nm. The nanoemulsions produced with the mixture of Tween 20 and lecithin presented the highest absolute zeta potential values and high kinetic stability. All the samples, after refrigerated storage, remained in the nanosized range after 8 weeks, with high physical stability ( $MDD < 500\text{ nm}$ ,  $ESI > 90\%$ ). In the case of refrigerated storage, sodium caseinate as an emulsifier proved to be highly affected leading to stable nanoemulsions. Among the coenzyme Q<sub>10</sub>-loaded nanoemulsions, the sample with 5% w/w EVOO and 5% w/w Tween 20/lecithin presented low MDD, PDI, viscosity and

turbidity. Furthermore, its chemical stability (RCoQ<sub>10</sub>%) was above 85% after 40 days storage at both storage conditions (25 °C, 4 °C).

For the formation of o<sub>1</sub>/w/o<sub>2</sub> double emulsions, the composition of the inner o<sub>1</sub>/w nanoemulsion was 5% w/w EVOO and 5% w/w Tween 20/lecithin. All double formations were confirmed upon microscopic investigation, as most of the analytical scattering methods like laser diffraction, ultrasonic attenuation and dynamic light scattering are not well suited for the characterization of multiple emulsions due to multiple scattering on inner droplets. Confocal scanning laser microscopy (CLSM) was used to visualize the microstructure changes among the experimental conditions, and the images clearly demonstrated that both aqueous and lipid phases can be differentiated with a satisfying signal-to-noise ratio. Moreover, CLSM results revealed that only Tween 20 formed a stable double emulsion with well-formed droplets and without emulsifiers' sedimentation.



## Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη .....	5
Abstract.....	7
Εισαγωγή .....	11
<b>1. Θεωρητικό Μέρος.....</b>	<b>13</b>
1.1 Γαλάκτωμα .....	13
1.1.1 Ορισμός.....	13
1.1.2 Ιδιότητες των γαλακτωμάτων.....	16
1.2 Νανογαλάκτωμα .....	22
1.3 Σύγκριση γαλακτωμάτων, μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων.....	24
1.4 Συστατικά Γαλακτώματος .....	25
1.4.1 Λιπαρή Φάση.....	26
1.4.1.1 Ελαιόλαδο .....	27
1.4.2 Υδατική Φάση .....	31
1.4.3 Γαλακτωματοποιητής.....	32
1.4.3.1 Καζεΐνη.....	34
1.4.3.2 Λεκθίνη .....	35
1.4.3.3 Επιφανειοδραστικά μικρού μορίου .....	38
1.4.3.4 Μίγματα Γαλακτωματοποιητών.....	40
1.5 Σχηματισμός νανογαλακτωμάτων .....	40
1.5.1 Παράγοντες σχηματισμού .....	40
1.5.2 Μέθοδοι Παρασκευής .....	41
1.5.2.1 Ομογενοποιητής Υψηλής Ταχύτητας.....	43
1.5.2.2 Ομογενοποιητής Υπερήχων .....	45
1.6 Σταθερότητα .....	46
1.6.1 Θερμοδυναμική Σταθερότητα .....	47
1.6.2 Κινητική Σταθερότητα .....	49
1.6.3 Δείκτες Σταθερότητας .....	50
1.6.3.1 ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) .....	51
1.6.3.2 Μέση Διάμετρος σταγονιδίων (Mean Droplet Diameter, MDD) και Δείκτης Πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI) .....	51
1.6.3.3 Δείκτης Σταθερότητας γαλακτώματος (ESI) .....	51
1.7 Βιοδραστικά Συστατικά.....	52

1.7.1 Συνένζυμο Q <sub>10</sub> .....	52
1.8 Διπλό Γαλάκτωμα .....	56
<b>2. Πειραματικό Μέρος.....</b>	<b>58</b>
2.1 Σκοπός .....	58
2.2 Υλικά και Μέθοδοι .....	59
2.2.1 Πρώτες Ύλες και Αντιδραστήρια.....	59
2.2.2 Συσκευές και Σκεύη .....	59
2.2.3 Πειραματική Διαδικασία .....	60
2.2.4 Αναλύσεις.....	61
2.3 Σχεδιασμός Πειραμάτων.....	67
<b>3. Αποτελέσματα – Συζήτηση .....</b>	<b>70</b>
3.1 Μελέτη των ιδιοτήτων των ναογαλακτωμάτων .....	72
3.1.1 Μη εμπλουτισμένα ναογαλακτώματα .....	72
3.1.1.1 Ιδιότητες των ναογαλακτωμάτων την ημέρα παρασκευής τους .....	72
3.1.1.2 Μελέτη της διατηρησιμότητας των ναογαλακτωμάτων.....	80
3.1.2 Ναογαλακτώματα με το ενσωματωμένο βιοδραστικό συστατικό CoQ <sub>10</sub> .....	100
3.1.2.1 Ιδιότητες των ναογαλακτωμάτων.....	100
3.1.2.2 Μελέτη της διατηρησιμότητας των ναογαλακτωμάτων.....	106
3.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) για τα εμπλουτισμένα ναογαλακτώματα.....	116
3.3 Διπλά Γαλακτώματα .....	120
<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>125</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>129</b>
<b>Παράρτημα .....</b>	<b>135</b>

## Εισαγωγή

Ένας μεγάλος αριθμός τροφίμων είναι εν μέρει ή εξ ολοκλήρου γαλακτώματα, ενώ άλλα τρόφιμα βρίσκονται σε κατάσταση γαλακτώματος ενδιάμεσα κατά την παραγωγή τους. Τέτοια τρόφιμα είναι το γάλα, οι κρέμες, τα ροφήματα και τα ποτά από φρούτα, οι βρεφικές τροφές, οι σούπες, οι ζύμες (cake batters), οι σάλτσες και οι επικαλύψεις (dressings), η μαγιονέζα, η κρέμα γάλακτος, τα επιδόρπια, το παγωτό, οι επαλείψεις (spreads), το βούτυρο και η μαργαρίνη. Τα παραπάνω τρόφιμα εμφανίζουν μία μεγάλη ποικιλία φυσικοχημικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, ως αποτέλεσμα των διαφόρων συστατικών και των συνθηκών επεξεργασίας τους (McClements, 2005).

Για παράδειγμα, το αγελαδινό γάλα είναι ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό, το οποίο αποτελείται από περίπου 3,5% λίπος διεσπαρμένο στην υδατική φάση. Αντίθετα, το βούτυρο είναι ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο που περιέχει έως και 20% νερό διεσπαρμένο στη λιπαρή φάση. Έτσι, ο σχηματισμός ενός φυσικού γαλακτώματος οδηγεί σε βέλτιστη διασπορά και αραίωση των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών. Η παρασκευή των γαλακτωμάτων σε βιομηχανική κλίμακα γίνεται με ανάλογο τρόπο, προκειμένου να βελτιωθεί η επίδραση της εκάστοτε βιοδραστικής ουσίας σε μία εφαρμογή – χρησιμοποιώντας την ουσία αυτή σε μία περισσότερο ή λιγότερο λεπτή διεσπαρμένη φάση, είτε για να ελεγχθούν τυχόν χημικές αντιδράσεις (π.χ. αντιδράσεις χλωρίωσης, πολυμερισμού κ.α.). Σε τέτοιες περιπτώσεις, η εξωτερική φάση λειτουργεί ως παράγοντας μεταφοράς ή/και αραίωσης (Heusch, Ag, & Republic, 2005).

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μία έντονη αύξηση στην ανάπτυξη και κατανάλωση τροφίμων, καθώς και μία τάση της αγοράς για εκμετάλλευση φυσικών τροφίμων με εκπληκτικές ιδιότητες. Έτσι, τόσο στον κλάδο των τροφίμων όσο και της φαρμακευτικής, παρατηρείται η χρήση γαλακτωμάτων για τον εγκλεισμό, την προστασία και την απελευθέρωση βιοδραστικών λιπόφιλων συστατικών (χαμηλή διαλυτότητα στο νερό), όπως νιτρικά, βιταμίνες, αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά. Επιπλέον, τα γαλακτώματα χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση λειτουργικών παραγόντων, όπως γευστικών, χρωστικών, αντιμικροβιακών, μικροθρεπτικών συστατικών και προσθέτων. Τα γαλακτώματα, τα μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως κολλοειδή συστήματα διασποράς, επειδή μπορούν να παρασκευαστούν σχετικά εύκολα, χρησιμοποιώντας απλές διαδικασίες επεξεργασίας, όπως η ανάμιξη και η ομογενοποίηση (Katsouli & Tzia, 2019; Rao & McClements, 2011). Τέλος, συνιστούν έναν αποδοτικό τρόπο μείωσης του λίπους στα τρόφιμα, χωρίς να προκαλούν υποβάθμιση των οργανοληπτικών τους ιδιοτήτων.

Κάθε ένα από αυτά τα συστήματα έχει συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες προσφέρουν πλεονεκτήματα ή μειονεκτήματα για συγκεκριμένες εφαρμογές. Ειδικότερα, τα νανογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα που, συνήθως, αποτελούνται από ένα έλαιο, μία επιφανειοδραστική ουσία και νερό. Επίσης, έχουν μικρό μέγεθος σωματιδίων – με

ακτίνα μικρότερη από τα 100 nm – και έτσι τείνουν να είναι είτε διαφανή είτε απλώς ελαφρώς θολά. Αντίθετα, τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα που αποτελούνται από έλαιο, επιφανειοδραστική ουσία και νερό, αλλά το μέγεθος των σωματιδίων τους είναι μεγαλύτερο – με ακτίνα μεγαλύτερη των 100 nm – και, έτσι, τείνουν να φαίνονται θολά ή αδιαφανή. Επιπλέον, τα νανογαλακτώματα αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα ορισμένων τύπων λιπόφιλων βιοδραστικών ουσιών, οι οποίες είναι εγκλεισμένες εντός αυτών. Επομένως, η ενσωμάτωση των λιπόφιλων δραστικών συστατικών μέσω νανογαλακτωμάτων συμβάλλει, ώστε τα τρόφιμα (π.χ. ορισμένα ενισχυμένα νερά, αναψυκτικά, σάλτσες κ.α.) να παραμένουν διαφανή (McClements, 2012).

Επιπλέον, τα νανογαλακτώματα παρουσιάζουν πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα συμβατικά γαλακτώματα, καθώς είναι πιο σταθερά στη συσσωμάτωση των σωματιδίων και το βαρυτικό διαχωρισμό. Παρέχουν, επίσης, ελεγχόμενη απελευθέρωση των ενσωματωμένων βιοδραστικών ενώσεων συγκριτικά με τα συμβατικά γαλακτώματα, όπου οι εν λόγω ενώσεις απελευθερώνονται αμέσως μετά την ανάμιξή τους με το τρόφιμο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα νανογαλακτώματα, λόγω του μεγέθους σε νανοκλίμακα, αυξάνουν την επιφάνεια του σωματιδίου ανά μάζα και, έτσι, αυξάνουν σημαντικά τη λειτουργικότητα των ενσωματωμένων ενώσεων. Οι ενσωματωμένες ενώσεις – εντός των σταγονιδίων του ελαίου – μπορούν να προστατευθούν από περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διάρκεια των διεργασιών επεξεργασίας (ψύξη, διάτμηση, θέρμανση) και των χημικών αντιδράσεων. Σε αντίθετη περίπτωση, θα επηρεαζόταν αρνητικά η σταθερότητα των γαλακτωμάτων, οδηγώντας σε ανεπιθύμητες αλλοιώσεις της φυσικοχημικής σταθερότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (χρώμα, γεύση, εμφάνιση) του προϊόντος (McClements, 2012; Rao & McClements, 2011).

Η εκτεταμένη εφαρμογή των νανογαλακτωμάτων στη βιομηχανία τροφίμων είναι προς το παρόν περιορισμένη λόγω διαφόρων τεχνικών και πρακτικών λόγων. Πρώτον, υπάρχει περιορισμένος αριθμός επιφανειοδραστικών ουσιών για τη σταθεροποίηση αυτών των συστημάτων. Πολλές από αυτές είναι συνθετικές επιφανειοδραστικές ουσίες, με αποτέλεσμα είτε να μην επιτρέπεται η χρήση τους σε όλες τις χώρες είτε να επιτρέπεται η χρήση τους σε χαμηλά επίπεδα λόγω νομικών, οικονομικών ή ποιοτικών θεμάτων. Δεύτερον, δεν υπάρχει επαρκής έρευνα γύρω από τη σύσταση και τη σταθερότητα συγκεκριμένων συστημάτων κολλοειδούς διασποράς. Και τρίτον, είναι δύσκολη η παρασκευή νανογαλακτωμάτων από πολλά – ευρέως χρησιμοποιούμενα – εδώδιμα έλαια, όπως το ιχθυέλαιο, το αραβοσιτέλαιο και το σογιέλαιο (Rao & McClements, 2011).

# 1. Θεωρητικό Μέρος

## 1.1 Γαλάκτωμα

### 1.1.1 Ορισμός

Η «φάση» είναι μία περιοχή της ύλης, όπου κάθε φυσική ιδιότητα (πυκνότητα, δείκτης διάθλασης, χημική σύσταση κ.α.) είναι ομοιόμορφη. Μία περιοχή του υλικού χαρακτηρίζεται ομοιόμορφη, όταν είναι χημικά ομοιόμορφη, φυσικά διακριτή και συχνά μηχανικά διαχωριζόμενη. Ένα σύστημα ονομάζεται «ετερογενές» όταν αποτελείται από παραπάνω από μία φάσεις, ενώ καλείται «ομογενές» όταν αποτελείται από μία μόνο φάση. Με διαφορετικούς όρους, ετερογενές λέγεται ένα σύστημα στο οποίο παρατηρείται η ύπαρξη διεπιφανειών, ωστόσο στο ομογενές σύστημα δεν παρατηρείται ύπαρξη διεπιφανειών. Οι φάσεις ενός ετερογενούς συστήματος μπορεί να βρίσκονται στην ίδια κατάσταση της ύλης, π.χ. δύο υγρές φάσεις (σύστημα έλαιο-νερό), ή σε διαφορετικές καταστάσεις, π.χ. μία υγρή και μία στερεή φάση (σύστημα πάγος-νερό). Έτσι, προκύπτει η διάκριση των μιγμάτων σε: διαλύματα, αιωρήματα και κολλοειδή.

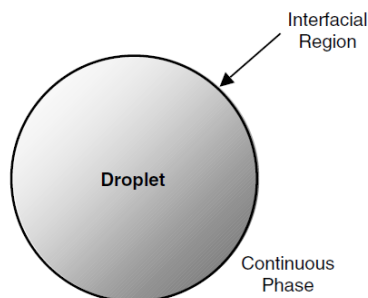
Τα διαλύματα είναι ομογενή μίγματα δύο ή περισσότερων συστατικών και αποτελούνται από μία φάση. Τα συστατικά των διαλυμάτων μπορεί να είναι μόρια ή/και ιόντα, διαμέτρου ίσης με 1 nm ( $10^{-9}$  m) ή μικρότερης. Τα αιωρήματα είναι ετερογενή συστήματα διασποράς με σωματίδια διαμέτρου μεγαλύτερης από 1000 nm ( $10^{-6}$  m). Τα συστατικά ενός αιωρήματος κατανέμονται με μηχανικό τρόπο (ανάδευση, ανακίνηση, ανατάραξη) και, με την πάροδο του χρόνου, τα συστατικά του διαχωρίζονται. Τέλος, τα κολλοειδή συστήματα διασποράς δεν διαχωρίζονται με την πάροδο του χρόνου και τα σωματίδιά τους έχουν διάμετρο από 1 έως 1000 nm. Ένα κολλοειδές σύστημα διασποράς αποτελείται από τη φάση σε διασπορά ή διεσπαρμένη φάση και το μέσο διασποράς ή συνεχή φάση. Οι πολύ μικρές διαστάσεις των σωματιδίων αυτών είναι η αιτία δημιουργίας μίας τεράστιας διεπιφανειακής περιοχής (Levine 2002; Πολυμένης και Λαμπρακόπουλος 2015).

Τα συστήματα διασποράς σχηματίζονται από όλες τις καταστάσεις της ύλης (στερεή, υγρή, αέρια) συνδυαζόμενες ανά δύο, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλοί συνδυασμοί τέτοιων συστημάτων. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι πιθανοί συνδυασμοί διεσπαρμένων ουσιών και μέσων διασποράς μαζί με τις αντίστοιχες ονομασίες των προκύπτόντων συστημάτων.

Διασκορπισμένη ουσία	Μέσο διασποράς	Όνομασία	Παραδείγματα
I. 1. Αέριο 2. Υγρό 3. Στερεό	Αέριο » »	Αερόλυμα Αερόλυμα » ή αιώρημα » » »	Ατμόσφαιρα* Σύννεφα, ομίχλη Καπνός, σκόνη**
II. 4. Αέριο 5. Υγρό 6. Στερεό	Υγρό » »	Υδρόλυμα Αφρός Γαλάκτωμα Αιώρημα	Κρέμα Chantilly { λ.χ. νερό σε λάδι, χρωματισμένο γυαλί AS <sub>2</sub> S <sub>3</sub> σε νερό
III. 7. Αέριο 8. Υγρό 9. Στερεό	Στερεό » »	Στερεόλυμα Στερεός αφρός Λύμα ή πηκτή Στερεό λύμα	H <sub>2</sub> σε Pd Ζελέ, εγκλείσεις

Εικόνα 1.1: Είδη κολλοειδών συστημάτων (Πολυμένης και Λαμπρακόπουλος 2015).

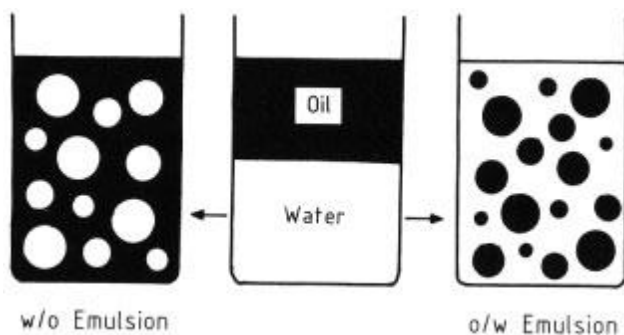
Τα γαλακτώματα είναι συστήματα διασποράς που αποτελούνται από δύο (ή περισσότερα) μη αναμίξιμα ή μερικώς αναμίξιμα υγρά. Το πρώτο υγρό – που συνήθως υπάρχει σε περίσσεια – ονομάζεται κλειστή, συνεχής ή εξωτερική φάση, ενώ το δεύτερο υγρό ονομάζεται εσωτερική ή διεσπαρμένη φάση. Η παρασκευή ενός γαλακτώματος ονομάζεται «γαλακτωματοποίηση» και οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό ονομάζονται «γαλακτωματοποιητές». Εκτός από τους γαλακτωματοποιητές, άλλοι παράγοντες, όπως οι σταθεροποιητές, προστίθενται συχνά σε ένα γαλάκτωμα για την ενίσχυση της γαλακτωματοποίησης. Συνεπώς, σε μία πρώτη προσέγγιση, τα περισσότερα γαλακτώματα μπορούν να θεωρηθούν ότι συνίστανται από τρεις διακριτές περιοχές με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες: το εσωτερικό των σταγονιδίων, τη συνεχή φάση και τη διεπιφάνεια (McClements, 2005).



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση ενός γαλακτώματος.

Η διεσπαρμένη φάση περιβάλλεται από τη συνεχή φάση και διαχωρίζεται από μία διεπιφάνεια (McClements, 2005).

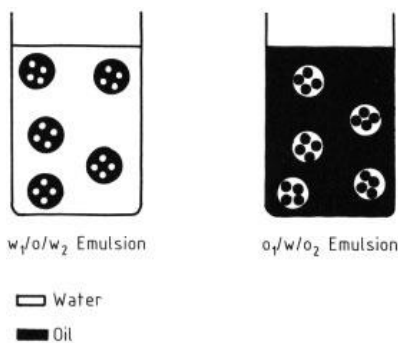
Τα γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την κατανομή των δύο φάσεων. Αν η εξωτερική φάση αποτελείται από νερό και η εσωτερική φάση από ένα οργανικό υγρό (π.χ. έλαιο), τότε χρησιμοποιείται ο όρος «γαλάκτωμα ελαίου σε νερό» (oil-in-water, o/w). Από την άλλη πλευρά, αν η εξωτερική φάση αποτελείται από ένα μη υδατικό υγρό και η εσωτερική φάση από νερό, τότε είναι ένα «γαλάκτωμα νερού σε έλαιο» (water-in-oil, w/o). Εναλλακτικά, στη διεθνή βιβλιογραφία, αναφέρονται συντομογραφίες όπως «L-H» για ένα γαλάκτωμα o/w και «H-L» για ένα γαλάκτωμα w/o. Σημειώνεται ότι τα αρχικά «L» και «H» προέρχονται από τις λέξεις «lipos» και «hygros». Πιο σπάνια, δύο μη υδατικά υγρά γαλακτωματοποιούνται και χρησιμοποιείται ο όρος γαλάκτωμα «ελαίου σε έλαιο» (oil-in-oil, o/o). Αντίστοιχα, αν δύο υδατικές φάσεις σχηματίσουν γαλάκτωμα, τότε περιγράφονται ως γαλάκτωμα «νερού σε νερό» (water-in-water, w/w) (Heusch et al., 2005; McClements, 2005).



**Εικόνα 1.3:** Τύποι γαλακτωμάτων (Αριστερά: γαλάκτωμα νερού σε έλαιο, Δεξιά: γαλάκτωμα ελαίου σε νερό) (Heusch et al., 2005).

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι ο όρος «πολλαπλά γαλακτώματα» (ή «γαλακτώματα πολλών φάσεων») χρησιμοποιείται για να περιγράψει συστήματα στα οποία σταγονίδια νερού είναι ήδη διεσπαρμένα στα σταγονίδια ελαίου ενός γαλακτώματος o/w (γαλάκτωμα w/o/w) ή συστήματα στα οποία σταγονίδια ελαίου είναι διεσπαρμένα στα σταγονίδια νερού ενός γαλακτώματος w/o (γαλάκτωμα o/w/o) ή, σπανιότερα, γαλακτώματα ελαίου-σε-νερό-σε-νερό (o/w/w). Τα προαναφερθέντα γίνονται με ομογενοποίηση ενός γαλακτώματος w/o ή o/w αντίστοιχα, με την παρουσία κατάλληλων επιφανειοδραστικών ουσιών. Τα πολλαπλά γαλακτώματα είναι πολύπλοκα συστήματα, στα οποία συνυπάρχουν γαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (o/w) και νερού-σε-έλαιο (w/o), όπου τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσης περιέχουν ακόμη μικρότερα διεσπαρμένα σταγονίδια. Τα o/w/o γαλακτώματα έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών γαλακτωμάτων o/w, καθώς αποτελούν καλύτερα συστήματα αποδέσμευσης βιοδραστικών λιπιδίων και για τον εγκλεισμό, την προστασία και την απελευθέρωση των υδρόφιλων συστατικών (Heusch et al., 2005).





Εικόνα 1.4: Πολλαπλά γαλακτώματα (Αριστερά: γαλάκτωμα νερού-σε-έλαιο-σε-νερό, Δεξιά: γαλάκτωμα ελαίου-σε-νερό-σε-έλαιο) (Heusch et al., 2005).

### 1.1.2 Ιδιότητες των γαλακτωμάτων

Η σύνθεση και οι ιδιότητες των γαλακτωμάτων ποικίλλουν από περιοχή σε περιοχή, ειδικότερα όταν εξετάζονται στην κλίμακα των νανομέτρων ή των μικρομέτρων. Παρακάτω, παρατίθενται οι κυριότερες ιδιότητες για τα γαλακτώματα.

- Δημιουργία των σταγονιδίων

Ένα γαλάκτωμα μοιάζει με ένα γαλακτώδες και θολό υγρό, όπως το αγελαδινό γάλα. Ωστόσο, αυτή η εικόνα προκύπτει μόνο στην περίπτωση μίας χονδροειδούς διασποράς των σωματιδίων στην εξωτερική φάση, όταν η μέση διάμετρος των σωματιδίων είναι από  $10^{-4}$  έως  $10^{-6}$  m. Τα γαλακτώματα με μέση διάμετρο σωματιδίων  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  m έχουν την τυπική εμφάνιση κolloειδών διαλυμάτων και παρουσιάζουν το φαινόμενο Tyndall<sup>1</sup>. Εάν τα σωματίδια είναι μικρότερα από  $10^{-8}$  m, το γαλάκτωμα είναι εξαιρετικά διασκορπισμένο και πρόκειται για διάλυμα.

Το χρώμα του γαλακτώματος είναι συχνά μία ένδειξη του μεγέθους των σωματιδίων. Εάν η διαφορά στους δείκτες διάθλασης των συστατικών του είναι αρκετά μεγάλη, τα γαλακτώματα με μπλε χρώμα είναι πιο λεπτά διασκορπισμένα από τα κίτρινα ή τα κόκκινα. Επιπλέον, το μέγεθος των σωματιδίων των περισσότερων γαλακτωμάτων δεν είναι ομοιόμορφο. Έτσι, ανάλογα με την κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων, το γαλάκτωμα χαρακτηρίζεται «μονοδιασπαρμένο» – αν έχει ένα ομοιόμορφο μέγεθος σταγονιδίων – ή «πολυδιασπαρμένο». Το ιδανικό μέγεθος των σωματιδίων εξαρτάται από τις διαθέσιμες μεθόδους παρασκευής, καθώς και τη βιομηχανική εφαρμογή του γαλακτώματος. Εντούτοις, τα περισσότερα γαλακτώματα που παρασκευάζονται βιομηχανικά είναι πολυδιασπαρμένα.

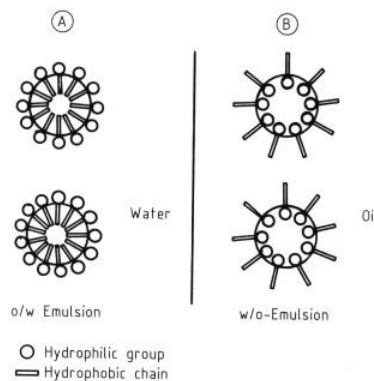
<sup>1</sup> Φαινόμενο Tyndall: Αν το προς εξέταση μίγμα φωτιστεί, τότε το φως θα περάσει με αποκλίσεις από αυτό, δηλαδή θα παρατηρηθούν σημαντικά φαινόμενα σκέδασης. Αυτό συμβαίνει λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους των σωματιδίων του κolloειδούς συστήματος. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «φαινόμενο Tyndall».



- Διεπιφάνεια των σταγονιδίων

Μετά το σχηματισμό των σταγονιδίων, είναι πιθανή είτε η σύγκρουσή τους είτε η συγκόλλησή τους, εάν συγκρουστούν. Έτσι, για την αποφυγή των προαναφερθέντων, προστίθενται γαλακτωματοποιητές, ενώ για τη διατήρηση των γαλακτωμάτων γίνεται προσθήκη σταθεροποιητών.

Τα μόρια πολικών γαλακτωματοποιητών στα o/w γαλακτώματα συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής φάσης, προκειμένου οι υδρόφιλες ομάδες τους να είναι σε επαφή με το νερό και οι υδρόφοβες ομάδες τους με την οργανική φάση αντίστοιχα. Ως απόρροια, δημιουργείται μία διεπιφάνεια, η οποία προσροφά μόρια γαλακτωματοποιητή. Αντίθετα, στα w/o γαλακτώματα χρησιμοποιούνται μη πολικοί γαλακτωματοποιητές. Συνεπώς, στην περίπτωση ενός γαλακτώματος o/w, οι υδρόφοβες υδρογονανθρακικές αλυσίδες περιέχονται στην εσωτερική φάση, ενώ στην περίπτωση του γαλακτώματος w/o περιέχονται στην εξωτερική φάση.



**Εικόνα 1.5:** Σχηματισμός διεπιφάνειας γαλακτωματοποιητή σε γαλάκτωμα o/w (A) και σε γαλάκτωμα w/o (B) (Heusch et al., 2005).

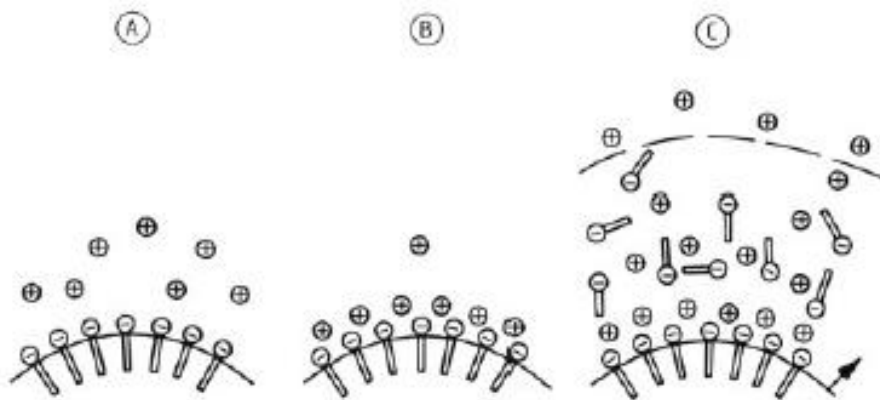
Το πάχος του στρώματος προσρόφησης που περιβάλλει τα σταγονίδια του γαλακτώματος εξαρτάται από το σύστημα και τη συγκέντρωση των συστατικών. Λίγοι γαλακτωματοποιητές σχηματίζουν ένα μονομοριακό οριακό στρώμα, ενώ κατά κανόνα δημιουργούνται πολλαπλά στρώματα.

- Φορτίο των σταγονιδίων

Εκτός από το μέγεθος των σταγονιδίων, το ηλεκτρικό φορτίο των σταγονιδίων παίζει καθοριστικό ρόλο στις διεργασίες γαλακτωματοποίησης και σταθεροποίησης. Αν σχηματιστεί μηχανικά ένα γαλάκτωμα δύο φάσεων, προκύπτει μία μετρήσιμη διαφορά ζ-Δυναμικού (zeta potential) μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής φάσης. Στα περισσότερα o/w γαλακτώματα, τα σταγονίδια ελαίου είναι αρνητικά φορτισμένα. Όταν χρησιμοποιούνται γαλακτωματοποιητές, η συσσώρευση επιφανειοδραστικών μορίων στην επιφάνεια των σταγονιδίων έχει ως αποτέλεσμα πρόσθετη ή αντίστροφη φόρτιση.

Οι ιοντικοί γαλακτωματοποιητές αλλάζουν πολύ το φορτίο, οι ανιοντικοί γαλακτωματοποιητές εντείνουν το αρνητικό φορτίο των σταγονιδίων του ελαίου σε ένα ο/w γαλάκτωμα και οι κατιονικοί γαλακτωματοποιητές προκαλούν αναστροφή του φορτίου. Τελικά, προκύπτει το φορτίο της επιφάνειας των σταγονιδίων, η οποία αντιτίθεται στη συνένωση. Το ηλεκτρικό φορτίο των σταγονιδίων σε γαλακτώματα ο/w είναι γενικά μεγαλύτερο από αυτό των γαλακτωμάτων w/o.

Η φόρτιση των σταγονιδίων παρουσιάζεται διαγραμματικά παρακάτω. Στο διάλυμα, ο γαλακτωματοποιητής διαχωρίζεται (Εικόνα Α) και η επιφάνεια των σταγονιδίων του ελαίου φορτίζεται, πρώτα, αρνητικά από τα ανιόντα του γαλακτωματοποιητή. Στη συνέχεια, τα κατιόντα έλκονται από την αρνητικά φορτισμένη διεπιφάνεια και δεσμεύονται, δημιουργώντας ένα ηλεκτρικό διπλό στρώμα, που ονομάζεται στρώμα Helmholtz (Εικόνα Β). Έτσι, έλκονται και άλλα ιόντα από το ηλεκτρικά ουδέτερο διάλυμα, σχηματίζοντας ένα «νέφος» διάχυτων ιόντων που ονομάζεται stern layer (Εικόνα C). Υπό αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση των θετικών ιόντων μειώνεται όσο μεγαλώνει η απόσταση από τη διεπιφάνεια. Η διαφορά δυναμικού μεταξύ των σταγονιδίων και του διαλύματος συμβολίζεται με τέσσερα ηλεκτρόνια (όπως φαίνεται στην Εικόνα C) και ονομάζεται ζ-Δυναμικό (Heusch et al., 2005).



**Εικόνα 1.6:** Φόρτιση των σταγονιδίων του γαλακτώματος και δημιουργία ζ-Δυναμικού. Α) Σχηματισμός της διεπιφάνειας. Β) Σχηματισμός του ηλεκτρικού διπλού στρώματος Helmholtz. C) Σχηματισμός του stern layer. (Heusch et al., 2005)

- Διεπιφανειακή Τάση

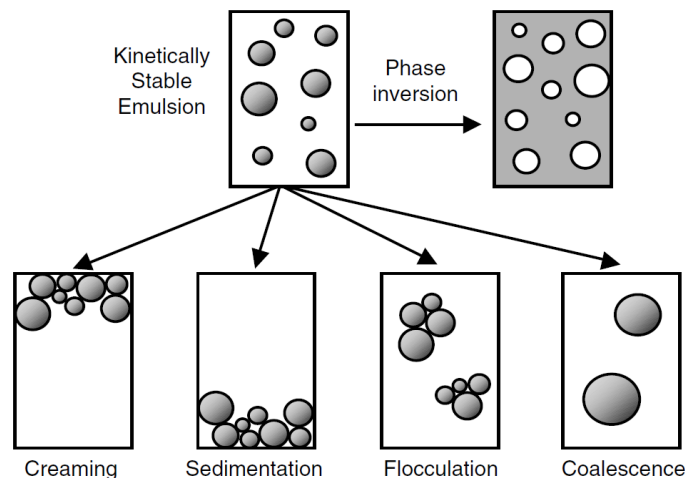
Η συσσώρευση ενός γαλακτωματοποιητή στη διεπιφάνεια μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής φάσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης μεταξύ των φάσεων. Σε ένα σύστημα δύο φάσεων, όσο ταχύτερα μειώνεται η διεπιφανειακή τάση στη χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωση τόσο αποτελεσματικότερος είναι και ο γαλακτωματοποιητής. Για να επιτευχθεί αυτό, τα μόρια του γαλακτωματοποιητή πρέπει να «φθάσουν» από την εξωτερική φάση του γαλακτώματος – στην οποία και έχουν διαλυθεί – στη διεπιφάνεια όσο το δυνατόν γρηγορότερα (φαινόμενο διάχυσης) και να προσροφηθούν σε αυτήν (φαινόμενο προσρόφησης) (Heusch et al., 2005).

- Αλληλεπιδράσεις των σταγονιδίων

Πολλές από τις φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων τροφίμων επηρεάζονται έντονα από τις ελκτικές και απωστικές αλληλεπιδράσεις που ενεργούν μεταξύ των σταγονιδίων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σταγονιδίων του γαλακτώματος μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλες αλλαγές στη σταθερότητα, τη ρεολογία, την εμφάνιση και τη γεύση των γαλακτωμάτων τροφίμων, και έτσι είναι σημαντικό να κατανοηθεί η φυσικοχημική τους προέλευση και να μελετηθούν οι ιδιότητές τους. Υπάρχουν πολύ διαφορετικά είδη κολλοειδών αλληλεπιδράσεων που μπορεί να εμφανιστούν στα γαλακτώματα τροφίμων, όπως αλληλεπιδράσεις τύπου van der Waals, ηλεκτροστατικές, στερεοχημικές, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κ.α. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές διαφέρουν ως προς τη φύση τους (ελκτικές ή απωστικές), την ισχύ τους (ισχυρές ή ασθενείς) και το εύρος τους (μεγάλο ή μικρό) (Κατσούλη, 2015).

- Σταθερότητα του γαλακτώματος

Ο όρος «σταθερότητα γαλακτώματος» περιγράφει την ικανότητα ενός γαλακτώματος να αντιστέκεται στις αλλαγές των ιδιοτήτων του με το χρόνο. Παρόλα αυτά, διάφοροι φυσικοχημικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για αυτές τις μεταβολές. Προτού αναπτυχθούν αποτελεσματικές στρατηγικές για τη βελτίωση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων, κρίνεται απαραίτητο να προσδιοριστούν οι σημαντικότεροι μηχανισμοί αποσταθεροποίησης του συστήματος. Οι πιο κοινί φυσικοί μηχανισμοί αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων τροφίμων φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

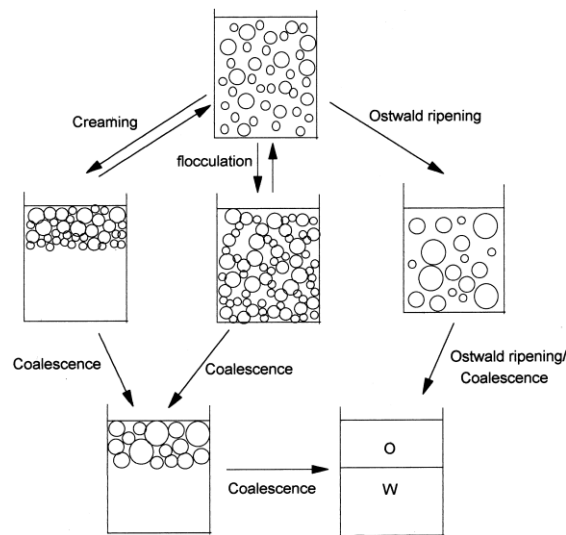


Εικόνα 1.7: Μηχανισμοί αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων (McClements, 2005).

Η δημιουργία κρέμας (creaming) και η καθίζηση (sedimentation) είναι οι δύο μορφές βαρυντικού διαχωρισμού των γαλακτωμάτων. Αναλυτικότερα, κατά τη δημιουργία κρέμας, παρατηρείται ανοδική κίνηση των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος λόγω της

μικρότερης πυκνότητάς τους από την εξωτερική φάση. Αντίθετο φαινόμενο παρατηρείται κατά την καθίζηση, όπου η καθοδική κίνηση των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος οφείλεται στη μεγαλύτερη πυκνότητά τους από την εξωτερική φάση.

Η κροκίδωση (flocculation) και η συνένωση (coalescence) είναι οι δύο μορφές συσσωμάτωσης των σταγονιδίων. Η μεν κροκίδωση εμφανίζεται όταν δύο ή περισσότερα σταγονίδια έρχονται σε επαφή και σχηματίζουν ένα ενιαίο μεγαλύτερο σταγονίδιο. Σε αυτήν την περίπτωση, τα σταγονίδια διατηρούν την ακεραιότητά τους. Η δε συνένωση, παρατηρείται όταν δύο ή περισσότερα σταγονίδια συγχωνεύονται και σχηματίζουν ένα μόνο μεγαλύτερο σταγονίδιο. Η εκτεταμένη συνένωση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μίας ξεχωριστής στρώσης/στοιβάδας ελαίου στην κορυφή του γαλακτώματος, που είναι γνωστή ως «oiling off».



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων (Taylor, 1998).

Ένας ακόμη μηχανισμός αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων είναι η ωρίμανση κατά Ostwald ή αναστροφή φάσης, κατά την οποία ένα γαλάκτωμα o/w μετατρέπεται σε γαλάκτωμα w/o, ή αντίστροφα. Σε αυτό το φαινόμενο, μεγάλο ρόλο παίζει η διάχυση των μορίων της διεσπαρμένης φάσης μέσω της συνεχούς φάσης. Πιο συγκεκριμένα, τα μεγαλύτερα σταγονίδια αναπτύσσονται εις βάρος των μικρότερων σταγονιδίων λόγω της μεταφοράς μάζας στη διεσπαρμένη φάση μέσω της συνεχούς φάσης.

Οι μηχανισμοί αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων μπορούν να δράσουν συνεργιστικά, προκαλώντας ο ένας τον άλλον. Εκτός από τους φυσικούς μηχανισμούς αποσταθεροποίησης, υπάρχουν διάφορες χημικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές διεργασίες που μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων. Ενδεικτικά αναφέρονται η οξείδωση λιπιδίων, η υδρόλυση ενζύμων και η ανάπτυξη βακτηρίων (McClements, 2005; Robins, Watson, & Wilde, 2002; Taylor, 1998).

- Οπτική Εμφάνιση του γαλακτώματος

Η οπτική εμφάνιση των γαλακτωμάτων εξαρτάται από δύο παραμέτρους: το είδος των συστατικών, δηλαδή το χρώμα και τη διαφορά που παρουσιάζουν στις τιμές του δείκτη διάθλασης, και το μέγεθος των διεσπαρμένων σταγονιδίων. Ένα γαλάκτωμα είναι αδιαφανές και συνήθως αποκτά το χρώμα της συνεχούς φάσης, όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι μεταξύ 0,5 και 5 μm και παρουσιάζει σημαντική διαφορά στο δείκτη διάθλασης της συνεχούς και της ασυνεχούς φάσης. Ένα γαλάκτωμα είναι διαφανές, είτε όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι της τάξης των nm και μάλιστα μικρότερο από το μήκος κύματος του ορατού φωτός (400-700 nm), είτε όταν οι δύο φάσεις του γαλακτώματος έχουν τον ιδανικό δείκτη διάθλασης (Georgalaki, Sotiroudis, & Xenakis, 1998).

- Αγωγιμότητα του γαλακτώματος

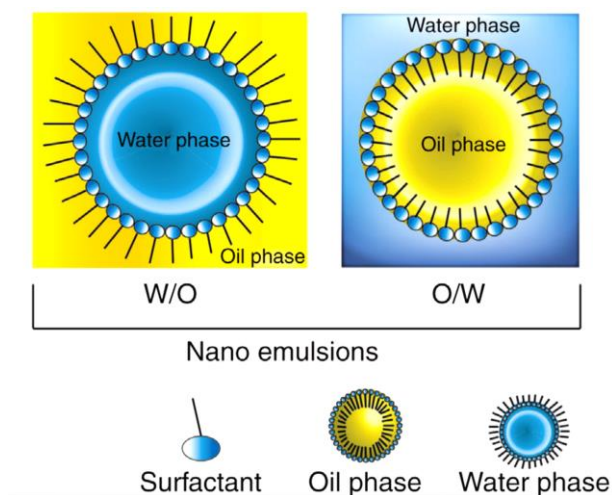
Η μέτρηση της αγωγιμότητας θεωρείται μία ακόμη μέθοδος για την αναγνώριση του είδους του γαλακτώματος. Η αγωγιμότητα ενός γαλακτώματος εξαρτάται από την αγωγιμότητα της συνεχούς φάσης. Έτσι ένα γαλάκτωμα έλαιο-σε-νερό είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού, ενώ ένα γαλάκτωμα νερού-σε-έλαιο είναι κακός αγωγός αντίστοιχα.

- Ιξώδες του γαλακτώματος

Το ιξώδες ενός γαλακτώματος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Πρώτον, το ιξώδες ενός γαλακτώματος είναι, συνήθως, όμοιο με το ιξώδες της συνεχούς φάσης. Δεύτερον, η αναλογία συνεχούς και ασυνεχούς φάσης επηρεάζει το ιξώδες του γαλακτώματος. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της συγκέντρωσης της ασυνεχούς φάσης σε σχέση με τη συνεχή προκαλεί αύξηση του ιξώδους, και η αύξηση του όγκου της ασυνεχούς φάσης προκαλεί αύξηση του φαινόμενου ιξώδους. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από τη συγκέντρωση μεγάλου αριθμού σωματιδίων στο γαλάκτωμα. Τρίτον, η μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων προκαλεί μία μικρή αύξηση του ιξώδους του γαλακτώματος. Και τέταρτον, το ιξώδες ενός γαλακτώματος εξαρτάται άμεσα από τον τύπο και τη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή (Hidalgo, Alaiiz, & Zamora, 2001).

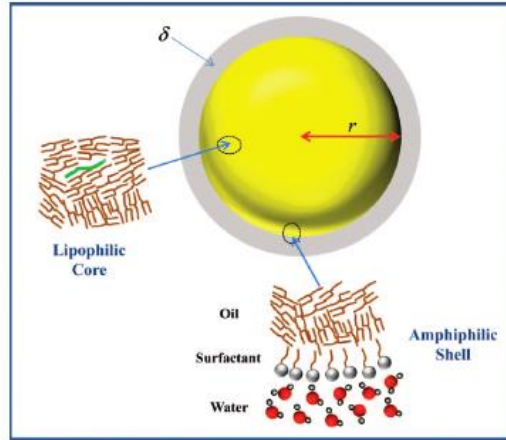
## 1.2 Νανογαλάκτωμα

Ένα νανογαλάκτωμα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συμβατικό γαλάκτωμα με εξαιρετικά μικρό μέγεθος σταγονιδίων. Τα νανογαλακτώματα έχουν οριστεί ως γαλακτώματα με μέση διάμετρο σταγονιδίων 10-500 nm από τους περισσότερους ερευνητές (Ghosh, Mukherjee, & Chandrasekaran, 2013; Rashidi & Khosravi-Darani, 2011; Tang, Manickam, Wei, & Nashiru, 2012), ενώ άλλοι ερευνητές (McClements & Rao, 2011) αναφέρουν εύρος διαμέτρου 10-100 nm. Το πολύ μικρό μέγεθος των σταγονιδίων εξασφαλίζει πολύ μεγαλύτερη σταθερότητα έναντι του βαρυτικού διαχωρισμού (McClements & Rao, 2011). Τα νανογαλακτώματα παρουσιάζουν θερμοδυναμική αστάθεια, αλλά υψηλή κινητική σταθερότητα και οπτική διαύγεια (Polychniatou & Tzia, 2018). Επιπλέον, εμφανίζουν μεγάλη αντίσταση στο βαρυτικό διαχωρισμό (δημιουργία κρέμας ή/και καθίζηση) και στη συσσωμάτωση (συνένωση ή/και κροκίδωση). Παρόλα αυτά, τα νανογαλακτώματα είναι ευαίσθητα στην ωρίμανση κατά Ostwald εξαιτίας του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων τους (Katsouli, Giannou, & Tzia, 2018).



Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση νανογαλακτωμάτων νερού-σε-έλαιο, w/o (αριστερά) και ελαίου-σε-νερό, o/w (δεξιά) (Jafari, Paximada, Mandala, Assadpour, & Mehrnia, 2017).

Τα νανογαλακτώματα μπορεί να είναι τύπου έλαιο-σε-νερό (o/w) ή νερό-σε-έλαιο (w/o), αν το έλαιο διασκορπίζεται ως σταγονίδια σε νερό ή το αντίστροφο. Ένα νανογαλάκτωμα «ελαίου σε νερό» ορίζεται ως μία θερμοδυναμικά ασταθής κολλοειδής διασπορά αποτελούμενη από δύο μη αναμίξιμα υγρά, με το έλαιο να διασκορπίζεται ως μικρά σφαιρικά σταγονίδια στο νερό. Η σταγόνα του ελαίου περιβάλλεται από μία διεπιφάνεια, σχηματιζόμενη από το γαλακτωματοποιητή, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



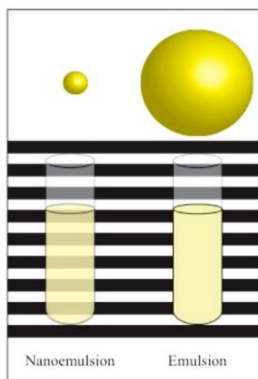
**Εικόνα 1.10:** Σχηματική απεικόνιση της δομής της εσωτερικής φάσης του ελαίου και της επιφανειοδραστικής ουσίας σε ένα νανογαλάκτωμα o/w (McClements & Rao, 2011).

Τα μόρια σε ένα νανογαλάκτωμα κατανέμονται μεταξύ των τριών περιοχών (συνεχής φάση, διεσπαρμένη φάση, διεπιφάνεια) ανάλογα με τη συγκέντρωση και την πολικότητά τους. Ειδικότερα, τα μη πολικά μόρια τείνουν να βρίσκονται κυρίως στην ελαιώδη φάση, τα πολικά μόρια στην υδατική φάση και τα αμφίφυλα μόρια στη διεπιφάνεια. Ακόμη και όταν το σύστημα βρίσκεται σε ισορροπία, υπάρχει μία συνεχής ανταλλαγή μορίων μεταξύ των διαφόρων περιοχών. Τα μόρια μπορούν, επίσης, να κινούνται από τη μία περιοχή στην άλλη, όταν υπάρχει κάποια μεταβολή στις περιβαλλοντικές συνθήκες του νανογαλακτώματος, για παράδειγμα μία αλλαγή της θερμοκρασίας. Η θέση και η μαζική μεταφορά των μορίων μέσα σε ένα νανογαλάκτωμα έχει σημαντική επίδραση στη γεύση και τη φυσικοχημική σταθερότητα των τροφίμων (McClements, 2005).

Ένα νανογαλάκτωμα μπορεί να σχηματιστεί από έλαιο και νερό χωρίς τη χρήση κάποιας επιφανειοδραστικής ουσίας. Στην πράξη, αυτό το σύστημα θα ήταν εξαιρετικά ασταθές, οπότε και απαιτείται μία επιφανειοδραστική ουσία για να διευκολύνει το σχηματισμό του νανογαλακτώματος και να εξασφαλίσει την κινητική του σταθερότητα κατά την αποθήκευση. Ορισμένες φορές, χρησιμοποιείται ένα μίγμα επιφανειοδραστικών ουσιών για τη δημιουργία και τη σταθεροποίηση των νανογαλακτωμάτων. Επομένως, ένα νανογαλάκτωμα παρασκευάζεται, συνήθως, χρησιμοποιώντας τα ίδια συστατικά όπως σε ένα γαλάκτωμα: έλαιο, νερό, επιφανειοδραστική ουσία και, πιθανώς, τασιενεργή ουσία (McClements, 2012). Τέλος, η μικρή διάμετρος των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων τα καθιστά εξαιρετικά συστήματα με υψηλή στοματική βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα και είναι κατάλληλα για την ενθυλάκωση υδρόφιλων και λιπόφιλων συστατικών, ανάλογα με τον τύπο τους. Παράλληλα, χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο της ποιότητας, της γεύσης και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των προϊόντων (Waraho, McClements, & Decker, 2011).



### 1.3 Σύγκριση γαλακτωμάτων, μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων



Εικόνα 1.11: Σχηματική απεικόνιση που συγκρίνει την εμφάνιση και το μέγεθος των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων και των νανογαλακτωμάτων (Walker, 2015).

Τα συμβατικά γαλακτώματα τείνουν να είναι οπτικά θολά ή αδιαφανή, επειδή τα σταγονίδια τους έχουν παρόμοιες διαστάσεις με το μήκος κύματος του φωτός ( $r \approx \lambda$ ) και, έτσι, διαχέουν το φως. Ωστόσο, η διαφορά του δείκτη διάθλασης μεταξύ του ελαίου και του νερού δεν πρέπει να πλησιάζει στο μηδέν. Το σχετικά μικρό μέγεθος σωματιδίων συγκριτικά με το μήκος κύματος του φωτός ( $r \ll \lambda$ ) εξηγεί τη διαφανή ή ελαφρώς θολή εμφάνιση των νανογαλακτωμάτων (παρόμοια με τα μικρογαλακτώματα), αφού διαχέουν το φως. Επιπλέον, αυτά τα συστήματα εξακολουθούν να είναι θερμοδυναμικά ασταθή, οπότε και τείνουν να καταρρεύσουν με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα, ένα μικρογαλάκτωμα είναι ένα θερμοδυναμικά σταθερό σύστημα με σωματίδια διαμέτρου 10 έως 100 nm. Σε αυτή την περίπτωση, η ελεύθερη ενέργεια του μικρογαλακτώματος είναι χαμηλότερη από αυτή των συστατικών του - αν ήταν διαχωρισμένα - οπότε και σχηματίζεται αυθόρμητα. Έτσι, παρασκευάζονται πιο εύκολα από τα νανογαλακτώματα και τα γαλακτώματα, ενώ απαιτούν μεγάλες συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικών ουσιών, οπότε και η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη. Εντούτοις, σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να υπάρξουν κινητικοί φραγμοί, πράγμα που σημαίνει ότι κάποια ενέργεια (π.χ. ανάδευση) πρέπει να εισαχθεί στο σύστημα πριν σχηματιστεί το μικρογαλάκτωμα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ένα μικρογαλάκτωμα είναι θερμοδυναμικά σταθερό μόνο σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. σύσταση, θερμοκρασία, κ.α.), ενώ σε περίπτωση μεταβολής αυτών των συνθηκών το μικρογαλάκτωμα μπορεί να μην είναι πλέον θερμοδυναμικά σταθερό και να έχει μετατραπεί σε ένα άλλο είδος συστήματος (π.χ. διαχωρισμένες φάσεις, ασυνεχές σύστημα, νανογαλάκτωμα ή συμβατικό γαλάκτωμα). Παρόλα αυτά, αν το σύστημα επανέλθει στις αρχικές του συνθήκες, τότε το σύστημα θα έχει και πάλι τη δομή του μικρογαλακτώματος. Τα μικρογαλακτώματα είναι συνήθως διαφανή, επειδή το μέγεθος των σωματιδίων είναι πολύ μικρότερο από το μήκος κύματος του φωτός ( $r \ll \lambda$ ), οπότε η σκέδαση του φωτός είναι ασθενής (McClements, 2005, 2012; Polychniatou & Tzia, 2018; Rao &



McClements, 2011). Στον Πίνακα 1.1, παρατίθενται συγκεντρωτικά οι κυριότερες ιδιότητες των γαλακτωμάτων σε σχέση με τα μικρο- και νανο-γαλακτώματα.

**Πίνακας 1.1:** Σύγκριση των ιδιοτήτων των γαλακτωμάτων, μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων (McClements, 2005, 2012; McClements & Rao, 2011).

	Γαλάκτωμα	Μικρογαλάκτωμα	Νανογαλάκτωμα
Μέγεθος Σταγονιδίων	0,1 έως 100 μm	10 έως 100 nm	10 έως 100 nm ή 10 έως 500 nm (ανάλογα με τον ερευνητή)
Θερμοδυναμική Σταθερότητα	Ασταθές	Σταθερό	Ασταθές
Κινητική Σταθερότητα	Χαμηλή	Υψηλή	Υψηλή
Θολότητα	Αδιαφανή/ Οπτικά Θολά	Διαφανή	Διαφανή/ Ελαφρώς Θολά
Ιξώδες	Μη νευτωνικά, συνήθως υψηλό	Νευτωνικά, εξαρτάται από τη συνεχή φάση	Νευτωνικά, εξαρτάται από τη συνεχή φάση

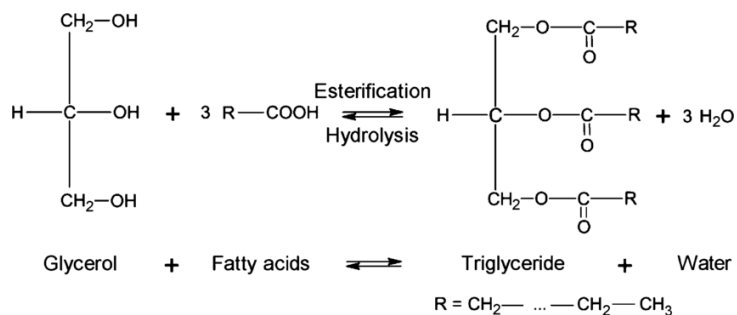
## 1.4 Συστατικά Γαλακτώματος

Βασικά συστατικά ενός γαλακτώματος αποτελούν η λιπαρή και η υδατική φάση. Είναι γνωστό πως, αν αναδευτεί καθαρό έλαιο με νερό, τότε σχηματίζεται προσωρινής φύσης γαλάκτωμα που σύντομα διαχωρίζεται στα συστατικά του. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης μεταξύ της γαλακτωματοποιημένης κατάστασης και της μη γαλακτωματοποιημένης κατάστασης. Για να δημιουργηθεί ένα γαλάκτωμα, σταθερό για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι απαραίτητη η χρήση ενός γαλακτωματοποιητή που επεμβαίνει δημιουργώντας μία υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης και αποτρέποντας την αστάθεια. Ο γαλακτωματοποιητής προσροφάται στην επιφάνεια των σταγονιδίων που έχουν ήδη σχηματιστεί και δημιουργείται μία «προστατευτική μεμβράνη» που τα αποτρέπει να συνενωθούν. Επίσης, ως πρόσθετα, εκτός από τους γαλακτωματοποιητές, αναφέρονται και οι τροποποιητές υφής, με αποτελέσματα ανάλογα με εκείνα των γαλακτωματοποιητών. Οι τροποποιητές υφής παρεμβαίνουν, αυξάνοντας το ιξώδες της συνεχούς φάσης ή σχηματίζοντας μία πηκτή (gel) έτσι, ώστε τα σταγονίδια να έχουν χαμηλότερη συχνότητα συγκρούσεων μεταξύ τους και επομένως μικρότερη τάση για συνένωση (McClements, 2005).

### 1.4.1 Λιπαρή Φάση

Τα λίπη και έλαια ή λιπαρά σώματα αποτελούν μέρος μίας ομάδας ενώσεων, γνωστή ως λιπίδια, ενώ είναι μία κατηγορία βασικών θρεπτικών συστατικών των τροφίμων. Εξ ορισμού, τα λιπίδια είναι ενώσεις διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, αλλά αδιάλυτες ή ελάχιστα διαλυτές στο νερό. Συνεπώς, τα λιπίδια παρουσιάζουν έντονη υδροφοβικότητα. Τα λιπίδια περιέχουν μεγάλο αριθμό – διαφορετικού τύπου – μορίων, όπως είναι οι ακυλογλυκερόλες (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια), τα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια. Τα τριγλυκερίδια είναι τα συχνότερα απαντώμενα λιπίδια στα τρόφιμα. Ανάλογα με την προέλευσή τους, τα τριγλυκερίδια διακρίνονται σε φυτικά ή ζωικά, π.χ. φυτικά λίπη (βούτυρο κακάο), φυτικά έλαια (ελαιόλαδο, βαμβακέλαιο, σογιέλαιο, αραβοσιτέλαιο), ζωικά λίπη (βούτυρο γάλακτος), έλαια ψαριών (ιχθυέλαιο). Παράλληλα, καλούνται «λίπη» όταν είναι στερεά ή ημιστερεά και «έλαια» όταν είναι υγρά, σε θερμοκρασία δωματίου (McClements 2005; Τζιά, Ταούκης, και Ωραιοπούλου 2009).

Λόγω της υψηλής αφθονίας τους και των ιδιοτήτων τους, τα διάφορα είδη εδωδιμων ελαίων – όπως είναι το ελαιόλαδο, το ηλιέλαιο, το αραβοσιτέλαιο, το πυρηνέλαιο – αποτελούν τη λιπαρή φάση των γαλακτωμάτων. Τούτη βρίσκεται με τη μορφή τριγλυκεριδίων, ενώ περιέχει μικρές ποσότητες από διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια, πολικά λιπίδια, και ελεύθερα λιπαρά οξέα.



Εικόνα 1.12: Σχηματισμός του τριγλυκεριδίου (Tenbohlen & Koch, 2010).

Τα λιπίδια επηρεάζουν τις διατροφικές, οργανοληπτικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων, αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας και τα βασικά θρεπτικά συστατικά στην ανθρώπινη διατροφή. Η οσμή-γεύση (flavor<sup>2</sup>), η σταθερότητα, η ρεολογία, η εμφάνιση και το θρεπτικό περιεχόμενο ενός γαλακτώματος τροφίμων επηρεάζονται άμεσα από τον τύπο και τη συγκέντρωση των λιπιδίων. Επιπλέον, τα λιπίδια υφίστανται ποικίλες χημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης των τροφίμων που είναι είτε επιθυμητές είτε επιβλαβείς για το flavor του προϊόντος.

<sup>2</sup> Ο όρος «flavor» αποδίδεται στα ελληνικά ως οσμή-γεύση και περιλαμβάνει όλα τα χαρακτηριστικά οσμής και γεύσης του τροφίμου που γίνονται αντιληπτά από το άτομο κατά το μάσημα.

Η υπερκατανάλωση ορισμένων τύπων λιπιδίων (λόγω χοληστερόλης, κορεσμένων λιπαρών, trans λιπαρών οξέων) έχει συνδεθεί με την παχυσαρκία, τις καρδιαγγειακές παθήσεις, το διαβήτη και τον καρκίνο. Ωστόσο, η υποκατανάλωση ορισμένων τύπων πολυακόρεστων λιπιδίων μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση καρδιακών παθήσεων, διαβήτη, καρκίνου και στη δυσκολία ανάπτυξης του εγκεφάλου. Κατά συνέπεια, η βιομηχανία τροφίμων προσπαθεί να μειώσει τη συνολική περιεκτικότητα σε λιπαρά πολλών τροφίμων και την αναλογία των ανεπιθύμητων λιπιδίων εντός της λιπαρής φάσης των γαλακτωμάτων, βρίσκοντας τη «χρυσή τομή» στο παραπάνω πρόβλημα (McClements, 2005).

Η λιπαρή φάση θεωρείται κρίσιμη για την παρασκευή των γαλακτωμάτων, καθώς επηρεάζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Η σύνθεση της λιπαρής φάσης μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο του ελαίου και των λιποδιαλυτών συστατικών (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια, αντιοξειδωτικά, ορυκτέλαια, πρόσθετα γεύσης, αιθέρια έλαια, βιταμίνες). Αφενός, οι υδρόφοβες βιοδραστικές ενώσεις που θα ενσωματωθούν στη λιπαρή φάση του γαλακτώματος ο/w θα επηρεάσουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος, αφετέρου η επιλογή αυτών των ενώσεων εξαρτάται άμεσα από την επιλογή του ελαίου (Katsouli & Tzia, 2019).

Η λιπαρή φάση των γαλακτωμάτων αποτελείται από διάφορα είδη ελαίων όπως ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πυρηνέλαιο και άλλα πολλά.

#### *1.4.1.1 Ελαιόλαδο*

Τα ακατέργαστα βρώσιμα έλαια – που προέρχονται από τους ελαιούχους σπόρους, τα φρούτα και τους λιπώδεις ιστούς των ζώων – εξάγονται με πίεση, με σκοπό το διαχωρισμό του ακατέργαστου ελαίου από το στερεό προϊόν. Τα φυσικά ακατέργαστα έλαια, μολονότι αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια δεν θεωρούνται ως ομοιογενή μίγματα, δεδομένου ότι ίχνη νερού και πολλών δευτερευόντων μικροσυστατικών μεταφέρονται από τους σπόρους, τα φρούτα και τους ιστούς εντός του ελαίου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής του. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα ακατέργαστα έλαια, με εξαίρεση κυρίως το παρθένο ελαιόλαδο, δεν θεωρούνται συνήθως βρώσιμα μέχρι τα δευτερεύοντα συστατικά τους να απομακρυνθούν μέσω διαφορετικών χημικών και φυσικών διεργασιών εξευγενισμού. Έτσι, το ελαιόλαδο θεωρείται ανώτερο από τα άλλα φυτικά έλαια, δεδομένου ότι μπορεί να καταναλωθεί χωρίς προηγούμενη επεξεργασία, γεγονός που του προσδίδει μοναδικά χαρακτηριστικά (Georgalaki et al., 1998; Κατσούλη, 2015).

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα παλαιότερα γνωστά φυτικά έλαια και εξάγεται από τον καρπό της ελιάς *Olea europaea*. Το ελαιόλαδο, βασικό μέρος της διατροφής στις περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο Θάλασσα, είναι πλέον δημοφιλές σε όλη την Ευρώπη, τις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά και σε άλλες χώρες. Τούτο οφείλεται αφενός στο εξαιρετικά χαρακτηριστικό φλαβορ του, αφετέρου στα οφέλη στην υγεία που αποδεδειγμένα προσφέρει το μεσογειακό πρότυπο διατροφής. Το ελαιόλαδο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υγιεινά μονοακόρεστα λιπαρά οξέα,

αξιοσημείωτη σταθερότητα, αντοχή στον ταγγισμό<sup>3</sup> και μπορεί να αποθηκευτεί για τουλάχιστον 18 μήνες. Το 2004, η αμερικανική υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (FDA) ανακοίνωσε το ποσοστό των μονοακόρεστων λιπαρών που πρέπει να καταναλώνονται από το ελαιόλαδο για το καλό της υγείας και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης της στεφανιαίας καρδιακής νόσου (CHD). Παράλληλα, είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο για μία ισορροπημένη διατροφή, δίνει ενέργεια και συμβάλλει στην πρόληψη διαφόρων τύπων καρκίνου και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Boskou, 2006).

Το ελαιόλαδο καταναλώνεται χωρίς εξευγενισμό. Για την εξαγωγή του ελαιόλαδου από τον καρπό της ελιάς, πραγματοποιείται θραύση, μάλαξη και φυγοκεντρικός διαχωρισμός (ως επί το πλείστον είναι διεργασία δύο φάσεων ή τριών φάσεων και στο τελευταίο στάδιο προστίθεται το νερό), με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτωμάτων ελαίου/νερού. Η σύνθεση του ελαιόλαδου είναι κυρίως τριγλυκερίδια (σε ποσοστό περίπου 99%), δευτερευόντως ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο- και δι-γλυκερίδια, υδρογονάνθρακες, στερόλες, αλειφατικές αλκοόλες, τοκοφερόλες και χρωστικές ουσίες. Επίσης, υπάρχει πληθώρα φαινολικών και πτητικών ενώσεων. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις συμβάλλουν στο μοναδικό χαρακτήρα του ελαιόλαδου.

Τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι: 7,5 έως 20,0% παλμιτικό (C16:0), 0,3 έως 3,5% παλμιτελαϊκό (C16:1), 0,5 έως 5,0% στεατικό (C18:0), 55,0 έως 83,0% ελαϊκό (C18:1), 3,5 έως 21,0% λινελαϊκό (C18:2) και 0,0 έως 1,5% λινολενικό (C18:3) οξύ. Δύο υδρογονάνθρακες υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στο ελαιόλαδο, το σκουαλένιο και το β-καροτένιο. Η α-τοκοφερόλη βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή. Οι αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι σε ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή. Οι στερόλες είναι σημαντικά λιπίδια που σχετίζονται με την ποιότητα του ελαίου και χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο της γνησιότητάς του. Στο ελαιόλαδο περιέχονται τέσσερις κατηγορίες στερολών: απλές στερόλες (4- δεσμεθυλοστερόλες), 4α-μεθυλο- στερόλες, αλκοόλες τριτερπενίου (4, 4-διμεθυλοστερόλες) και διαλκοόλες τριτερπενίου. Τα υδροξυ-πεντακυκλικά τριτερπένια είναι σημαντικά συστατικά του ελαιόλαδου, βιολογικώς δραστικές ενώσεις και υπάρχουν σε ίχνη στο ελαιόλαδο. Το ελαϊνολικό και το μασλινικό οξύ είναι τα κύρια οξέα τριτερπενίου που υπάρχουν στο παρθένο ελαιόλαδο, καθώς βρίσκονται στο φλοιό της ελιάς και μία μικρή ποσότητα αυτών μπορεί να εξαχθεί κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες βρίσκονται επίσης σε ίχνη. Όσον αφορά τις χρωστικές ουσίες, το χρώμα του παρθένου ελαιόλαδου είναι αποτέλεσμα πράσινων και κίτρινων αποχρώσεων λόγω της παρουσίας χλωροφύλλης και καροτενοειδών (Boskou, Blekas, & Tsimidou, 2006; Tsimidou, Blekas, & Boskou, 2003).

---

<sup>3</sup> Ταγγισμός είναι το φαινόμενο της οξειδωσης των λιπών - συνήθως ακόρεστα λιπαρά διασπώνται σε δύο στάδια - και των ελαίων από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Η οξειδωση οφείλεται ή επιταχύνεται από παράγοντες, όπως το φως (βοηθούν στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών), η θερμότητα (επιταχύνει την αντίδραση), το οξυγόνο (απαραίτητο για τη διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελεύθερων ριζών), τα ένζυμα (οδηγούν στο σχηματισμό λιπαρών οξέων) και οι καταλύτες. Συνέπεια του ταγγισμού είναι ο σχηματισμός υπεροξειδίων, λιπαρών οξέων, αλδεϋδών και κετονών, τα οποία προσδίδουν στο προϊόν δυσάρεστη οσμή και γεύση (Dormandy, 1980).

Η σύνθεση του ελαιόλαδου μπορεί να διαφέρει από δείγμα σε δείγμα, ανάλογα με τη ζώνη παραγωγής, το γεωγραφικό πλάτος, το κλίμα, την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης των ελιών κατά τη συλλογή. Το ελαιόλαδο έχει σύνθεση λιπαρών οξέων παρόμοια με αυτή των φουντουκιών, του αμυγδαλού και του ηλιέλαιου πλούσιου σε ελαϊκό οξύ. Η σύνθεση αυτή διαφέρει σημαντικά από οποιοδήποτε άλλο είδος εδωδιμου ελαίου και λίπους (Tsimidou et al., 2003). Επιπλέον, υπάρχει ένα μεγάλος εύρος γεύσεων, χρωμάτων και χαρακτηριστικών ανάλογα με το έδαφος, το κλίμα, το έτος, την ποικιλία και την ωριμότητα των καρπών από τις οποίες εξάγεται το έλαιο καθώς και τις συνθήκες επεξεργασίας. Έτσι, δύσκολα μπορούν να προκύψουν δύο ακριβώς όμοια ελαιόλαδα. Το ελαιόλαδο διατίθεται στο εμπόριο με τα χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως αυτά ορίζονται στην Εικόνα 1.13.

Οι διαφορετικές ποιότητες του ελαιόλαδου είναι οι εξής:

- Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο,
- Παρθένο ελαιόλαδο,
- Ελαιόλαδο, μίγμα εξευγενισμένου και παρθένου ελαιόλαδου, και
- Εξευγενισμένο (ή Ραφινέ) ελαιόλαδο, μέσω εξουδετέρωσης, αποχρωματισμού, απόσμησης.

Εκτός των παραπάνω, η κατηγορία «Lampante» (μη βρώσιμο ελαιόλαδο) εξευγενίζεται και κυκλοφορεί ως εξευγενισμένο στην αγορά. Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο έχει την ίδια γλυκεριδική σύνθεση με το παρθένο ελαιόλαδο, αλλά περιέχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε α-τοκοφερόλη και σκουαλένιο. Ακόμη, έχει την ίδια σύνθεση τριγλυκεριδίων με το παρθένο ελαιόλαδο, δεν περιέχει όμως πολικές αντιοξειδωτικές φαινόλες και είναι πλουσιότερο σε βιολογικά δραστικά πεντακυκλικά τριτερπένια, όπως το ελαϊνολικό οξύ και η ερυθροδιόλη.

	Extra virgin olive oil	Virgin olive oil	Ordinary virgin olive oil <sup>b</sup>	Lampante virgin olive oil	Refined olive oil	Olive oil <sup>d</sup>	Crude olive-pomace oil	Refined olive-pomace oil	Olive-pomace oil
1. Organoleptic characteristics:									
Panel test score (scale 1–9)	≥ 6.5	≥ 5.5	≥ 3.5	≤ 3.5					
Odor and taste					Acceptable	Good		Acceptable	Good
Color					Light yellow	Light yellow to green		Light yellow to brownish yellow	Light yellow to green
Aspect at 20 °C for 24 h					Limpid	Limpid		Limpid	Limpid
2. Free acidity % m/m (expressed as oleic acid)	≤ 1.0 <sup>a</sup>	≤ 2.0	≤ 3.3	> 3.3	≤ 0.3	≤ 1.5 <sup>e</sup>	No limit	≤ 0.3	≤ 1.5
3. Peroxide value (mEq peroxide oxygen per kg oil)	≤ 20	≤ 20	≤ 20	No limit	≤ 5.0	≤ 15	No limit	≤ 5	≤ 15
4. Absorbance in ultraviolet ( $K_{270}^{1\%}$ )									
270 nm	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.30 <sup>f</sup>	No limit <sup>f</sup>	≤ 1.10	≤ 0.90		≤ 2.00	≤ 1.70
$\Delta K$	≤ 0.01	≤ 0.01	≤ 0.01		≤ 0.16	≤ 0.15		≤ 0.20	≤ 0.18

<sup>a</sup> ≤ 0.8; <sup>b</sup> Banning of the category agreed in the EC; <sup>c</sup> After passage of the sample through activated alumina, absorbance at 270 nm shall be equal to or less than 0.11; <sup>d</sup> commercial name is discussed; <sup>e</sup> ≤ 1 proposed.

Data from IOOC (1999) Trade Standards Applying to Olive Oil and Olive Pomace Oil. COI/T. 15/NC, Doc. No. 2, rev. 9. Madrid: International Olive Oil Council.

Εικόνα 1.13: Χαρακτηριστικά ποιότητας ελαιόλαδου (Tsimidou et al., 2003).

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο έχει οξύτητα μέχρι 0,8% σε ελαιϊκό οξύ, το παρθένο ελαιόλαδο μέχρι 2,0% και το ελαιόλαδο οξύτητα που δεν ξεπερνά το 1,0%. Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και το παρθένο ελαιόλαδο έχουν αριθμό υπεροξειδίων (Peroxide Value, PV) μέχρι 20 *meq O<sub>2</sub>/kg*, ενώ το ελαιόλαδο 15 *meq O<sub>2</sub>/kg*. Όσον αφορά την οργανοληπτική αξιολόγηση, ορίζεται διάμεση τιμή ελαττώματος ( $M_d$ ) για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο  $M_d = 0$  και για το παρθένο ελαιόλαδο  $M_d \leq 2,5$ . Επιπλέον, η διάμεση τιμή φρουτώδους ( $M_f$ ) τόσο για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο όσο και για το παρθένο ελαιόλαδο είναι  $M_f > 0$ .

Το ελαιόλαδο είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα λειτουργικού τροφίμου<sup>4</sup>, με ποικίλα θρεπτικά συστατικά που επιδρούν σε κάποια λειτουργία του οργανισμού, λόγω της σύνθεσης των υψηλών επιπέδων των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων του (MUFA) και της παρουσίας των δευτερευόντων συστατικών του, κυρίως των φαινολών, του σκουαλενίου και της α-τοκοφερόλης. Τα επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι στις χώρες της Μεσογείου υπάρχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου, η οποία συνδέεται με τη μεσογειακή διατροφή και την κατανάλωση του ελαιόλαδου. Επιπλέον, η ισχυρή προστατευτική δράση που παρέχει το ελαιόλαδο ενάντια στον καρκίνο του μαστού δεν σχετίζεται αποκλειστικά με τα λιπαρά οξέα του, αλλά και με τα υψηλά επίπεδα των αντιοξειδωτικών και των άλλων συστατικών του. Έρευνες έχουν δείξει ότι το σκουαλένιο μπορεί να δράσει ως χημειοπροληπτικός παράγοντας σε πολλές μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του παγκρέατος. Επιπλέον, έρευνες έχουν γίνει για τη θεραπευτική δράση του ελαιόλαδου στο ανοσοποιητικό σύστημα, πιο συγκεκριμένα η ελευρωπαΐνη ενισχύει την ανοσολογική απόκριση και δρα ενάντια σε φλεγμονές. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και άλλες ιδιότητες του ελαιόλαδου, γίνεται φανερό ότι είναι ένα λειτουργικό τρόφιμο, του οποίου τα συστατικά αναμένεται να παρέχουν πρόσθετα οφέλη για την υγεία πέρα από την κάλυψη των βασικών διατροφικών αναγκών (Stark & Madar, 2013).

Το ελαιόλαδο καταναλώνεται είτε σε ακατέργαστη κατάσταση είτε χρησιμοποιείται – από τη βιομηχανία τροφίμων – για την παρασκευή τυποποιημένων τροφίμων (π.χ. πέστο, σάλτσες, μαγιονέζα) ή ως πληρωτικό υλικό σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα (π.χ. τόνος). Λόγω της βιολογικής σημασίας του ελαιόλαδου, γίνονται συνεχώς νέες προσπάθειες για την επέκταση των χρήσεών του και την αντικατάσταση των λιπαρών σε ποικίλα προϊόντα (π.χ. μαργαρίνη, μαγιονέζα, κρέμες βουτύρου, προϊόντα σοκολάτας ή πάστες από αμύγδαλα, φουντούκια και άλλους ξηρούς καρπούς). Τα τελευταία χρόνια το ελαιόλαδο επιλέγεται ως κύριο συστατικό σε γαλακτώματα, λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας του και της μεγάλης οξειδωτικής του σταθερότητας. Το ελαιόλαδο έχει μία αξιοσημείωτη σταθερότητα σε διεργασίες υψηλών θερμοκρασιών (π.χ. τηγάνισμα). Σε σύγκριση με το ηλιέλαιο, το βαμβακέλαιο, το καλαμποκέλαιο και το σογιέλαιο, το ελαιόλαδο έχει σημαντικά χαμηλότερο ρυθμό αλλοίωσης.

---

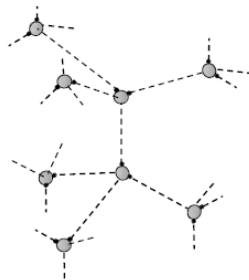
<sup>4</sup> Με τον όρο «λειτουργικά τρόφιμα» (functional foods ή nutraceuticals), χαρακτηρίζονται τα τρόφιμα, φυσικά (δηλαδή τρόφιμα της καθημερινής διατροφής, μη γενετικά τροποποιημένα) ή εμπλουτισμένα, τα οποία έχουν – σύμφωνα με μελέτες και επίσημα επιστημονικά ευρήματα – συγκεκριμένες ευεργετικές επιδράσεις σε μία ή περισσότερες παραμέτρους υγείας.



Τούτη η ανθεκτικότητα του ελαιόλαδου – στην ταχεία αλλοίωσή του σε υψηλές θερμοκρασίες – οφείλεται στη σύνθεση του λιπαρού οξέος και στην παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως το σκουαλένιο, η α-τοκοφερόλη και η Δ5-αβεναστερόλη. Μάλιστα, το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είναι πιο ανθεκτικό στην οξείδωση συγκριτικά με τις άλλες κατηγορίες ελαιόλαδου, λόγω των ασαπωνοποίητων συστατικών του, συμπεριλαμβανομένων των τοκοφερολών και των φαινολικών ενώσεων (Boskou, 2006; Polychniatou & Tzia, 2016; Κατσούλη, 2015).

### 1.4.2 Υδατική Φάση

Ένα μόριο νερού αποτελείται από δύο άτομα υδρογόνου ομοιοπολικά συνδεδεμένα με ένα άτομο οξυγόνου. Το άτομο οξυγόνου είναι εξαιρετικά ηλεκτραρνητικό και έλκει τα ηλεκτρόνια των δύο ατόμων υδρογόνου προς αυτό. Έτσι, αφήνει ένα μερικό θετικό φορτίο ( $\delta^+$ ) σε κάθε ένα από τα άτομα υδρογόνου και ένα μερικό αρνητικό φορτίο ( $\delta^-$ ) σε κάθε ένα από τα μονά ζεύγη ηλεκτρονίων στο άτομο του οξυγόνου. Η τετραεδρική διάταξη των μερικών φορτίων σε ένα μόριο νερού σημαίνει ότι μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τέσσερα από τα «γειτονικά» του.



Εικόνα 1.14: Τετραεδρική δομή των μορίων νερού.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του καθαρού νερού προσδιορίζονται από τη μάζα, τις διαστάσεις, τις γωνίες των δεσμών, την κατανομή φορτίου και τις αλληλεπιδράσεις του μορίου. Το νερό έχει σχετικά υψηλό σημείο τήξης, σημείο βρασμού, ενθαλπία εξάτμισης και επιφανειακή τάση, σε σύγκριση με άλλα μόρια παρόμοιου μεγέθους που περιέχουν υδρογόνο (π.χ.  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HF}$  και  $\text{H}_2\text{S}$ ) (McClements, 2005).

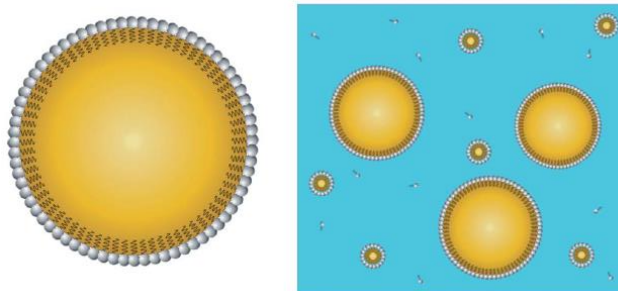
Στα γαλακτώματα, ο ρόλος της υδατικής φάσης είναι κυρίως ως διαλύτης για τα υδατοδιαλυτά συστατικά (άλατα, γαλακτωματοποιητές, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, κ.α.), είτε ως συνεχής φάση στην περίπτωση των ο/w γαλακτωμάτων είτε ως διεσπαρμένη φάση σε w/o γαλακτώματα. Το νερό λόγω της μοριακής δομής του, έχει μεγάλη διεπιφανειακή τάση και έντονο ιοντικό προσανατολισμό, ο οποίος οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου. Έτσι, αποτρέπεται η διάσπαση του γαλακτώματος. Εδώ, πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση των γαλακτωματοποιητών γίνεται, προκειμένου να μειωθεί η ένταση των διεπιφανειακών δυνάμεων. Το pH, η ιοντική ισχύς και η

συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή της υδατικής φάσης στα γαλακτώματα o/w επηρεάζουν το σχηματισμό και τα φυσικά χαρακτηριστικά του γαλακτώματος, μεταβάλλοντας το μέγεθος των σταγονιδίων και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (Robins et al., 2002).

Η συγκέντρωση του νερού παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο, δεδομένου ότι καθορίζει τις φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων των τροφίμων. Οι μοναδικές μοριακές και δομικές ιδιότητές του καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη διαλυτότητα και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών που υπάρχουν στα υδατικά διαλύματα. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να γίνει κατανοητή η συμβολή του νερού στις συνολικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων των τροφίμων. Επιπλέον, η κρυστάλλωση του νερού έχει έντονη επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων τροφίμων. Η παρουσία κρυστάλλων πάγου στην υδατική φάση ενός γαλακτώματος o/w, όπως το παγωτό, συμβάλλει στη χαρακτηριστική γεύση και υφή του προϊόντος. Όταν οι κρύσταλλοι πάγου αυξηθούν πολύ, το προϊόν θεωρείται «κοκκώδες». Στην περίπτωση του παγωτού, κάτι τέτοιο συμβαίνει, όταν αυτό λιώνει και στη συνέχεια αναμιγνύεται. Σημαντική προσοχή πρέπει, λοιπόν, να δοθεί στην επιλογή των συστατικών και των συνθηκών κατάψυξης-απόψυξης για τη δημιουργία ενός προϊόντος-γαλακτώματος, ώστε να είναι σταθερό κατά την κατάψυξη-απόψυξη (McClements, 2005).

### 1.4.3 Γαλακτωματοποιητής

Ο όρος «γαλακτωματοποιητής» χρησιμοποιείται για να περιγράψει κάθε επιφανειοδραστική ουσία που είναι ικανή να προσροφάται σε μία διεπιφάνεια ελαίου-νερού και να προστατεύει τα σταγονίδια του γαλακτώματος έναντι συσσωμάτωσης (κροκίδωση ή/και συνένωση). Η δομή των σταγονιδίων σε ένα νανογαλάκτωμα o/w είναι η εξής: οι μη πολικές ουρές των επιφανειοδραστικών μορίων προεξέχουν στον υδρόφοβο πυρήνα που σχηματίζεται από την ελαιώδη φάση, ενώ οι ομάδες πολικών κεφαλών των επιφανειοδραστικών μορίων προεξέχουν στην υδατική φάση (McClements, 2012).



Εικόνα 1.15: Απεικόνιση της δομής των σταγονιδίων σε ένα νανογαλάκτωμα o/w (McClements, 2012).



Στις μεθόδους υψηλής ενέργειας, ο γαλακτωματοποιητής διευκολύνει τη διάσπαση των σταγονιδίων στον ομογενοποιητή μειώνοντας την ενδοεπιφανειακή τάση, οπότε και ευνοεί την παραγωγή μικρών σταγονιδίων. Στις μεθόδους χαμηλής ενέργειας, ο γαλακτωματοποιητής διευκολύνει τον αυθόρμητο σχηματισμό μικρών σταγονιδίων λόγω της ικανότητάς του να παράγει πολύ χαμηλές επιφανειακές τάσεις υπό ορισμένες συνθήκες περιβάλλοντος και διαλύματος. Έτσι, ο τύπος του γαλακτωματοποιητή σχετίζεται άμεσα με τη μέθοδο ομοιογενοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί (McClements, 2005; McClements & Rao, 2011).

Η σταθερότητα ενός νανογαλακτώματος - σε διαφορετικές συνθήκες pH, ιοντικής ισχύος, θέρμανσης, ψύξης ή μακροχρόνιας αποθήκευσης - καθορίζεται κυρίως από το είδος του χρησιμοποιούμενου γαλακτωματοποιητή. Ιδανικά, ο γαλακτωματοποιητής πρέπει να προσροφάται γρήγορα στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού, να μειώνει τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ του ελαίου και του νερού ή του αέρα και του νερού και να αποτρέπει τη συσσωμάτωση των σταγονιδίων, κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Ωστόσο, ο γαλακτωματοποιητής, σχηματίζοντας μία μεμβράνη στη διεπιφάνεια, είναι αναγκαίο να εμποδίζει τη συσσωμάτωση των σταγονιδίων σε όλες τις συνθήκες παρασκευής, μεταφοράς, αποθήκευσης και χρήσης του προϊόντος.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι γαλακτωματοποιητές στη βιομηχανία τροφίμων είναι οι επιφανειοδραστικές ουσίες μικρού μορίου, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Αυτοί οι γαλακτωματοποιητές διαφέρουν ως προς την ικανότητα σχηματισμού και σταθεροποίησης των γαλακτωμάτων ανάλογα με τα μοριακά και φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Πολλές επιφανειοδραστικές ουσίες μικρού μορίου είναι αποτελεσματικές στην παρασκευή νανογαλακτωμάτων με τη χρήση μεθόδων τόσο υψηλής όσο και χαμηλής ενέργειας. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες δεν είναι ιδιαίτερα κατάλληλοι για την παραγωγή νανογαλακτωμάτων με μεθόδους χαμηλής ενέργειας, ενώ δεν είναι αποτελεσματικοί στο σχηματισμό νανογαλακτωμάτων με μικρή διάμετρο σταγονιδίων χρησιμοποιώντας μεθόδους υψηλής ενέργειας. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες είναι φυσικά συστατικά και ως εκ τούτου συχνά θεωρούνται «φιλικά προς τον καταναλωτή» (label-friendly), δημιουργώντας μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση τους στην παραγωγή νανογαλακτωμάτων. Συνεπώς, οι χημικοί γαλακτωματοποιητές είναι αρκετά αποτελεσματικοί, φθηνοί και σταθεροί για τη χρήση τους στη βιομηχανία των τροφίμων, ωστόσο τείνουν να αντικατασταθούν τελευταία από τους φυσικούς γαλακτωματοποιητές, λόγω της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σε θέματα υγείας και ασφάλειας (McClements, 2011; Polychniatou & Tzia, 2018).

Ο σχηματισμός και η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων, συνήθως, βελτιώνονται με τη χρήση μίγματος γαλακτωματοποιητών, σε σχέση με τη χρήση ενός μόνο γαλακτωματοποιητή. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας ένα λιπόφιλο και ένα υδρόφιλο επιφανειοδραστικό υλικό σε συνδυασμό, ευνοείται ο σχηματισμός μικρών σταγονιδίων, είτε χρησιμοποιηθούν μέθοδοι υψηλής είτε χαμηλής ενέργειας (McClements & Rao, 2011).

Παρακάτω, θα εξετασθούν οι κυριότεροι τύποι γαλακτωματοποιητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

#### 1.4.3.1 Καζεΐνη

Οι πρωτεΐνες –που εξάγονται από ποικίλες φυσικές πηγές– μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γαλακτωματοποιητές, εξαιτίας της ικανότητάς τους να διευκολύνουν το σχηματισμό, να βελτιώνουν τη σταθερότητα και να προσδίδουν τις επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w). Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση τέτοιων φυσικών πρωτεϊνών έναντι άλλων συνθετικών γαλακτωματοποιητών που χρησιμοποιούνται σήμερα σε πολλά τρόφιμα (Surh, Decker, & McClements, 2006).

Οι πρωτεΐνες γάλακτος αποτελούνται κυρίως από την καζεΐνη και τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Η καζεΐνη (CN) αντιπροσωπεύει το 80% των πρωτεϊνών του γάλακτος και περιλαμβάνει τέσσερις κύριες πρωτεΐνες:  $\alpha$ s1-CN,  $\alpha$ s2-CN,  $\beta$ -CN και  $\kappa$ -CN, η αναλογία μάζας των οποίων είναι περίπου 4:1:4:1. Οι πρωτεΐνες γάλακτος χρησιμοποιούνται στη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων ως γαλακτωματοποιητές και για την ενθυλάκωση λιπόφιλων συστατικών ως φορείς βιοδραστικών συστατικών, ενώ καθυστερούν την οξείδωση. Επιπλέον, είναι φθηνές, εύκολα διαθέσιμες, πολύ σταθερές, εύπεπτες και μη τοξικές (Horne, 2003; Zhang, He, Li, & Tang, 2017). Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες γάλακτος αποικοδομούνται εύκολα για την απελευθέρωση των ενσωματωμένων συστατικών, λόγω της ανοικτής τριτοταγούς δομής τους που οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε προλίνη (Kumar et al., 2016).

Η καζεΐνη μπορεί να σχηματίσει παχύτερο στρώμα διεπιφάνειας (της τάξης των 10 nm) γύρω από τα σταγονίδια της λιπαρής φάσης, σε σύγκριση με τις άλλες πρωτεΐνες που σχηματίζουν σχετικά λεπτό στρώμα διεπιφάνειας (π.χ. οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος γύρω στα 1 με 2 nm). Έτσι, η καζεΐνη δημιουργεί ταχέως μία παχιά σταθεροποιητική στοιβάδα, η οποία προστατεύει τα σταγονίδια από τη συσσωμάτωση (κροκίδωση ή/και συνένωση) (Kumar et al., 2016; Surh et al., 2006; Zhang et al., 2017).

Το καζεϊνικό νάτριο (NaCas ή SC, Sodium Caseinate) είναι μία μορφή καζεΐνης και παράγεται από το γάλα, διαμέσου διαδοχικών σταδίων ισοηλεκτρικής καταβύθισης των καζεϊνών ( $pI = 4,6$ ), επαναιώρησης και εξουδετέρωσης της καταβυθισμένης καζεΐνης με υδροξείδιο του νατρίου και ξήρανσης με ψεκασμό (Xue & Zhong, 2014). Το NaCas είναι ένας πολύ γνωστός γαλακτωματοποιητής στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Οι  $\beta$ -καζεΐνη και  $\alpha$ s1-καζεΐνη συνθέτουν περισσότερα από τα τρία τέταρτα της συνολικής πρωτεΐνης και είναι κυρίως οι υπεύθυνες για τις ιδιότητες γαλακτωματοποίησης του καζεϊνικού νατρίου (Surh et al., 2006).

Ακόμη, η γαλακτωματοποιητική ιδιότητα του NaCas προέρχεται από την υψηλή περιεκτικότητά του σε υδρόφοβα αμινοξέα, όπως η προλίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη. Τα κύρια επιφανειακά ενεργά συστατικά του καζεϊνικού νατρίου είναι οι  $\alpha$ s1- και  $\beta$ -καζεΐνες. Η  $\alpha$ s1-καζεΐνη έχει υδρόφοβα κομμάτια στα δύο άκρα και ενδιάμεσα, ενώ η  $\beta$ -καζεΐνη έχει μία

συστάδα φωσφοσερυλίου (υδρόφιλη περιοχή) και μία υδρόφοβη περιοχή (Su & Zhong, 2016). Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της ικανότητας δέσμευσης νερού και λίπους, πάχυνσης, ζελοποίησης και της αύξησης των ιδιοτήτων ιξώδους και σταθερότητας (Kumar et al., 2016).

Τα γαλακτώματα με το καζεϊνικό νάτριο τείνουν να είναι πιο σταθερά κατά τη θέρμανση συγκριτικά με τα γαλακτώματα με πρωτεΐνη ορού γάλακτος, πιθανώς επειδή τα σχετικά «ευλύγιστα» μόρια καζεΐνης δεν υφίστανται αξιόλογες μεταβολές λόγω της θερμότητας, σε αντίθεση με τις σφαιρικές πρωτεΐνες. Όπως προαναφέρθηκε, σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες, το καζεϊνικό νάτριο μπορεί να σχηματίσει ένα παχύτερο σφαιρικό σταθεροποιητικό στρώμα στα σταγονίδια του γαλακτώματος, προστατεύοντάς τα από τη συσσωμάτωση. Γενικά, παρουσιάζει καλή σταθερότητα και μειώνει το μέγεθος των σωματιδίων του γαλακτώματος λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης της πρωτεϊνικής αλυσίδας και της ηλεκτροστατικής άπωσης των φωσφορικών ομάδων του (Xue & Zhong, 2014; Zhang et al., 2017).

Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά του καζεϊνικού νατρίου και το γεγονός ότι είναι ένα φυσικό προϊόν, το καθιστούν έναν ιδιαίτερα καλό γαλακτωματοποιητή. Εντούτοις, έρευνες έχουν δείξει ότι η χρήση καζεϊνικού νατρίου ως γαλακτωματοποιητή παρέχει καλή προστασία έναντι συσσωμάτωσης των σταγονιδίων σε ουδέτερο pH, λόγω ενός συνδυασμού ηλεκτροστατικής και στερεοχημικής σταθεροποίησης. Ωστόσο, τα γαλακτώματα με NaCas είναι ασταθή και διαχωρίζονται μέσω κροκίδωσης σε τιμές pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (pI=4,6), λόγω της μείωσης της ηλεκτροστατικής απόθησης μεταξύ των σταγονιδίων (Perugini et al., 2018; Surh et al., 2006; Zhang et al., 2017).

#### 1.4.3.2 Λεκιθίνη

Η λεκιθίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1850 από το Γάλλο χημικό Theodore Nicolaw Gobley, ο οποίος τη διαχώρισε από τον κρόκο του αυγού. Ονομάστηκε λεκιθίνη από την αρχαία ελληνική λέξη «λέκιθος», που σημαίνει ο κρόκος του αυγού. Αργότερα, η λεκιθίνη αναγνωρίστηκε ως ένα μίγμα πολλών φωσφολιπιδίων. Στη δεκαετία του 1920, αναπτύχθηκε η πρώτη διαδικασία για το διαχωρισμό της λεκιθίνης από το ακατέργαστο σογιέλαιο, ενώ ακόμη και σήμερα η σόγια εξακολουθεί να αποτελεί την κύρια πηγή για τη μαζική παραγωγή της λεκιθίνης. Άλλες όχι τόσο σημαντικές πηγές λεκιθίνης είναι το καλαμπόκι, ο βαμβακόσπορος, η ελαιοκράμβη και τα αυγά. Γενικά, ο όρος «λεκιθίνη» χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη λεκιθίνη σόγιας, η οποία αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια και σογιέλαιο. Ωστόσο, κάποιες φορές ως «λεκιθίνη» αναφέρεται για τη φωσφατιδυλοχολίνη και τα μίγματα φωσφολιπιδίων (Tanno, 2005).

Η σύνθεση της λεκιθίνης σόγιας δίδεται στην παρακάτω εικόνα.



Η λεκιθίνη σόγιας λαμβάνεται ως παραπροϊόν της παραγωγής του σογιέλαιου. Το έλαιο του σπόρου περιέχει μία ποσότητα λεκιθίνης και λαμβάνεται από τους ακατέργαστους σπόρους μέσω συμπίεσης. Τούτο το έλαιο περιέχει από 1 έως 30% φωσφολιπίδια και προστίθεται νερό σε αυτό για την ενυδάτωση των φωσφολιπιδίων (διογκώνονται με νερό). Μετά την προσθήκη του νερού, το μίγμα νερού-ελαίου θερμαίνεται (ενδεικτικά αναφέρεται στη βιβλιογραφία η θερμοκρασία των 70 °C για 30-60 min σε ένα αγωγό που εξασφαλίζει καλή ανάμιξη). Έτσι, γίνεται διαχωρισμός φάσης, οπότε οι δύο φάσεις διαχωρίζονται μεταξύ τους με φυγοκέντρωση και η ένυδρη λεκιθίνη μεταφέρεται σε δεξαμενή αποθήκευσης για την προσθήκη παραγόντων ρευστοποίησης και λεύκανσης, εάν απαιτείται. Για τη λεύκανση, χρησιμοποιείται υπεροξείδιο του υδρογόνου ή/και υπεροξείδιο του βενζολίου. Το προκύπτον κόμμι περιέχει 25-50% νερό, γεγονός που ενθαρρύνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών και καθιστά απαραίτητη την ξήρανση του προϊόντος. Τέλος, γίνεται ψύξη και παραλαβή της λεκιθίνης (Rydhag & Wilton, 1981; Tanno, 2005).

Τα εμπορικά σκευάσματα λεκιθίνης μπορούν να επεξεργαστούν ή να τροποποιηθούν χημικά, ώστε να παραχθεί ένα προϊόν με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Ο FCC (Food Chemical Codex) III ταξινομεί τα προϊόντα λεκιθίνης ως εξής: ακατέργαστη λεκιθίνη (crude lecithin), ρευστοποιημένη λεκιθίνη (fluidized lecithin), υψηλής διήθησης λεκιθίνη (highly filtered lecithin), σύνθετη λεκιθίνη (compound lecithin), χημικά τροποποιημένη λεκιθίνη (chemically modified lecithin), κλασματοποιημένη λεκιθίνη (fractionated lecithin). Η ακατέργαστη λεκιθίνη είναι ρευστή, έχει υψηλό ιξώδες και καφετί χρώμα. Η NSPA (National Soybean Processors Association) έχει τυποποιήσει τη λεύκανση, την προσθήκη μετάλλων και την περιεκτικότητα σε υγρασία. Η ακατέργαστη λεκιθίνη περιέχει 65% φωσφολιπίδια και 35% έλαιο. Η ρευστοποιημένη λεκιθίνη παράγεται με προσθήκη ανόργανων αλάτων, αραιωτικών ή λιπαρών οξέων στην ακατέργαστη λεκιθίνη, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευκολότερα λόγω του χαμηλότερου ιξώδους της. Η υψηλής διήθησης λεκιθίνη είναι κατάλληλη για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων και παράγεται μέσω διήθησης για την απομάκρυνση των αδιάλυτων σε εξάνιο συστατικών. Η σύνθετη λεκιθίνη παράγεται με ανάμιξη της ξηρής ρευστής (dry fluid) λεκιθίνης με άλλα συστατικά, όπως έλαια, μονογλυκερίδια, γαλακτωματοποιητές, διαλύτες κ.α. Η χημικά τροποποιημένη λεκιθίνη προέρχεται από διεργασίες υδρογόνωσης, υδροξυλίωσης, αλογόνωσης, φωσφορυλίωσης κ.α., ωστόσο στη βιομηχανία τροφίμων επιτρέπεται μόνο η υδροξυλιωμένη λεκιθίνη. Ειδικότερα, η υδροξυλίωση της λεκιθίνης λαμβάνει χώρα στους διπλούς δεσμούς, αυξάνει τον υδρόφιλο χαρακτήρα της και επομένως είναι ιδανική για το σχηματισμό γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό. Οι υδροξυλιωμένες λεκιθίνες παράγονται μέσω επεξεργασίας της ακατέργαστης λεκιθίνης με νερό και υπεροξείδιο του υδρογόνου σε γαλακτικό ή οξικό οξύ. Το αποτέλεσμα είναι ένα προϊόν με βελτιωμένες γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες σχετικά με τη μη-τροποποιημένη λεκιθίνη. Τέλος, η σύνθεση της ακατέργαστης λεκιθίνης μπορεί να αλλάξει με κλασμάτωσή της με διάφορους διαλύτες, οπότε και προκύπτει η κλασματοποιημένη λεκιθίνη. Η τελευταία κατηγορία είναι κατάλληλη άλλοτε για το σχηματισμό γαλακτωμάτων o/w και άλλοτε w/o, ανάλογα με το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται.

Παραδείγματος χάριν, η κλασμάτωση με ακετόνη διαχωρίζει τα τριγλυκερίδια και τα λιπαρά οξέα από την ακατέργαστη λεκιθίνη, οπότε και προκύπτει σκόνη λεκιθίνης χωρίς έλαιο.

Τα τριγλυκερίδια είναι διαλυτά σε ακετόνη, όχι όμως και τα φωσφολιπίδια. Έτσι, όσο πιο μεγάλο είναι το ποσοστό του μη διαλυτού υλικού στην ακετόνη, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των φωσφολιπιδίων στην ακατέργαστη λεκιθίνη. Εξαιτίας αυτού, ένα από τα κυριότερα κριτήρια αξιολόγησης της λεκιθίνης είναι το ποσοστό του μη διαλυτού σε ακετόνη υλικού. Το κόστος της εν λόγω λεκιθίνης είναι δέκα φορές μεγαλύτερο από της ακατέργαστης λεκιθίνης, ενώ αυτή είναι περισσότερο υδρόφιλη και κατάλληλη για χρήση ως γαλακτωματοποιητής (Tanno, 2005).

Η λεκιθίνη αξιολογείται βάσει διαφόρων παραγόντων, που περιλαμβάνουν το ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων, το ποσοστό μη διαλυτού σε εξάνιο υλικού, το ποσοστό του νερού, τον αριθμό υπεροξειδίων και το περιεχόμενο ιχνοστοιχείων μετάλλων. Οι γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες της ακατέργαστης και της τροποποιημένης λεκιθίνης μπορούν να καθοριστούν βάσει μίας μεθόδου που έχει προταθεί από τον Von Pardun (1982). Αρχικά, δημιουργείται ένα γαλάκτωμα χρησιμοποιώντας λεκιθίνη. Στη συνέχεια, αφού τοποθετηθεί κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες πίεσης, μετράται ο χρόνος ημιζώης του σκευάσματος. Εναλλακτικά, ο ρυθμός διαχωρισμού των φάσεων, της συσσωμάτωσης, της αύξησης της κρεμώδους υφής του σκευάσματος και της συνάφειας μπορούν να υπολογιστούν βάσει οπτικής παρατήρησης, σε συνδυασμό με τον υπολογισμό του μεγέθους των σταγονιδίων (Κατσούλη, 2015).

Η λεκιθίνη σόγιας χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα τόσο ως φυσικός γαλακτωματοποιητής όσο και ως θρεπτικό τρόφιμο ως έχει, δεδομένου ότι προσδίδει εξαιρετική γεύση. Επιπλέον, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε φωσφολιπίδια, η λεκιθίνη σόγιας μπορεί να λειτουργήσει και ως γαλακτωματοποιητής σε φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα. Η αμφίφιλη δομή των φωσφολιπιδίων είναι υπεύθυνη για τις εξαιρετικές ιδιότητες γαλακτωματοποίησης της λεκιθίνης και τα αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων παρέχουν απωθητικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, σημαντικές για τη σταθερότητα των σταγονιδίων του γαλακτώματος (Rydhag & Wilton, 1981; Xue & Zhong, 2014).

#### 1.4.3.3 *Επιφανειοδραστικά μικρού μορίου*

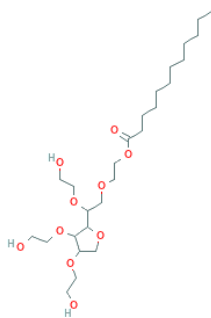
Συχνά, είναι εύκολο να ταξινομηθούν τα επιφανειοδραστικά συστατικά μικρού μορίου σε ιοντικά, μη ιοντικά και αμφοτερικά.

- Ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες: Οι περισσότερες ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. CITREM, DATEM και SLS) είναι αρνητικά φορτισμένες, υπάρχουν όμως και ελάχιστες θετικά φορτισμένες επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. LAE, lauric arginate). Είναι κατάλληλες για τη δημιουργία νανογαλακτώματων με μεθόδους είτε χαμηλής είτε υψηλής ενέργειας, ωστόσο δεν είναι αποτελεσματικές σε w/o νανογαλακτώματα.



- Μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες: Οι μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω της χαμηλής τους τοξικότητας και της εύκολης δημιουργίας νανογαλακτωμάτων τόσο με μεθόδους υψηλής όσο και χαμηλής ενέργειας. Επιπλέον, δεν επηρεάζονται πολύ από τις τιμές του pH του συστήματος. Κατά κανόνα, χρησιμοποιούνται για την παρασκευή w/o γαλακτωμάτων, ωστόσο δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα και ως γαλακτωματοποιητές σε o/w γαλακτώματα. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι οι εστέρες σακχάρων (μονοελαϊκή σορβιτάνη/ sorbitanmonooleate, μονοπαλμιτική σακχαρόζη/ sucrose monopalmitate), επιφανειοδραστικά πολυοξυαιθυλενικού αιθέρα/ polyoxyethylene ether (POE), επιφανειοδραστικά τύπου Brij 97 και εστέρες πολυοξυαιθυλενοσορβιτάνης (Tweens, Spans).
- Αμφοτερικές επιφανειοδραστικές ουσίες: Οι αμφοτερικές επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν δύο ή περισσότερες αντίθετα φορτισμένες ιοντικές ομάδες στο ίδιο μόριο. Κατά συνέπεια, μπορούν να έχουν ένα καθαρά αρνητικό, ουδέτερο ή θετικό φορτίο, ανάλογα με το pH του διαλύματος. Τα φωσφολιπίδια (π.χ. λεκιθίνη) είναι τα πιο κοινά αμφοτερικά επιφανειοδραστικά, ενώ επιτρέπεται η χρήση τους στα γαλακτώματα τροφίμων. Ωστόσο, πολλά φωσφολιπίδια δεν είναι ιδιαίτερα καλά στο σχηματισμό ή/και τη σταθεροποίηση των νανογαλακτωμάτων, όταν χρησιμοποιούνται μόνα τους. Έτσι, στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ως αποτελεσματική η χρήση τους σε συνδυασμό με συνθετικές ουσίες (Heusch et al., 2005; McClements & Rao, 2011).

Στην κατηγορία των αιθοξυλιωμένων παραγώγων μονογλυκεριδίων, ανήκει και ένας από τους γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ο Tween 20. Τα αιθοξυλιωμένα μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια παράγονται από την αντίδραση αρκετών moles αιθυλενικού οξειδίου και μονογλυκεριδίων και διγλυκεριδίων, κάτω από συνθήκες πίεσης. Η αιθοξυλίωση των μονογλυκεριδίων έχει ως αποτέλεσμα ένα προϊόν που είναι αρκετά πιο υδροφιλικό σε σχέση με τα μονογλυκερίδια. Οι εν λόγω γαλακτωματοποιητές ανήκουν στην κατηγορία των μη ιοντικών γαλακτωματοποιητών, όπως προαναφέρθηκε, και προσφέρουν υψηλή σταθερότητα. Είναι σταθερά σε ήπια οξέα, αλκάλια και ηλεκτρολύτες και δεν αντιδρούν με ιοντικά συστατικά. Ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 είναι εκ φύσεως υδρόφιλος και διαλύεται στο νερό και σε αραιά διαλύματα ηλεκτρολυτών (McClements & Decker, 2000).



Εικόνα 1.18: Δισδιάστατη απεικόνιση της χημικής δομής του Tween 20 (PubChem Database, 2019).



#### 1.4.3.4 Μίγματα Γαλακτωματοποιητών

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση μίγματος γαλακτωματοποιητών, ιδίως ενός φυσικού και ενός χημικού. Σε κάποιες περιπτώσεις, έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία ο τρόπος δράσης των μιγμάτων. Ενδεικτικά, αναφέρεται η περίπτωση των πρωτεϊνών με τους γαλακτωματοποιητές μικρών μορίων.

Είναι μέχρι τώρα γνωστό ότι οι πρωτεΐνες και οι γαλακτωματοποιητές μικρών μορίων ανταγωνίζονται για τη διεπιφάνεια στα γαλακτώματα ελαίου σε νερό. Στα γαλακτώματα που σταθεροποιούνται με πρωτεΐνες γάλακτος σε συνδυασμό με Tweens, αν και η πρωτεΐνη μπορεί αρχικά να υπάρχει στη διεπιφάνεια, θα μετατοπιστεί μερικώς ή πλήρως από το επιφανειοδραστικό μικρού μορίου (Tweens). Αυτή η μετατόπιση εξαρτάται από την αναλογία πρωτεΐνης και Tween. Επειδή οι επιφάνειες των σταγονιδίων του γαλακτώματος αλλάζουν, καθώς η επιφανειοδραστική ουσία αντικαθιστά την πρωτεΐνη, οι ιδιότητές τους μεταβάλλονται. Επιπλέον, εάν υπάρχουν περισσότεροι από ένας τύποι πρωτεϊνών, το επιφανειοδραστικό μικρού μορίου μπορεί να ενισχύσει τον ανταγωνισμό των μορίων στη διεπιφάνεια ελαίου και νερού. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των πρωτεϊνών στη διεπιφάνεια εξαρτάται από την προέλευσή τους. Έτσι, παρόλο που οι  $\alpha$ 1- και  $\beta$ - καζεΐνες ανταγωνίζονται για τη διεπιφάνεια, το καζεϊνικό νάτριο (που περιέχει κυρίως αυτές οι δύο πρωτεΐνες) παρουσιάζει λιγότερη τάση ανταγωνισμού. Αυτό ισχύει επίσης και όταν το καζεϊνικό άλας χρησιμοποιείται σε γαλακτώματα αναμεμιγμένα με Tweens.

Παρ' όλο που τα επιφανειοδραστικά μικρού μορίου μπορούν να μειώσουν τη διεπιφανειακή τάση περισσότερο από τις πρωτεΐνες, αποδυναμώνουν τις μηχανικές ιδιότητες της διεπιφάνειας και, στην πραγματικότητα, μπορεί να αποσταθεροποιήσουν τα γαλακτώματα. Επίσης, οι πρωτεΐνες φορτίζονται, συνήθως, αρνητικά, οπότε και τα σταγονίδια του γαλακτώματος, στα οποία έχει προσροφηθεί η πρωτεΐνη, αποκτούν ένα σημαντικό φορτίο. Αυτό μπορεί, λοιπόν, να εμποδίσει τη συνένωση των σταγονιδίων (Dickinson, Ritzoulis, & Povey, 1999).

## 1.5 Σχηματισμός νανογαλακτωμάτων

### 1.5.1 Παράγοντες σχηματισμού

Σημαντικό πλεονέκτημα των νανογαλακτωμάτων αποτελεί η παρασκευή τους από συστατικά τροφίμων με τη χρήση σχετικά απλών διεργασιών επεξεργασίας, όπως η ανάμιξη, η διάτμηση και η ομογενοποίηση. Τα νανογαλακτώματα μπορούν να χαρακτηριστούν προσδιορίζοντας τα μοριακά συστατικά και την περιεκτικότητά τους, καθώς και το μέγεθος των σταγονιδίων μετά το σχηματισμό με διάτμηση του γαλακτώματος.

Για την παρασκευή ενός σταθερού νανογαλακτώματος με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτυγχάνεται το ίδιο αποτέλεσμα κάθε φορά που παρασκευάζεται, πρέπει να ελέγχεται αυστηρά ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων. Γενικά, απαιτείται η επιλογή της κατάλληλης σύνθεσης του νανογαλακτώματος, ο έλεγχος της σειράς προσθήκης των συστατικών και η εφαρμογή διάτμησης ικανής να θραύει αποτελεσματικά τα σταγονίδια.

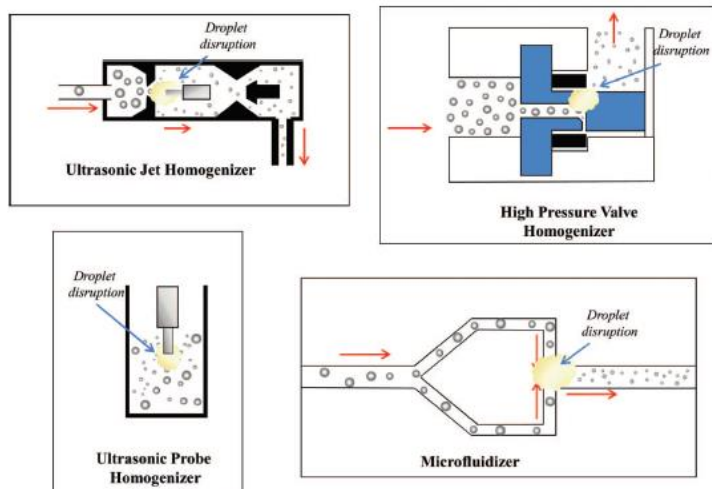
Ωστόσο, κατά το σχηματισμό των νανογαλακτωμάτων, υπάρχουν επιπλέον παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο. Καταρχάς, τα διεσπαρμένα μόρια πρέπει να είναι αδιάλυτα στη συνεχή φάση, προκειμένου η ωρίμανση κατά Ostwald να μην συμβεί γρήγορα, παρά τις υψηλές πιέσεις από τη δύναμη Laplace. Η καταστολή της ωρίμανσης κατά Ostwald μπορεί να γίνει και με άλλες μεθόδους, όμως ο ευκολότερος τρόπος είναι η κατάλληλη επιλογή της υδατικής φάσης, ώστε τα διεσπαρμένα μόρια να παραμένουν αδιάλυτα. Στη συνέχεια, σημαντικό ρόλο παίζει η επιλογή των συστατικών, ειδικά των επιφανειοδραστικών ουσιών, που δεν πρέπει να οδηγεί σε σχηματισμό νανογαλακτωμάτων με κρυσταλλικές φάσεις. Τέτοιες ανεπιθύμητες φάσεις είναι γνωστό πως σχηματίζονται σε συστήματα που περιέχουν βραχείας αλυσίδας αλκάνια, αλκοόλες και επιφανειοδραστικά.

Σημαντική, επίσης, παράμετρος κατά την παρασκευή νανογαλακτωμάτων είναι η συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας στην υγρή φάση. Η περίσσεια επιφανειοδραστικού επιτρέπει τη γρήγορη επικάλυψη των επιφανειών των σταγονιδίων που σχηματίζονται, αναστέλλοντας τα φαινόμενα συσσωμάτωσης που τείνουν να εκδηλωθούν μεταξύ των σταγονιδίων. Τέλος, καθοριστική απαίτηση για το σχηματισμό νανογαλακτωμάτων είναι η επιβολή κάποιας ακραίας μορφής διάτμησης έτσι, ώστε να επιτευχθεί η ρήξη των σταγονιδίων από τη μικρο-κλίμακα ( $\mu\text{m}$ ) στη νανο-κλίμακα ( $\text{nm}$ ). Τυπικά η πίεση για τη δημιουργία του επιθυμητού μεγέθους σταγονιδίων πρέπει να φθάσει τις 10 έως 100 atm. Δεδομένου ότι η επιφανειοδραστική ουσία θα πρέπει να υπάρχει στη συνεχή φάση, στην πράξη, η συγκέντρωσή της κυμαίνεται από μερικές δεκάδες έως και εκατοντάδες mM (Mason, Wilking, Meleson, Chang, & Graves, 2006; McClements, 2005; Κατσούλη, 2015).

### **1.5.2 Μέθοδοι Παρασκευής**

Για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, είναι απαραίτητη η επιβολή ικανής διάτμησης για τη διάρρηξη των σωματιδίων. Η παρασκευή γίνεται με την υποβολή και των δύο φάσεων (έλαιο και νερό) σε βίαιη ανατάραξη, με σκοπό τα μεγάλα σταγονίδια της εσωτερικής φάσης να ωθηθούν σε διάτμηση. Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των μεθόδων δημιουργίας των νανογαλακτωμάτων. Παρόλο που υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι για την παρασκευή τους, συνήθως κατηγοριοποιούνται σε μέθοδοι υψηλής ή χαμηλής ενέργειας.

Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούν μηχανικές συσκευές («ομογενοποιητές») για να δημιουργήσουν έντονες δυνάμεις ικανές να διαταράξουν και να αναμίξουν τη λιπαρή με την υδατική φάση, δημιουργώντας πολύ μικρά σταγονίδια ελαίου. Σε αυτήν τη μέθοδο, εντάσσεται η χρήση βαλβίδας/ομογενοποιητή υψηλής πίεσης, ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, περιστροφικού αναδευτήρα (rotor-stator), κολλοειδούς μύλου, σφαιρόμυλου/μύλου διασποράς (balls mills/ dispersion mills), μικρορευστοποιητή, μεμβράνης γαλακτωματοποίησης και συστήματος υπερήχων. Προς το παρόν, οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας είναι οι περισσότερο κοινές μέθοδοι παρασκευής νανογαλακτωμάτων στη βιομηχανία. Τούτο συμβαίνει, καθώς οι εν λόγω μέθοδοι χρησιμοποιούνται και για την παραγωγή συμβατικών γαλακτωμάτων, οπότε αφενός η τεχνογνωσία είναι ήδη καλά εδραιωμένη, αφετέρου είναι ικανές για την παραγωγή προϊόντων σε μεγάλη κλίμακα. Συνεπώς, μεταβάλλοντας τις πρώτες ύλες, οι εν λόγω μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην παρασκευή των νανογαλακτωμάτων (McClements & Rao, 2011; Κατσούλη, 2015).

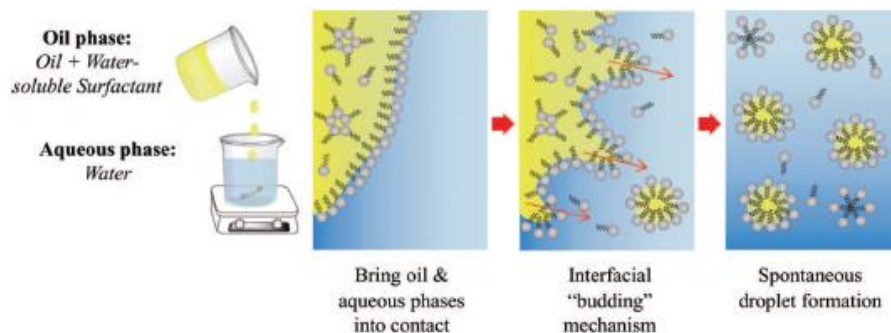


**Εικόνα 1.19:** Σχηματική απεικόνιση διαφόρων μηχανικών συσκευών για την παραγωγή νανογαλακτωμάτων με τη μέθοδο υψηλής ενέργειας (ομογενοποιητές υπερήχων, βαλβίδα υψηλής πίεσης, μικρορευστοποιητής) (McClements & Rao, 2011).

Οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας βασίζονται στον αυθόρμητο σχηματισμό πολύ μικρών σταγονιδίων ελαίου μέσα σε μίγματα ελαίου-νερού-γαλακτωματοποιητή, όταν το διάλυμα ή οι περιβαλλοντικές συνθήκες μεταβάλλονται, π.χ. αναστροφή φάσης, αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση, κ.α. Κατά την αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση (spontaneous emulsification), γίνεται απλή ανάμιξη, καθώς η μία φάση προστίθεται αργά στην άλλη, ώστε να σχηματιστεί αυθόρμητα το νανογαλάκτωμα, π.χ. η οργανική φάση που περιέχει γαλακτωματοποιητή και έλαιο προστίθεται σε μία υδατική φάση που περιέχει νερό. Η μέθοδος EIP (Emulsion Inversion Point, Σημείο αναστροφής φάσης του γαλακτώματος) αλλάζει την αναλογία μεταξύ των φάσεων του ελαίου και του νερού, ενώ διατηρεί τις ιδιότητες του γαλακτωματοποιητή. Προστίθεται νερό σε ένα μίγμα ελαίου και υδατοδιαλυτού γαλακτωματοποιητή, υπό συνεχή ανάδευση. Καθώς προστίθενται ποσότητες του νερού, αρχικά

σχηματίζεται ένα w/o γαλάκτωμα, στη συνέχεια ένα o/w/o γαλάκτωμα και τέλος ένα γαλάκτωμα o/w. Η μέθοδος PIT (Phase Inversion Temperature, Θερμοκρασία αναστροφής φάσης) χρησιμοποιεί τη μεταβολή της θερμοκρασίας για να αλλάξει τη διαλυτότητα ή τη βέλτιστη καμπυλότητα (μοριακή γεωμετρία) των μη-ιοντικών γαλακτωματοποιητών, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται ένα γαλάκτωμα o/w σε γαλάκτωμα w/o, ή και αντίστροφα (Ostertag, Weiss, & McClements, 2012; Walker, 2015).

Συχνά, οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας είναι πιο αποτελεσματικές στην παραγωγή μικρών σταγονιδίων από τις μεθόδους υψηλής ενέργειας, αλλά υπάρχει περιορισμός στους τύπους ελαίων και γαλακτωματοποιητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Για παράδειγμα, προς το παρόν, δεν είναι δυνατή η χρήση πρωτεϊνών ή πολυσακχαριτών ως γαλακτωματοποιητές στην πλειονότητα των προσεγγίσεων χαμηλής ενέργειας για τη δημιουργία νανογαλακτωμάτων. Αντίθετα, είναι απαραίτητη η χρήση σχετικά υψηλής συγκέντρωσης συνθετικών επιφανειοδραστικών ουσιών για να σχηματιστούν νανογαλακτώματα από τις μεθόδους χαμηλής ενέργειας. Έτσι, είναι περιορισμένη η χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων.

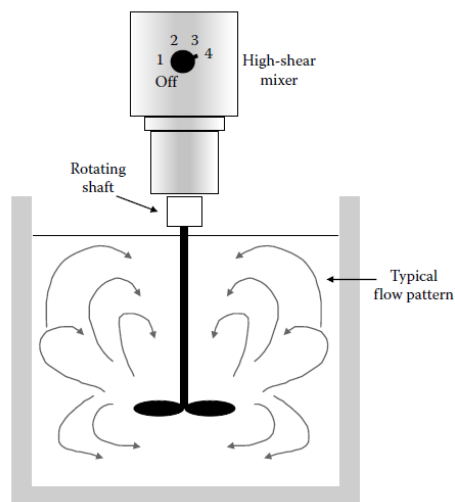


Εικόνα 1.20: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού αυθόρμητης γαλακτωματοποίησης (McClements & Rao, 2011).

Το μικρότερο δυνατό μέγεθος σταγονιδίων που μπορεί να παραχθεί με την εκάστοτε μέθοδο εξαρτάται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες (McClements & Rao, 2011).

### 1.5.2.1 Ομογενοποιητής Υψηλής Ταχύτητας

Στη βιομηχανία τροφίμων, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες συσκευές για την άμεση ομογενοποίηση μίας λιπαρής και μίας υδατικής φάσης είναι οι ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας. Σε μία ασυνεχή διεργασία ομογενοποίησης, το έλαιο, το νερό και τα άλλα συστατικά τοποθετούνται σε ένα δοχείο κατάλληλου όγκου για εργαστηριακή ( $cm^3$ ) ή βιομηχανική ( $m^3$ ) χρήση. Στη συνέχεια, τα συστατικά αναδεύονται με μία κεφαλή ανάμιξης, η οποία περιστρέφεται με υψηλή ταχύτητα (τυπικά έως 3600 rpm/min). Τα συστατικά του γαλακτώματος μπορούν να προστεθούν στην αρχή της διαδικασίας ή διαδοχικά, με σκοπό τη βελτίωση της διασποράς ή/και τη μείωση του χρόνου ομογενοποίησης.



Εικόνα 1.21: Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας (McClements, 2005).

Η ταχύτατη περιστροφή της κεφαλής ανάμιξης παράγει ένα συνδυασμό από επιμήκεις, περιστροφικές και ακτινωτές κλίσεις ταχύτητας στα υγρά. Η ταχύτητα αυτή διαταράσσει την επιφάνεια του ελαίου και του νερού, ωθώντας τα δύο υγρά να ενωθούν και να σχηματιστούν μικρά σταγονίδια. Η αποδοτική ομογενοποίηση επιτυγχάνεται, όταν το μίγμα είναι ομοιόμορφο σε όλο το δοχείο. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διευκολυνθεί έχοντας διαφράγματα στερεωμένα στα εσωτερικά τοιχώματα του δοχείου.

Επίσης, ο σχεδιασμός της κεφαλής ανάμιξης καθορίζει την αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης. Για το λόγο αυτό, είναι διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός διαφόρων τύπων κεφαλών ανάμιξης ανάλογα με τη διεργασία, για παράδειγμα λεπίδες, έλικες και τουρμπίνες. Οι ειδικά σχεδιασμένες κεφαλές ανάμιξης, συχνά, χρησιμοποιούνται για να παράγουν εντονότερες και πιο ομοιόμορφα κατανεμημένες διασπαστικές δυνάμεις, έτσι ώστε να δημιουργηθούν μικρότερα σταγονίδια, να μειωθεί ο χρόνος ομογενοποίησης ή/και να εξασφαλιστεί πιο ομοιόμορφη ανάμιξη.

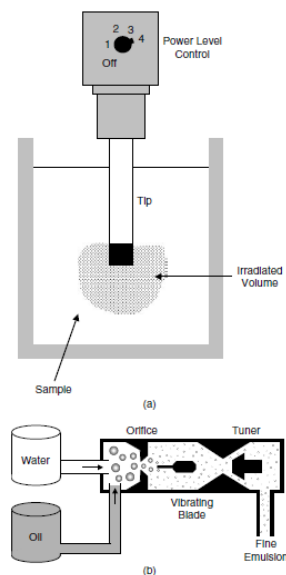
Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση μίας κεφαλής ανάμιξης, η οποία περιστρέφεται σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτή που περιστρέφεται το δοχείο. Για βιομηχανικούς σκοπούς, πολλές συσκευές ανάμιξης υψηλής ταχύτητας είναι διαθέσιμες να λειτουργούν σε σειρά, προκειμένου να υπάρχει συνεχής παραγωγή προϊόντων. Η τυπική απόδοση για τις συσκευές σε σειρά κυμαίνονται από μερικά λίτρα έως μερικές εκατοντάδες λίτρα ανά ώρα. Γενικά, η ανάμιξη οδηγεί σε μικρή αύξηση της θερμοκρασίας του γαλακτώματος, διότι μέρος της μηχανικής ενέργειας μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω της ιξώδους διάχυσης. Εάν κάποιο από τα συστατικά στο γαλάκτωμα είναι ευαίσθητο στη θερμότητα, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της θερμοκρασίας του δοχείου κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Οι ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την παρασκευή γαλακτωμάτων με χαμηλό ή μέτριο ιξώδες. Το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται συνήθως, όταν ο χρόνος ομογενοποίησης ή η ταχύτητα περιστροφής της κεφαλής ανάμιξης αυξάνεται, έως ότου φτάσει σε ένα κατώτερο όριο, το οποίο εξαρτάται από τη φύση και τη συγκέντρωση των συστατικών που χρησιμοποιούνται και την πυκνότητα ισχύος του ομογενοποιητή.

Τυπικά, τα σταγονίδια που παράγονται από έναν ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε σειρά, έχουν διάμετρο μεταξύ 2 και 10  $\mu\text{m}$ . Οι βιομηχανικοί ομογενοποιητές σχεδιάζονται με στόχο την αποφυγή της υπερβολικής ενσωμάτωσης φυσαλίδων αέρα, κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Τούτο μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην επεξεργασία και τις ιδιότητες πολλών γαλακτωμάτων. Τέλος, είναι φανερό ότι οι ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν ένα χονδροειδές γαλάκτωμα και να εξασφαλίσουν την αποτελεσματική διασπορά και τη διάλυση των συστατικών στο γαλάκτωμα, ιδιαίτερα των κονιοποιημένων συστατικών (Mason et al., 2006; McClements, 2005).

### 1.5.2.2 Ομογενοποιητής Υπερήχων

Οι ομογενοποιητές υπερήχων έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια για την παραγωγή γαλακτωμάτων. Στη γαλακτωματοποίηση με σύστημα υπερήχων, η ενέργεια παρέχεται μέσω των αποκαλούμενων σονοτροδίων (αισθητήρες υπερήχων), που περιέχουν ένα πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο χαλαζία, το οποίο συμβάλλει στην εναλλασσόμενη ηλεκτρική τάση. Καθώς η άκρη των ανιχνευτών υπερήχων έρχεται σε επαφή με το υγρό, παράγει μηχανικές δονήσεις, οπότε και πραγματοποιείται το φαινόμενο της σπηλαίωσης.



**Εικόνα 1.22:** Ανιχνευτής υπερήχων (α) και ομογενοποιητής (β) χρήση στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή των γαλακτωμάτων. Αυτές οι συσκευές λειτουργούν, κυρίως, μέσω του μηχανισμού σπηλαίωσης (McClements, 2005).



Οι υπέρηχοι μπορούν να δημιουργηθούν είτε μηχανικά είτε ηλεκτρικά (αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο). Ο ευρέως χρησιμοποιημένος τύπος συσκευής είναι ένα παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο υψηλής συχνότητας, το οποίο μετατρέπει το ηλεκτρικό πεδίο σε μηχανική δόνηση της ίδιας συχνότητας. Η σπηλαιώση είναι ο σχηματισμός και η κατάρρευση των φυσαλίδων ατμού σε ένα ρέον υγρό. Η κατάρρευση αυτών των φυσαλίδων ωθεί τα μεγαλύτερα σταγονίδια να σπάσουν σε μικρότερα. Εντός της περιοχής υπερήχων, η διαθέσιμη ισχύς μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα με τη συχνότητα και μόνο οι ισχυροί υπέρηχοι (16 έως 100 kHz) είναι σε θέση να παράγουν φυσικές και χημικές αλλαγές, όπως η γαλακτωματοποίηση. Κατά τη γαλακτωματοποίηση, ο υπέρηχος εκπέμπεται από συγκεκριμένους μετατροπείς στο εξωτερικό τοίχωμα του δοχείου ή μέσω κυλινδρικών σονοτροδίων στο βυθισμένο υγρό. Σε συνεχή λειτουργία, το υγρό που κυκλοφορεί μπορεί να εισέλθει και να εξέλθει με τη χρήση μίας αντλίας. Ξεκινώντας από δύο ξεχωριστές φάσεις, οι υπέρηχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για την παραγωγή γαλακτωμάτων, αλλά δεδομένου ότι για τη διάσπαση μίας διεπιφάνειας απαιτείται μεγάλη ποσότητα ενέργειας, είναι καλύτερα να παρασκευαστεί πρώτα ένα χονδροειδές γαλάκτωμα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι υπέρηχοι μπορούν να λειτουργήσουν και ως τεχνική αντιγαλακτωματοποίησης. Λόγω του μικρού βαθμού απόδοσης, η διαδικασία γαλακτωματοποίησης υπερήχων εφαρμόζεται κυρίως σε εργαστήρια, όπου μπορούν να ληφθούν γαλακτώματα με διάμετρο σφαιριδίων κοντά 0,2 μm. Υπέρηχοι υψηλής έντασης (ισχύς > 10 W) είναι ικανοί να τροποποιήσουν τις ιδιότητες του υλικού μέσω του οποίου διαδίδονται, δημιουργώντας αύξηση της πίεσης, θερμοκρασίας και διατμητικής τάσης, με αποτέλεσμα να προκαλούν φαινόμενα σπηλαιώσης. Η διάμετρος των σταγονιδίων, μετά την επεξεργασία με υπέρηχους, κυμαίνεται από 0,1 έως 0,6 μm. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι οι υπέρηχοι προκαλούν και άλλες μεταβολές στα συστήματα που εφαρμόζονται, όπως τροποποιήσεις στη δομή των πρωτεϊνών που πιθανώς περιέχονται στο γαλάκτωμα και αλλαγές στη σύνθεση και τη δομή των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης (Mason et al., 2006; McClements, 2005; Κατσούλη, 2015).

## 1.6 Σταθερότητα

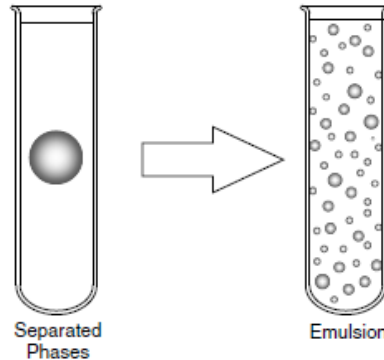
Όταν εξετάζεται η «σταθερότητα» ενός γαλακτώματος, είναι εξαιρετικά σημαντικό να γίνεται διάκριση μεταξύ της θερμοδυναμικής σταθερότητας και της κινητικής σταθερότητας. Η μεν θερμοδυναμική σταθερότητα δίνει απάντηση στο αν μία δεδομένη διαδικασία θα συμβεί ή όχι, η δε κινητική προσδιορίζει το ρυθμό της διαδικασίας, αν συμβεί. Επιπλέον, οι διαφορές στην κινητική σταθερότητα είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για το ευρύ φάσμα φυσικοχημικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων των διαφόρων γαλακτωμάτων στα τρόφιμα.



### 1.6.1 Θερμοδυναμική Σταθερότητα

Η θερμοδυναμική αστάθεια ενός γαλακτώματος προσδιορίζεται εύκολα με την ανάμιξη καθαρού ελαίου και καθαρού νερού, οπότε και παρατηρείται μεταβολή στην εμφάνιση του συστήματος συναρτήσει του χρόνου. Το αρχικά οπτικώς αδιαφανές γαλάκτωμα διασπάται με την πάροδο του χρόνου, μέχρις ότου εμφανιστεί ένα στρώμα ελαίου πάνω από ένα στρώμα νερού.

Η εξήγηση της θερμοδυναμικής αστάθειας μπορεί να γίνει σαφέστερη, συγκρίνοντας την ελεύθερη ενέργεια ενός συστήματος που αποτελείται από ένα έλαιο και μία υδατική φάση πριν και μετά τη γαλακτωματοποίηση. Γίνεται παραδοχή ότι, αρχικά, είναι πλήρως διαχωρισμένες οι δύο φάσεις (έστω μία μεγάλη σταγόνα ελαίου μέσα στην υδατική φάση) και, τελικά, δημιουργείται το σύστημα του γαλακτώματος, δηλαδή η διασπορά της σταγόνας ελαίου σε σταγονίδια μέσα στην υδατική φάση.



Εικόνα 1.23: Απεικόνιση του σχηματισμού ενός γαλακτώματος, ο οποίος είναι θερμοδυναμικά δυσμενής εξαιτίας της αύξησης της επιφάνειας επαφής των δύο φάσεων (McClements, 2005).

Στην αρχική κατάσταση, η συνολική ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs είναι:

$$G^i = G_o^i + G_w^i + G_I^i - T \cdot S_{config}^i$$

και στην τελική κατάσταση, μετά τη γαλακτωματοποίηση:

$$G^f = G_o^f + G_w^f + G_I^f - T \cdot S_{config}^f$$

όπου:

$G_o, G_w, G_I$  : οι ελεύθερες ενέργειες κατά Gibbs του ελαίου, του νερού και της διεπιφάνειας ελαίου-νερού, αντίστοιχα,

$T$  : η απόλυτη θερμοκρασία, και

$S_{config}$  : η εντροπία διαμόρφωσης των σταγονιδίων στο σύστημα.

Οι ενέργειες Gibbs του νερού και του ελαίου παραμένουν σταθερές πριν και μετά την ομογενοποίηση:  $G_o^i = G_o^f$  και  $G_w^i = G_w^f$ , οπότε η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ της αρχικής και τελικής κατάστασης δίνεται:

$$\Delta G_{formation} = G^f - G^i = G_I^f - G_I^i - (T \cdot S_{config}^f - T \cdot S_{config}^i) = \Delta G_I - T \cdot \Delta S_{config} .$$

Εξ ορισμού, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας μεταξύ της τελικής και της αρχικής κατάστασης ( $\Delta G_I$ ) είναι ίση με την αύξηση της επιφάνειας επαφής μεταξύ των φάσεων ελαίου και νερού ( $\Delta A$ ) πολλαπλασιαζόμενη με τη διεπιφανειακή τάση ( $\gamma$ ), δηλαδή:  $\Delta G_{formation} = \gamma \cdot \Delta A$ . Συνεπώς, προκύπτει ότι:

$$\Delta G_{formation} = \gamma \cdot \Delta A - T \cdot \Delta S_{config} .$$

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας ( $\gamma \cdot \Delta A$ ) είναι πάντα θετική, εξαιτίας της αύξησης της επιφάνειας επαφής κατά την ομογενοποίηση, και ως εκ τούτου είναι αντίθετη στο σχηματισμό γαλακτώματος. Από την άλλη πλευρά, ο όρος της εντροπίας διαμόρφωσης των σταγονιδίων  $-T \cdot \Delta S_{config}$  είναι πάντοτε αρνητικός, επειδή ο αριθμός των διαμορφώσεων που είναι προσβάσιμες στα σταγονίδια του γαλακτώματος είναι πολύ μεγαλύτερος από ότι σε άλλη μορφή, οπότε και ευνοείται ο σχηματισμός του γαλακτώματος. Μία έκφραση για τη μεταβολή της εντροπίας διαμόρφωσης των σταγονιδίων μεταξύ της αρχικής και τελικής κατάστασης μπορεί να δοθεί από τη σχέση:

$$\Delta S_{config} = -\frac{n \cdot k}{\varphi} \cdot (\varphi \cdot \ln \varphi + (1 - \varphi) \cdot \ln(1 - \varphi))$$

όπου:

k: η σταθερά Boltzmann,

n: ο αριθμός σταγονιδίων στο γαλάκτωμα, και

$\varphi$ : το κλάσμα όγκου στη διεσπαρμένη φάση.

Στα περισσότερα γαλακτώματα τροφίμων, η μεταβολή της εντροπίας διαμόρφωσης των σταγονιδίων είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας και θεωρείται αμελητέα. Η συνολική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs για το σχηματισμό ενός γαλακτώματος και, ειδικότερα ενός γαλακτώματος τροφίμων, δίνεται τελικά από τη σχέση:

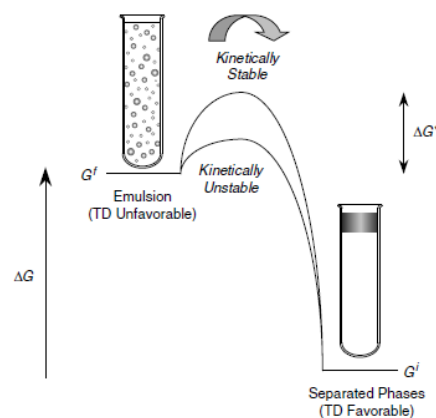
$$\Delta G_{formation} = \gamma \cdot \Delta A$$

Έτσι, ο σχηματισμός ενός γαλακτώματος τροφίμων είναι μία θερμοδυναμικά ασταθής κατάσταση, λόγω της αύξησης της διεπιφανειακής τάσης μετά τη γαλακτωματοποίηση. Θα πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι σε κάποιες περιπτώσεις που η επιφανειακή τάση  $\gamma$  είναι σχετικά μικρή, ο όρος της εντροπίας διαμόρφωσης των σταγονιδίων είναι μεγαλύτερος από τον όρο της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφανείας, οπότε προκύπτει σχηματισμός γαλακτωμάτων θερμοδυναμικά σταθερών (νανογαλακτώματα) (McClements, 2005).

### 1.6.2 Κινητική Σταθερότητα

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας (θερμοδυναμική σταθερότητα) σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό του γαλακτώματος και καθορίζει εάν ένα γαλάκτωμα είναι θερμοδυναμικά σταθερό ή όχι. Ωστόσο, δεν δίνει καμία πληροφορία για το ρυθμό μεταβολής των ιδιοτήτων του γαλακτώματος με το χρόνο, το είδος και τους μηχανισμούς αυτών των μεταβολών. Η έννοια της κινητικής σταθερότητας αναφέρεται ακριβώς σε αυτόν το ρυθμό και ελέγχεται με σύγκριση της μακροπρόθεσμης σταθερότητας δύο γαλακτωμάτων με την ίδια σύνθεση, αλλά με διαφορετικό μέγεθος σταγονιδίων. Ένα γαλάκτωμα που περιέχει μικρά σταγονίδια, συνήθως, έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (μεγαλύτερη κινητική σταθερότητα) από το αντίστοιχο γαλάκτωμα που περιέχει μεγαλύτερα σταγονίδια, παρότι τα μικρά σταγονίδια λόγω μεγαλύτερης διεπιφανείας επαφής εμφανίζουν υψηλή θερμοδυναμική αστάθεια.

Πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα του γαλακτώματος ως προς το χρόνο είναι ιδιαίτερα σημαντικές, ειδικά για τους επιστήμονες τροφίμων, ώστε να δημιουργούν προϊόντα που να διατηρούν τις επιθυμητές ιδιότητές τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Κατά συνέπεια, πολλές φορές στην τεχνολογία τροφίμων, η κινητική σταθερότητα είναι σημαντικότερη της θερμοδυναμικής σταθερότητας ενός γαλακτώματος.



Εικόνα 1.24: Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα, όμως μπορούν να υπάρξουν σε μία μετασταθή κατάσταση που μπορούν να είναι κινητικά σταθερά (McClements, 2005).

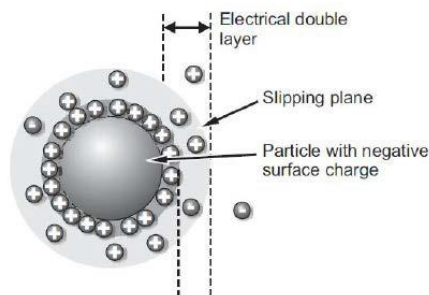
Ένα γαλάκτωμα που είναι κινητικά σταθερό πρέπει να έχει ενέργεια  $\Delta G^*$  σημαντικά υψηλότερη από τη θερμική ενέργεια του συστήματος (kT). Στην πραγματικότητα, τα γαλακτώματα έχουν πλήθος διαφορετικών μετασταθών καταστάσεων, με διαφορετική ενέργεια ενεργοποίησης η καθεμία. Έτσι, ένα γαλάκτωμα μπορεί να μεταφερθεί από τη μία μετασταθή κατάσταση στην επόμενη, μέχρι τελικά να καταλήξει στη θερμοδυναμικά σταθερή του κατάσταση. Τέτοιου είδους αλλαγές μπορούν να επιφέρουν σημαντικές μεταβολές στην ποιότητα των τροφίμων που συμμετέχει το γαλάκτωμα.

Η ερμηνεία της κινητικής σταθερότητας των γαλακτωμάτων στηρίζεται στη δυναμική φύση των σταγονιδίων. Τα σταγονίδια του γαλακτώματος βρίσκονται συνεχώς σε κίνηση μέσα στο γαλάκτωμα και συγκρούονται περιοδικά μεταξύ τους, εξαιτίας της βαρύτητας και των εφαρμοζόμενων εξωτερικών δυνάμεων. Το κατά πόσον τα σταγονίδια απομακρύνονται μεταξύ τους, παραμένουν ως έχουν ή συνενώνονται μετά από μία σύγκρουσή τους εξαρτάται από τη φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Η κινητική σταθερότητα, λοιπόν, των γαλακτωμάτων ερμηνεύεται από τη δυναμική των σταγονιδίων και τη φύση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων (McClements, 2005).

### 1.6.3 Δείκτες Σταθερότητας

Μετά την ανάλυση της έννοιας της σταθερότητας του γαλακτώματος, θα πρέπει να αναφερθούν και οι δείκτες που την προσδιορίζουν. Ο πιο αποδεκτός τρόπος για τον προσδιορισμό της σταθερότητας ενός νανογαλακτώματος ο/w είναι η μέτρηση της διαμέτρου των σταγονιδίων ελαίου ή/και του διαχωρισμού των φάσεων. Ο πρώτος προσδιορισμός γίνεται είτε μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) είτε με ανάλυση διάθλασης με λέιζερ (Laser Diffraction Analysis). Ο δεύτερος προσδιορισμός πραγματοποιείται μέσω οπτικής παρακολούθησης της αλλαγής του ύψους του ορίου μεταξύ της κρεμώδους φάσης και του γαλακτώματος. Σε πολλές περιπτώσεις, ωστόσο, τα χαρακτηριστικά των γαλακτωμάτων (όπως το χρώμα, το ιξώδες, η περιεκτικότητά τους σε έλαιο κ.α.) εμποδίζουν την ορθή «ανάγνωση» του ορίου.

### 1.6.3.1 ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)



Εικόνα 1.25: Σχηματική απεικόνιση του διπλού στρώματος ιόντων γύρω από το νανοσωματίδιο.

Η μέτρηση του ζ-Δυναμικού είναι μία τεχνική για τον προσδιορισμό του φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων σε κολλοειδή συστήματα. Τα νανοσωματίδια έχουν ένα επιφανειακό φορτίο, το οποίο προσελκύει ένα λεπτό στρώμα ιόντων αντίθετου φορτίου στην επιφάνειά τους. Τούτο το διπλό στρώμα ιόντων μεταφέρεται με το νανοσωματίδιο, καθώς το τελευταίο διαχέεται σε όλο το διάλυμα. Το ηλεκτρικό δυναμικό στο όριο της διπλής στρώσης είναι γνωστό ως ζ-Δυναμικό των σωματιδίων και έχει τιμές που κυμαίνονται συνήθως από 100 mV έως -100 mV.

### 1.6.3.2 Μέση Διάμετρος σταγονιδίων (Mean Droplet Diameter, MDD) και Δείκτης Πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI)

Η μέση διάμετρος των σωματιδίων αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη για το γαλάκτωμα, καθώς το χαρακτηρίζει ως προς τον τύπο του (γαλάκτωμα, μικρογαλάκτωμα ή νανογαλάκτωμα) και είναι ενδεικτική της σταθερότητας του γαλακτώματος. Όσο πιο μικρή η διάμετρος του σωματιδίου, τόσο πιο σταθερό και λιγότερο «επιρρεπές» στο βαρυντικό διαχωρισμό είναι και το γαλάκτωμα. Ο δείκτης πολυδιασποράς υποδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο τα σταγονίδια διασπείρονται στη συνεχή φάση. Η τιμή του κυμαίνεται από 0 έως και 1. Χαμηλές τιμές του δείκτη PDI δείχνουν ότι το γαλάκτωμα είναι μονοδιασπαρμένο, δηλαδή παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα, ενώ υψηλές τιμές PDI χαρακτηρίζουν τα πολυδιασπαρμένα νανογαλακτώματα, με χαμηλή σταθερότητα.

### 1.6.3.3 Δείκτης Σταθερότητας γαλακτώματος (ESI)

Τα νανογαλακτώματα που προορίζονται για εμπορική χρήση πρέπει να παραμένουν σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης. Η επίτευξη ενός γαλακτώματος με υψηλή σταθερότητα έχει κρίσιμη σημασία στη βιομηχανία τροφίμων. Ο δείκτης ESI μπορεί να προσδιοριστεί ογκομετρικά, μέσω οπτικής παρατήρησης του διαχωρισμού των φάσεων που συμβαίνει στα o/w ή τα w/o γαλακτώματα, αφού έχουν αποθηκευτεί σε βαθμονομημένους ογκομετρικούς σωλήνες. Επιπλέον, υπολογίζεται μέσα από κατάλληλες εξισώσεις, ανάλογα με τον τύπο του γαλακτώματος, και βασίζεται στην αποκορύφωση των λιπαρών (creaming) που συμβαίνει κατά την αποθήκευση ενός γαλακτώματος. Εκφράζεται ως ποσοστό επί τις εκατό και όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό αυτό, τόσο υψηλότερη σταθερότητα έχει το γαλάκτωμα.

## 1.7 Βιοδραστικά Συστατικά

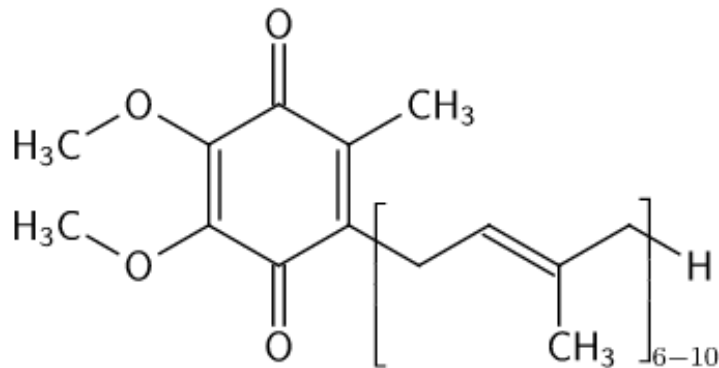
Τα νανογαλακτώματα ο/w είναι κατάλληλα είτε ως μέσα για τη διαλυτοποίηση των φαρμάκων και των τροφίμων είτε ως συστήματα χορήγησης για την ελεγχόμενη απελευθέρωση λιποδιαλυτών θεραπευτικών συστατικών, αρωματικών και χρωστικών στα τρόφιμα. Η βιοδιαθεσιμότητα των βιοενεργών συστατικών εγκλεισμένων σε μικρά σταγονίδια είναι, συνήθως, μεγαλύτερη από εκείνη των μεγαλύτερων σωματιδίων. Τα μικρότερα σταγονίδια έχουν μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια, αυξάνοντας τη δραστικότητα του ενζύμου στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού και οδηγώντας σε ταχύτερη πέψη των λιπιδίων. Επιπλέον, τα μικρότερα σταγονίδια μπορούν να διεισδύσουν στο στρώμα βλέννας που επικαλύπτει τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, αυξάνοντας έτσι το χρόνο για την πέψη και την απορρόφηση των λιπιδίων. Τα σταγονίδια μικρού μεγέθους αυξάνουν τη διαλυτότητα των ενσωματωμένων λιπόφιλων συστατικών στην υδατική φάση. Είναι καλύτερο για τα βιοδραστικά λιπίδια να γίνεται ο εγκλεισμός τους σε υγρή μορφή, γιατί έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη γευστικότητα και τη βιοδραστικότητά τους, λόγω των διαφορετικών μοριακών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Συνεπώς, οι διαφορετικές ιδιότητες του κάθε βιοδραστικού λιπιδίου θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για να παραχθεί το βέλτιστο προϊόν (McClements, 2011; McClements, Decker, & Weiss, 2007).

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα λιπόφιλα βιοδραστικά συστατικά, όπως έχουν χρησιμοποιηθεί και στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, είναι τα λιπαρά οξέα ( $\omega$ -3 λιπαρά οξέα, συζευγμένο λινελαϊκό οξύ, βουτυρικό οξύ), τα καροτενοειδή ( $\beta$ -καροτένιο, λυκοπένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη), τα αντιοξειδωτικά (τοκοφερόλες, φλαβονοειδή, πολυφαινόλες) και οι φυτοστερόλες (στιγμαστερόλη,  $\beta$ -σιτοστερόλη, καμπεστερόλη). Έτσι, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη ενός βιοδραστικού συστατικού που ανήκει στην κατηγορία των βιταμινών, του συνένζυμου  $Q_{10}$ .

### 1.7.1 Συνένζυμο $Q_{10}$

Το συνένζυμο  $Q_{10}$  είναι μία φυσικά απαντώμενη κινόνη, η οποία βρίσκεται στους περισσότερους αερόβιους οργανισμούς, από βακτήρια έως θηλαστικά. Η πρώτη ταυτοποίησή της έγινε το 1940, ενώ απομονώθηκε από τα μιτοχόνδρια της καρδιάς του βοδιού το 1957. Το συνένζυμο  $Q_{10}$  είναι, επίσης, γνωστό ως Coenzyme Q, CoQ, Co $Q_{10}$ , Ουβικινόνη (Ubiquinone), Ubiquinone- $Q_{10}$ , Ubidecarenone ή Βιταμίνη  $Q_{10}$ .

Οι διάφοροι τύποι συνένζυμου Q μπορούν να διακριθούν από τον αριθμό ισοπρενοειδών πλευρικών αλυσίδων τους<sup>5</sup>. Το πιο κοινό συνένζυμο Q στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια είναι το CoQ<sub>10</sub>. Ο αριθμός «10» αναφέρεται στον αριθμό των ισοπρενοειδών πλευρικών αλυσίδων, οι οποίες οφείλονται και για το κίτρινο χρώμα του συνένζυμου Q<sub>10</sub>. Το CoQ<sub>10</sub> βρίσκεται παντού στους ανθρώπινους ιστούς, αν και τα επίπεδά του σε αυτούς μεταβάλλονται. Πιο συγκεκριμένα, το επίπεδο του CoQ<sub>10</sub> είναι το υψηλότερο στα όργανα με υψηλό ρυθμό μεταβολισμού, όπως η καρδιά, τα νεφρά και το ήπαρ (114, 66,5 και 54,9 g / g ιστού, αντίστοιχα), όπου και λειτουργεί ως μόριο μεταφοράς ενέργειας (Saini, 2011; Shin et al., 2009).



Εικόνα 1.26: Χημική δομή του συνένζυμου Q<sub>10</sub>.

Η κύρια βιοχημική δράση του CoQ<sub>10</sub> είναι ως συμπαραγοντας στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις για τη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Οι περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες εξαρτώνται από την επαρκή παροχή τριφωσφορικής αδενοσίνης, με αποτέλεσμα το CoQ<sub>10</sub> να είναι απαραίτητο για την υγεία σχεδόν όλων των ανθρώπινων ιστών και οργάνων. Το συνένζυμο Q<sub>10</sub> είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά, το οποίο εμποδίζει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Σε πολλές ασθένειες που συνδέονται με την αυξημένη παραγωγή και τη λειτουργία των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)<sup>6</sup>, η συγκέντρωση του συνένζυμου Q<sub>10</sub> στο ανθρώπινο σώμα μειώνεται. Τούτη η ανεπάρκεια του συνένζυμου Q<sub>10</sub> οδηγεί στη δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας (Korkmaz, Gokce, & Ozer, 2013; Thanatuksorn, Kawai, Hayakawa, Hayashi, & Kajiwara, 2009).

<sup>5</sup> Οι ισοπρενοειδείς ενώσεις ανήκουν στα λιποειδή και περιλαμβάνουν διάφορες τάξεις ενώσεων, όπως υδρογονάνθρακες, τερπενοειδή, καροτενοειδή, στερόλες, χολικά οξέα, λιποδιαλυτές βιταμίνες, στεροειδείς ορμόνες κ.α. Ως κοινό χαρακτηριστικό, περιλαμβάνουν στο μόριό τους δύο ή περισσότερες ρίζες ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο).

<sup>6</sup> Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: ελεύθερες ρίζες, ιόντα, συνδυασμός ελευθέρων ριζών και ιόντων και μόρια. Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, κλέβοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (Salway, 2006).



Για την προστασία των κυττάρων και των οργάνων έναντι των ROS, οι άνθρωποι έχουν αναπτύξει ένα εξαιρετικά περίπλοκο και πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής προστασίας. Το τελευταίο περιλαμβάνει μία ποικιλία συστατικών, ενδογενούς και εξωγενούς προέλευσης, τα οποία δρουν συνεργικά για να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες. Τέτοια συστατικά είναι τα αντιοξειδωτικά που προέρχονται από θρεπτικά συστατικά (βιταμίνη C και E, β-καροτένιο και πολυφαινόλες), αντιοξειδωτικά ένζυμα (χολερυθρίνη, θειόλες, ουβικινόνες και ουρικό οξύ), πρωτεΐνες δέσμησης μετάλλων (λευκωματίνη, σερουλοπλασμίνη, φερριτίνη και μυοσφαιρίνη) και πολυάριθμα άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά, όπως οι φυτικές ίνες που υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλία φυτικών τροφών (Saini, 2011). Τα αντιοξειδωτικά, όπως το CoQ<sub>10</sub>, μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες, να μειώσουν ή/και να βοηθήσουν στην πρόληψη ορισμένων βλαβών που αυτές προκαλούν.

Ειδικότερα, το CoQ<sub>10</sub> βελτιώνει την ενέργεια, ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και δρα ως αντιοξειδωτικό. Παρά την ικανότητα του ανθρώπου να συνθέτει το CoQ<sub>10</sub>, οι εσωτερικοί (γενετικοί) ή οι εξωτερικοί (στατίνες) παράγοντες μπορούν να μειώσουν τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις του. Η χρήση συμπληρωμάτων CoQ<sub>10</sub> ή ο συνδυασμός τους με φάρμακα και συμπληρώματα διατροφής μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη ή τη θεραπεία ορισμένων από τις εξής ασθένειες: καρδιαγγειακές παθήσεις, υψηλή αρτηριακή πίεση, καρκίνος, περιοδοντικές παθήσεις, μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, τραυματισμοί από ακτινοβολία, παχυσαρκία, διαβήτης, νόσος του Parkinson, νόσος του Alzheimer, σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), γαστρικά έλκη, αλλεργίες, κεφαλαλγίες, ημικρανίες, νεφρική ανεπάρκεια και μυϊκή δυστροφία. Η χρήση του CoQ<sub>10</sub> είναι αρκετά διαδεδομένη και στη βιομηχανία των καλλυντικών λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του και της πρόληψης της γήρανσης (Balakrishnan et al., 2009; Cheuk et al., 2015; Onoue et al., 2015; Shin et al., 2009).

Το CoQ<sub>10</sub> διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και της σωματικής απόδοσης, καθώς οι ιστοί και τα κύτταρα που εμπλέκονται στη λειτουργία του ανοσοποιητικού εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ενέργεια και κατά συνέπεια απαιτούν επαρκή ποσότητα CoQ<sub>10</sub> για βέλτιστη λειτουργία. Οι πρωτογενείς διατροφικές πηγές του CoQ<sub>10</sub> περιλαμβάνουν τα λιπαρά ψάρια (όπως ο σολομός και ο τόνος), τα κρέατα (όπως το σουκάκι) και τα δημητριακά ολικής άλεσης. Η συνολική απορρόφηση του CoQ<sub>10</sub> είναι μικρότερη από 10%, με αποτέλεσμα τα περισσότερα άτομα να μην λαμβάνουν επαρκείς ποσότητες CoQ<sub>10</sub> μέσω της διατροφής. Έτσι, τα συμπληρώματα μπορεί να είναι απαραίτητα και χρήσιμα για ορισμένα άτομα.

Το CoQ<sub>10</sub> διατίθεται ως συμπλήρωμα διατροφής σε διάφορες μορφές, συμπεριλαμβανομένων καψουλών μαλακής πηκτής, σπρέι στόματος, κάψουλες σκληρού κελύφους και δισκία. Μία τυπική δόση CoQ<sub>10</sub> είναι 30 έως 90 mg ημερησίως, η οποία λαμβάνεται σε διηρημένες δόσεις, αλλά η συνιστώμενη ποσότητα μπορεί να φθάσει τα 200 mg ημερησίως. Το CoQ<sub>10</sub> είναι λιποδιαλυτό, επομένως απορροφάται καλύτερα, όταν λαμβάνεται με ένα γεύμα που περιέχει έλαιο ή κάποιο λιπαρό. Η κλινική επίδραση δεν είναι άμεση και μπορεί να διαρκέσει έως και οκτώ εβδομάδες (Belhaj et al., 2012; Saini, 2011; Thanatuksorn et al., 2009).

Συμπερασματικά, το CoQ<sub>10</sub> είναι μία λιποδιαλυτή κινόνη και έχει δομή παρόμοια με τη βιταμίνη Κ. Αποτελεί ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό, τόσο από μόνο του, όσο και σε συνδυασμό με τη βιταμίνη Ε και είναι θεμελιώδες για την παροχή ενέργειας στο σώμα μέσω της παραγωγής ATP. Το CoQ<sub>10</sub> βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες, ειδικά στις εσωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες, και είναι άφθονο κυρίως στην καρδιά, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τους νεφρούς, τον σπλήνα, το πάγκρεας και τα επινεφρίδια. Το συνένζυμο Q<sub>10</sub> είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά λιπαρών που αποτρέπει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και τροποποιήσεων πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA. Το συνολικό περιεχόμενο του σώματος σε CoQ<sub>10</sub> κυμαίνεται από 500 έως 1500 mg και μειώνεται με την ηλικία. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχει θανατηφόρος δόση (LD50<sup>7</sup>) για το CoQ<sub>10</sub>, καθώς οι παρενέργειες των μεγάλων δόσεων του, όπως η δυσπεψία, σχετίζονται περισσότερο με τις μεγάλες ποσότητες ελαίου που χρησιμοποιούνται για τη διάλυσή του (Belhaj et al., 2012; Cheuk et al., 2015; Saini, 2011).

Το συνένζυμο Q<sub>10</sub> είναι σήμερα το τρίτο πιο καταναλισκόμενο θρεπτικό συμπλήρωμα, μετά από το ιχθυέλαιο και τις πολυβιταμίνες. Επομένως, έχει επιλεγεί ως η λιπόφιλη βιοδραστική ένωση που ενδιαφέρει αυτήν την εργασία. Παρά την ευελιξία του CoQ<sub>10</sub>, η μακριά πλαϊνή αλυσίδα των 10 ισοπρενοειδών μονάδων το καθιστά ελάχιστα υδατοδιαλυτό, γεγονός που περιορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα και τις ποικίλες εφαρμογές του. Επιπλέον, η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του CoQ<sub>10</sub> οφείλεται και στο υψηλό μοριακό του βάρος (863 g/mol). Έτσι, παρουσιάστηκε μία πρόκληση για την ανάπτυξη συνθέσεων και μεθόδων για την υπερνίκηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του CoQ<sub>10</sub>. Οι περισσότερες από αυτές τις συνθέσεις είναι γαλακτώματα ελαίου σε νερό ή κάψουλες με σκόνη ή πηκτές (gel) με αιωρήματα ελαίου. Η γαλακτωματοποίηση βιοενεργών μορίων έχει αποδειχθεί ως ένας αποτελεσματικός τρόπος αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας διαφόρων θρεπτικών ουσιών και φαρμάκων. Επιπλέον, η χρήση γαλακτωμάτων, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας (π.χ. η μεταβολή της μοριακής δομής ή η ενδοφλέβια χορήγηση), έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική στη μικρο- και τη νανο- κλίμακα (Belhaj et al., 2012; Cheuk et al., 2015; Onoue et al., 2015; Shin et al., 2009; Thanatuksorn et al., 2009).

Τα γαλακτώματα αναπτύχθηκαν για να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των λιπόφιλων θρεπτικών και φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτά τα συστήματα τυπικά χρησιμοποιούν μικρά σταγονίδια ελαίου για την ενθυλάκωση των λιπόφιλων συστατικών. Η λειτουργικότητα των γαλακτωμάτων μεταβάλλεται με βάση τη σύνθεση και τη δομή τους. Ακόμη, μπορούν να παρασκευαστούν γαλακτώματα με διαφορετικές κατανομές μεγέθους σωματιδίων, με μέσες διαμέτρους σωματιδίων που κυμαίνονται από 50 nm έως και 50 μm. Έτσι, υπάρχουν μεγάλα περιθώρια δημιουργίας γαλακτωμάτων ως φορείς ενσωμάτωσης βιοδραστικών συστατικών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Belhaj et al., 2012; Cho et al., 2014).

---

<sup>7</sup> Στην τοξικολογία, η μέση θανατηφόρος δόση (median lethal dose) ή LD50 (lethal dose, 50%), μίας τοξίνης, ακτινοβολίας, ή παθογόνου ουσίας είναι η απαιτούμενη δόση για να σκοτώσει τα μισά μέλη του ελεγχόμενου πληθυσμού μετά από έναν συγκεκριμένο χρόνο δοκιμής. Οι αριθμοί LD50 χρησιμοποιούνται συχνά ως ένας γενικός δείκτης οξείας τοξικότητας μίας ουσίας. Η χαμηλή τιμή LD50 είναι ένδειξη αυξημένης τοξικότητας.

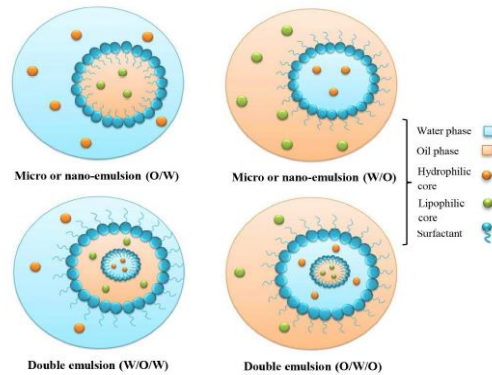
Τα νανογαλακτώματα μπορεί να είναι ένα αποτελεσματικό σύστημα για την ενσωμάτωση, την προστασία και την απελευθέρωση διαφόρων λειτουργικών συστατικών. Θεωρούνται χρήσιμο εργαλείο σε πολλούς βιομηχανικούς κλάδους (βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών) λόγω της υψηλής οπτικής διαύγειας, της φυσικής τους σταθερότητας και της εύκολης αφομοίωσής τους. Τα νανογαλακτώματα ελαίου-νερού (o/w), με διάμετρο σταγονιδίων μικρότερη από 500 nm, ως φορείς για λειτουργικά συστατικά και πρόσθετα (βιταμίνες, αντιμικροβιακά, αντιοξειδωτικά, χρωστικές και συντηρητικά), μπορούν να βελτιώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα, τη διαλυτότητα, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θερμική σταθερότητα (Katsouli & Tzia, 2019).

## 1.8 Διπλό Γαλάκτωμα

Τα νανογαλακτώματα προσφέρουν βελτιωμένες ιδιότητες και ευελιξία, αντικαθιστώντας τα μικρογαλακτώματα σε ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών. Τα νανογαλακτώματα είναι μετασταθείς διασπορές σταγονιδίων ενός υγρού σε ένα διαφορετικό μη αναμίξιμο υγρό, ενώ έχουν παραχθεί εδώ και δεκαετίες χρησιμοποιώντας ποικίλες μεθόδους. Οι πρόσφατες βελτιώσεις στη σύνθεση και τη γαλακτωματοποίηση οδηγούν σε προηγμένα νανογαλακτώματα με την επιθυμητή λειτουργικότητα και ελεγχόμενες φυσικές ιδιότητες.

Διάφοροι τύποι διπλών γαλακτωμάτων έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία, όπως γαλακτώματα oil-in-water-in-oil (o/w/o), water-in-oil-in-water (w/o/w), water-in-oil-in-oil (w/o/o) και oil-in-water-in-water (o/w/w). Τα w/o/w και o/w/o είναι οι πιο γνωστοί τύποι διπλών γαλακτωμάτων, με εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Αρκετές μελέτες πραγματοποιούνται τόσο για τη σύσταση και τη σταθερότητα αυτών των συστημάτων όσο και για τη διατηρησιμότητα και την ικανότητα απελευθέρωσης των ενσωματωμένων βιοδραστικών συστατικών της εσωτερικής φάσης. Αντίθετα με τα γαλακτώματα, ένα διπλό γαλάκτωμα αποτελείται από διεσπαρμένα σταγονίδια υγρής φάσης, καθένα από τα οποία περιέχει ένα ή περισσότερα εσωτερικά σταγονίδια ενός διαφορετικού μη αναμίξιμου υγρού. Για παράδειγμα, τα διπλά γαλακτώματα (Double Emulsions, DEs) ελαίου σε νερό σε έλαιο ( $o_1/w/o_2$ ) είναι πολυδισεπαρμένα συστήματα, όπου είναι ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό ( $o_1/w$ ) διασκορπίζεται σε σταγονίδια μέσα σε μία εξωτερική ελαιώδη φάση ( $o_2$ ).

Τα γαλακτώματα w/o/w έχουν διερευνηθεί για τις δομικές τους ιδιότητες και, όσον αφορά τον τύπο των επιφανειοδραστικών ουσιών, έχει βρεθεί ότι για το γαλάκτωμα  $w_1/o$  χρησιμοποιούνται λιπόφιλοι γαλακτωματοποιητές, όπως το Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR) ή οι Spans. Το PGPR παράγει σταθερότερα και μικρότερα σταγονίδια. Επιπλέον, για την παρασκευή του τελικού γαλακτώματος ( $w_1/o/w_2$ ), χρησιμοποιούνται μη ιοντικές υδρόφιλες επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως τα Tweens και διάφοροι υδατάνθρακες, πρωτεΐνες ή μίγμα αυτών που έχουν πλεονεκτήματα έναντι των επιφανειοδραστικών ουσιών μικρού μορίου (Jafari et al., 2017).



Εικόνα 1.27: Σχηματική απεικόνιση μικρο- ή νανο-γαλακτωμάτων (πάνω) και διπλών γαλακτωμάτων (κάτω) (Shishir, Xie, Sun, Zheng, & Chen, 2018).

Τα διπλά γαλακτώματα μπορούν να παρασκευαστούν με διάφορους τρόπους. Παραδοσιακά, τα DEs παρασκευάζονται σε δύο στάδια. Αρχικά, φτιάχνεται ένα γαλάκτωμα o/w με τη χρήση μίας ή μίγματος επιφανειοδραστικών ουσιών για τη σταθεροποίησή του. Στη συνέχεια, το παρασκευασθέν γαλάκτωμα προστίθεται σταδιακά σε έλαιο, στο οποίο έχει πρωτίτερα διαλυθεί ένας γαλακτωματοποιητής. Τέλος, το σύστημα γαλακτωματοποιείται με κάποια μέθοδο, για να αποφευχθεί η συσσωμάτωση και η καταστροφή των εσωτερικών σταγονιδίων ελαίου, αποδίδοντας ένα διπλό γαλάκτωμα o<sub>1</sub>/w/o<sub>2</sub> που τυπικά έχει σημαντική πολυδιασπορά. Μονοδιεσπαρμένα διπλά γαλακτώματα έχουν δημιουργηθεί μέσω της μικρορευστοποίησης (microfluidic flow) και των T-junctions. Με τη μεταβολή των ρυθμών ροής ή/και άλλων παραμέτρων, ο αριθμός και το μέγεθος των εσωτερικών σταγονιδίων μπορεί να ελεγχθεί, αλλά η απόδοση είναι μάλλον περιορισμένη, καθώς κάθε σταγόνα διπλού γαλακτώματος πρέπει να σχηματίζεται ξεχωριστά. Το χαμηλότερο όριο που έχει επιτευχθεί για το μέγεθος του εξωτερικού σταγονιδίου είναι αρκετά μικρόμετρα (μm). Τα διπλά γαλακτώματα κατασκευάζονται, συνήθως, με τη χρήση γαλακτωματοποιητών υψηλής ταχύτητας ή/και υπερήχων (Fryd & Mason, 2012). Ο σχηματισμός ενός διπλού νανογαλακτώματος με διάμετρο εσωτερικών και εξωτερικών σταγονιδίων μικρότερη των 100 nm δεν έχει επιτευχθεί (Hanson et al., 2008).

Εξαιτίας της εσωτερικής δομής τους, τα διπλά γαλακτώματα έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των o/w νανογαλακτωμάτων, όπως η ικανότητά τους να φέρουν τόσο πολικά όσο και μη πολικά φορτία. Ο εγκλεισμός και η ελεγχόμενη απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών είναι μία από τις κύριες εφαρμογές αυτού του τύπου των γαλακτωμάτων στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες – πολλά υποσχόμενες – εφαρμογές. Τα DEs χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό συστημάτων «διανομής» (delivery systems) των λιπαρών οξέων, ανταποκρινόμενα στις διατροφικές απαιτήσεις για την πρόληψη χρόνιων παθήσεων, π.χ. η μείωση της πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) και η προώθηση της κατανάλωσης μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) Ω-3 και Ω-6 λιπαρών οξέων. Επομένως, με κατάλληλο σχηματισμό της λιπαρής φάσης, τα DEs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα λίπους στην ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων με χαμηλότερα επίπεδα SFA και υψηλότερη περιεκτικότητα σε MUFA και PUFA (Hanson et al., 2008; Silva et al., 2018).

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Σκοπός

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, παρασκευάστηκαν νανογαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w) με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και με τη χρήση τόσο χημικών όσο και φυσικών γαλακτωματοποιητών. Ειδικότερα, ως χημικός γαλακτωματοποιητής επιλέχθηκε το Tween 20, λόγω της αποτελεσματικότητας που επέδειξε σε ποικίλα πειράματα του εργαστηρίου, ενώ ως φυσικοί γαλακτωματοποιητές επιλέχθηκαν το καζεϊνικό νάτριο (καζεΐνη) και η λεκιθίνη. Πρωταρχικός στόχος ήταν η μελέτη και σύγκριση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της σταθερότητας των παρασκευασθέντων νανογαλακτωμάτων με τα διαφορετικά είδη γαλακτωματοποιητών. Επιπλέον τούτων, παρασκευάστηκαν και κάποια νανογαλακτώματα o/w με μίγματα χημικών και φυσικών γαλακτωματοποιητών. Η χρήση των εν λόγω μιγμάτων βελτιώνει τη λειτουργικότητα των φυσικών γαλακτωματοποιητών, όπως βρέθηκε και βιβλιογραφικά (Surh et al., 2006). Έπειτα, επιλέχθηκαν τα καλύτερα συστήματα και παρασκευάστηκαν εκ νέου αυτά τα νανογαλακτώματα με ενσωματωμένο το βιοδραστικό συστατικό, το συνένζυμο Q<sub>10</sub>.

Τα νανογαλακτώματα και στις δύο περιπτώσεις εξετάστηκαν ως προς τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (MDD), το δείκτη πολυδιασποράς (PDI), το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential), το δείκτη σταθερότητας του νανογαλακτώματος (ESI), τη θολότητα, το ιζώδες, το δείκτη διάθλασης και, επιπλέον, μελετήθηκε η διατηρησιμότητα του ενσωματωμένου βιοδραστικού συστατικού. Πρακτικά, οι παραπάνω μετρήσεις που ελήφθησαν παρέχουν πληροφορίες τόσο για τις φυσικές ιδιότητες όσο και για την αντοχή των νανογαλακτωμάτων στο χρόνο.

Τα πειράματα χωρίστηκαν σε δύο στάδια. Στο μεν πρώτο στάδιο, παρασκευάστηκαν τα μη εμπλουτισμένα δείγματα, δηλαδή τα νανογαλακτώματα χωρίς το βιοδραστικό συστατικό. Τούτα διατηρήθηκαν σε αποθήκευση και μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους για 8 εβδομάδες. Στο δε δεύτερο στάδιο, τα νανογαλακτώματα με το συνένζυμο Q<sub>10</sub> διατηρήθηκαν σε αποθήκευση και μετρήθηκαν οι ιδιότητές τους για διάστημα 40 ημερών.

Στη βιομηχανία των τροφίμων, χρησιμοποιείται συχνά αποθήκευση υπό ψύξη, για τη διατήρηση της μικροβιολογικής και της χημικής σταθερότητας των τελικών προϊόντων. Εντούτοις, πολλά προϊόντα τύπου γαλακτώματος είναι ευαίσθητα στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών, οπότε και καθίστανται φυσικά ασταθή και διασπώνται γρήγορα μέσω διαφορετικών μηχανισμών αποσταθεροποίησης (κροκίδωση, συσσωμάτωση και δημιουργία κρέμας). Είναι απαραίτητο, λοιπόν, να σχεδιαστούν προϊόντα νανογαλακτώματος με μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης υπό ψύξη. Έτσι, τα δείγματα διατηρήθηκαν και μελετήθηκαν σε δύο συνθήκες (αποθήκευση στο περιβάλλον και αποθήκευση σε ψύξη).

Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα παρασκευής διπλών γαλακτωμάτων ο<sub>1</sub>/w/ο<sub>2</sub> με τη χρήση φυσικών και μιγμάτων φυσικών και χημικών γαλακτωματοποιητών. Η μορφολογία και η δομή τους αξιολογήθηκε με συνεστιακό ανάστροφο μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ (Leica TCS SP8P).

## 2.2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.2.1 Πρώτες Ύλες και Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν:

- Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (Μινέρβα Α.Ε., Ελλάδα) ως λιπαρή φάση,
- Tween 20 (μονολαυρική πολυοξυαιθυλενο-σορβιτάνη) από την Across Organics (New Jersey, USA), Καζεϊνικό Νάτριο από τη Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA) και Λεκιθίνη από την ION Α.Ε. (Νέο Φάληρο, Ελλάδα) ως γαλακτωματοποιητές,
- Συνένζυμο Q<sub>10</sub> από την Transparent Labs (Utah, USA) ως βιοδραστικό συστατικό, και
- Απιονισμένο νερό ως υδατική φάση.

Επιπλέον, για τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, έγινε χρήση εξανίου και αιθανόλης από την Across Organics (New Jersey, USA). Ως φθορίζουσες χρωστικές ουσίες για τα διπλά γαλακτώματα, χρησιμοποιήθηκε ερυθρό του Νείλου (Nile red) και φθορίζον άλας του νατρίου (Fluorescein sodium salt) από τη Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA).

### 2.2.2 Συσκευές και Σκεύη

Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Υδατόλουτρο (Kotterman Labortechnik, type 3047 West Germany),
- Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας (CAT Unidrive 1000 Homogenizer, CAT Scientific, Ca., USA),
- Συσκευή υπερήχων (High intensity ultrasonic processor, Microprocessor controlled, 400W),
- Συνεστιακό ανάστροφο μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ (Leica TCS SP8P),
- Ιξωδόμετρο (Brookfield DV-II Pro Viscometer, Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA),
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V),



- Φυγόκεντρος (Heraeus™ Megafuge™ 16 Centrifuge Series),
- Vortex mixer (Velp Scientifica),
- Αναλυτής σκέδασης φωτός (Zetasizer nano-zs 2000, Malvern Instruments Ltd, UK),
- Διαθλασίμετρο (B&C 32400 ABBE),
- Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη πλάκα (Velp Scientifica),
- Αυτόματες πιπέτες, και
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας.

Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα υάλινα σκεύη, όπως ποτήρια ζέσεως, δοκιμαστικοί σωλήνες, σιφόνια μέτρησης, χωνιά και διαχωριστικές χοάνες. Επιπλέον, σταγονόμετρα, πλαστική αντλία σιφονίου και πουάρ, πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης και ρύγχη πιπετών (tips) χρειάστηκαν. Τέλος, έγινε χρήση αντικειμενοφόρων πλακών για το μικροσκόπιο σάρωσης.

### **2.2.3 Πειραματική Διαδικασία**

#### ***A. Παρασκευή μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων***

Τα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ο/w παρασκευάστηκαν με την ακόλουθη διαδικασία. Σε ένα ποτήρι ζέσεως, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού και προστίθεται ο εκάστοτε γαλακτωματοποιητής σε προκαθορισμένη αναλογία 3%, 5%, 8% και 10% κατά βάρος τελικού μίγματος. Το εν λόγω μίγμα αναδεύεται σε μαγνητικό stirrer για τουλάχιστον 10 min μέχρις ότου διαλυθεί πλήρως ο γαλακτωματοποιητής στο νερό. Σε ένα δεύτερο ποτήρι ζέσεως, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου. Στη συνέχεια, το πρώτο ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 40 °C και σε ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (10.000 rpm) για 10 min. Ταυτόχρονα, στο εν λόγω μίγμα, ξεκίνησε η στάγδην προσθήκη του προζυγισμένου ελαίου, περιεκτικότητας 5% ή 10% κ.β. Το τελικό βάρος του προκύπτοντος δείγματος ήταν 50 g. Τέλος, το γαλάκτωμα που έχει σχηματιστεί τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων (high intensity ultrasonic processor με μέγιστη ισχύ 400 W), ενώ ρυθμίζεται ένταση ποσοστού 50% της συνολικής διαθέσιμης από τη συσκευή και χρόνος 8 min.

#### ***B. Παρασκευή νανογαλακτωμάτων με το ενσωματωμένο βιοδραστικό συστατικό CoQ<sub>10</sub>***

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων ήταν ίδια με αυτή που περιεγράφηκε παραπάνω για τα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα. Η μόνη διαφορά ήταν ότι το έλαιο ήταν εμπλουτισμένο με το βιοδραστικό συστατικό CoQ<sub>10</sub> σε περιεκτικότητα 6% κατά βάρος.



### *Γ. Παρασκευή διπλών γαλακτωμάτων ο<sub>1</sub>/w/ο<sub>2</sub>*

Η παρασκευή των διπλών ο<sub>1</sub>/w/ο<sub>2</sub> γαλακτωμάτων έγινε ακολουθώντας τη διαδικασία ομογενοποίησης δύο σταδίων. Σε ένα ποτήρι ζέσεως, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου και προστίθεται ο εκάστοτε γαλακτωματοποιητής (ο<sub>2</sub>), σε προκαθορισμένη αναλογία 3% κατά βάρος τελικού μίγματος. Οι γαλακτωματοποιητές που δοκιμάστηκαν ήταν το Tween 20, το καζεϊνικό νάτριο, η λεκιθίνη, τα μίγματα Tween 20/καζεϊνικού νατρίου, Tween 20/λεκιθίνης και καζεϊνικού νατρίου/λεκιθίνης. Το εν λόγω μίγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 40 °C και αναδεύεται σε ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (10.000 rpm) για τουλάχιστον 10 min μέχρις ότου διαλυθεί πλήρως ο γαλακτωματοποιητής στο έλαιο. Σε ένα δεύτερο ποτήρι ζέσεως, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα του φρέσκου ο<sub>1</sub>/w νανογαλακτώματος με EVOO 5% κ.β. και μίγμα γαλακτωματοποιητών Tween 20/λεκιθίνης 5% κ.β. και διαλύθηκε σε αυτήν ποσότητα φθορίζουσας χρωστικής ουσίας (0,2% βάρος κατ' όγκο). Στο πρώτο στάδιο, στο ποτήρι με το έλαιο, ξεκίνησε η στάγδην προσθήκη του προζυγισμένου νανογαλακτώματος, περιεκτικότητας 3% κ.β. Το τελικό βάρος του προκύπτοντος δείγματος ήταν 30 g. Τέλος, στο δεύτερο στάδιο, το αρχικό ο<sub>1</sub>/w/ο<sub>2</sub> γαλάκτωμα που έχει σχηματιστεί τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων (high intensity ultrasonic processor με μέγιστη ισχύ 400 W), ενώ ρυθμίζεται ένταση ποσοστού 40% της συνολικής διαθέσιμης από τη συσκευή και χρόνος 2 min. Στη λιπαρή φάση, προστέθηκε ερυθρό του Νείλου (Nile red) σε περιεκτικότητα 0,02% κ.β. και στην υδατική φάση, με φθορίζον άλας του νατρίου (Fluorescein sodium salt) σε περιεκτικότητα 0,2% κ.ο.

### *2.2.4 Αναλύσεις*

#### *Μέτρηση Ιξώδους*

Το ιξώδες των νανογαλακτωμάτων μετρείται με το ιξωδόμετρο Brookfield. Συγκεκριμένα, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και σε ειδικό δοχείο προστίθενται 60 mL από το προς μέτρηση δείγμα. Στη συνέχεια, επιλέγεται το στέλεχος S61 και ορίζεται η ταχύτητα στα 50 rpm. Τα συγκεκριμένα γαλακτώματα είναι νευτωνικά ρευστά, επομένως η τιμή που προκύπτει από το όργανο αρκεί για τον προσδιορισμό των ρεολογικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων. Παράλληλα με την τιμή του ιξώδους, καταγράφεται και η θερμοκρασία που δίνει το όργανο για τον έλεγχο τυχόν αποκλίσεων και σφαλμάτων.

#### *Εξοπλισμός:*

1. Ιξωδόμετρο Brookfield με χρήση στελέχους S61.
2. Ογκομετρικός σωλήνας για τοποθέτηση δείγματος.



Εικόνα 2.1: Ίξωδόμετρο Brookfield.

#### Διαδικασία:

1. Τίθεται σε λειτουργία το ιξωδόμετρο και γίνεται αυτόματη βαθμονόμηση (calibration) του οργάνου.
2. Τοποθετείται το στέλεχος.
3. Επιλέγεται από την οθόνη του οργάνου η ρύθμιση για το στέλεχος S61 και ο αριθμός των στροφών ανά min (50 rpm).
4. Μεταφέρεται η κατάλληλη ποσότητα γαλακτώματος στον ογκομετρικό κύλινδρο.
5. Ακολουθεί εμβάπτιση του στελέχους στο γαλάκτωμα και λήψη της μέτρησης σε cP.

#### *Μέτρηση Θολότητας*

Η θολότητα των νανογαλακτωμάτων προσδιορίστηκε με φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V). Η μέτρηση γίνεται στα 600 nm και η θερμοκρασία των δειγμάτων ήταν σταθερή και ίση με 25 °C.

#### Εξοπλισμός:

1. Φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V).
2. Ειδικές γυάλινες κυψελίδες 10 mm για την τοποθέτηση των δειγμάτων (Hellma Analytics, Germany).



Εικόνα 2.2: Φασματοφωτόμετρο.

### Διαδικασία:

1. Τίθεται σε λειτουργία το όργανο και ορίζεται το μήκος κύματος στα 600 nm.
2. Τοποθετείται ποσότητα απιονισμένου νερού στην ειδική κυψελίδα μέχρι το ύψος της χαραγής.
3. Τοποθετείται η κυψελίδα στην ειδική υποδοχή του οργάνου και γίνεται autozero.
4. Τοποθέτηση δείγματος στην ειδική κυψελίδα μέχρι το ύψος της χαραγής και λήψη μέτρησης.

Σημειώνεται ότι για τη μετατροπή της απορρόφησης σε θολότητα χρησιμοποιείται η εξής σχέση:

$$\text{Θολότητα} = 2,303 \cdot \text{Απορρόφηση}$$

όπου: Θολότητα [ $cm^{-1}$ ].

### **Μέτρηση Δείκτη Διάθλασης**

Ο δείκτης διάθλασης των γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε με χρήση διαθλασίμετρου (B&C 32400 ABBE) σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C. Παράλληλα με την τιμή του δείκτη διάθλασης, καταγράφεται και η θερμοκρασία που δίνει το όργανο για τον έλεγχο τυχόν αποκλίσεων και σφαλμάτων.

### Εξοπλισμός:

1. Διαθλασίμετρο (B&C 32400 ABBE).
2. Σταγονόμετρο.



Εικόνα 2.3: Διαθλασίμετρο (B&C 32400 ABBE).

### Διαδικασία:

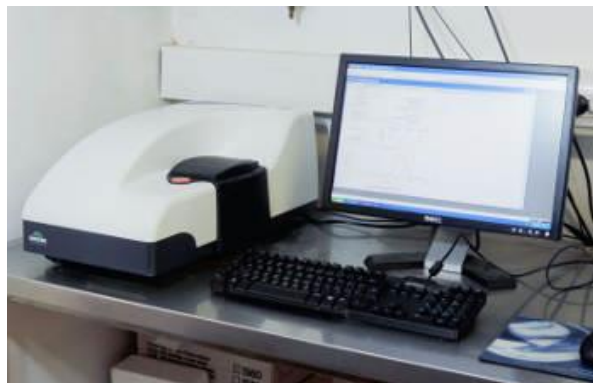
1. Άνοιγμα του οργάνου.
2. Τοποθέτηση σταγόνας δείγματος στην ειδική πλάκα.
3. Λήψη της μέτρησης.

## *Μέτρηση Μέσης Διαμέτρου (Mean Diameter) σταγονιδίων και Δείκτη Πολυδιασποράς PDI (Polydispersity Index)*

Το μέγεθος των σταγονιδίων και η κατανομή του μεγέθους τους προσδιορίστηκαν με τη Δυναμική Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Οι μετρήσεις έγιναν στους 25 °C.

### Εξοπλισμός:

1. Όργανο Zetasizer nano-zs 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK).
2. Ειδικές κυψελίδες τοποθέτησης δείγματος/Disposable folded capillary cells (Malvern Instruments Ltd, UK).
3. Software οργάνου.



Εικόνα 2.4: Zetasizer Nano-zs 2000.

### Διαδικασία:

1. Γίνεται εκκίνηση του προγράμματος και κατόπιν άνοιγμα του οργάνου.
2. Επιλέγεται η μέθοδος της μέτρησης και ορίζεται το όνομα του δείγματος και η κωδικοποίησή του.
3. Τοποθετείται η κυψελίδα στην ειδική υποδοχή.
4. Λαμβάνεται η μέτρηση και αποθηκεύεται σε ειδικό spreadsheet του Software.

## *Μέτρηση ζ-Δυναμικού (Zeta-Potential)*

Το ηλεκτρικό δυναμικό στο επίπεδο διάτμησης αναφέρεται ως ζ-Δυναμικό (Zeta-Potential). Μετρείται μέσω του Zetasizer Nano-ZS 2000 και οι μονάδες μέτρησής του είναι τα mV. Η διαδικασία της μέτρησης είναι ίδια με αυτήν που περιεγράφηκε παραπάνω για τη μέση διάμετρο σταγονιδίων.

### *Μέτρηση Δείκτη Σταθερότητας γαλακτώματος (Emulsion Stability Index, ESI)*

Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε βάσει του διαχωρισμού φάσης, λόγω της διαφοράς του ειδικού βάρους. Σε δύο γυάλινους βαθμονομημένους δοκιμαστικούς σωλήνες των 20 mL, μεταφέρθηκε ποσότητα του ίδιου παρασκευαζόμενου γαλακτώματος. Οι σωλήνες αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον (25 °C) και σε ψύξη (4 °C) για 8 εβδομάδες. Η αποκορύφωση των λιπαρών και η δημιουργία κρέμας στην κορυφή του δείγματος προσδιορίζονται από την αναλογία του όγκου της κορυφής και του ιζήματος επί του συνολικού όγκου του γαλακτώματος.

Ο Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI) υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$ESI (\%) = 100 \cdot \frac{HE - (HS + HC)}{HE}$$

όπου:

*HC*: είναι το ύψος της κρέμας,

*HS*: είναι το ύψος του ιζήματος, και

*HE*: είναι το αρχικό ύψος του γαλακτώματος.

#### Εξοπλισμός:

1. Γυάλινοι βαθμονομημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 mL.

#### Διαδικασία:

1. Μεταφέρονται 20 mL από κάθε παρασκευασθέν δείγμα σε δοκιμαστικό σωλήνα.
2. Αποθηκεύονται για διάστημα 8 εβδομάδων στους 4 και τους 25 °C.
3. Πραγματοποιείται εβδομαδιαία παρακολούθηση και καταγραφή της στάθμης των φάσεων.
4. Γίνεται υπολογισμός των λόγων ESI.

### *Μέτρηση Διατηρησιμότητας Συνένζυμου Q<sub>10</sub> (RCoQ<sub>10</sub>%)*

Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με στόχο τον υπολογισμό του περιεχομένου σε CoQ<sub>10</sub>, ώστε να μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα ως προς τη διατηρησιμότητα του ενσωματωμένου βιοδραστικού συστατικού.

Η διατηρησιμότητα του CoQ<sub>10</sub> υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης:

$$RCoQ_{10} \% = \frac{RCoQ_{10, f}}{RCoQ_{10, i}} \cdot 100$$

όπου:

$RCoQ_{10}\%$ : το ποσοστό διατήρησης του  $CoQ_{10}$ ,

$RCoQ_{10}, i$ : η συγκέντρωση του  $CoQ_{10}$  την ημέρα παρασκευής του νανογαλακτώματος,

$RCoQ_{10}, f$ : η συγκέντρωση του  $CoQ_{10}$  την ημέρα της δειγματοληψίας,

#### Εξοπλισμός:

1. Φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V).
2. Ειδικές κυψελίδες χαλαζία 10 mm για την τοποθέτηση των δειγμάτων (Hellma Analytics, Germany).
3. Φυγόκεντρος (Heraeus™ Megafuge™ 16 Centrifuge Series).

#### Διαδικασία:

1. Σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρωσης, προστίθενται 1 g δείγματος (νανογαλάκτωμα), 2 mL αιθανόλης και 3 mL εξάνιου.
2. Οι σωλήνες σφραγίζονται και τοποθετούνται στη φυγόκεντρο, η οποία ρυθμίζεται στις 5500 rpm για 10 min.
3. Το δείγμα τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη, απορρίπτεται η κάτω φάση της αιθανόλης με το νερό και παραλαμβάνεται η πάνω φάση του ελαίου με το εξάνιο σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως.
4. Το ποτήρι με το έλαιο και το εξάνιο αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h, προκειμένου να εξατμιστεί το εξάνιο και να ληφθεί το έλαιο.
5. Το ποτήρι ζυγίζεται και προσδιορίζεται η ποσότητα του ελαίου που περιείχε το δείγμα του νανογαλακτώματος.
6. Στο ποτήρι, προστίθεται 5 mL εξάνιου για την παραλαβή του ελαίου και πραγματοποιείται αραιώση 1:50.
7. Τέλος, προσδιορίζεται η απορρόφηση του δείγματος στα 275 nm, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV / Vis, 200 V). Το διάλυμα ελαίου (χωρίς το  $CoQ_{10}$ ) και εξάνιου χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό δείγμα. Η συγκέντρωση του συνένζυμου  $Q_{10}$  προσδιορίστηκε μέσω καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με διάλυση του  $CoQ_{10}$  σε εξάνιο και σε διάφορες γνωστές συγκεντρώσεις.

#### **Μέτρηση Δομής των διπλών γαλακτωμάτων**

Η μορφολογία και η δομή των διπλών γαλακτωμάτων  $o_1/w/o_2$  αξιολογήθηκαν με συνεστιακό ανάστροφο μικροσκόπιο σάρωσης με λείζερ (Leica TCS SP8P), σε μεγέθυνση 63X. Η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8P της Μονάδας Οπτικής Μικροσκοπίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε - κατάλληλες για το μικροσκόπιο - αντικειμενοφόρες πλάκες, οι οποίες

καλύφθηκαν με γυαλί και υποβλήθηκαν σε μήκος κύματος διέγερσης 561 nm. Το μήκος κύματος εκπομπής για το Nile red ήταν 543 nm και 605 nm, ενώ για το Fluorescein sodium salt 510 – 520 nm. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση CLSM ήταν το LASX.



Εικόνα 2.5: Συνεστιακό ανάστροφο μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ (Leica TCS SP8P).

## 2.3 Σχεδιασμός Πειραμάτων

Για την κατανόηση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, θα γίνει μία συνοπτική περιγραφή τους. Συγκεκριμένα, θα παρουσιαστούν οι αναλογίες των γαλακτωματοποιητών, του νερού και του ελαίου χωρίς και με το βιοδραστικό συστατικό. Το συνένζυμο Q<sub>10</sub> διαλύθηκε σε περιεκτικότητα 6% κ.β. στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα πειράματα χωρίστηκαν σε δύο μέρη, στο μεν πρώτο έγινε η παρασκευή μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων και στο δε δεύτερο – αφότου έγινε επιλογή των καλύτερων συστημάτων – παρασκευάστηκαν τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.

### A. Παρασκευή μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων

Στους παρακάτω πίνακες, φαίνονται οι ονομασίες των δειγμάτων και τα είδη των γαλακτωματοποιητών, καθώς και οι περιεκτικότητες % κ.β. τόσο του γαλακτωματοποιητή όσο και του νερού, για περιεκτικότητες 5% και 10% κατά βάρος εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου.



**Πίνακας 2.1:** Αναλογίες γαλακτωματοποιητών–νερού σε περιεκτικότητα 5% κ.β. εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου.

<i>Όνομασία Δείγματος</i>	<i>Είδος Γαλακτωματοποιητή</i>	<i>Περιεκτικότητα % κ.β. σε γαλακτωματοποιητή</i>	<i>Περιεκτικότητα % κ.β. σε νερό</i>
O5 T20 3	Tween 20	3%	92%
O5 T20 5	Tween 20	5%	90%
O5 K 3	Καζεΐνη	3%	92%
O5 K 5	Καζεΐνη	5%	90%
O5 L 3	Λεκιθίνη	3%	92%
O5 L 5	Λεκιθίνη	5%	90%
O5 T20/K 5	Tween 20/Καζεΐνη (1:1)	5% (Tween 20: 2,5%, Καζεΐνη: 2,5%)	90%
O5 T20/L 5	Tween 20/Λεκιθίνη (1:1)	5% (Tween 20: 2,5%, Λεκιθίνη: 2,5%)	90%

**Πίνακας 2.2:** Αναλογίες γαλακτωματοποιητών–νερού σε περιεκτικότητα 10% κ.β. εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου.

<i>Όνομασία Δείγματος</i>	<i>Είδος Γαλακτωματοποιητή</i>	<i>Περιεκτικότητα % κ.β. σε γαλακτωματοποιητή</i>	<i>Περιεκτικότητα % κ.β. σε νερό</i>
O10 T20 8	Tween 20	8%	82%
O10 T20 10	Tween 20	10%	80%
O10 K 8	Καζεΐνη	8%	82%
O10 K 10	Καζεΐνη	10%	80%
O10 L 8	Λεκιθίνη	8%	82%
O10 L 10	Λεκιθίνη	10%	80%
O10 T20/K 10	Tween 20/Καζεΐνη (1:1)	10% (Tween 20: 5%, Καζεΐνη: 5%)	80%
O10 T20/L 10	Tween 20/Λεκιθίνη (1:1)	10% (Tween 20: 5%, Λεκιθίνη: 5%)	80%

## *B. Παρασκευή νανογαλακτωμάτων με το ενσωματωμένο βιοδραστικό συστατικό CoQ<sub>10</sub>*

Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται τα καλύτερα συστήματα νανογαλακτωμάτων, τα οποία και εμπλουτίστηκαν με το συνένζυμο Q<sub>10</sub>.

**Πίνακας 2.3:** Αναλογίες γαλακτωματοποιητών–νερού–ελαίου των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων.

<i>Ονομασία Δείγματος</i>	<i>Είδος Γαλακτωματοποιητή</i>	<i>Περιεκτικότητα % κ.β. σε γαλακτωματοποιητή</i>	<i>Περιεκτικότητα % κ.β. σε νερό</i>	<i>Περιεκτικότητα % κ.β. σε EVOO</i>
Q10 O5 T20 3	Tween 20	3%	92%	5%
Q10 O5 L 3	Λεκιθίνη	3%	92%	5%
Q10 O5 T20/K 5	Tween 20/Καζεΐνη (1:1)	5% (Tween 20: 2,5%, Καζεΐνη: 2,5%)	90%	5%
Q10 O5 T20/L 5	Tween 20/Λεκιθίνη (1:1)	5% (Tween 20: 2,5%, Λεκιθίνη: 2,5%)	90%	5%
Q10 O10 T20 8	Tween 20	8%	82%	10%
Q10 O10 L 8	Λεκιθίνη	8%	82%	10%

### 3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η παρασκευή σταθερών ναογαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό με την προσθήκη βιοδραστικού συστατικού. Όσον αφορά τους γαλακτωματοποιητές, χρησιμοποιήθηκε ένας χημικός, το Tween 20, που έχει μελετηθεί αρκετές φορές στο παρελθόν στο εργαστήριο και είναι γνωστός για τις καλές γαλακτωματοποιητικές ιδιότητές του. Παράλληλα, το πεδίο της μελέτης επικεντρώθηκε στους φυσικούς γαλακτωματοποιητές, με το καζεϊνικό νάτριο (καζεΐνη) και τη λεκιθίνη που αναφέρονται αφενός στη βιβλιογραφία και αφετέρου παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της φύσης τους και της εύκολης διαθεσιμότητάς τους. Ωστόσο, στην πορεία των πειραμάτων, φάνηκε σκόπιμη η παρασκευή και η μελέτη ναογαλακτωμάτων με μίγματα χημικών και φυσικών γαλακτωματοποιητών, για την επίτευξη καλύτερων ιδιοτήτων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πειραματικό μέρος της εργασίας χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος, παρασκευάστηκε ένας μεγάλος αριθμός ναογαλακτωμάτων χωρίς την προσθήκη βιοδραστικού συστατικού, ενώ προσδιορίστηκαν και μελετήθηκαν οι ιδιότητες αυτών. Η σταθερότητα και η διατηρησιμότητα αποτέλεσαν τις βασικές παραμέτρους για την επιλογή των καλύτερων συστημάτων που θα χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια. Στο δεύτερο μέρος λοιπόν, παρασκευάστηκαν ναογαλακτώματα με βιοδραστικό συστατικό, τα οποία διατηρήθηκαν και μελετήθηκαν παρομοίως.

Το πρώτο μέρος χωρίστηκε σε τρεις σειρές πειραμάτων.

- 1<sup>η</sup> σειρά: περιεκτικότητα 5% κ.β. σε EVOO και 3% και 5% κ.β. σε γαλακτωματοποιητές (Tween 20, καζεΐνη, λεκιθίνη).
- 2<sup>η</sup> σειρά: περιεκτικότητα 10% κ.β. σε EVOO και 8% και 10% κ.β. σε γαλακτωματοποιητές (Tween 20, καζεΐνη, λεκιθίνη).
- 3<sup>η</sup> σειρά: περιεκτικότητα 5% και 10% κ.β. σε EVOO και 5% και 10% κ.β., αντίστοιχα, σε μίγματα 1 προς 1 χημικού και φυσικών γαλακτωματοποιητών (Tween 20 με καζεΐνη, Tween 20 με λεκιθίνη).

Σε όλα τα δείγματα, εξετάστηκε η δυνατότητα σχηματισμού των ναογαλακτωμάτων ο/w και μετρήθηκαν όλες οι ιδιότητές τους και η διατηρησιμότητά τους. Η αποθήκευσή τους έγινε σε συνθήκες περιβάλλοντος (25 °C) και ψύξης (4 °C).

Το δεύτερο μέρος των πειραμάτων έγινε μετά το πέρας δύο μηνών μελέτης των μη εμπλουτισμένων ναογαλακτωμάτων. Τα καλύτερα συστήματα που επιλέχθηκαν είχαν:

- περιεκτικότητα 5% κ.β. σε EVOO και 3% κ.β. σε Tween 20,
- περιεκτικότητα 5% κ.β. σε EVOO και 3% κ.β. σε λεκιθίνη,
- περιεκτικότητα 5% κ.β. σε EVOO και 5% κ.β. σε Tween 20 και καζεΐνη (μίγμα 1 προς 1),

- περιεκτικότητα 5% κ.β. σε EVOO και 5% κ.β. σε Tween 20 και λεικιθίνη (μίγμα 1 προς 1),
- περιεκτικότητα 10% κ.β. σε EVOO και 8% κ.β. σε Tween 20, και
- περιεκτικότητα 10% κ.β. σε EVOO και 8% κ.β. σε λεικιθίνη.

Η αναλογία του CoQ<sub>10</sub> ήταν 6% κ.β. σε EVOO. Πέρα από τις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν και στα δείγματα χωρίς το βιοδραστικό συστατικό, μελετήθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης του CoQ<sub>10</sub>. Όλες οι μετρήσεις έγιναν στα ίδια δείγματα, το ένα μέρος των οποίων αποθηκεύτηκε στο περιβάλλον και το άλλο σε ψύξη.

Οι ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων που εξετάστηκαν είναι οι εξής: το ιξώδες, η θολότητα, ο δείκτης διάθλασης, η μέση διάμετρος σταγονιδίων (MDD), ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI), το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) και ο δείκτης σταθερότητας του νανογαλακτώματος (ESI). Στο πρώτο μέρος των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε σε εβδομαδιαία βάση μέτρηση της μέσης διαμέτρου σταγονιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς, του ζ-Δυναμικού και του δείκτη σταθερότητας του νανογαλακτώματος για χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων. Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, μετρήθηκαν η MDD, ο PDI, ο ESI, το ζ-Δυναμικό και η συγκέντρωση του CoQ<sub>10</sub> ανά δέκα ημέρες για χρονικό διάστημα 40 ημερών.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται σε διαγράμματα, παρακάτω. Ωστόσο, τούτα δεν αρκούν για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη και η στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος STATISTICA. Πιο συγκεκριμένα, θα γίνει εφαρμογή της μεθόδου ANOVA (Analysis of variance, Ανάλυση διακύμανσης), καθώς και της μεθόδου PCA (Principal Component Analysis, Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών). Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, η θερμοκρασία και ο χρόνος αποθήκευσης και η διατήρηση του βιοδραστικού συστατικού. Συνεπώς, μελετήθηκε η επίδραση των παραγόντων αυτών στις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων. Τέλος, επισημάνθηκαν για καθεμία ιδιότητα, οι τυχόν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των ιδιοτήτων των δειγμάτων (με χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test).

Σημειώνεται ότι τα δείγματα με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. και γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη 10% και το μίγμα καζεΐνης και Tween 20 (αναλογία 1:1) 10% δεν σχημάτισαν νανογαλακτώματα, καθώς διασπάστηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους. Συνεπώς, στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων και τη στατιστική επεξεργασία δεν συμπεριλαμβάνονται.

Τέλος, όσον αφορά τα διπλά γαλακτώματα, παρατίθενται οι απεικονίσεις CLSM για κάθε χρησιμοποιούμενο γαλακτωματοποιητή.

## **3.1 Μελέτη των ιδιοτήτων των νανογαλακτωμάτων**

### **3.1.1 Μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα**

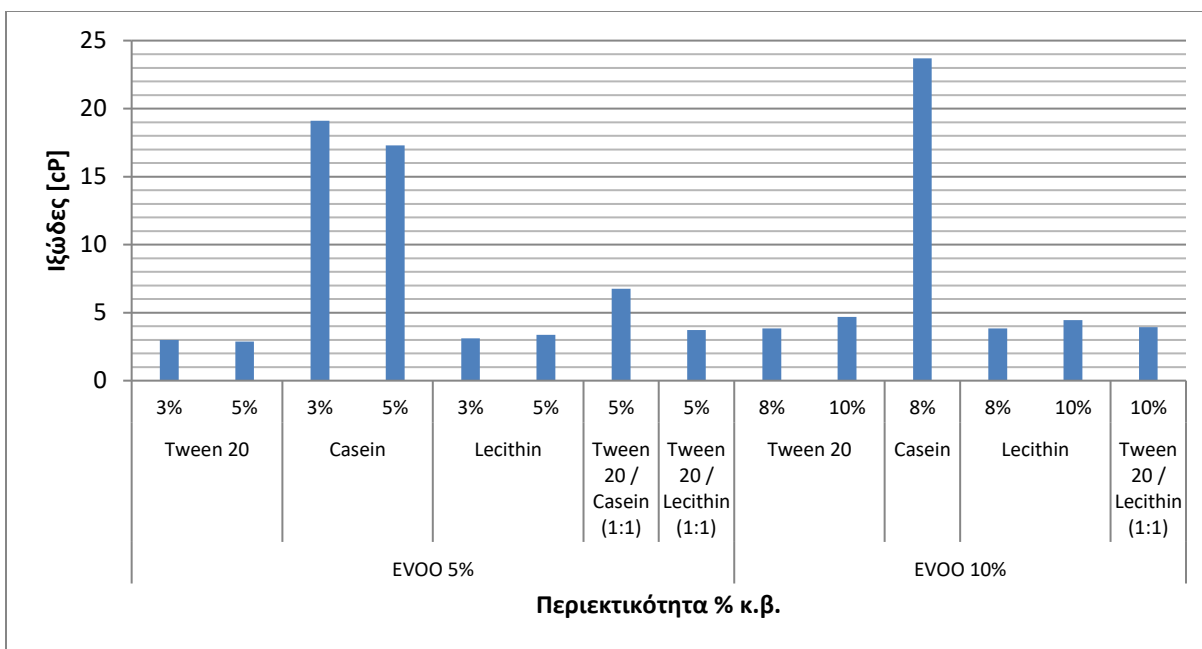
Παρακάτω, παρατίθενται οι ιδιότητες όλων των νανογαλακτωμάτων την ημέρα της παρασκευής τους και μελετάται η διατηρησιμότητά τους με τη χρήση διαφόρων δεικτών. Μέσω της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, μελετήθηκαν τα νανογαλακτώματα με έναν χημικό ή φυσικό γαλακτωματοποιητή και έγινε διαχωρισμός των δειγμάτων σε εκείνα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και σε εκείνα με 10% κ.β.

#### **3.1.1.1 Ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων την ημέρα παρασκευής τους**

Μέσω της στατιστικής επεξεργασίας, μελετήθηκε η επίδραση του είδους και της περιεκτικότητας % κ.β. του γαλακτωματοποιητή στις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων κατά την ημέρα της παρασκευής τους.

#### **Ιξώδες**

Γενικά, οι ρεολογικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων καθορίζονται από τη δομή τους. Το ιξώδες εξαρτάται από τη δομή του νανογαλακτώματος, τη συγκέντρωση και την κατανομή μεγέθους των διεσπαρμένων σταγονιδίων, καθώς και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σταγονιδίων. Επιπλέον, ο τύπος και το σχήμα των συσσωματωμάτων που ενδέχεται να σχηματιστούν επηρεάζουν το τελικό ιξώδες του νανογαλακτώματος. Στην παρούσα εργασία, όλα τα νανογαλακτώματα ο/w που παρασκευάστηκαν ήταν νευτωνικά ρευστά και η τιμή του ιξώδους τους κυμάνθηκε από 2,88 έως 23,7 cP. Η θερμοκρασία μέτρησης των δειγμάτων κυμαινόταν από 20,5 έως και 21,4 °C, σύμφωνα με την ένδειξη του ιξωδόμετρου.



**Διάγραμμα 3.1:** Μεταβολή της τιμής του ιζώδους συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.

Από το Διάγραμμα 3.1, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με το Tween 20 και τη λεκιθίνη ως γαλακτωματοποιητές έδωσαν τις μικρότερες τιμές ιζώδους. Αντίθετα, τα νανογαλακτώματα με την καζεΐνη είχαν τις υψηλότερες τιμές ιζώδους. Τούτο ήταν αναμενόμενο, καθώς η καζεΐνη είναι γνωστή για την ικανότητα δέσμευσης νερού και λίπους, πάχυνσης, ζελοποίησης και αύξησης του ιζώδους. Όσον αφορά την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, δεν επηρέασε τις τιμές του ιζώδους κάθε νανογαλακτώματος. Ειδικότερα, στην περίπτωση του Tween 20 και της λεκιθίνης, ανεξαρτήτως της περιεκτικότητας του ελαίου, το ιζώδες των γαλακτωμάτων παραμένει σταθερό αυξανόμενης της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή. Αντίθετα, τα νανογαλακτώματα με την καζεΐνη φαίνεται να έχουν μικρότερο ιζώδες με την αύξηση της περιεκτικότητάς της. Η μέγιστη τιμή ιζώδους (23,7 cP) παρουσιάστηκε στο νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα EVOO 10% και καζεΐνης 8%, ενώ η ελάχιστη τιμή (2,88 cP) για περιεκτικότητα EVOO 5% και Tween 20 5%. Τα νανογαλακτώματα με τα μίγματα γαλακτωματοποιητών έχουν αρκετά χαμηλές τιμές ιζώδους. Συγκεκριμένα, το δείγμα με το μίγμα Tween 20/καζεΐνης έχει μικρότερο ιζώδες απ' ό,τι με την καζεΐνη, ενώ τα νανογαλακτώματα με το μίγμα Tween 20/λεκιθίνης έχουν παρόμοιο ιζώδες με εκείνα με τη λεκιθίνη.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

Από τη στατιστική επεξεργασία των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα EVOO 5% κατά βάρος, προέκυψε ότι το είδος του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά την τιμή του ιζώδους των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ), όπως παρατηρήθηκε και στο Διάγραμμα 3.1. Επιπλέον, για το είδος του γαλακτωματοποιητή, μελετήθηκαν οι τυχόν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών του ιζώδους, με χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test.

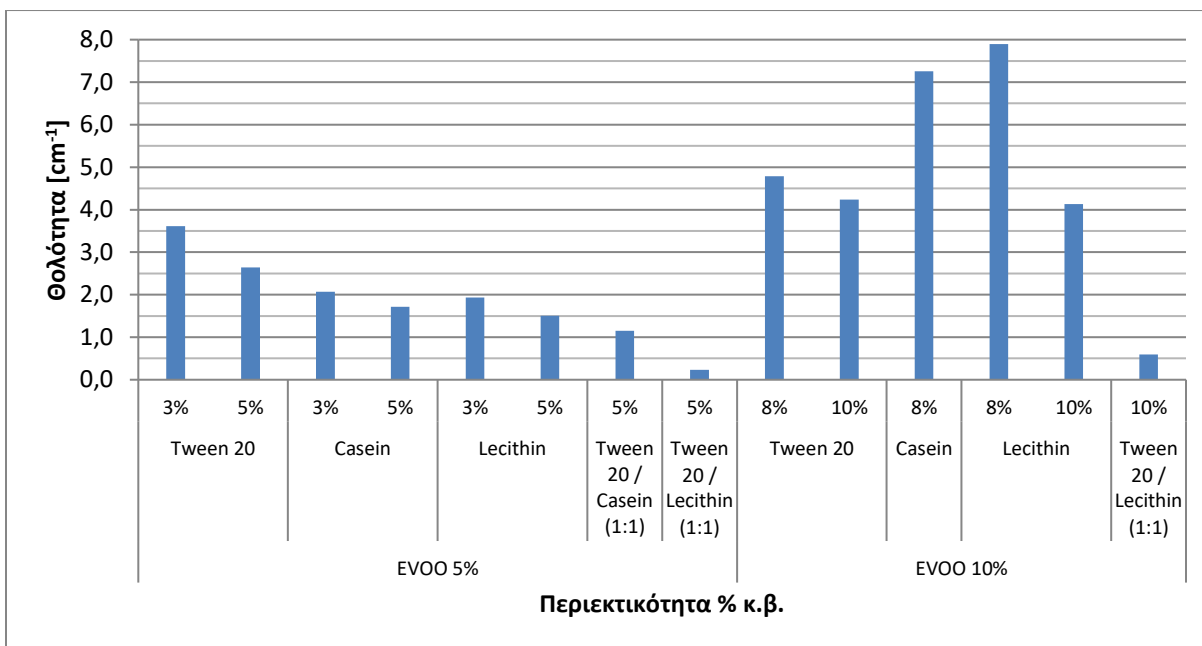
Προέκυψε, λοιπόν, ότι τα δείγματα του Tween 20 (μέση τιμή 2,94 *cP*) έχουν παρόμοιες μέσες τιμές ιξώδους με τα δείγματα της λεκιθίνης (μέση τιμή 3,24 *cP*). Αντίθετα, τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη έχουν σημαντικά μεγαλύτερο ιξώδες (18,2 *cP*).

### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Ομοίως και για τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα ελαίου 10% κατά βάρος, προέκυψε ότι το είδος του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά την τιμή του ιξώδους των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ), όπως φάνηκε και στο Διάγραμμα 3.1. Από το Duncan's test, βρέθηκε ότι η μέση τιμή του ιξώδους των δειγμάτων με την καζεΐνη (23,7 *cP*) είναι σημαντική μεγαλύτερη από εκείνη των νανογαλακτωμάτων με το Tween 20 (4,26 *cP*) και τη λεκιθίνη (4,14 *cP*). Είναι ξεκάθαρο ότι το Tween 20 και η λεκιθίνη παρέχουν παρόμοιες τιμές ιξώδους στα νανογαλακτώματά τους.

### Θολότητα

Η θολότητα είναι ένδειξη του μέσου μεγέθους και του βαθμού διασποράς των σταγονιδίων, καθώς και της σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων. Τα οπτικά διαυγή και ομογενή νανογαλακτώματα με χαμηλή θολότητα εμφανίζουν χαμηλή πολυδιασπορά, οπότε και είναι αρκετά σταθερά. Στην παρούσα εργασία, οι τιμές της θολότητας κυμάνθηκαν από 0,233 έως 07,899  $cm^{-1}$ .



**Διάγραμμα 3.2:** Μεταβολή της τιμής της θολότητας συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.



Από το Διάγραμμα 3.2, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με το Tween 20 έχουν μεγαλύτερη θολότητα από εκείνα με τους φυσικούς γαλακτωματοποιητές, για περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. Ωστόσο, το είδος του γαλακτωματοποιητή δεν επηρεάζει τις τιμές της θολότητας των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. Ακόμη, η θολότητα των νανογαλακτωμάτων μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή. Η μέγιστη τιμή θολότητας ( $7,899 \text{ cm}^{-1}$ ) παρουσιάστηκε στο νανογαλάκτωμα με EVOO 10% και λεκιθίνη 8%, ενώ η ελάχιστη τιμή ( $0,233 \text{ cm}^{-1}$ ) για περιεκτικότητα EVOO 5% και μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 5%. Τα νανογαλακτώματα με τα μίγματα γαλακτωματοποιητών είχαν τις μικρότερες τιμές θολότητας και στις δύο περιεκτικότητες της λιπαρής φάσης.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

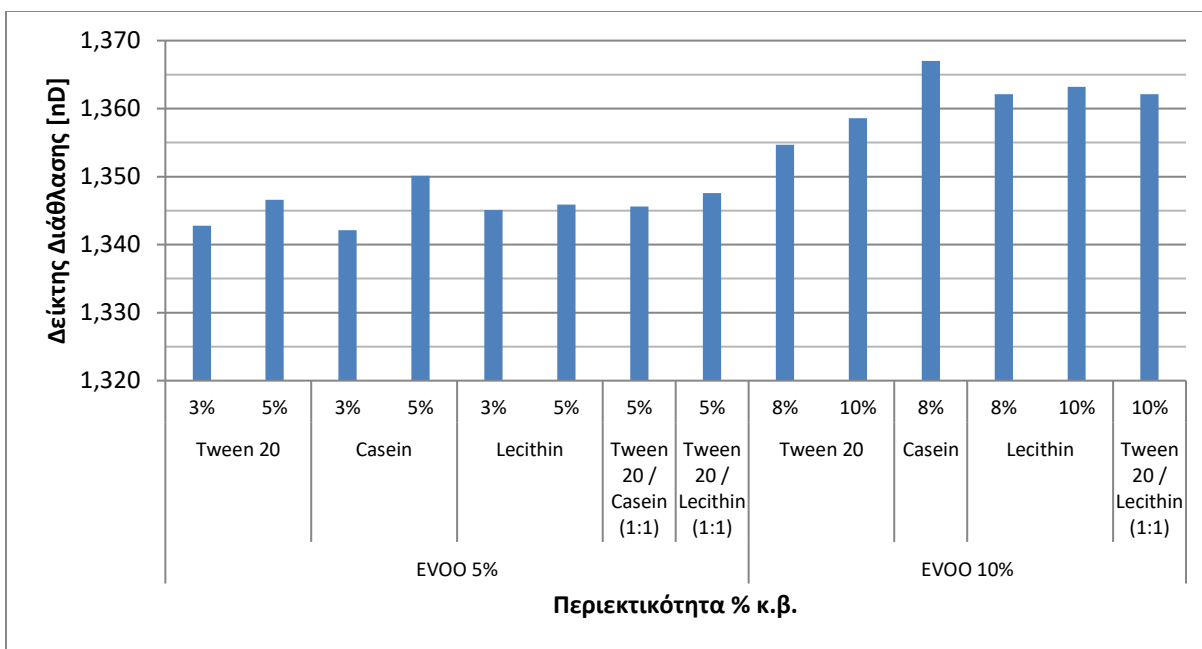
Από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν (είδος και περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή), το είδος του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά την τιμή της θολότητας των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β. ( $p < 0,05$ ). Προέκυψε, λοιπόν, ότι τα δείγματα με τη λεκιθίνη ( $1,721 \text{ cm}^{-1}$ ) και την καζεΐνη ( $1,893 \text{ cm}^{-1}$ ) έχουν παρόμοιες μέσες τιμές θολότητας. Αντίθετα, το Tween 20 παρέχει σημαντικά μεγαλύτερη μέση τιμή θολότητας ( $3,127 \text{ cm}^{-1}$ ) από τους φυσικούς γαλακτωματοποιητές.

#### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Από τη στατιστική επεξεργασία των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα EVOO 10% κατά βάρος, κανένας παράγοντας (είδος και περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή) δεν επηρέασε σημαντικά τη θολότητα των νανογαλακτωμάτων.

#### **Δείκτης Διάθλασης**

Ένα νανογαλάκτωμα είναι διαφανές ή ελαφρώς θολό, αφού τα σταγονίδια είναι σημαντικά μικρότερα από το μήκος κύματος του φωτός, με αποτέλεσμα να το διαχέουν. Επιπλέον, η εμφάνιση ενός νανογαλακτώματος επηρεάζεται από τη διαφορά του δείκτη διάθλασης μεταξύ του ελαίου και της υδατικής φάσης, καθώς αυτός καθορίζει το κλάσμα του φωτός που σκεδάζεται από τα σταγονίδια. Στην παρούσα εργασία, οι τιμές του δείκτη διάθλασης κυμάνθηκαν από 1,3421 έως 1,3670 nD.



**Διάγραμμα 3.3:** Μεταβολή της τιμής του δείκτη διάθλασης συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.

Από το Διάγραμμα 3.3, παρατηρείται ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν ιδιαίτερα το δείκτη διάθλασης του νανογαλακτώματος. Επιπλέον, τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. έχουν μικρότερο δείκτη διάθλασης από τα αντίστοιχα – όσον αφορά το είδος των γαλακτωματοποιητών – με 10% έλαιο. Έτσι, η περιεκτικότητα % κ.β. του EVOO επηρέασε τις τιμές του δείκτη διάθλασης των νανογαλακτωμάτων. Η μέγιστη τιμή του δείκτη διάθλασης (1,3670 nD) παρουσιάστηκε στο νανογαλακτώμα με EVOO 10% και καζεΐνη 8%, ενώ η ελάχιστη τιμή (1,3421 nD) για περιεκτικότητα EVOO 5% και καζεΐνης 3%. Τα νανογαλακτώματα με τα μίγματα γαλακτωματοποιητών είχαν παρόμοιες τιμές δείκτη διάθλασης με εκείνα με έναν γαλακτωματοποιητή.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

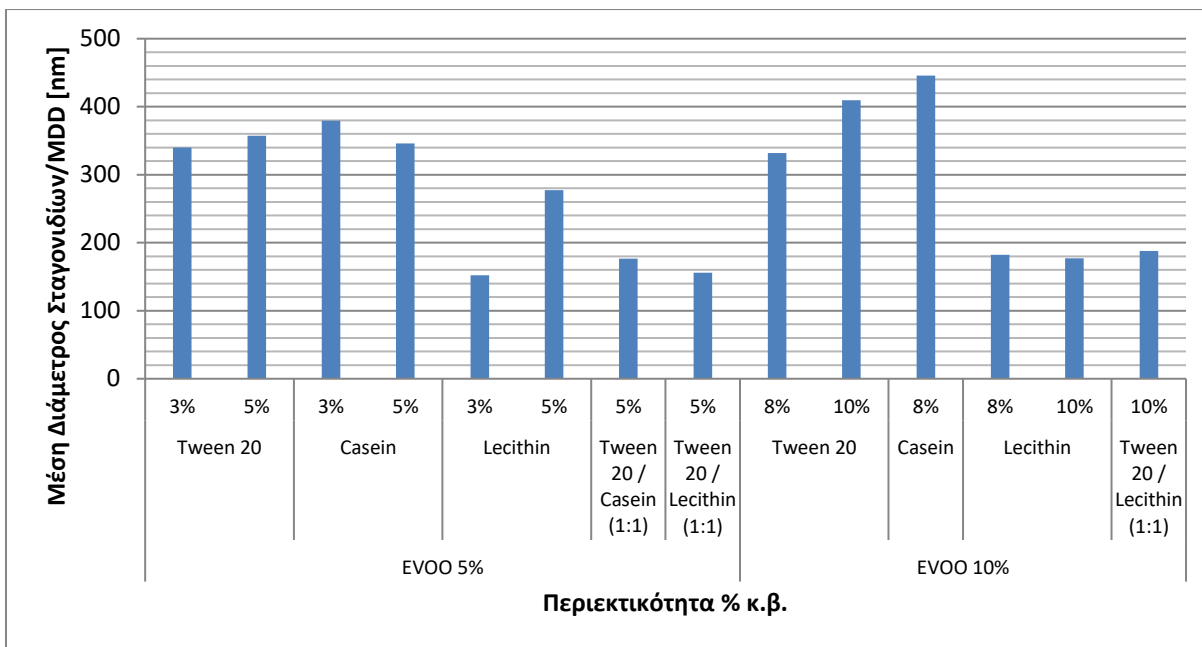
Μέσω της στατιστικής επεξεργασίας, προέκυψε ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν το δείκτη διάθλασης των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. Τούτο εντοπίστηκε και από το Διάγραμμα 3.3.

#### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Ομοίως για τα δείγματα με περιεκτικότητα EVOO 10% κατά βάρος, βρέθηκε ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν σημαντικά το δείκτη διάθλασης των νανογαλακτωμάτων.

### Μέση Διάμετρος σταγονιδίων (MDD)

Η μέση διάμετρος των σταγονιδίων χαρακτηρίζει το είδος του γαλακτώματος και θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική ένδειξη για την αξιολόγηση της σταθερότητάς του. Οι τιμές της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων κυμάνθηκαν από 152,1 έως 445,8 nm.



**Διάγραμμα 3.4:** Μεταβολή της τιμής της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή.

Από το Διάγραμμα 3.4, οι μικρότερες τιμές της MDD παρατηρούνται στα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη και τα μίγματα (Tween 20/καζεΐνη, Tween 20/λεκιθίνη) γαλακτωματοποιητών. Ειδικότερα, για περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β., η περιεκτικότητα της καζεΐνης και του Tween 20 δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων. Στην περίπτωση, όμως, της λεκιθίνης, η αύξηση της περιεκτικότητάς της οδηγεί σε αύξηση της MDD των δειγμάτων. Όσον αφορά τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β., η αύξηση της περιεκτικότητας τόσο του Tween 20 όσο και της λεκιθίνης δεν μεταβάλλει ιδιαίτερα τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων. Η μέγιστη τιμή MDD (445,8 nm) παρουσιάστηκε στο νανογαλάκτωμα με EVOO 10% και καζεΐνη 8%, ενώ η ελάχιστη τιμή (152,1 nm) σε εκείνο με περιεκτικότητα EVOO 5% και λεκιθίνης 3%.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

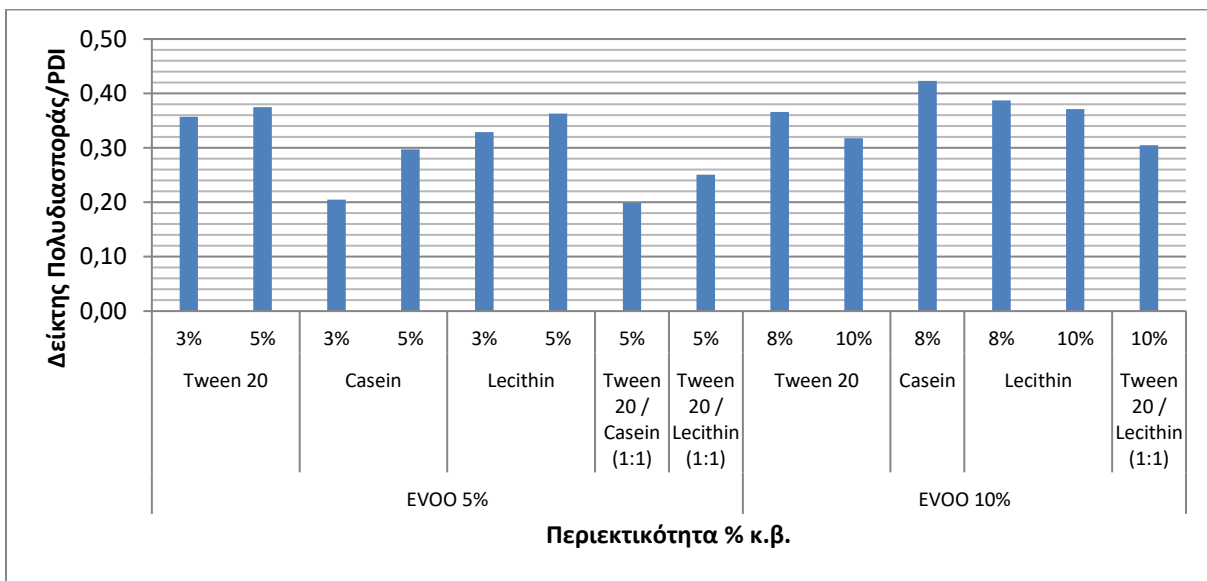
Από τη στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5%, φαίνεται ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν σημαντικά το μέγεθος των σταγονιδίων του νανογαλακτώματος.

### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Ομοίως για τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β., προέκυψε ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν την MDD των νανογαλακτωμάτων.

### **Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)**

Ο δείκτης πολυδιασποράς υποδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο τα σταγονίδια διασπείρονται στη συνεχή φάση (υδατική φάση στα νανογαλακτώματα ο/w). Χαμηλή τιμή του PDI σημαίνει μονοδιασπαρμένα νανογαλακτώματα με υψηλή σταθερότητα, ενώ υψηλή τιμή πολυδιασπαρμένα νανογαλακτώματα με χαμηλή σταθερότητα. Έτσι, ζητούμενο είναι η επίτευξη χαμηλών τιμών του δείκτη πολυδιασποράς. Στην παρούσα εργασία, οι τιμές του PDI κυμάνθηκαν μεταξύ του 0,199 και του 0,423. Γενικά, είναι επιθυμητό ο PDI να είναι κοντά στο 0,3 ή τουλάχιστον μικρότερος του 0,5, πράγμα που έχει επιτευχθεί στα παρασκευασθέντα νανογαλακτώματα.



**Διάγραμμα 3.5:** Μεταβολή της τιμής του δείκτη πολυδιασποράς των μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή.

Στο Διάγραμμα 3.5, παρατηρείται το είδος του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασε ιδιαίτερα το PDI των δειγμάτων. Εξάιρεση αποτελεί το δείγμα με EVOO 5% και καζεΐνη 3%, το οποίο είχε αρκετά μικρότερο PDI από τα υπόλοιπα. Ακόμη, η αύξηση της περιεκτικότητας % κ.β. του γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε μικρή αύξηση του PDI των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%, ενώ αντίθετη τάση παρατηρήθηκε στα νανογαλακτώματα με EVOO 10%. Η μέγιστη τιμή του PDI (0,423) μετρήθηκε στο νανογαλάκτωμα με EVOO 10% και καζεΐνη 8%, ενώ η ελάχιστη τιμή (0,199) για περιεκτικότητα EVOO 5% και μίγμα Tween 20/καζεΐνης 5%. Τέλος, τα νανογαλακτώματα με τα μίγματα γαλακτωματοποιητών είχαν αρκετά μικρές τιμές PDI.

### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

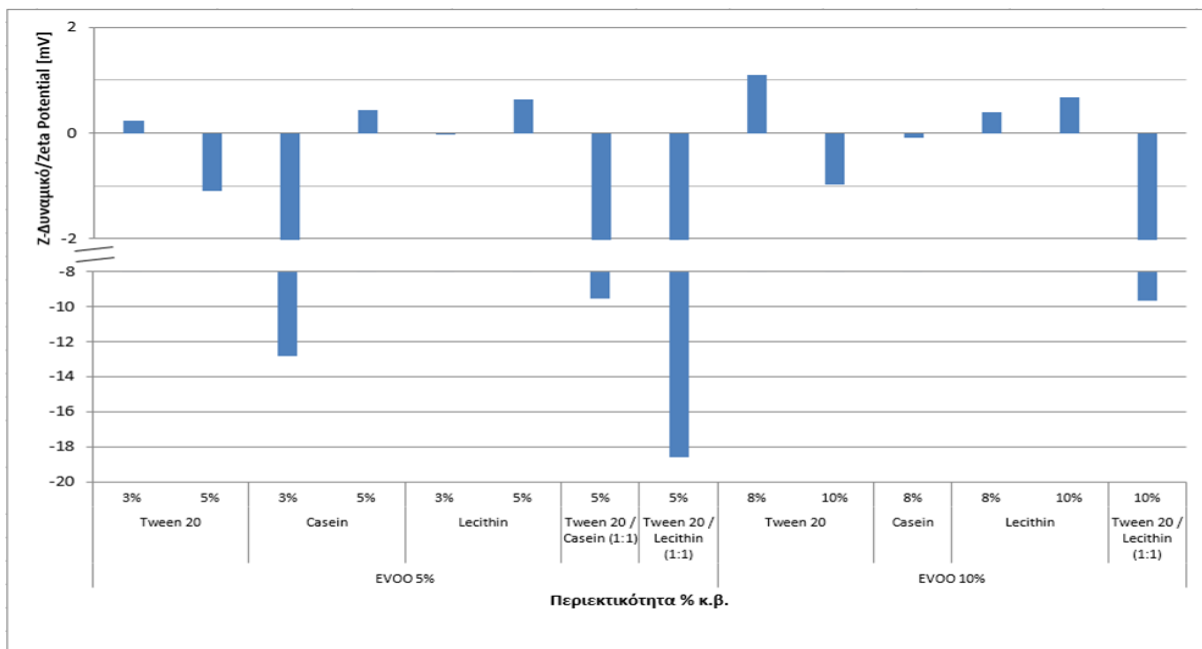
Από τη στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5%, προέκυψε ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων.

### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Ομοίως για τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα EVOO 10%, κανένας παράγοντας δεν επηρέασε σημαντικά τις τιμές του δείκτη πολυδιασποράς τους.

### **ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)**

Το ζ-Δυναμικό είναι ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό δυναμικό στο όριο της διεπιφάνειας μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος. Στα περισσότερα ο/w νανογαλακτώματα, τα σταγονίδια ελαίου είναι αρνητικά φορτισμένα, οπότε η χρήση γαλακτωματοποιητών οδηγεί σε πρόσθετη ή αντίστροφη φόρτιση. Το Tween 20 ανήκει στους μη ιοντικούς γαλακτωματοποιητές, οι οποίοι συνήθως δεν έχουν φορτίο. Σε περίπτωση που εντοπιστεί μικρό φορτίο, όπως και συνέβη, μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία ανιοντικών στοιχείων (ελεύθερα λιπαρά οξέα) στη λιπαρή φάση και στην προσρόφιση ιόντων υδροξυλίου από την υδατική φάση. Η καζεΐνη και η λεκιθίνη είναι αμφοτερικές επιφανειοδραστικές ουσίες, δηλαδή μπορούν να έχουν ένα καθαρά αρνητικό, ουδέτερο ή θετικό φορτίο. Στην παρούσα εργασία, οι τιμές του ζ-Δυναμικού κυμάνθηκαν από  $-18,6$  έως  $1,090$  mV.



**Διάγραμμα 3.6:** Μεταβολή της τιμής του ζ-Δυναμικού των νανογαλακτωμάτων συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξααιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή.

Στο Διάγραμμα 3.6, παρατηρείται ότι το νανογαλάκτωμα με EVOO 5% και μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 5% εμφάνισε το μεγαλύτερο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό ( $-18,6\text{ mV}$ ), γεγονός που δηλώνει ότι κατά πάσα πιθανότητα είναι και το σταθερότερο νανογαλάκτωμα. Εξίσου σταθερό με τιμή ζ-Δυναμικού ίση με  $-12,8\text{ mV}$  είναι και το νανογαλάκτωμα με EVOO 5% και καζεΐνη 3%. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι ιδιαίτερα αρνητικές τιμές ζ-Δυναμικού έχουν και τα νανογαλακτώματα με EVOO 5% και μίγμα Tween 20 και καζεΐνης 5% ( $-9,57\text{ mV}$ ) και με EVOO 10% και μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 10% ( $-9,67\text{ mV}$ ). Γενικά, δεν φαίνεται να παρατηρείται κάποια εξάρτηση του είδους ή/και της περιεκτικότητας των γαλακτωματοποιητών στις τιμές του ζ-Δυναμικού.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5%, το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν σημαντικά τις τιμές του ζ-Δυναμικού των νανογαλακτωμάτων.

#### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Το ζ-Δυναμικό των δειγμάτων με περιεκτικότητα λιπαρής φάσης 10% κ.β. δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος και την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, με βάση τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων.

### *3.1.1.2 Μελέτη της διατηρησιμότητας των νανογαλακτωμάτων*

Τα εμπορικά νανογαλακτώματα είναι σημαντικό να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και σταθερά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, η αποθήκευση υπό ψύξη παίζει, συχνά, καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της μικροβιολογικής και της χημικής σταθερότητας των τελικών προϊόντων. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας στη μέση διάμετρο σταγονιδίων (MDD), το δείκτη πολυδιασποράς (PDI), το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) και το δείκτη σταθερότητας γαλακτώματος (ESI).

Για τη σαφέστερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων και τη δυνατότητα σύγκρισης των δειγμάτων, έγινε διαχωρισμός των μετρήσεων στις δύο περιεκτικότητες EVOO (5% και 10% κ.β.) και τις δύο συνθήκες αποθήκευσης, περιβάλλον και ψύξη. Όπως φαίνεται παρακάτω, τα δείγματα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη διασπάστηκαν την 4<sup>η</sup> ή την 5<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έτσι, από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων, δεν θα ήταν δυνατή η σύγκρισή τους με τα υπόλοιπα και για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης. Πραγματοποιήθηκαν, λοιπόν, δύο ξεχωριστές αναλύσεις διακύμανσης:

- σε όλα τα δείγματα μέχρι και την 3<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης, και
- στα δείγματα με γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη μέχρι και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης.

Εδώ, οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν το είδος και η περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή, ο χρόνος και η θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων.

### *Δείκτης Σταθερότητας γαλακτώματος (ESI)*

Τα εμπορικά νανογαλακτώματα είναι σημαντικό να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και σταθερά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της σταθερότητας των συστημάτων και η επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας αποθήκευσης στο δείκτη σταθερότητας του γαλακτώματος (ESI). Παρακάτω παρατίθενται οι πίνακες που εξετάζουν τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων και τη μεταβολή του δείκτη σταθερότητας υπό την επίδραση του χρόνου.

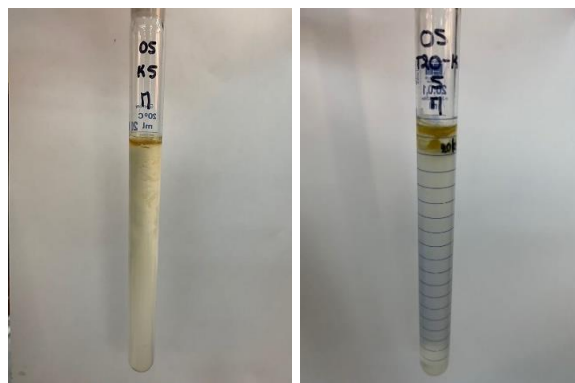
#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

**Πίνακας 3.1:** Μεταβολή του δείκτη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.

Χρόνος Αποθήκευσης [Εβδομάδες]	EVOO 5% Tween 20 3%	EVOO 5% Tween 20 5%	EVOO 5% Casein 3%	EVOO 5% Casein 5%	EVOO 5% Lecithin 3%	EVOO 5% Lecithin 5%	EVOO 5% Tween 20/ Casein (1:1) 5%	EVOO 5% Tween 20/ Lecithin (1:1) 5%
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	94,9	100	100	100	100	94,9	100
3	100	94,9	90,0	100	100	100	94,9	100
4	100	94,9	-	90,0	99,0	100	-	100
5	95,0	94,9	-	-	99,0	100	-	100
6	95,0	94,9	-	-	99,0	100	-	100
7	95,0	94,9	-	-	99,0	100	-	100
8	95,0	94,9	-	-	99,0	90,0	-	100

Από τον Πίνακα 3.1, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με το Tween 20, τη λεκιθίνη και το μίγμα αυτών δεν είχαν αισθητές μεταβολές στο δείκτη σταθερότητάς τους. Επιπλέον, εκείνα τα δείγματα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη και το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης διασπάστηκαν την 4<sup>η</sup> ή την 5<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσής τους. Όσον αφορά την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, τα νανογαλακτώματα του Tween 20 και της λεκιθίνης είχαν καλύτερη σταθερότητα σε μικρότερες περιεκτικότητες. Στις παρακάτω εικόνες, φαίνονται τα δείγματα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη και το μίγμα Tween 20/καζεΐνης, καθώς και η διάσπασή τους.





**Εικόνα 3.1:** Φωτογραφίες των διασπασμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές την καζεΐνη 5% (αριστερά) και το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης 5% (δεξιά) κατά τη διατήρησή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Πίνακας 3.2:** Μεταβολή του δείκτη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία ψύξης ως προς το χρόνο.

Χρόνος Αποθήκευσης [Εβδομάδες]	EVOO 5% Tween 20 3%	EVOO 5% Tween 20 5%	EVOO 5% Casein 3%	EVOO 5% Casein 5%	EVOO 5% Lecithin 3%	EVOO 5% Lecithin 5%	EVOO 5% Tween 20/ Casein (1:1) 5%	EVOO 5% Tween 20/ Lecithin (1:1) 5%
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	97,3	93,0	100	100	100	100	100
3	100	97,3	93,0	100	100	100	100	100
4	100	97,3	93,0	100	100	100	90,9	100
5	100	97,3	93,0	100	100	100	90,9	100
6	97,0	97,3	93,0	100	100	97,0	90,9	100
7	97,0	97,3	93,0	100	100	97,0	90,9	100
8	97,0	97,3	93,0	100	100	97,0	90,9	100

Από τον Πίνακα 3.2, προκύπτει ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του Tween 20 και της καζεΐνης οδήγησε σε μικρή αύξηση της σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων (μεγαλύτερο ESI) την 8<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης, σε θερμοκρασία ψύξης. Αντίθετη τάση παρατηρείται στα δείγματα με γαλακτωματοποιητή τη λεκιθίνη. Γενικά, οι δείκτες σταθερότητας των δειγμάτων δεν μεταβλήθηκαν αισθητά με την πάροδο του χρόνου. Την καλύτερη σταθερότητα στο διάστημα των 8 εβδομάδων είχαν τα νανογαλακτώματα με καζεΐνη 5%, λεκιθίνη 3% και μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 5%. Όσον αφορά τα νανογαλακτώματα με τα μίγματα γαλακτωματοποιητών, η χρήση λεκιθίνης είχε καλύτερα αποτελέσματα στη σταθεροποίηση του νανογαλακτώματος συγκριτικά με την καζεΐνη.



### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

**Πίνακας 3.3:** Μεταβολή του δείκτη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.

Χρόνος Αποθήκευσης [Εβδομάδες]	EVOO 10% Tween 20 8%	EVOO 10% Tween 20 10%	EVOO 10% Casein 8%	EVOO 10% Lecithin 8%	EVOO 10% Lecithin 10%	EVOO 10% Tween 20/ Lecithin (1:1) 10%
0	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
2	100	92,0	100	100	100	100
3	100	92,0	90	100	100	100
4	93,9	92,0	-	100	97,1	100
5	93,9	92,0	-	96,9	97,1	100
6	93,9	92,0	-	96,9	97,1	99,0
7	93,9	92,0	-	96,9	97,1	99,0
8	93,9	92,0	-	96,9	97,1	99,0

Από τον Πίνακα 3.3, φαίνεται ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του Tween 20 και της λεκιθίνης δεν μετέβαλε αισθητά τις τιμές του ESI και τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Επιπλέον, το νανογαλάκτωμα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη (Εικόνα 3.3) διασπάστηκε την 4<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσής του. Αντίθετα, ο δείκτης σταθερότητας του νανογαλακτώματος με το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης μεταβλήθηκε πολύ λίγο, εμφανίζοντας παράλληλα την καλύτερη σταθερότητα απ' όλα τα δείγματα.



**Εικόνα 3.3:** Φωτογραφία του διασπασμένου νανογαλακτώματος με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη 8% κατά τη διατήρησή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Πίνακας 3.4:** Μεταβολή του δείκτη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψύξης ανά μία εβδομάδα.

Χρόνος Αποθήκευσης [Εβδομάδες]	EVOO 10% Tween 20 8%	EVOO 10% Tween 20 10%	EVOO 10% Casein 8%	EVOO 10% Lecithin 8%	EVOO 10% Lecithin 10%	EVOO 10% Tween 20/ Lecithin (1:1) 10%
0	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
2	100	92,5	100	100	100	100
3	100	92,5	100	100	100	100
4	100	92,5	100	100	99,0	100
5	93,0	92,5	96,8	99,5	99,0	100
6	93,0	92,5	96,8	99,5	99,0	100
7	93,0	92,5	96,8	99,5	99,0	100
8	93,0	92,5	96,8	99,5	99,0	100

Από τον Πίνακα 3.4, προκύπτει ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του Tween 20 και της λεκιθίνης προκάλεσε μία μικρή μείωση στις τιμές του ESI και τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, σε θερμοκρασία ψύξης. Τις μικρότερες τιμές του δείκτη σταθερότητας είχαν τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή το Tween 20, ενώ την καλύτερη σταθερότητα είχε το δείγμα με το μίγμα Tween 20/λεκιθίνης.

Συγκρίνοντας τους δείκτες σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης, προκύπτει ότι σε όλες τις περιπτώσεις η ψύξη είχε καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή συνέβαλε στη σταθερότητα των δειγμάτων (υψηλότερη τιμή ESI). Ακόμα και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε η καζεΐνη ως γαλακτωματοποιητής, το νανογαλάκτωμα που αποθηκεύτηκε υπό ψύξη διατηρήθηκε για 8 εβδομάδες, ενώ εκείνο που αποθηκεύτηκε στο περιβάλλον διασπάστηκε νωρίτερα.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης, προέκυψε ότι μόνο η περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή επηρέασε το δείκτη σταθερότητας των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Τα δείγματα με 3% γαλακτωματοποιητή είχαν μέση τιμή ESI 99,6% και εκείνα με 5% γαλακτωματοποιητή 98,1%, οπότε και δεν θεωρείται σημαντική η διαφορά τους.

Ομοίως, για τα δείγματα με γαλακτωματοποιητές τη λεκιθίνη και το Tween 20 για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, βρέθηκε ότι όλοι οι εξεταζόμενοι παράγοντες εκτός της θερμοκρασίας αποθήκευσης επηρέασαν σημαντικά το δείκτη σταθερότητας των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Για το είδος του γαλακτωματοποιητή, αρχικά, προέκυψε ότι τα δείγματα με το Tween 20 (μέση

τιμή ESI 95,4%) είχαν μικρότερη σταθερότητα από εκείνα με τη λεικθίνη (μέση τιμή ESI 99,1%). Έπειτα, οι μέσες τιμές του ESI ήταν 98,0% για τα δείγματα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 8% κ.β. και 96,5% για εκείνα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 10% κατά βάρος. Από το Duncan's test, για το χρόνο διατήρησης, βρέθηκε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά έχει ο δείκτης σταθερότητας των δειγμάτων την ημέρα παρασκευής τους, την 1<sup>η</sup>, τη 2<sup>η</sup> και την 3<sup>η</sup> εβδομάδα με την 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup> και 8<sup>η</sup> εβδομάδα. Τούτο το συμπέρασμα είναι λογικό αφού τα περισσότερα ναογαλακτώματα κάνουν creaming μετά την 5<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης.

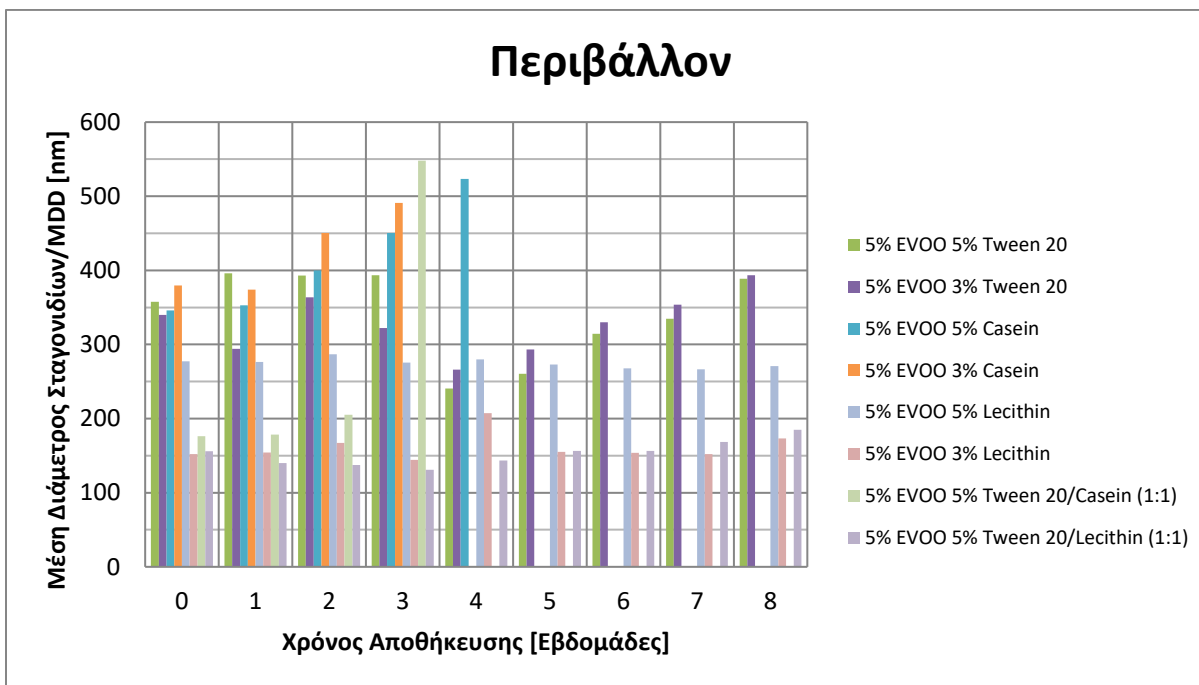


**Εικόνα 3.4:** Φωτογραφίες των ναογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20, την καζεΐνη και τη λεικθίνη 8% (αριστερά), το Tween 20 και τη λεικθίνη 10% (μέση) και το μίγμα Tween 20/λεικθίνης 10% (δεξιά) την 8<sup>η</sup> εβδομάδα διατήρησή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψύξης.

### Μέση Διάμετρος σταγονιδίων (MDD)

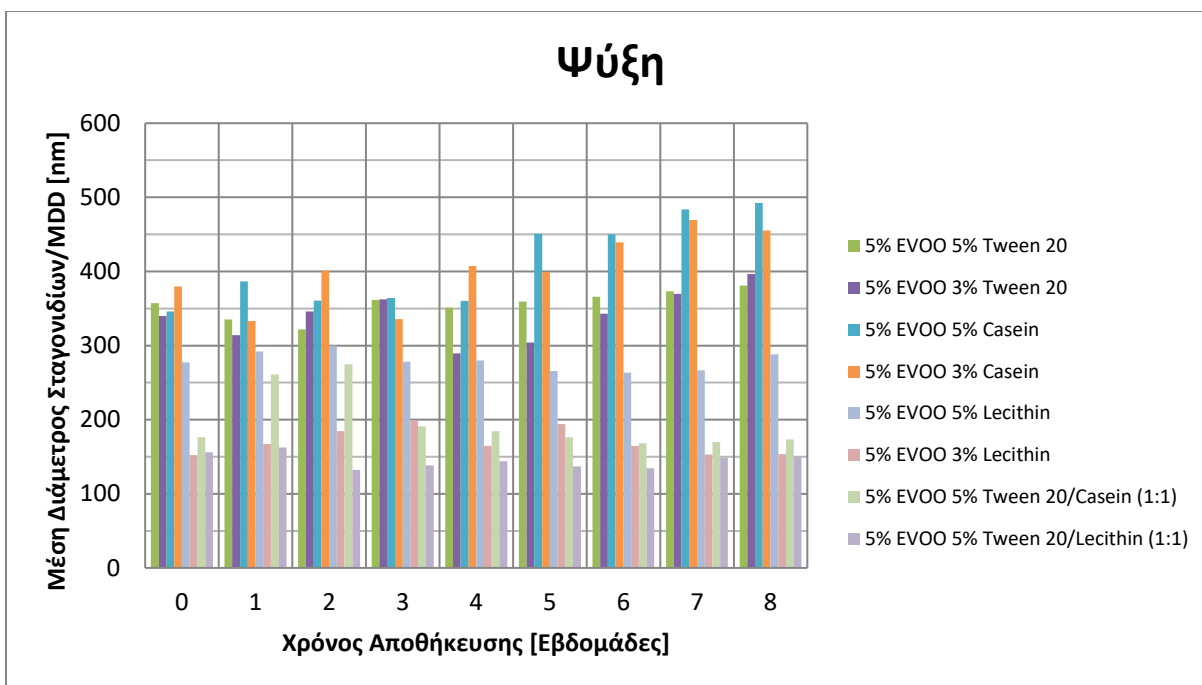
Παρακάτω, παρατίθενται τα διαγράμματα της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης, για κάθε περιεκτικότητα ελαίου και κάθε συνθήκη αποθήκευσης.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.



**Διάγραμμα 3.7:** Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των νανογαλακτώματων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.

Στο Διάγραμμα 3.7, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη και εκείνο με το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης δεν σημείωσαν μεγάλες μεταβολές στη μέση διάμετρο των σταγονιδίων τους κατά το διάστημα των δύο μηνών διατήρησής τους. Ωστόσο, το νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα καζεΐνης 5% διατηρήθηκε για διάστημα τεσσάρων εβδομάδων, ενώ εκείνα με καζεΐνη 3% και με το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης 5% για τρεις εβδομάδες. Έτσι, είναι λογικές και οι μεγάλες αυξήσεις στις τιμές των μέσων διαμέτρων των σταγονιδίων τους. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή της MDD του νανογαλακτώματος με την καζεΐνη 3% είναι 491 nm την 3<sup>η</sup> εβδομάδα, εκείνου με την καζεΐνη 5% 523 nm την 4<sup>η</sup> εβδομάδα και εκείνου με το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης 548 nm την 3<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσής του.



**Διάγραμμα 3.8:** Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία ψύξης ως προς το χρόνο.

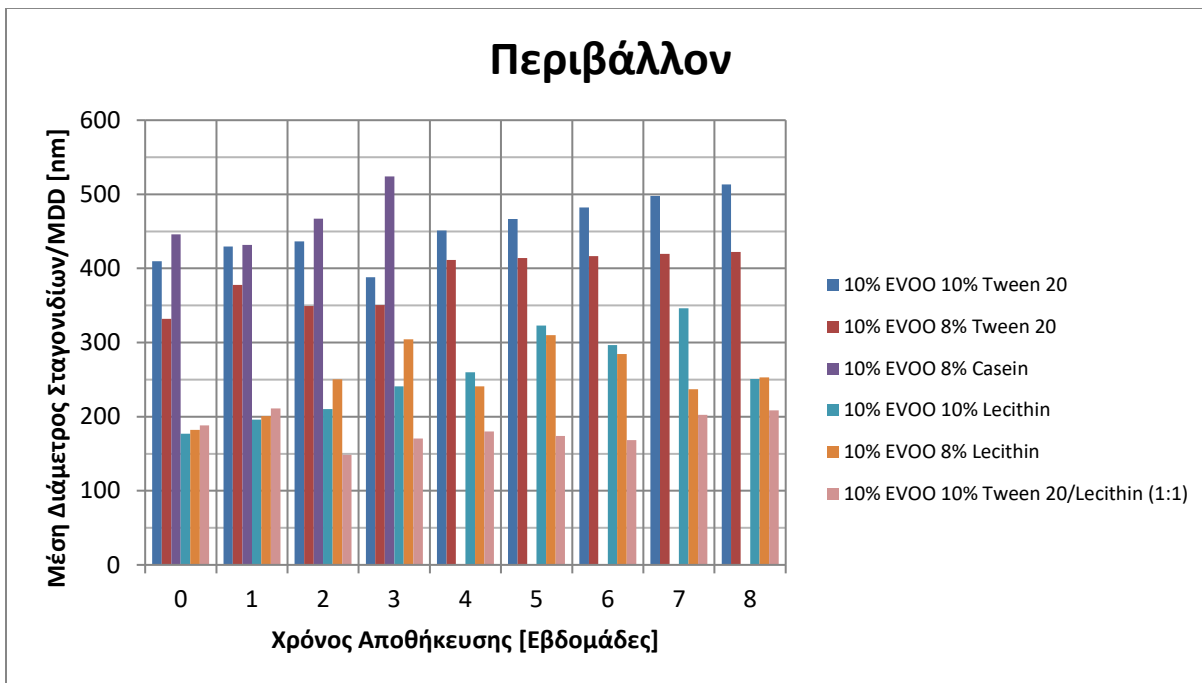
Στο Διάγραμμα 3.8, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη 3% και 5% και εκείνο με το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 5% είχαν μικρές αρχικές μέσες διαμέτρους σταγονιδίων, τις οποίες και διατήρησαν. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η ψύξη συνέβαλε στη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα καζεΐνης 3%, 5% και με το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης 5% για διάστημα δύο μηνών με μικρές αυξήσεις των MDD τους.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης, προέκυψε ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν σημαντικά τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι οι μέσες τιμές της MDD ήταν 224 nm για τη λεκιθίνη, 350 nm για το Tween 20 και 384 nm για την καζεΐνη. Ομοίως, από το Duncan's test για την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές της MDD για τα δείγματα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 3% κ.β. (298 nm) και για εκείνα με 5% κ.β. (341 nm).

Μέσω της στατιστικής επεξεργασίας των μετρήσεων των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητές τη λεκιθίνη και το Tween 20 για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, προέκυψε πάλι ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν σημαντικά τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Από το Duncan's test, φάνηκε ότι τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη έχουν μέση τιμή MDD 222 nm, η οποία είναι σημαντικά μικρότερη από εκείνη των δειγμάτων με το Tween 20 (342 nm). Ακόμη, για την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, βρέθηκε ότι τα νανογαλακτώματα με 3% γαλακτωματοποιητή είχαν μέση τιμή MDD 250 nm, ενώ εκείνα με 5% 313 nm.

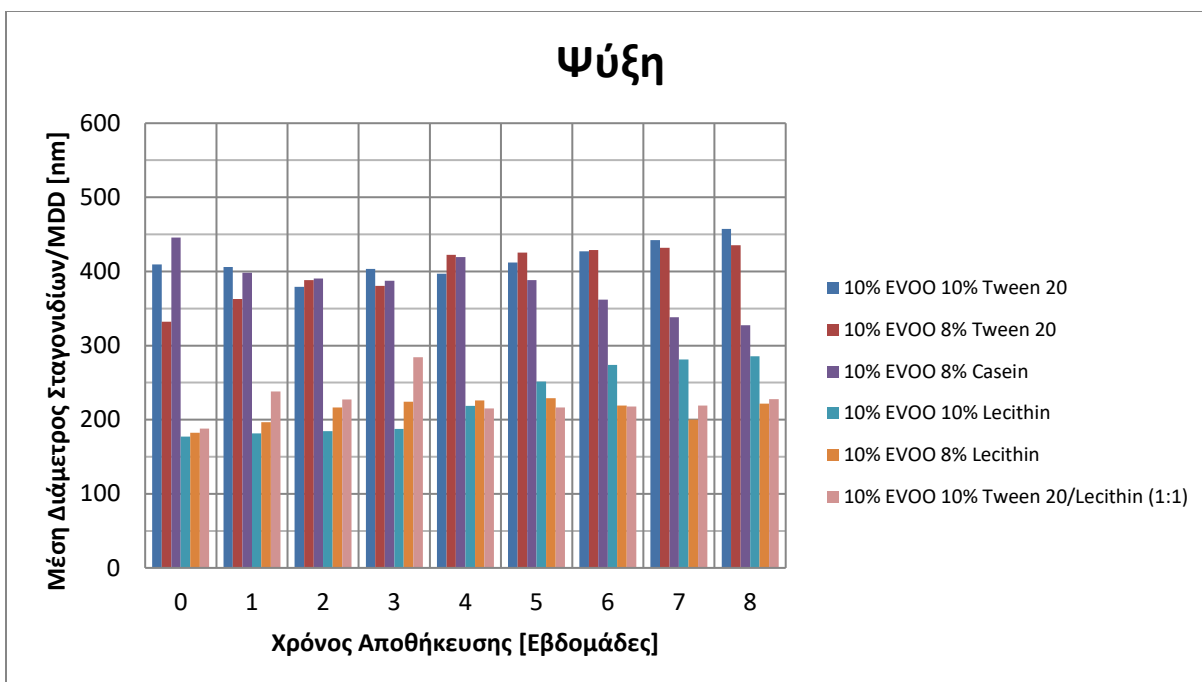


Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.



**Διάγραμμα 3.9:** Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.

Στο Διάγραμμα 3.9, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη 3% και 5% σημείωσαν σταδιακή αύξηση της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων, ενώ η αύξηση της MDD από την ημέρα παρασκευής έως την 8<sup>η</sup> εβδομάδα ήταν περίπου 80 nm. Αντίστοιχα, τα δείγματα με γαλακτωματοποιητή το Tween 20 σε περιεκτικότητα 8% και 10% κ.β. είχαν αύξηση της MDD από την ημέρα παρασκευής έως την 8η εβδομάδα της τάξης των 100 nm. Το νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα καζεΐνης 8% διατηρήθηκε για διάστημα τριών εβδομάδων, πράγμα που δικαιολογείται και από την τιμή της MDD (524 nm) την 3<sup>η</sup> εβδομάδα. Το καλύτερο δείγμα, όσον αφορά τη μεταβολή του MDD, φαίνεται να είναι το νανογαλάκτωμα με το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 10%, καθώς η αύξηση της MDD από την ημέρα παρασκευής έως την 8η εβδομάδα ήταν περίπου 20 nm.



**Διάγραμμα 3.10:** Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία ψύξης ως προς το χρόνο.

Στο Διάγραμμα 3.10, παρατηρείται ότι τα δείγματα με γαλακτωματοποιητή το Tween 20 και εκείνα με τη λεκιθίνη είχαν αύξηση της MDD, από την ημέρα παρασκευής έως την 8η εβδομάδα αποθήκευσής τους, μικρότερη από 100 nm. Το νανογαλάκτωμα με το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 10% είχε αύξηση της MDD από την ημέρα παρασκευής έως την 8<sup>η</sup> εβδομάδα περίπου 40 nm.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης, προέκυψε ότι το είδος του γαλακτωματοποιητή και η θερμοκρασία αποθήκευσης των γαλακτωμάτων επηρέασαν σημαντικά τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Ειδικότερα, τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη είχαν μέση τιμή MDD 207 nm, η οποία ήταν σημαντικά μικρότερη από εκείνη των δειγμάτων τόσο με το Tween (384 nm) όσο και με την καζεΐνη (436 nm). Έπειτα, τα δείγματα που διατηρήθηκαν στο περιβάλλον (μέση τιμή MDD 335 nm) είχαν υψηλότερη μέση διάμετρο σταγονιδίων από αυτά που αποθηκεύτηκαν σε ψύξη (312 nm).

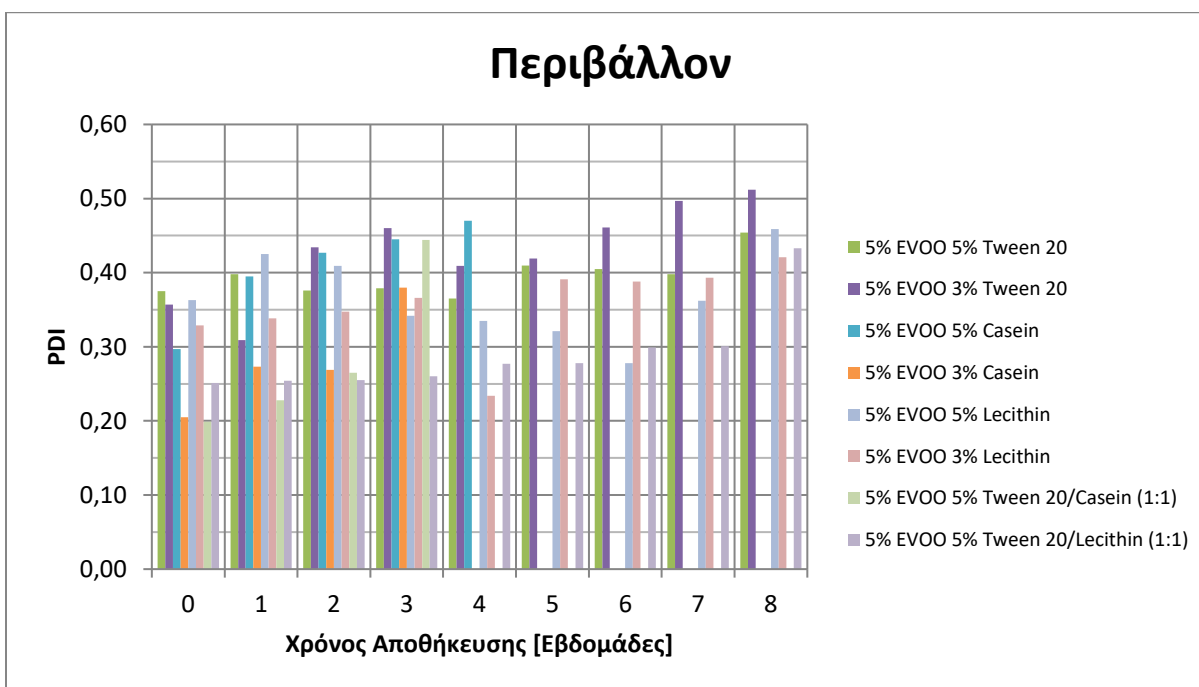
Μέσω της στατιστικής επεξεργασίας των μετρήσεων των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητές τη λεκιθίνη και το Tween 20 για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, προέκυψε ότι όλες οι παράγοντες επηρέασαν σημαντικά τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Από το Duncan's test, φάνηκε ότι τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη έχουν μέση τιμή MDD 237 nm, αισθητά μικρότερη από εκείνη των δειγμάτων με το Tween 20 (414 nm). Ομοίως, για την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, βρέθηκε ότι τα νανογαλακτώματα με 8% γαλακτωματοποιητή είχαν μέση τιμή MDD 313 nm, ενώ εκείνα με 10% 338 nm. Η

συγκεκριμένη διαφορά δεν θεωρείται σημαντική. Έπειτα, τα νανογαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον είχαν μέση τιμή MDD 337 nm, ενώ εκείνα στο ψυγείο 314 nm δηλαδή οι δύο μελετώμενες θερμοκρασίες αποθήκευσης δεν έχουν σημαντική διαφορά. Τέλος, από το Duncan's test, για το χρόνο διατήρησης, βρέθηκε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά έχει η ημέρα παρασκευής των δειγμάτων, η 1<sup>η</sup>, η 2<sup>η</sup> και η 3<sup>η</sup> εβδομάδα με την 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup> και 8<sup>η</sup>. Τούτο το συμπέρασμα είναι λογικό, αφού τα περισσότερα νανογαλακτώματα κάνουν creaming μετά την 4<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων η μέση τιμή της MDD ήταν 275 nm και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα 355 nm.

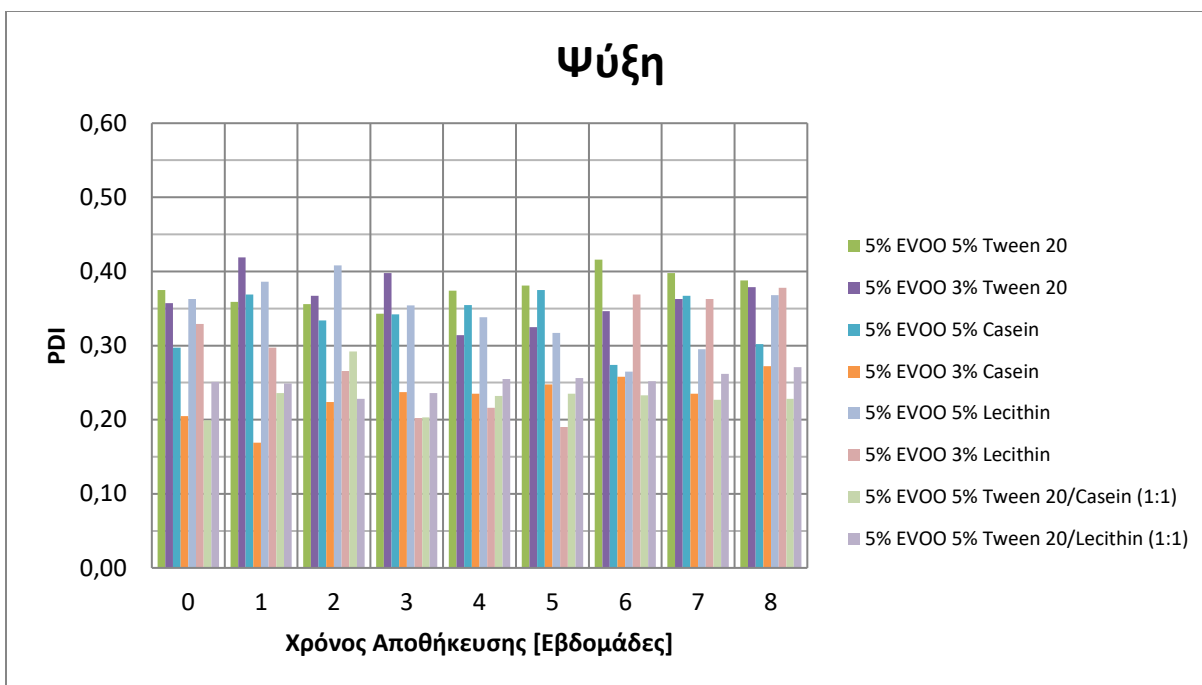
### *Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)*

Ο δείκτης πολυδιασποράς αποτελεί ένδειξη του τρόπου διασποράς των σταγονιδίων ελαίου στη συνεχή φάση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, επιδιώκονται τιμές του PDI κοντά στο 0,3, προκειμένου το νανογαλάκτωμα να είναι μονοδισπαρμένο και να έχει υψηλή σταθερότητα. Έτσι, παρακάτω παρατίθενται τα αντίστοιχα διαγράμματα για τον PDI.

### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.



**Διάγραμμα 3.11:** Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.



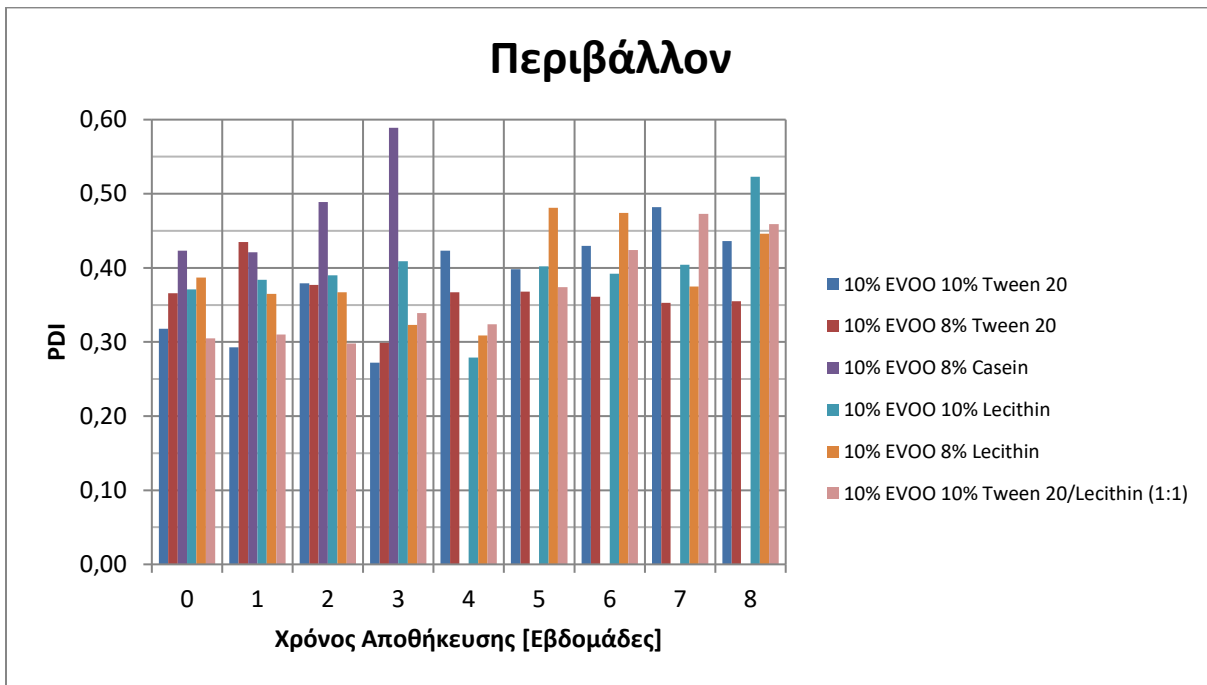
**Διάγραμμα 3.12:** Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψύξης ανά μία εβδομάδα.

Από τα δύο παραπάνω διαγράμματα, παρατηρείται ότι ο δείκτης πολυδιασποράς των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη δεν αυξήθηκε ιδιαίτερα με την πάροδο του χρόνου, ενώ ακόμα και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης οι τιμές του PDI δεν ξεπέρασαν το 0,4. Αντίθετα, τα νανογαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εμφάνισαν αύξηση του PDI τουλάχιστον κατά 0,1, ενώ τα δείγματα που διατηρήθηκαν μέχρι και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα είχαν PDI μεγαλύτερο του 0,4.

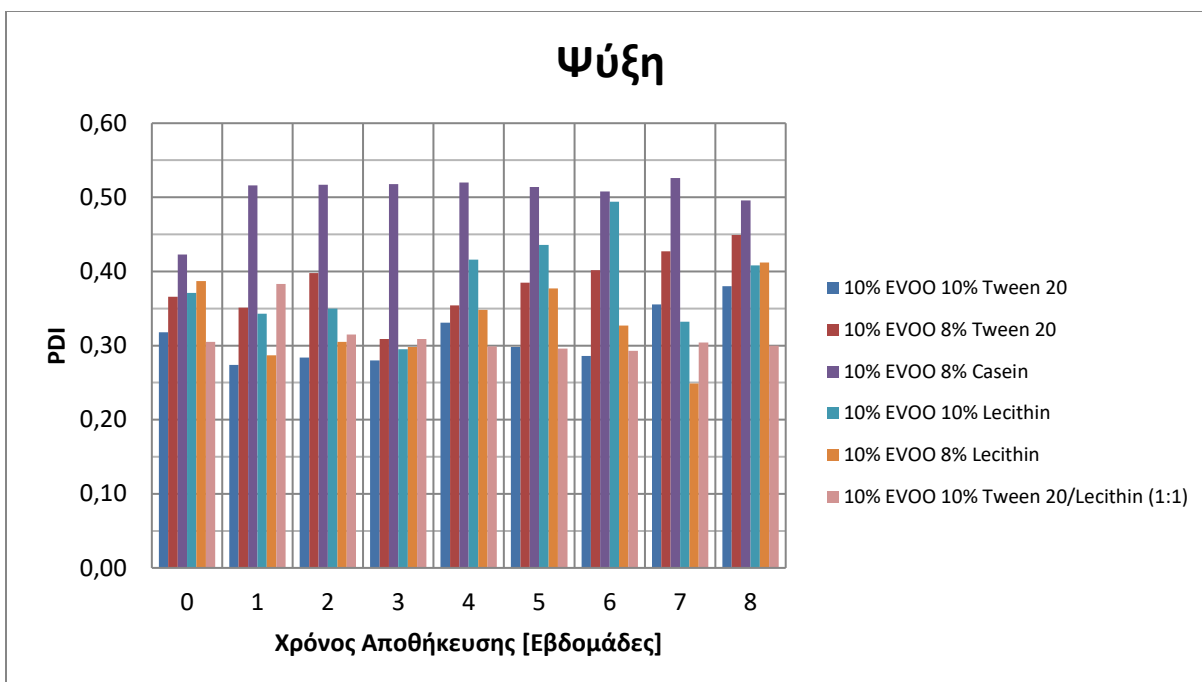
Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης, διαπιστώθηκε ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή και η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρέασαν σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Στη συνέχεια, για το είδος του γαλακτωματοποιητή, μελετήθηκαν οι τυχόν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών της PDI, με χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test. Προέκυψε, λοιπόν, ότι τα νανογαλακτώματα με την καζεΐνη (μέση τιμή PDI 0,30) έχουν καλύτερη διασπορά των σταγονιδίων τους συγκριτικά με εκείνα του Tween 20 (μέση τιμή PDI 0,38) και της λεκιθίνης (μέση τιμή PDI 0,35). Όσον αφορά την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του δείκτη πολυδιασποράς των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητή 3% (μέση τιμή του PDI 0,31) και 5% κ.β. (μέση τιμή του PDI 0,37). Τέλος, τα νανογαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη είχαν μέση τιμή του PDI ίση με 0,32 και εκείνα στο περιβάλλον 0,36. Έτσι, τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη ήταν σταθερότερα από τα αντίστοιχα στο περιβάλλον.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητές τη λεικιθίνη και το Tween 20 για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, βρέθηκε ότι όλοι οι παράγοντες εκτός της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Η λεικιθίνη (μέση τιμή του PDI 0,34) προσφέρει καλύτερη διασπορά σταγονιδίων σε σχέση με το Tween 20 (μέση τιμή του PDI 0,39). Τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη είχαν μικρότερο PDI από εκείνα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, οπότε ήταν και πιο σταθερά. Ομοίως, από το Duncan's test, για το χρόνο διατήρησης, βρέθηκε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά έχει η 8<sup>η</sup> εβδομάδα με την ημέρα παρασκευής, την 1<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> εβδομάδα, καθώς και η 4<sup>η</sup> με την 7<sup>η</sup> εβδομάδα. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι την ημέρα παρασκευής η μέση τιμή του PDI ήταν 0,36 και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα 0,42.

Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.



**Διάγραμμα 3.13:** Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.



**Διάγραμμα 3.14:** Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. αποθηκευμένων σε θερμοκρασία ψύξης ως προς το χρόνο.

Σύμφωνα με τα δύο παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται ότι το νανογαλάκτωμα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη 8% εμφανίζει υψηλές τιμές του PDI τόσο στην αποθήκευση στο περιβάλλον όσο και σε εκείνη υπό ψύξη. Ειδικότερα, το δείγμα του περιβάλλοντος έχει τιμή PDI ίση με 0,59 την 3<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης, πράγμα που δηλώνει χαμηλή σταθερότητα και δικαιολογεί τη διάσπασή του, αμέσως μετά. Γενικά, διαπιστώνεται ότι η αποθήκευση υπό ψύξη συνέβαλε στη σταθερότητα όλων των δειγμάτων.

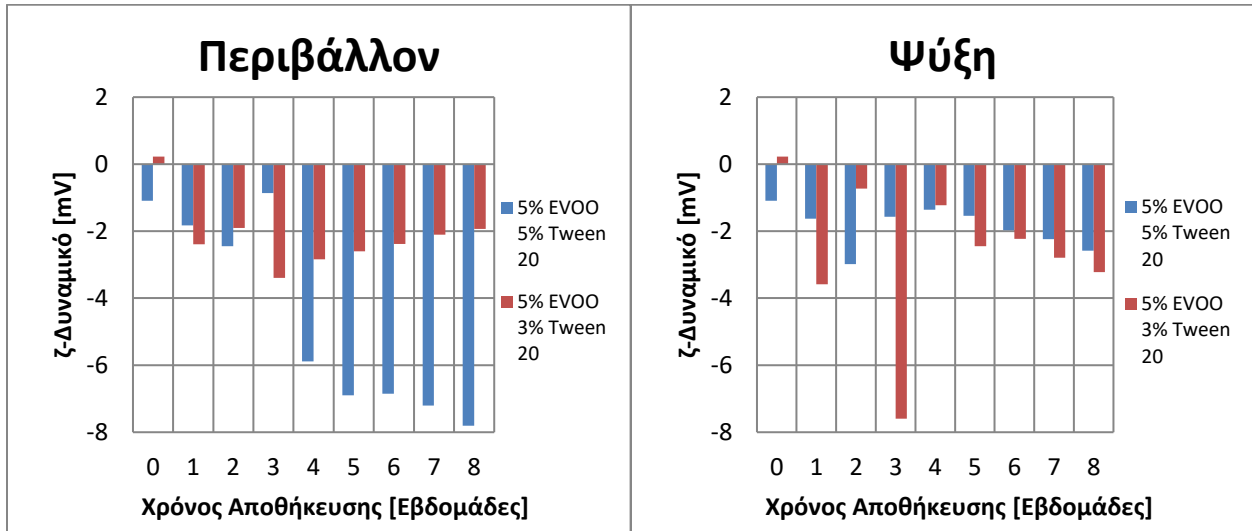
Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης, προέκυψε ότι το είδος του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά το PDI των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη είχαν μέση τιμή PDI 0,35, λίγο μεγαλύτερη από εκείνη των δειγμάτων με το Tween (0,33) και αρκετά μικρότερη από εκείνη των δειγμάτων με την καζεΐνη (0,49). Συνεπώς, τα δείγματα με τη λεκιθίνη φαίνονται να είναι τα σταθερότερα.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητές τη λεκιθίνη και το Tween 20 για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, βρέθηκε ότι η θερμοκρασία και ο χρόνος αποθήκευσης επηρέασαν σημαντικά το PDI των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον είχαν μέση τιμή του PDI ίση με 0,38 και εκείνα υπό ψύξη 0,35, οπότε και δεν μπορεί να ληφθεί υπόψιν αυτή η διαφορά. Έπειτα, για την εβδομάδα διατήρησης, βρέθηκε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά έχει η 8<sup>η</sup> εβδομάδα με την ημέρα παρασκευής, την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup>, και 4<sup>η</sup> εβδομάδα, καθώς και η 3<sup>η</sup> με την 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> εβδομάδα. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι την ημέρα παρασκευής η μέση τιμή του PDI ήταν 0,36 και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα 0,43.

## ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)

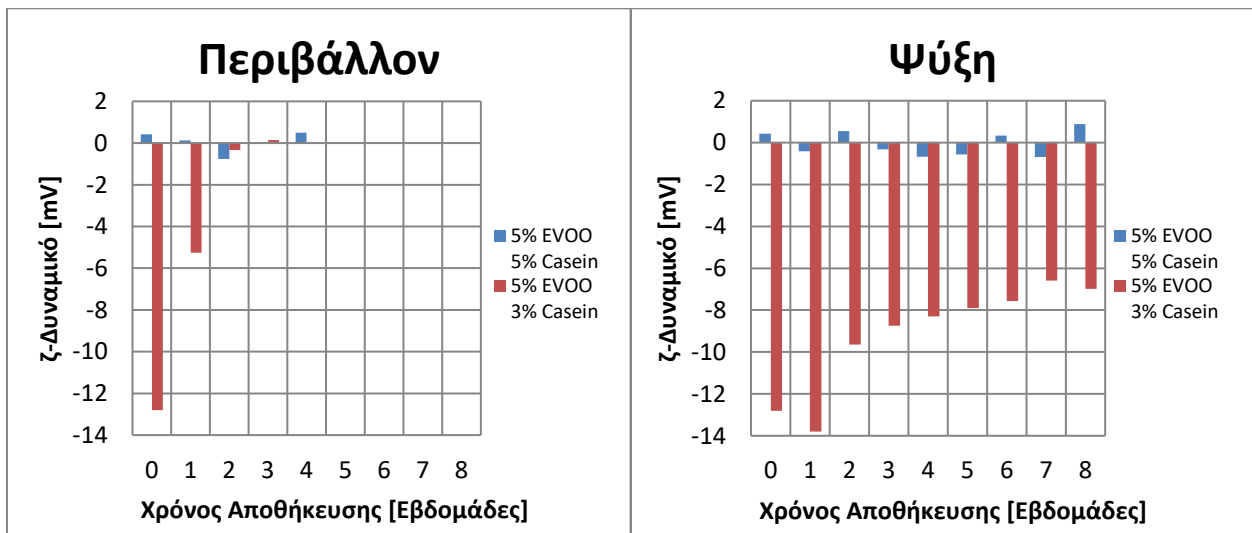
Εδώ, οι τιμές του ζ-Δυναμικού εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις, οπότε η παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα γίνει σε επιμέρους διαγράμματα.

### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.



**Διάγραμμα 3.15:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτοματοποιητή το Tween 20 αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αριστερά) και ψύξης (δεξιά) ως προς το χρόνο.

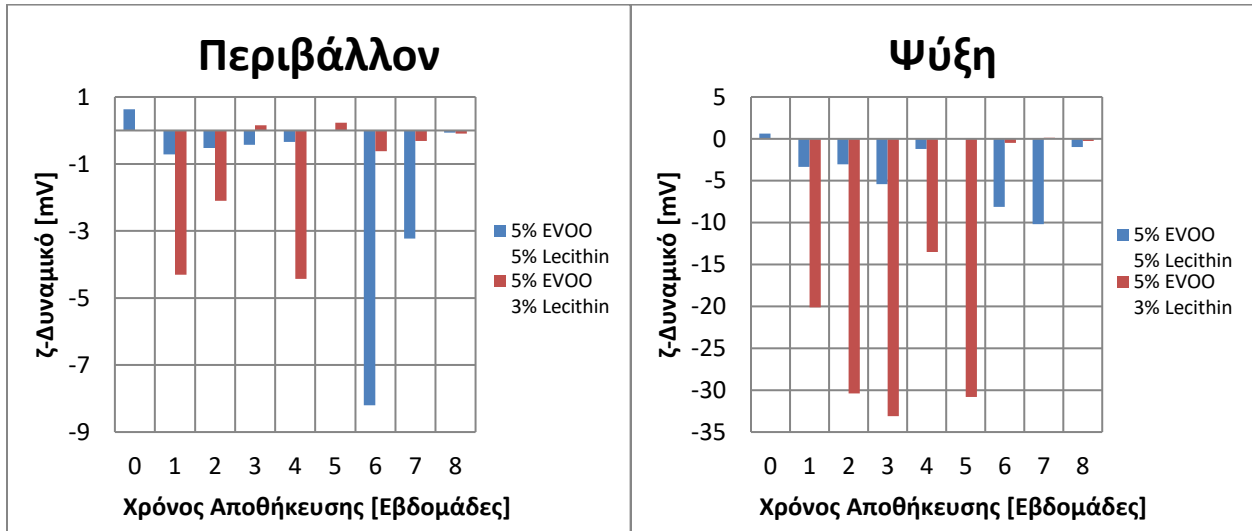
Από το Διάγραμμα 3.15, διαπιστώνεται ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον εμφανίζουν μεγαλύτερο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό, το οποίο αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερης σταθερότητας.



**Διάγραμμα 3.16:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτοματοποιητή την καζεΐνη αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αριστερά) και ψύξης (δεξιά) ως προς το χρόνο.

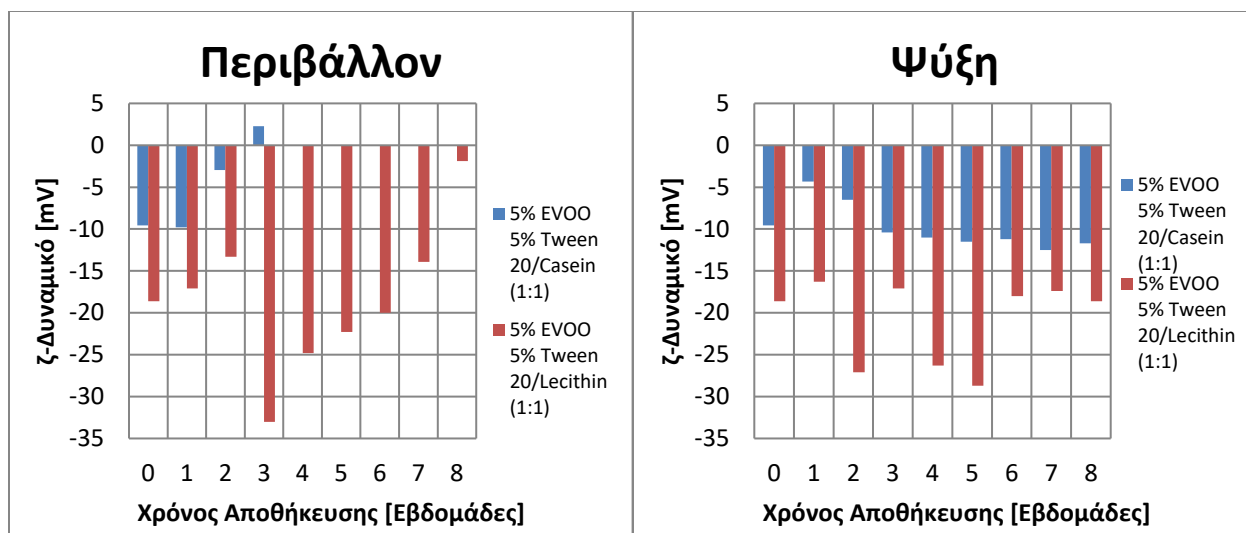


Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.16, το νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα καζεΐνης 5% έχει μικρό κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό, οπότε και δεν είναι σταθερό. Εντούτοις, είναι ξεκάθαρο ότι η ψύξη συμβάλλει στη διατήρησή του για 8 εβδομάδες, συγκριτικά με την αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όπου διασπάται πλήρως μετά τις 3 ή 4 εβδομάδες. Όσον αφορά, το νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα καζεΐνης 3%, η αποθήκευση υπό ψύξη βοηθά στη διατήρησή του για 8 εβδομάδες και στην επίτευξη υψηλών κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικών.



**Διάγραμμα 3.17:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή τη λεκιθίνη αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αριστερά) και ψύξης (δεξιά) ως προς το χρόνο.

Από το Διάγραμμα 3.17, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή τη λεκιθίνη εμφανίζουν διακυμάνσεις στις τιμές του ζ-Δυναμικού, οι οποίες είναι μεγαλύτερες στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον. Αξίζει να σημειωθεί ότι το νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα λεκιθίνης 3% κ.β. που αποθηκεύτηκε υπό ψύξη εμφανίζει μεγάλο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό τις πρώτες 5 εβδομάδες διατήρησής του, πράγμα που αποτελεί ένδειξη καλής σταθερότητας.



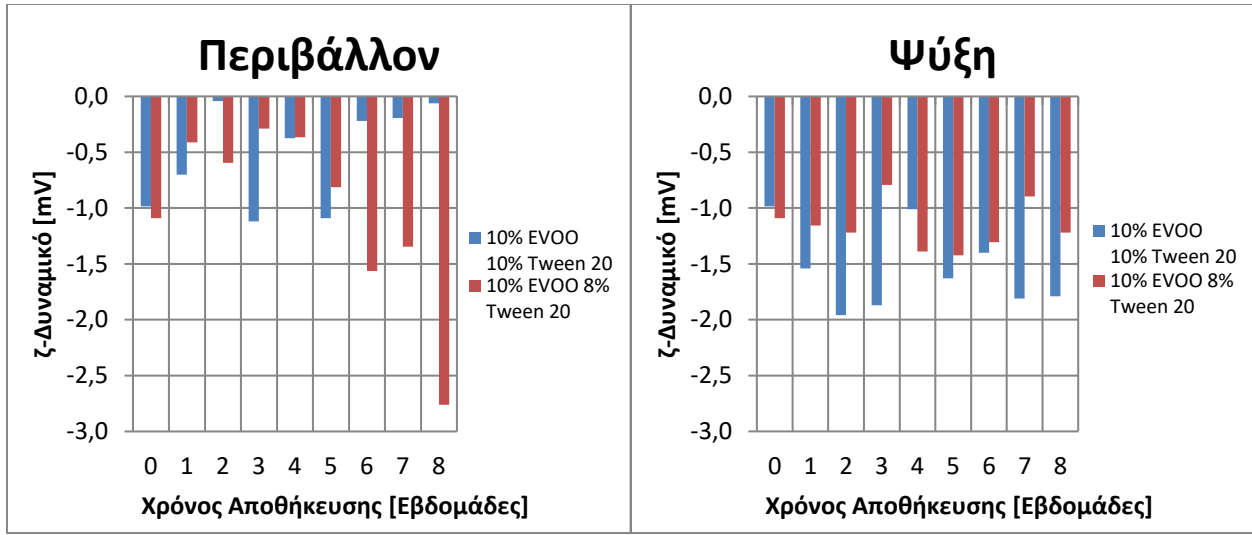
**Διάγραμμα 3.18:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή τα μίγματα του Tween 20 με την καζεΐνη και τη λεκιθίνη αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αριστερά) και ψύξης (δεξιά) ως προς το χρόνο.

Από το Διάγραμμα 3.18, φαίνεται ότι το νανογαλάκτωμα με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης έχει εξίσου μεγάλο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης, οπότε και έχει καλή σταθερότητα. Αντίθετα, το νανογαλάκτωμα με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης έχει εμφανώς καλύτερη σταθερότητα όταν διατηρείται υπό ψύξη, με αρκετά υψηλό κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό, συγκριτικά με τη διατήρησή του στο περιβάλλον. Γενικά, καλύτερος γαλακτωματοποιητής είναι το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης, βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή και η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρέασαν σημαντικά το ζ-Δυναμικό των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Στη συνέχεια, προέκυψε ότι τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 3% κ.β. είχαν μέση τιμή ζ-Δυναμικού  $-7,2 mV$ , μεγαλύτερη από εκείνη των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητή 5% κ.β. ( $-1,1 mV$ ). Πρακτικά, τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 3% κ.β. ήταν σταθερότερα. Τέλος, τα νανογαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον είχαν μέση τιμή ζ-Δυναμικού  $-1,6 mV$ , ενώ αυτά που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη  $-6,6 mV$ . Δηλαδή, τα νανογαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη ήταν σταθερότερα.

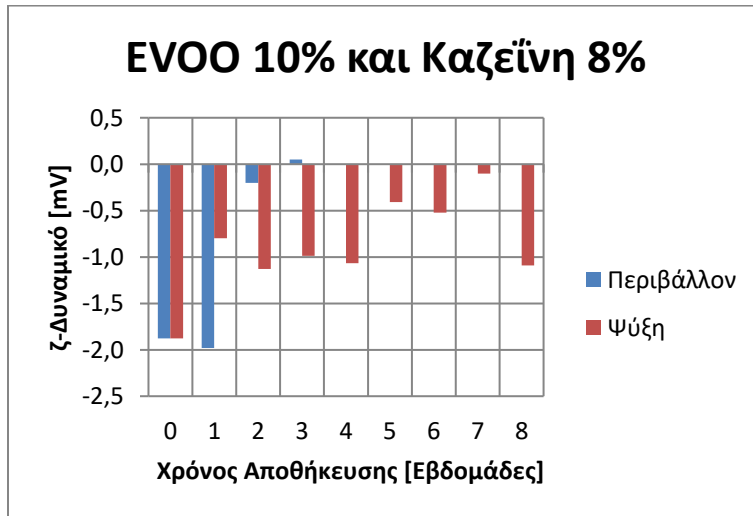
Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητές τη λεκιθίνη και το Tween 20 για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, διαπιστώθηκε ότι μόνο η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρέασε σημαντικά το ζ-Δυναμικό των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Από το Duncan's test, φάνηκε ότι τα νανογαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είχαν μέση τιμή ζ-Δυναμικού  $-2,4 mV$ , ενώ εκείνα υπό ψύξη  $-5,6 mV$ .

Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.



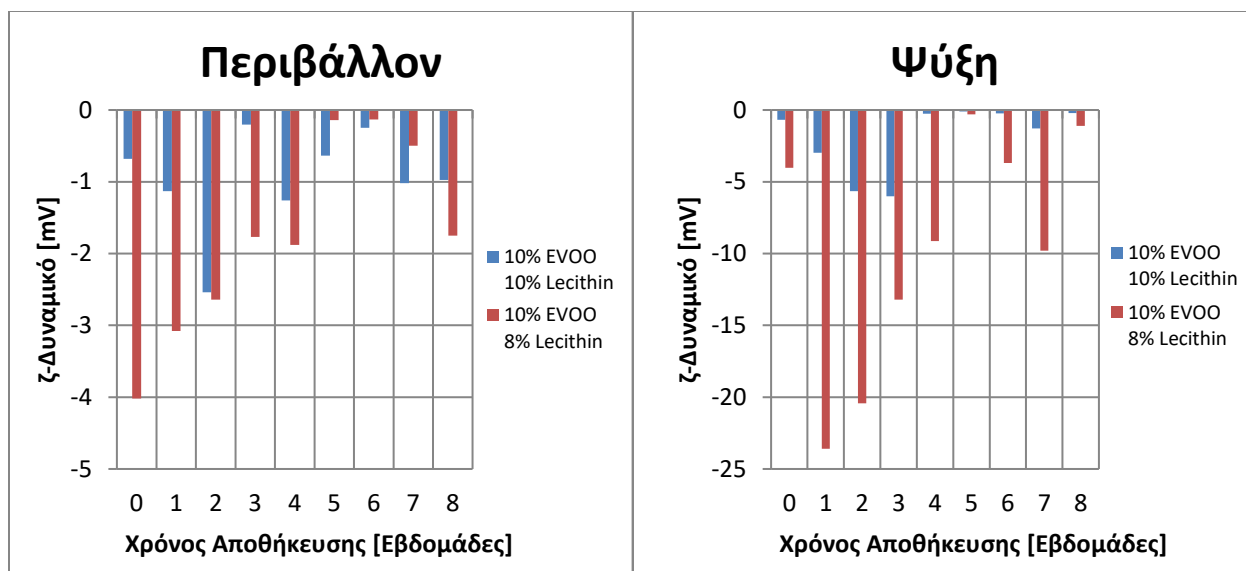
**Διάγραμμα 3.19:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το Tween 20 αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αριστερά) και ψύξης (δεξιά) ως προς το χρόνο.

Από το Διάγραμμα 3.19, διαπιστώνεται ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό, το οποίο και αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερης σταθερότητας. Όσον αφορά την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, τα δείγματα με 8% που διατηρήθηκαν στο περιβάλλον έχουν μεγαλύτερο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό από εκείνα με 10%, το αντίθετο διαπιστώνεται στα νανογαλακτώματα του ψυγείου.



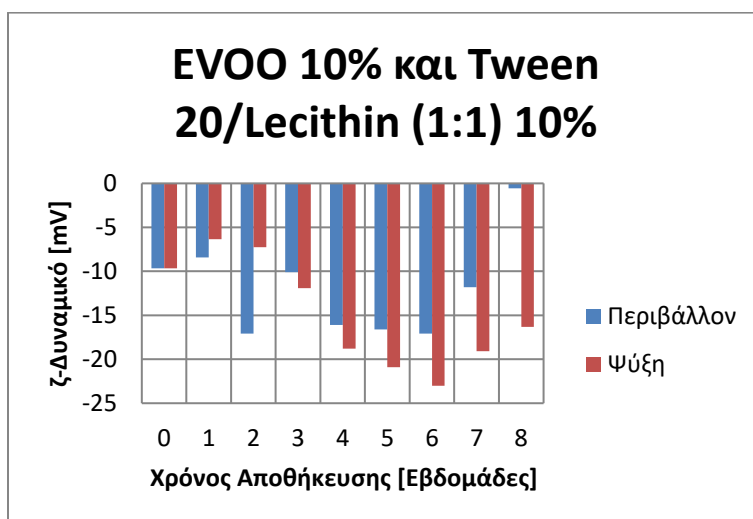
**Διάγραμμα 3.20:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. και γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη 8% αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (μπλε) και ψύξης (κόκκινο) ως προς το χρόνο.

Από το Διάγραμμα 3.20, είναι ξεκάθαρο ότι η ψύξη συμβάλλει στη διατήρηση του εν λόγω γαλακτώματος για 8 εβδομάδες, συγκριτικά με την αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όπου διασπάται πλήρως μετά τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης.



**Διάγραμμα 3.21:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. και γαλακτωματοποιητή τη λεκιθίνη αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αριστερά) και ψύξης (δεξιά) ως προς το χρόνο.

Από το Διάγραμμα 3.21, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή τη λεκιθίνη εμφανίζουν διακυμάνσεις στις τιμές του ζ-Δυναμικού. Αξίζει να σημειωθεί ότι το νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα λεκιθίνης 8% κ.β. που διατηρήθηκε υπό ψύξη εμφανίζει μεγάλο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό σχεδόν όλες τις εβδομάδες αποθήκευσης του, πράγμα που αποτελεί ένδειξη καλής σταθερότητας.



**Διάγραμμα 3.22:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20/Λεκιθίνης 10% αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (μπλε) και ψύξης (κόκκινο) ως προς το χρόνο.

Στο Διάγραμμα 3.22, φαίνεται ότι το νανογαλάκτωμα με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης σε περιεκτικότητα 10% κ.β. είναι ένα αρκετά σταθερό δείγμα με μεγάλο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων για τις 3 εβδομάδες αποθήκευσης, προέκυψε ότι το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή και η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρέασαν σημαντικά το ζ-Δυναμικό των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Πιο συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις μέσες τιμές του ζ-Δυναμικού έχει η λεκιθίνη με το Tween 20 και την καζεΐνη. Τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη είχαν μέση τιμή ζ-Δυναμικού  $-5,8 mV$ , ενώ αυτά με τη καζεΐνη  $-1,1 mV$  και με το Tween 20  $-0,99 mV$ . Συνεπώς, η λεκιθίνη είχε καλύτερα αποτελέσματα γαλακτωματοποίησης. Τέλος, οι δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα νανογαλακτώματα υπό ψύξη είχαν μέση τιμή ζ-Δυναμικού  $-4,6 mV$ , ενώ αυτά που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον  $-1,3 mV$ , οπότε η ψύξη συνέβαλε στη σταθερότητα των δειγμάτων.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με γαλακτωματοποιητές τη λεκιθίνη και το Tween 20 για τις 8 εβδομάδες αποθήκευσης, βρέθηκε ότι όλες οι παράγοντες εκτός του χρόνου αποθήκευσης επηρέασαν σημαντικά το ζ-Δυναμικό των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Από το Duncan's test, φάνηκε ότι τα νανογαλακτώματα με τη λεκιθίνη και εκείνα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 8% κ.β. είχαν μεγαλύτερο κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικό, οπότε και ήταν σταθερότερα. Ακόμη, τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είχαν μέση τιμή ζ-Δυναμικού  $-1,1 mV$ , ενώ εκείνα υπό ψύξη  $-3,5 mV$ .

### **3.1.2 Νανογαλακτώματα με το ενσωματωμένο βιοδραστικό συστατικό CoQ<sub>10</sub>**

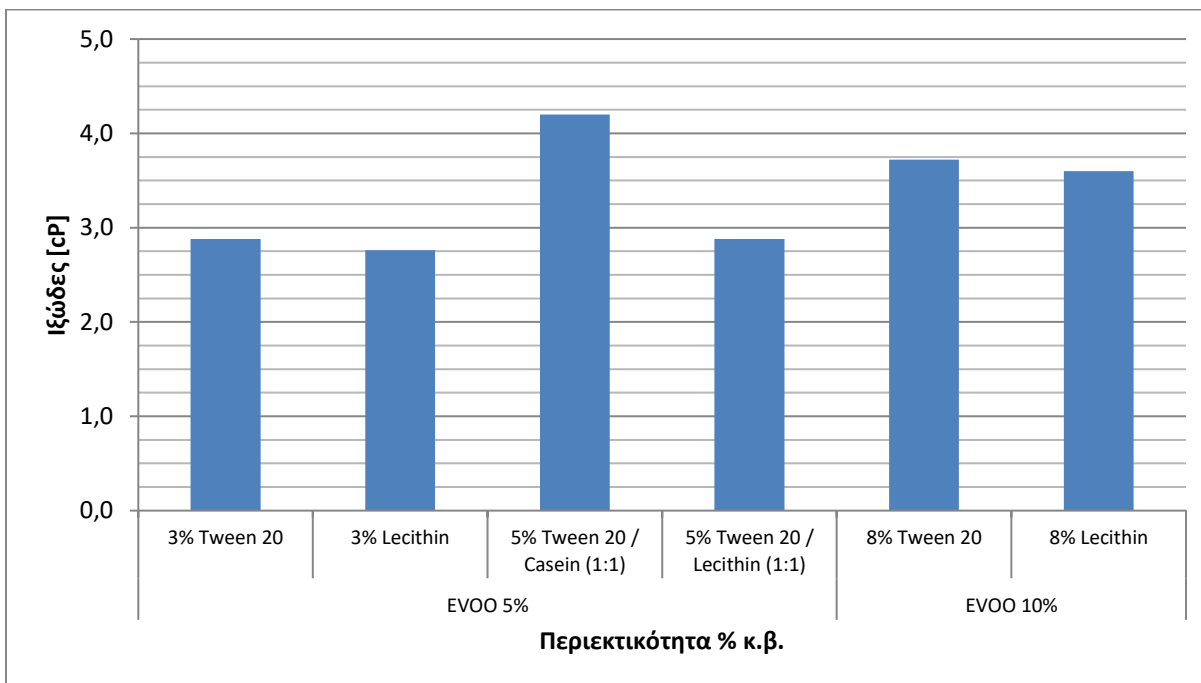
Στο δεύτερο μέρος, παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν τα καλύτερα συστήματα νανογαλακτωμάτων με το ενσωματωμένο βιοδραστικό συστατικό CoQ<sub>10</sub>.

#### **3.1.2.1 Ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων**

Παρακάτω, παρατίθενται οι ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων που μετρήθηκαν την ημέρα της παρασκευής τους.

## Ιξώδες

Το ιξώδες των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων κυμαίνεται από 2,88 έως 4,20 cP.

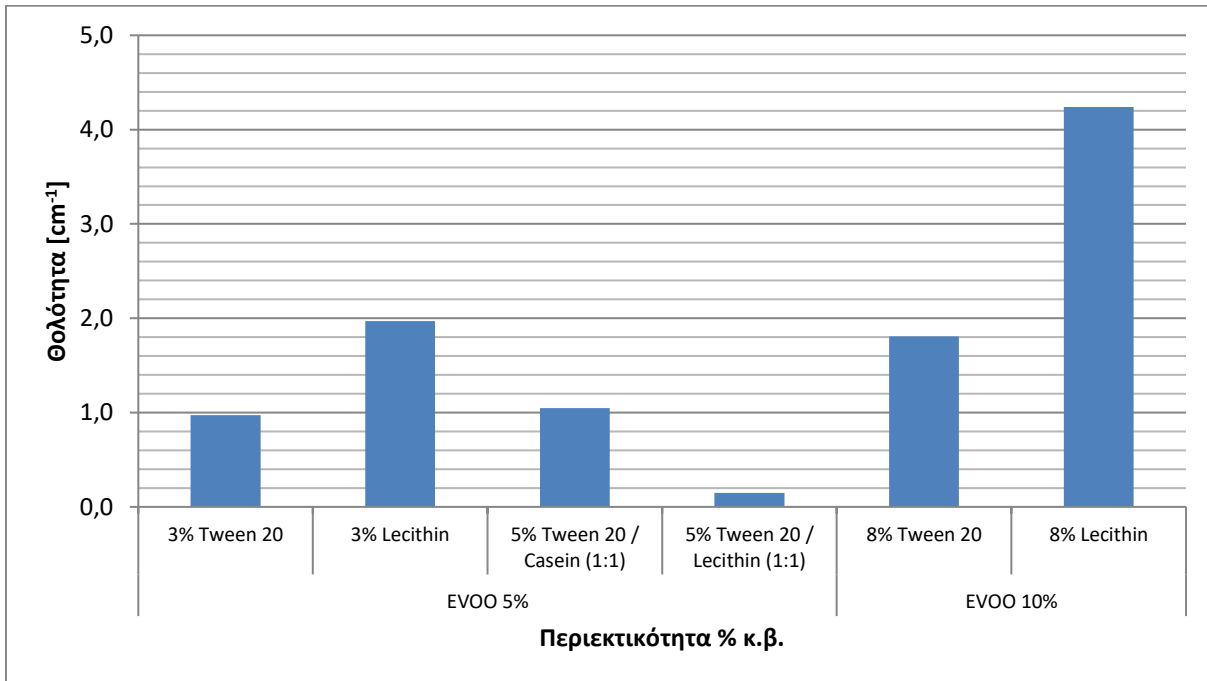


**Διάγραμμα 3.23:** Μεταβολή της τιμής του ιξώδους συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.

Στο Διάγραμμα 3.23, το είδος του γαλακτωματοποιητή δεν επηρεάζει τις τιμές του ιξώδους τόσο στην περίπτωση των δειγμάτων με έλαιο 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή 3% κ.β. όσο και στα νανογαλακτώματα με έλαιο 10% κ.β. και γαλακτωματοποιητή 8% κ.β. Ωστόσο, τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με τα μίγματα χημικού και φυσικών γαλακτωματοποιητών εμφανίζουν διαφορά στην τιμή του ιξώδους τους. Η μέγιστη τιμή του ιξώδους (4,20 cP) μετρήθηκε στο δείγμα με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης. Τούτο οφείλεται στην παρουσία της καζεΐνης στο γαλάκτωμα, καθώς και στα μη εμπλουτισμένα δείγματα παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους παρουσία της, είτε μόνη της είτε ως μίγμα.

## Θολότητα

Η θολότητα των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων κυμαίνεται από 0,147 έως 4,240  $cm^{-1}$ .



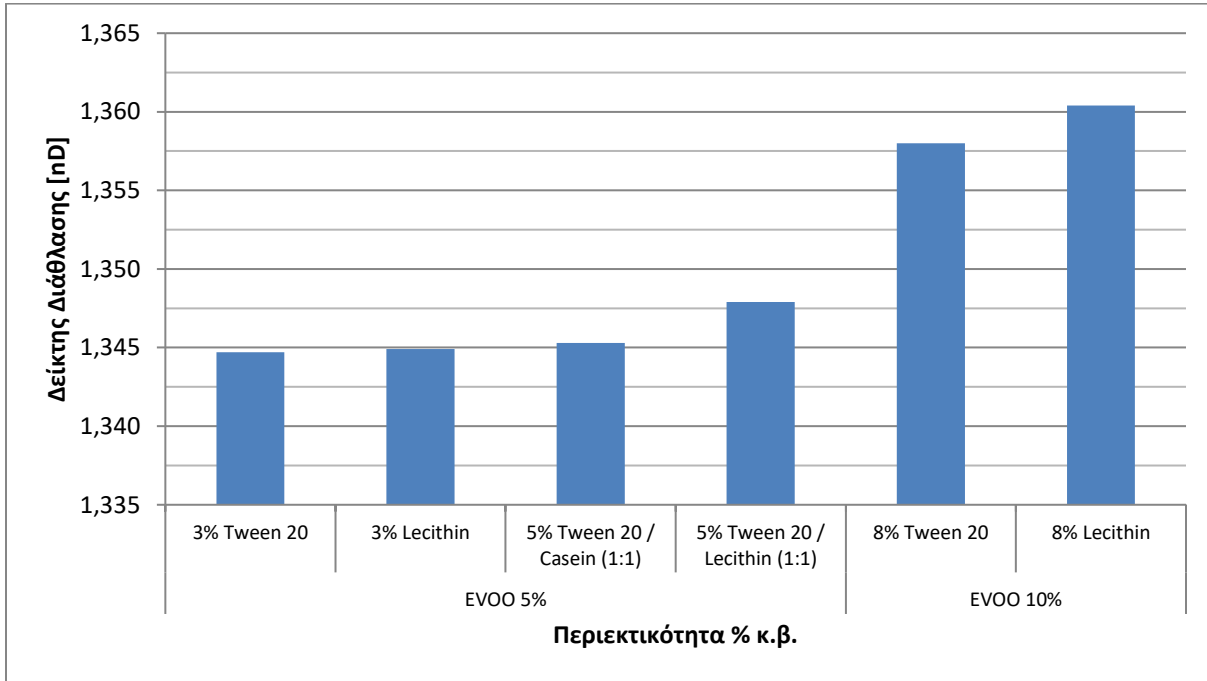
**Διάγραμμα 3.24:** Μεταβολή της τιμής της θολότητας συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.

Από το Διάγραμμα 3.24, φαίνεται ότι τα δείγματα με τη λεκιθίνη εμφανίζουν υψηλότερες τιμές θολότητας συγκριτικά με εκείνα με το Tween 20 και στις δύο «περιπτώσεις» νανογαλακτωμάτων (περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. με γαλακτωματοποιητή 3% κ.β. και περιεκτικότητα ελαίου 10% κ.β. με γαλακτωματοποιητή 8% κ.β.). Τα νανογαλακτώματα με τα μίγματα χημικού και φυσικών γαλακτωματοποιητών έχουν αρκετά χαμηλές τιμές θολότητας, ειδικότερα εκείνο που περιέχει μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης έχει την ελάχιστη τιμή θολότητας (0,147  $cm^{-1}$ ). Τούτο αποτελεί ένδειξη υψηλής σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων.



## Δείκτης Διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων κυμαίνεται από 1,3447 έως 1,3604 *nD*.

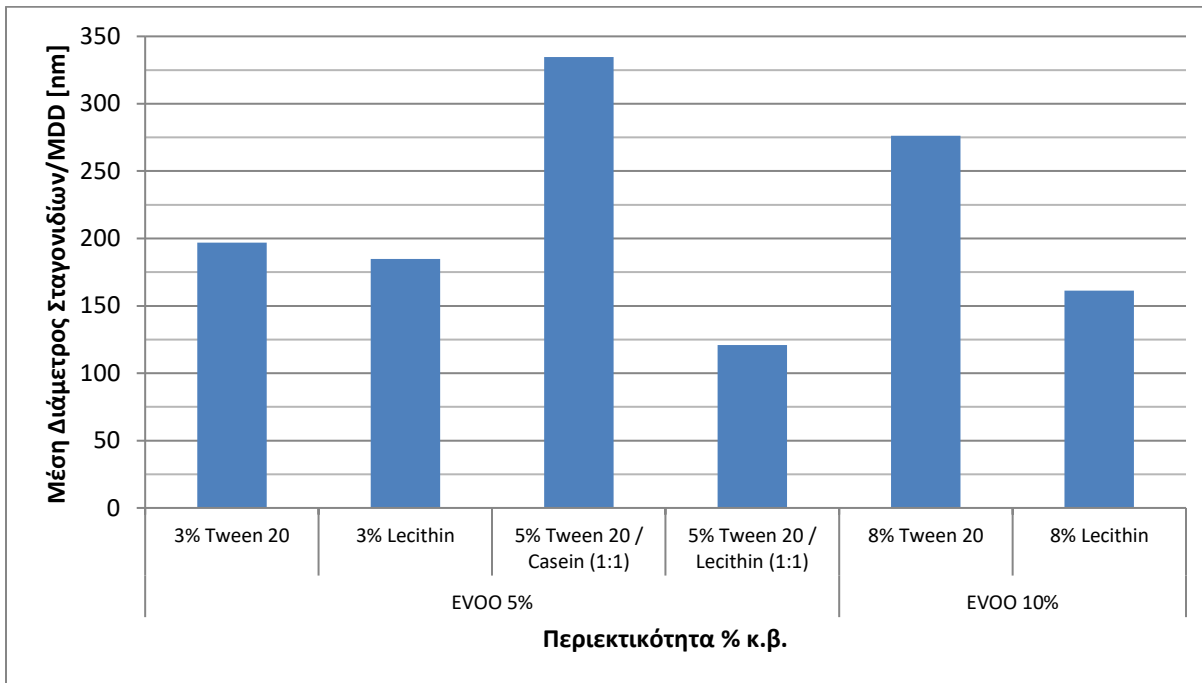


**Διάγραμμα 3.25:** Μεταβολή της τιμής του δείκτη διάθλασης συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.

Από το Διάγραμμα 3.25, παρατηρείται ότι ο δείκτης διάθλασης των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5% δεν επηρεάστηκε από το είδος και την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, συγκρίνοντας τους απλούς γαλακτωματοποιητές με τα μίγματα. Η ίδια τάση υπάρχει και στα δείγματα με EVOO 10%, όπου ο δείκτης διάθλασης ήταν σχεδόν ίδιος στο νανογαλάκτωμα με το Tween 20 και σε εκείνο με τη λεκιθίνη.

### Μέση διάμετρος σταγονιδίων (MDD)

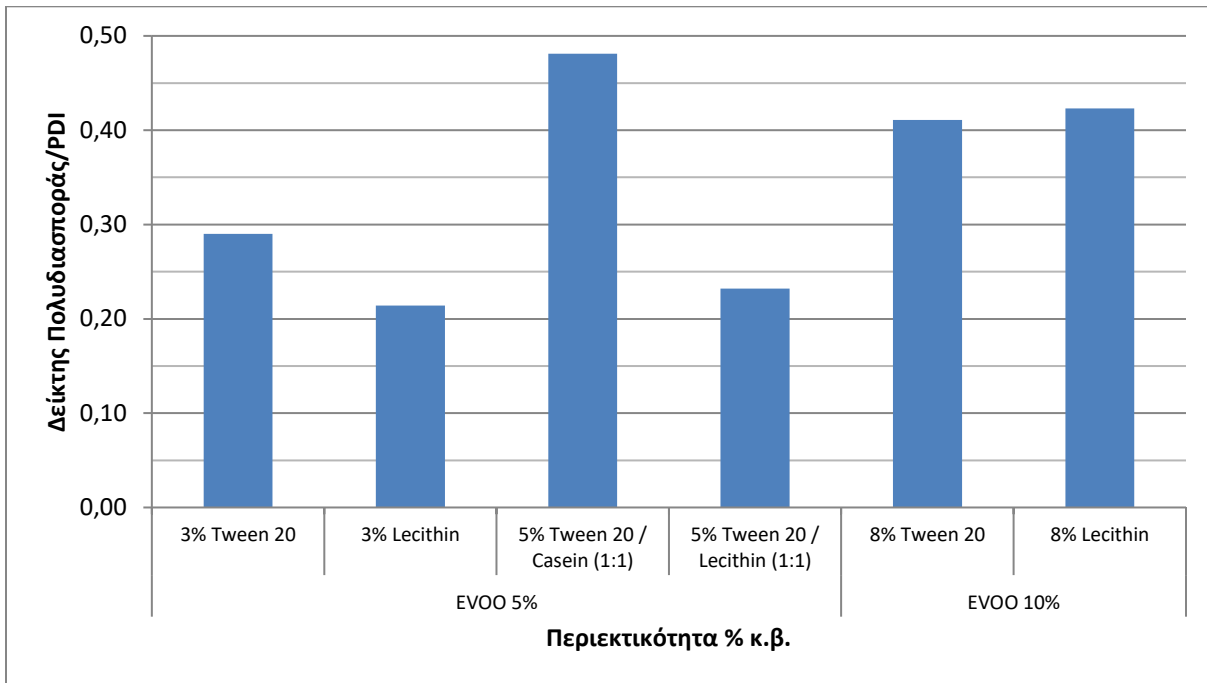
Η μέση διάμετρος των σταγονιδίων των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων κυμαίνεται από 121,0 έως 334,6 nm.



**Διάγραμμα 3.26:** Μεταβολή της τιμής της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή.

Από το Διάγραμμα 3.26, παρατηρείται ότι όλα τα γαλακτώματα έχουν διάμετρο μικρότερη των 350 nm, οπότε και ανήκουν στην κατηγορία των νανογαλακτωμάτων. Επιπλέον, φαίνεται ότι η λεκιθίνη ως γαλακτωματοποιητής συμβάλλει στην παρασκευή νανογαλακτωμάτων με μικρότερη διάμετρο σε σχέση με το Tween 20, συγκρίνοντας ίδιες περιεκτικότητες % κ.β. ελαίου και γαλακτωματοποιητών. Η μεγαλύτερη μέση διάμετρος σταγονιδίων (334,6 nm) μετρήθηκε στο δείγμα με το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης, ενώ η μικρότερη μέση διάμετρος σταγονιδίων (121,0 nm) στο δείγμα με το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης.

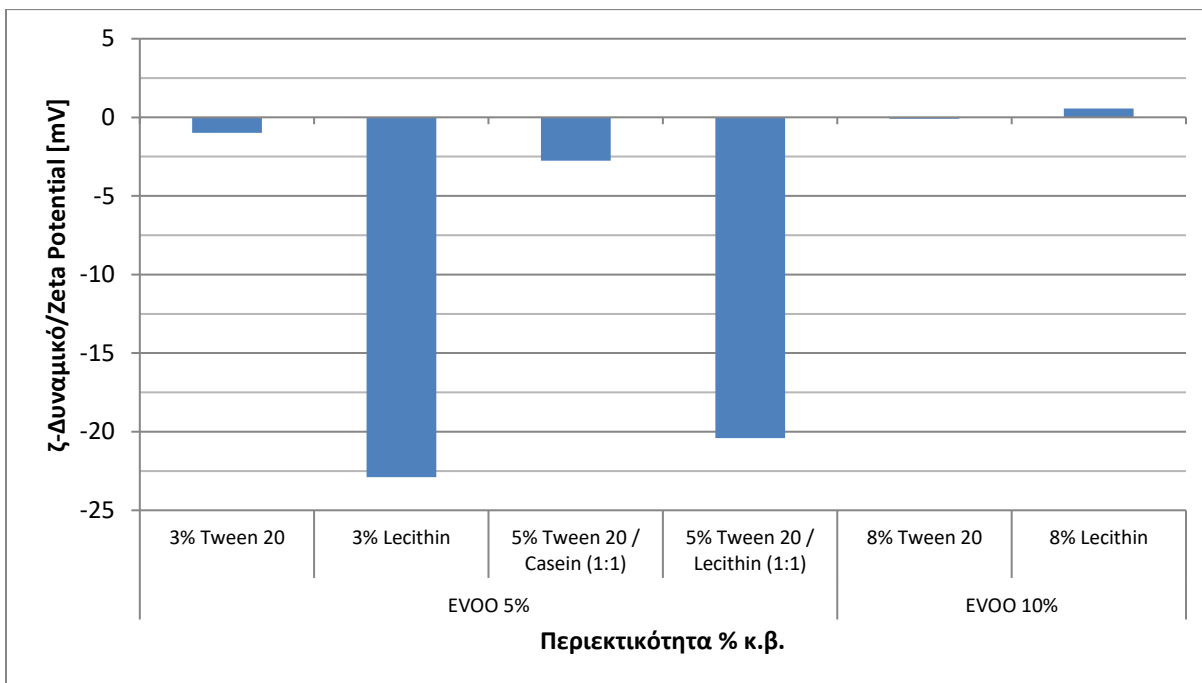
### Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)



**Διάγραμμα 3.27:** Μεταβολή της τιμής του δείκτη πολυδιασποράς των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή.

Από το Διάγραμμα 3.27, φαίνεται ότι τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητές το Tween 20, τη λεκιθίνη και το μίγμα αυτών σε περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. είχαν τιμές του δείκτη πολυδιασποράς κοντά στο 0,3, πράγμα που σημαίνει ότι τα δείγματα ήταν μονοδιασπαρμένα, οπότε και έχουν καλή σταθερότητα. Ωστόσο, και στις άλλες περιπτώσεις, οι τιμές του PDI ήταν μικρότερες του 0,5 και θεωρούνται καλές.

## ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)



**Διάγραμμα 3.28:** Μεταβολή της τιμής του ζ-Δυναμικού των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, της περιεκτικότητας % κ.β. και του είδους του γαλακτωματοποιητή.

Από το Διάγραμμα 3.28, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα με το Tween 20 έχουν ζ-Δυναμικό κοντά στο 0, πράγμα αναμενόμενο, καθώς ο εν λόγω γαλακτωματοποιητής είναι μη ιοντικός και η φόρτιση οφείλεται, λογικά, στην παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων στο έλαιο. Επιπλέον, τα δείγματα με τη λεκιθίνη σε περιεκτικότητα 3% κ.β. και το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης σε περιεκτικότητα 5% κ.β. εμφανίζουν τα μεγαλύτερα κατ' απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικά, οπότε είναι και τα σταθερότερα δείγματα.

### 3.1.2.2 Μελέτη της διατηρησιμότητας των νανογαλακτωμάτων

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, μελετήθηκαν τα νανογαλακτώματα ως ενιαία συστήματα είδους και περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν το σύστημα (είδος και περιεκτικότητα) του γαλακτωματοποιητή, η θερμοκρασία αποθήκευσης των γαλακτωμάτων (περιβάλλον και ψύξη) και ο χρόνος διατήρησης. Επιπλέον, έγινε διαχωρισμός των δειγμάτων σε εκείνα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και σε εκείνα με 10% κ.β.

### Δείκτης σταθερότητας (ESI)

Παρακάτω παρατίθενται οι πίνακες που εξετάζουν τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων και τη μεταβολή του δείκτη σταθερότητας υπό την επίδραση του χρόνου.

**Πίνακας 3.5:** Μεταβολή του δείκτη σταθερότητας των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.

Χρόνος Αποθήκευσης [Ημέρες]	EVOO 5% Tween 20 3%	EVOO 5% Lecithin 3%	EVOO 5% Tween 20/ Casein (1:1) 5%	EVOO 5% Tween 20/ Lecithin (1:1) 5%	EVOO 10% Tween 20 8%	EVOO 10% Lecithin 8%
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
20	100,0	95,7	97,0	100,0	97,3	100,0
30	100,0	95,7	97,0	100,0	97,3	97,2
40	97,4	95,7	97,0	100,0	97,3	97,2

Από τον Πίνακα 3.5, παρατηρείται ότι τα νανογαλακτώματα δεν είχαν αισθητές μεταβολές στο δείκτη σταθερότητάς τους.

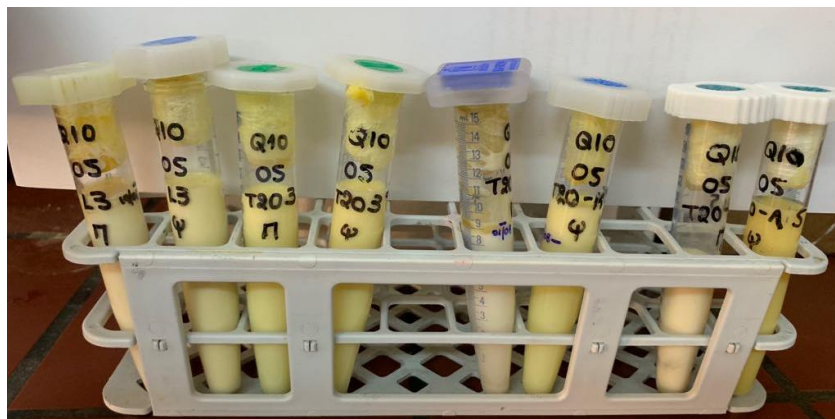
**Πίνακας 3.6:** Μεταβολή του δείκτη σταθερότητας των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων αποθηκευμένων υπό ψύξη ως προς το χρόνο.

Χρόνος Αποθήκευσης [Ημέρες]	EVOO 5% Tween 20 3%	EVOO 5% Lecithin 3%	EVOO 5% Tween 20/ Casein (1:1) 5%	EVOO 5% Tween 20/ Lecithin (1:1) 5%	EVOO 10% Tween 20 8%	EVOO 10% Lecithin 8%
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
20	100,0	100,0	95,6	100,0	100,0	100,0
30	100,0	100,0	95,6	100,0	97,3	100,0
40	97,5	100,0	92,9	100,0	97,3	100,0

Ομοίως, από τον παραπάνω πίνακα, παρατηρείται ότι όλα τα νανογαλακτώματα δεν είχαν αισθητές μεταβολές στο δείκτη σταθερότητάς τους. Ωστόσο, η ψύξη φαίνεται να συνέβαλε στη σταθερότητά τους (μεγαλύτερο ESI), με εξαίρεση το δείγμα με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης 5%.

### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

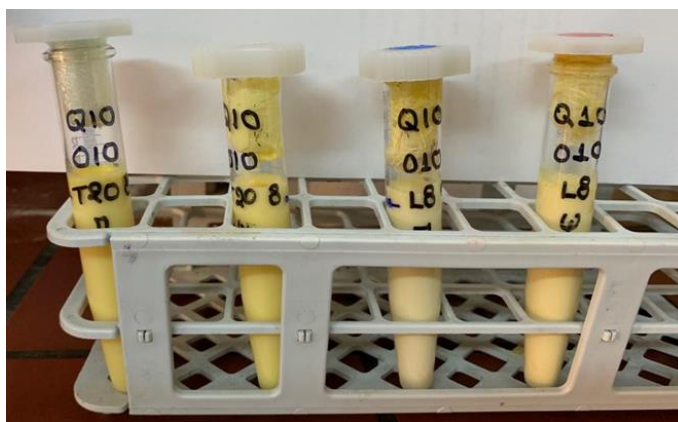
Το σύστημα του γαλακτωματοποιητή και ο χρόνος διατήρησης επηρέασαν το ESI των γαλακτωμάτων με περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β. Το νανογαλάκτωμα με το μίγμα Tween 20/καζεΐνης έχει μικρότερο ESI από εκείνο με το Tween 20 και το μίγμα Tween 20/λεκιθίνης. Όσον αφορά το χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων, βρέθηκε ότι οι μέσες τιμές του ESI είναι μεγαλύτερες του 98% ακόμα και στις 40 ημέρες, συνεπώς μπορεί να θεωρεί ικανοποιητική η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της διατήρησης.



Εικόνα 3.5: Φωτογραφία εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους στο περιβάλλον και σε ψύξη.

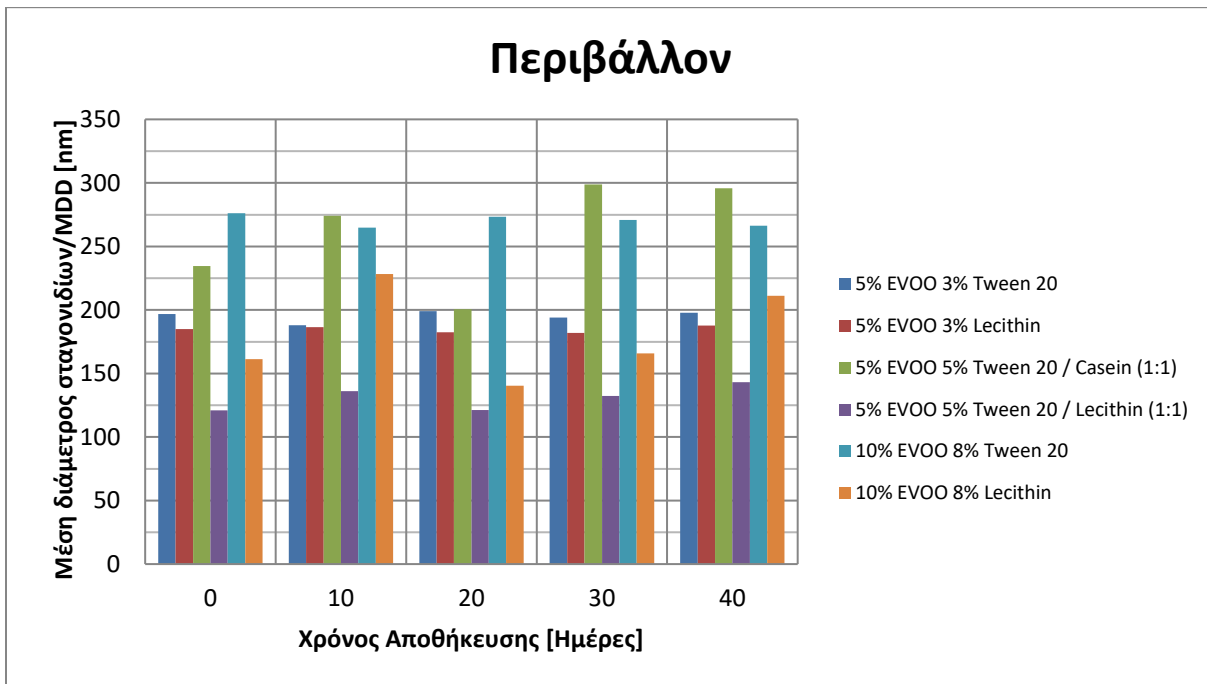
### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Ο χρόνος διατήρησης επηρέασε το δείκτη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων με περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β. Βρέθηκε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά έχει η μέση τιμή του ESI την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων, στις 10 και 20 ημέρες με τις 30 και 40 ημέρες, Πάλι, οι μέσες τιμές του ESI είναι μεγαλύτερες του 98% ακόμα και στις 40 ημέρες, οπότε και θεωρείται ικανοποιητική η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων.

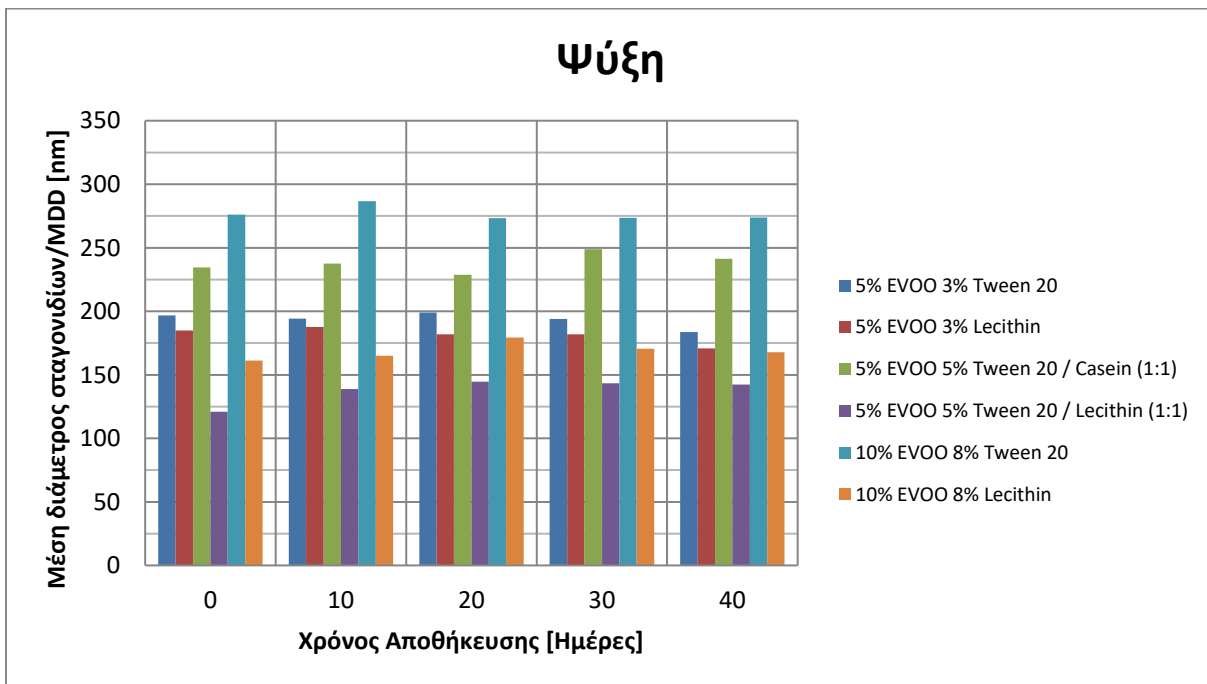


Εικόνα 3.6: Φωτογραφία εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους στο περιβάλλον και σε ψύξη.

## Μέση διάμετρος σταγονιδίων (MDD)



Διάγραμμα 3.29: Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.



Διάγραμμα 3.30: Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων αποθηκευμένων υπό ψύξη ως προς το χρόνο.

Από το Διάγραμμα 3.29, παρατηρείται ότι όλα τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα διατήρησαν τη MDD τους για το διάστημα των 40 ημερών. Η μικρότερη MDD τόσο αρχικά την ημέρα παρασκευής του όσο και μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης μετρήθηκε στο νανογαλακτώμα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20/ λεκιθίνης 5%.

Ομοίως, από το Διάγραμμα 3.30, παρατηρείται ότι όλα τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα διατήρησαν τη MDD τους για χρονικό διάστημα 40 ημερών. Τη μικρότερη διάμετρο σταγονιδίων τόσο αρχικά την ημέρα παρασκευής του όσο και μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης είχε, πάλι, το νανογαλακτώμα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 5%.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

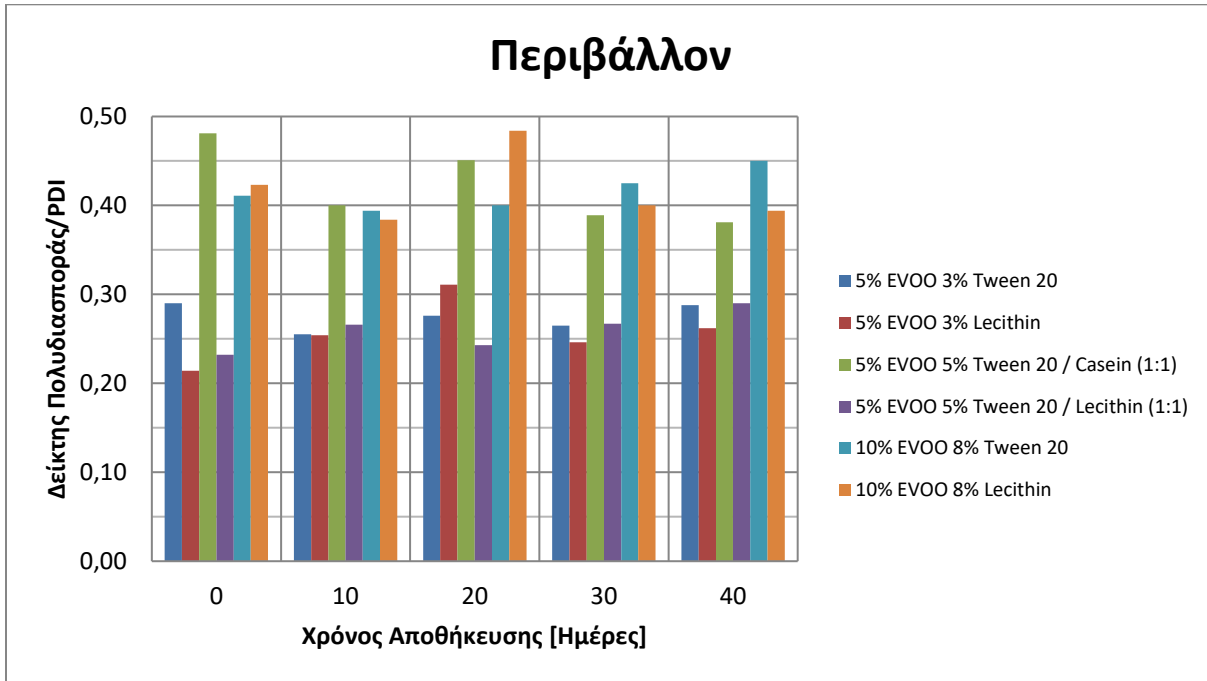
Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα EVOO 5%, προέκυψε ότι το σύστημα του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά τη MDD των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Τα δείγματα με το Tween 20 (194 nm) και τη λεκιθίνη (183 nm) έχουν παρόμοιες μέσες τιμές MDD. Τα νανογαλακτώματα, ωστόσο, με τα δύο μίγματα χημικού και φυσικών γαλακτωματοποιητών διαφέρουν τόσο μεταξύ τους όσο και με τα δείγματα των απλών γαλακτωματοποιητών. Συγκεκριμένα έχουν μέση τιμή MDD ίση με 250 nm για το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης και 134 nm για το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης.

#### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

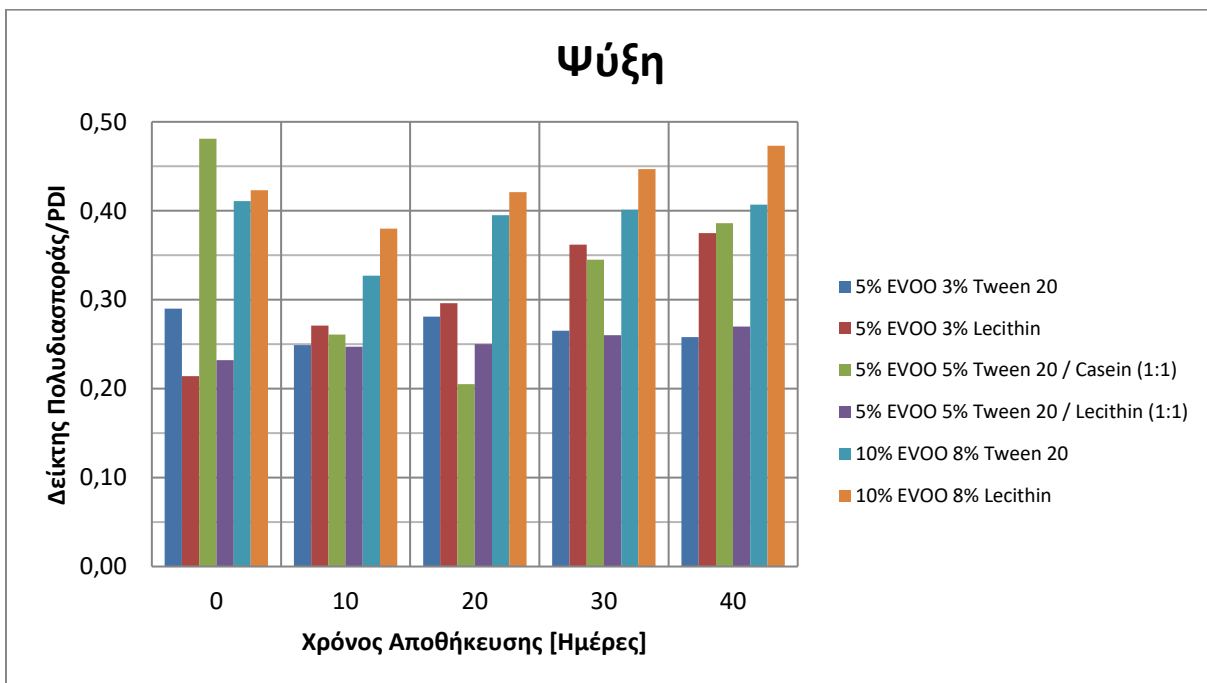
Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα EVOO 10%, προέκυψε ότι το σύστημα του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Ειδικότερα, το δείγμα με το Tween 20 (274 nm) και εκείνο με τη λεκιθίνη (175 nm) έχουν διαφορετικές τιμές MDD.



## Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)



Διάγραμμα 3.31: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς των εμπλουτισμένων ναογαλακτωμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.



Διάγραμμα 3.32: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς των εμπλουτισμένων ναογαλακτωμάτων αποθηκευμένων υπό ψύξη ως προς το χρόνο.

Από τα Διαγράμματα 3.31 και 3.32, καλύτερη διασπορά φαίνεται ότι επετεύχθη και διατηρήθηκε στα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 3% και το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης 5%, ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας αποθήκευσης.

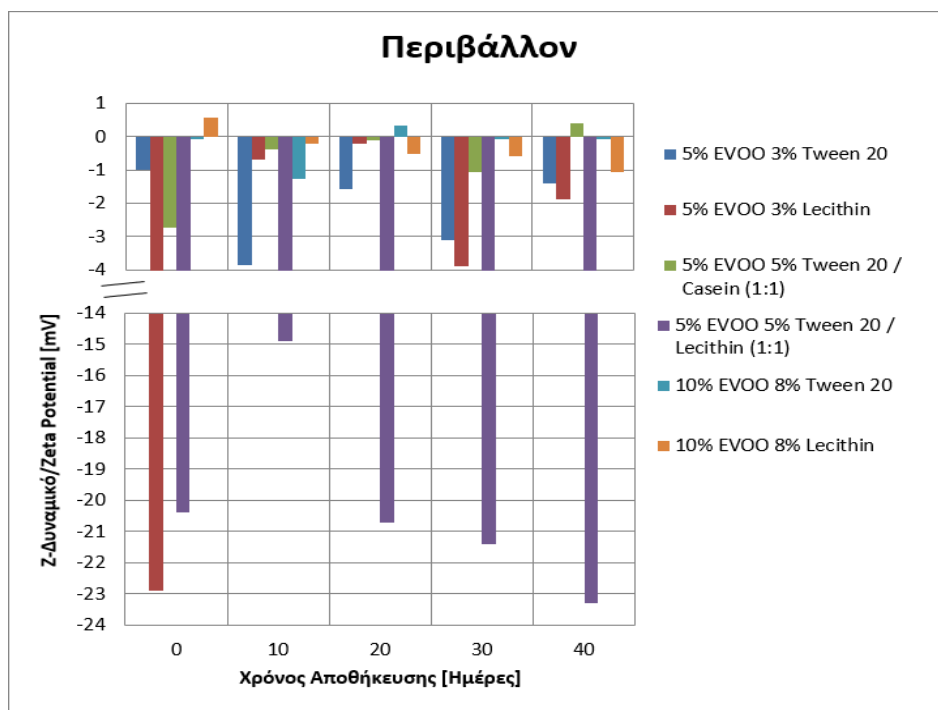
#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 5%, προέκυψε ότι το σύστημα του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το νανογαλάκτωμα με το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης (0,38) είχε μεγαλύτερη μέση τιμή PDI συγκριτικά με το δείγμα με το Tween 20 (0,27), αλλά και εκείνα με τη λεκιθίνη (0,28) και το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης (0,26).

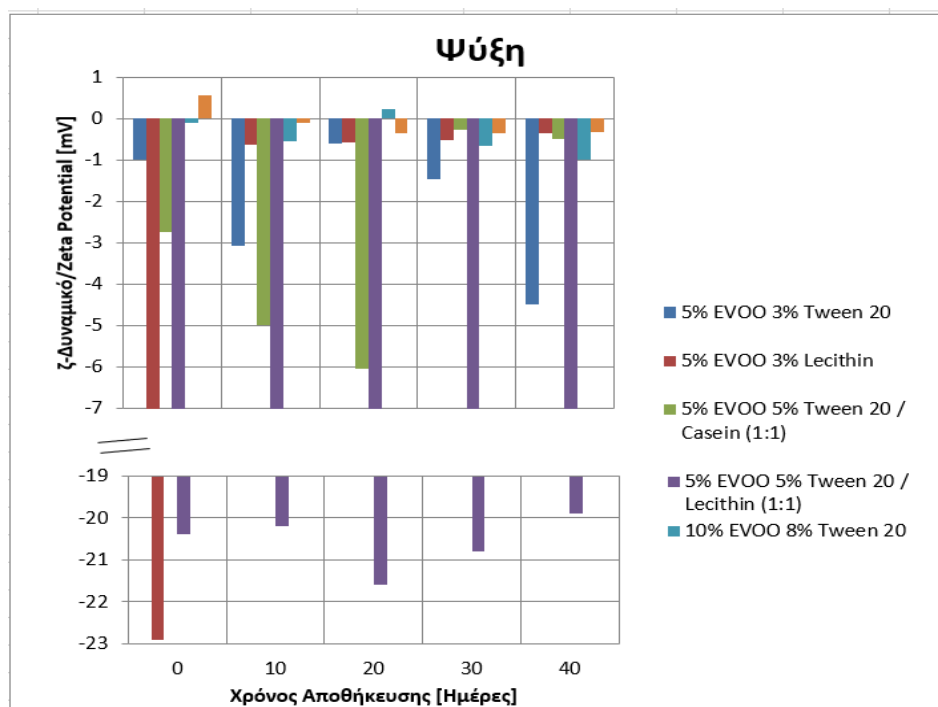
#### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Μέσω της στατιστικής επεξεργασίας των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα λιπαρής φάσης 10%, προέκυψε ότι κανένας παράγοντας δεν επηρέασε σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων.

### *ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)*



Διάγραμμα 3.33: Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως προς το χρόνο.



**Διάγραμμα 3.34:** Μεταβολή του ζ-Δυναμικού των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων αποθηκευμένων υπό ψύξη ως προς το χρόνο.

Από τα Διαγράμματα 3.33 και 3.34, μεγαλύτερη απόλυτη τιμή ζ-Δυναμικού και τις 40 ημέρες της αποθήκευσης είχε το νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20/λεκιθίνης, ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας διατήρησης.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

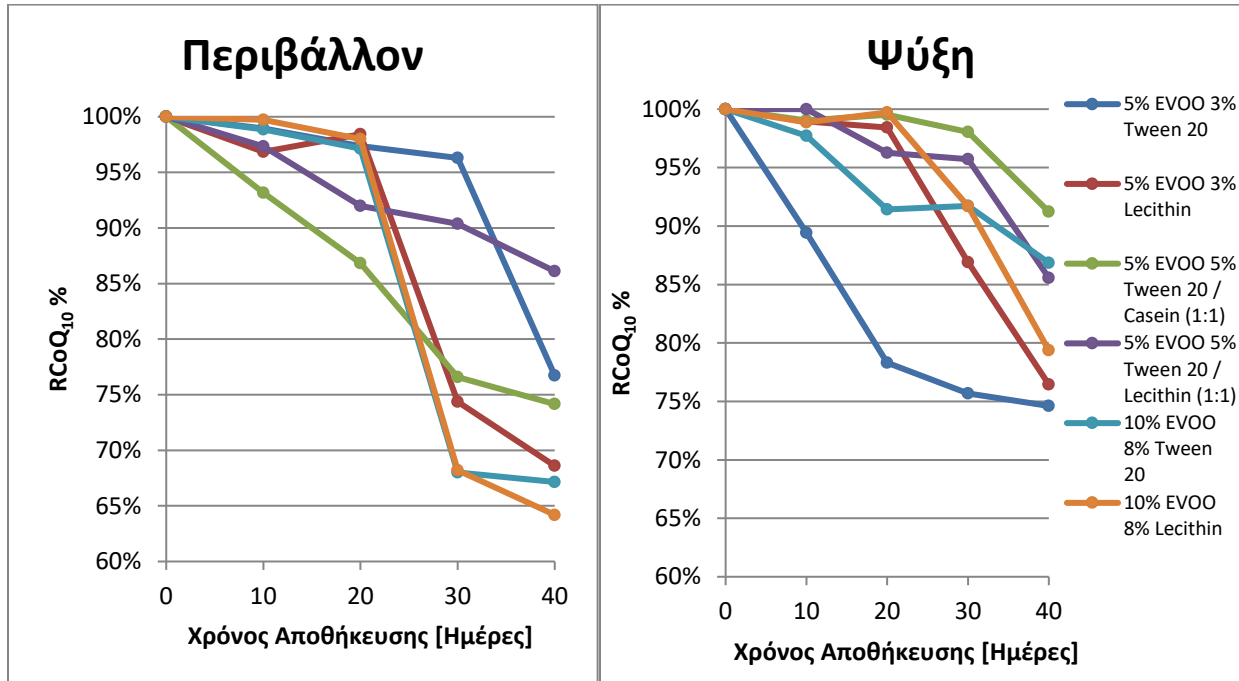
Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα EVOO 5%, προέκυψε ότι το σύστημα του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά το ζ-Δυναμικό των νανογαλακτωμάτων ( $p < 0,05$ ). Με χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test, συμπεραίνεται ότι το νανογαλάκτωμα με το μίγμα Tween 20/λεκιθίνης είχε μέση τιμή ζ-Δυναμικού  $-20,4 mV$ , σημαντικά μεγαλύτερη κατ' απόλυτη τιμή από εκείνη των δειγμάτων με το Tween 20 ( $-2,2 mV$ ), τη λεκιθίνη ( $-5,5 mV$ ) και το μίγμα Tween 20/καζεΐνης ( $-1,8 mV$ ).

#### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα ελαίου 10%, προέκυψε ότι κανένας παράγοντας δεν επηρέασε σημαντικά το ζ-Δυναμικό τους.

### Διατηρησιμότητα CoQ<sub>10</sub> (RCoQ<sub>10</sub>%)

Η μέτρηση της διατηρησιμότητας του συνένζυμου Q<sub>10</sub> πραγματοποιήθηκε στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με στόχο τον υπολογισμό του ποσοστού διατήρησης του CoQ<sub>10</sub>. Είναι αναγκαίο να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα ως προς τη διατηρησιμότητα του ενσωματωμένου βιοδραστικού συστατικού στο νανογαλάκτωμα ο/w.



Διάγραμμα 3.35: Προφίλ μείωσης της συγκέντρωσης του συνένζυμου Q<sub>10</sub> κατά την αποθήκευση των νανογαλακτωμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αριστερά) και ψύξης (δεξιά).

Από το Διάγραμμα 3.35, παρατηρείται ότι και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης το ποσοστό διατήρησης του CoQ<sub>10</sub> των δειγμάτων ήταν πάνω από 60% για 40 ημέρες διατήρησης. Ωστόσο, φαίνεται τα δείγματα υπό ψύξη να παρουσιάζουν γενικά καλύτερη διατήρηση του συνένζυμου Q<sub>10</sub>.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα λιπαρής φάσης 5%, προέκυψε ότι ο χρόνος αποθήκευσης επηρέασε σημαντικά τη διατηρησιμότητα του βιοδραστικού συστατικού που ενσωματώθηκε στα νανογαλακτώματα ( $p < 0,05$ ). Με χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test, βρέθηκε ότι η μέση τιμή του ποσοστού διατήρησης του συνένζυμου Q<sub>10</sub> το πρώτο δεκαήμερο αποθήκευσης είναι 96,7%, ενώ στις 40 ημέρες το ποσοστό έχει μειωθεί στο 79,2%.

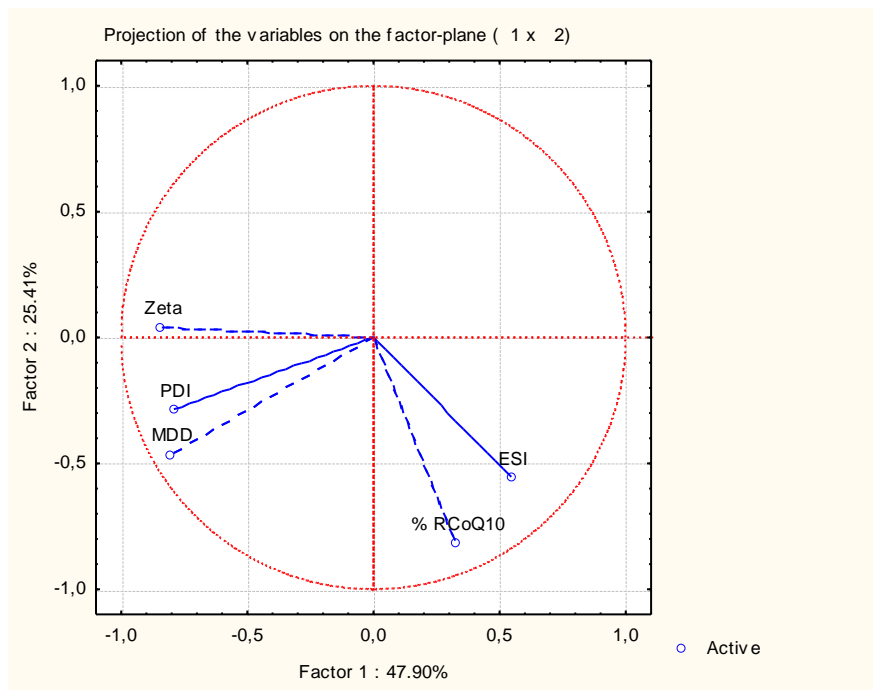
### Περιεκτικότητα EVOO 10% κ.β.

Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων με περιεκτικότητα EVOO 10%, προέκυψε ότι ο χρόνος και η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρέασαν σημαντικά τη διατηρησιμότητα του βιοδραστικού συστατικού που ενσωματώθηκε στα νανογαλακτώματα ( $p < 0,05$ ). Ειδικότερα, οι μέσες τιμές του ποσοστού διατήρησης του συνένζυμου  $Q_{10}$  είναι 86,1% για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον και 93,7% για εκείνα που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη. Ομοίως, όσον αφορά το χρόνο αποθήκευσης, οι μέσες τιμές του  $RCoQ_{10}\%$  είναι αισθητά μικρότερο στις 30 και τις 40 ημέρες αποθήκευσης με την ημέρα παρασκευής, το πρώτο δεκαήμερο και εικοσαήμερο. Συγκεκριμένα, το πρώτο δεκαήμερο είναι 98,8% και στις 40 ημέρες 74,4%.

### 3.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) για τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα

Μετά από την επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων από το Statistica, λαμβάνονται τα παρακάτω διαγράμματα για τα νανογαλακτώματα με το ενσωματωμένο βιοδραστικό συστατικό CoQ<sub>10</sub>. Επιπλέον, έγινε διαχωρισμός των δειγμάτων σε εκείνα με περιεκτικότητα ελαίου 5% κ.β. και σε εκείνα με 10% κ.β.

#### Περιεκτικότητα EVOO 5%



Εικόνα 3.7: Γραφική απεικόνιση των ιδιοτήτων με την ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα EVOO 5%.

Στην παραπάνω εικόνα, οι άξονες x και y απεικονίζουν τις κύριες συνιστώσες για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Παρατηρείται ότι η πρώτη κύρια συνιστώσα (Factor 1) συνεισφέρει κατά 47,90% στη συνολική διακύμανση, ενώ η δεύτερη (Factor 2) κατά 25,41%. Η συνολική διακύμανση είναι το άθροισμα των κυρίων συνιστωσών, οπότε και είναι ίση με 73,31%. Είναι επιθυμητό να ξεπερνά το 70%, κάτι που συμβαίνει σε αυτή την ανάλυση.

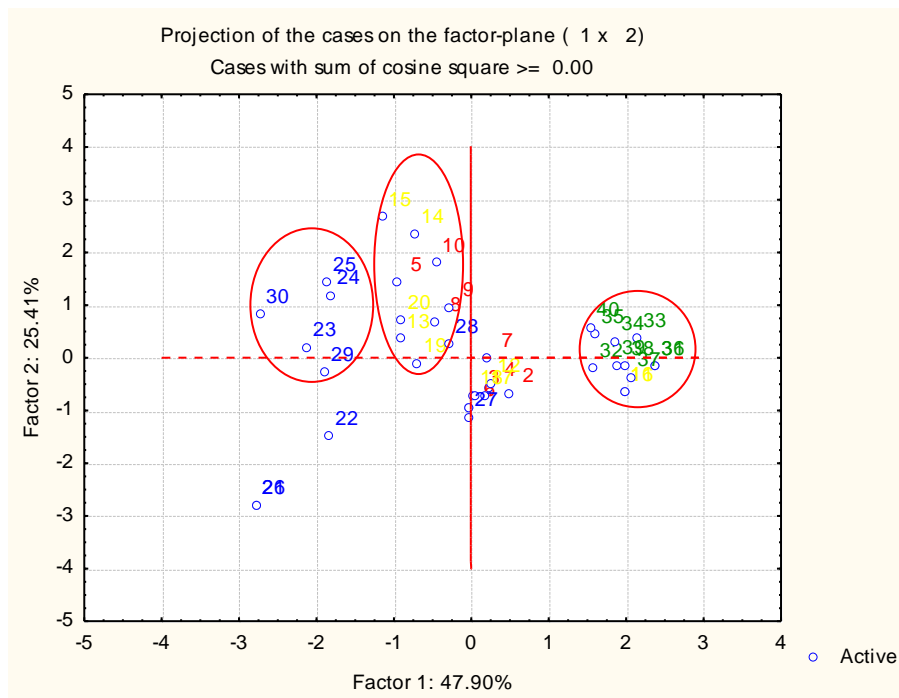
Οι ιδιότητες που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα x και έχουν μεγαλύτερη προβολή σε αυτόν σχετίζονται ισχυρά με την πρώτη κύρια συνιστώσα. Αντίστοιχα, οι ιδιότητες που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα y και έχουν μεγαλύτερη προβολή σε αυτόν σχετίζονται ισχυρά με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα. Ο υπολογισμός των τιμών των προβολών γίνεται στον παρακάτω πίνακα για όλες τις εξεταζόμενες ιδιότητες και τις 2 κύριες συνιστώσες.

Πίνακας 3.7: Τιμές των προβολών των ιδιοτήτων στις 2 κύριες συνιστώσες.

Variable	Factor coordinates of the variables, based on correlations (Q10 DIATHRSH 5%)				
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
MDD	-0.807309	-0.463572	-0.090247	-0.023916	-0.353039
PDI	-0.794253	-0.286296	0.266420	0.418376	0.202925
Zeta	-0.843446	0.041466	0.050275	-0.499472	0.186761
ESI	0.543822	-0.555919	0.602473	-0.175963	-0.035721
% RCoQ10	0.324699	-0.814114	-0.451141	-0.038794	0.163569

Έτσι, παρατηρείται ότι η μέση διάμετρος των σταγονιδίων (MDD) και ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) συσχετίζονται μεταξύ τους και έχουν αρνητική συνεισφορά στην πρώτη κύρια συνιστώσα. Το ζ-Δυναμικό των νανογαλακτωμάτων έχει αρνητική συνεισφορά στην πρώτη κύρια συνιστώσα. Επιπλέον, το ποσοστό διατήρησης του CoQ<sub>10</sub> έχει αρνητική συνεισφορά στη δεύτερη κύρια συνιστώσα.

Έπειτα, παρατίθεται το διάγραμμα που απεικονίζει τις θέσεις των δειγμάτων σε σχέση με τις κύριες συνιστώσες.

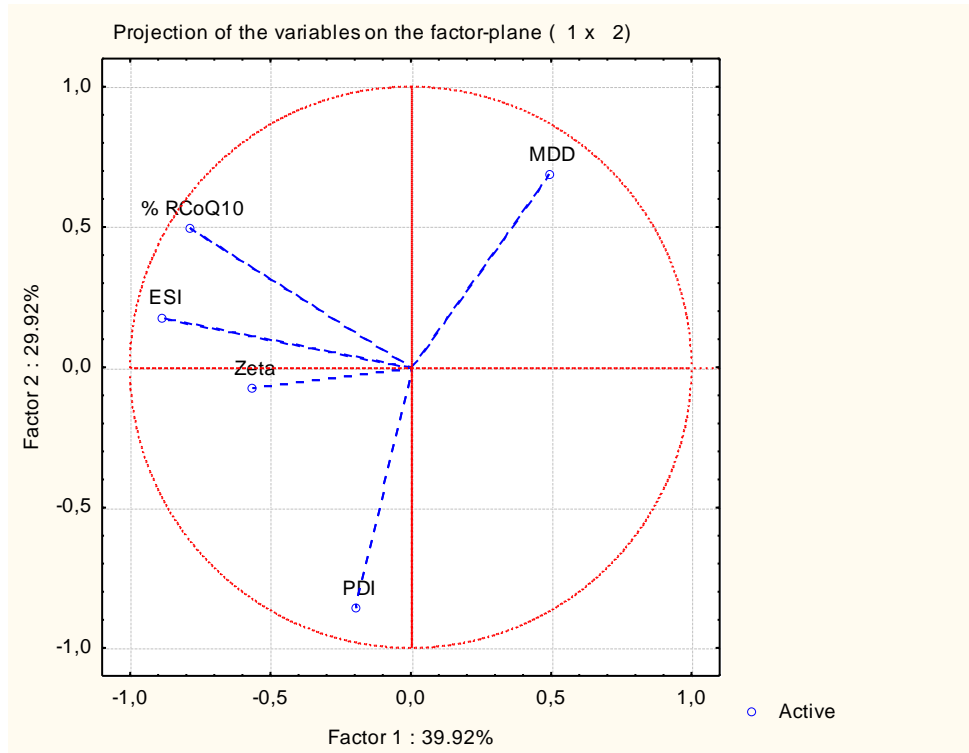


Εικόνα 3.8: Γραφική απεικόνιση των δειγμάτων με ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα EVOO 5%.

Τα δείγματα 1 έως 10 έχουν ως γαλακτωματοποιητή το Tween 20 (κόκκινο χρώμα), τα 11 έως 20 τη λεκιθίνη (κίτρινο χρώμα), τα 21 έως 30 το μίγμα Tween 20/καζεΐνης (μπλε χρώμα) και τα 31 έως 40 το μίγμα Tween 20/λεκιθίνης (πράσινο χρώμα). Παρατηρείται ότι τα δείγματα με το μίγμα Tween 20/λεκιθίνης έχουν μεγάλες τιμές ESI και RCoQ<sub>10</sub>% καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. Παράλληλα, έχουν μικρές τιμές MDD και PDI. Το αποτέλεσμα είναι

αναμενόμενο, καθώς όσο μικρότερη είναι η τιμή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων, τόσο σταθερότερο είναι το νανογαλάκτωμα. Ένα νανογαλάκτωμα με μικρότερα σταγονίδια, συνήθως, έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (μεγαλύτερη κινητική σταθερότητα) από το αντίστοιχο νανογαλάκτωμα με μεγαλύτερα σταγονίδια, παρόλο που τα μικρά σταγονίδια λόγω μεγαλύτερης διεπιφάνειας επαφής εμφανίζουν υψηλή θερμοδυναμική αστάθεια. Επιπλέον, τα δείγματα 23, 24, 25, 29 και 30 αντιπροσωπεύουν τα τελευταία δεκαήμερα διατήρησης των νανογαλακτωμάτων με το μίγμα Tween 20/καζεΐνης που διατηρήθηκαν είτε στο περιβάλλον είτε σε ψύξη. Τούτα έχουν μικρές τιμές ESI και RCoQ<sub>10</sub>%, πράγμα αναμενόμενο καθώς το συγκεκριμένο σύστημα γαλακτωματοποιητών δεν ήταν ιδιαίτερα καλό. Παρόμοια χαρακτηριστικά (μικρές τιμές ESI και RCoQ<sub>10</sub>%) έχουν και τα δείγματα 5, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 19 και 20, τα οποία έχουν ως γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη και αποτελούν τις μετρήσεις των 30 και 40 ημερών.

### Περιεκτικότητα EVOO 10%



**Εικόνα 3.9:** Γραφική απεικόνιση των ιδιοτήτων με την ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα EVOO 10%.

Στην παραπάνω εικόνα, οι άξονες x και y απεικονίζουν τις κύριες συνιστώσες για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Παρατηρείται ότι η πρώτη κύρια συνιστώσα (Factor 1) συνεισφέρει κατά 39,92% στη συνολική διακύμανση, ενώ η δεύτερη (Factor 2) κατά 29,92%. Η συνολική διακύμανση είναι το άθροισμα των κυρίων συνιστωσών, οπότε και είναι ίση με



69,84%. Είναι επιθυμητό να ξεπερνά το 70%, κάτι που δεν συμβαίνει σε αυτή την ανάλυση, ωστόσο η τιμή είναι αρκετά κοντά και γίνεται αποδεκτή.

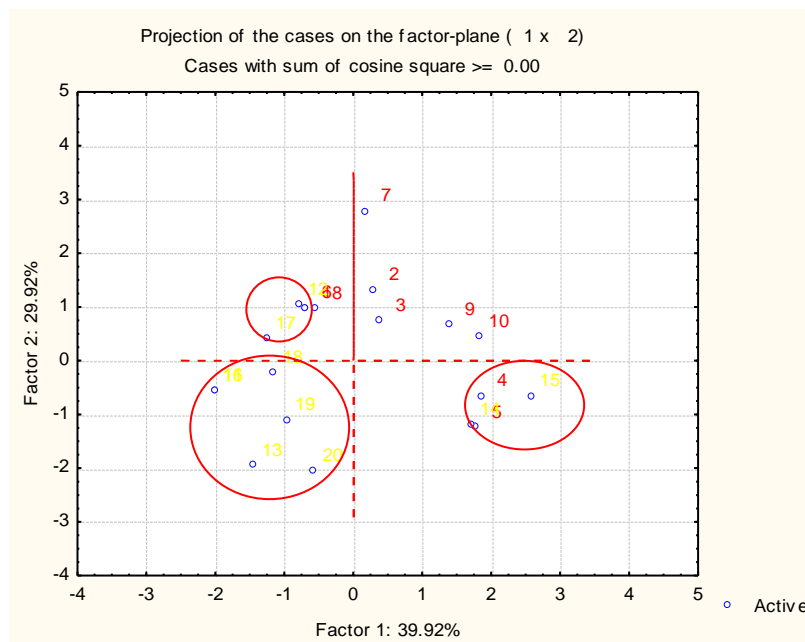
Οι ιδιότητες που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα x και έχουν μεγαλύτερη προβολή σε αυτόν σχετίζονται ισχυρά με την πρώτη κύρια συνιστώσα. Αντίστοιχα, οι ιδιότητες που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα y και έχουν μεγαλύτερη προβολή σε αυτόν σχετίζονται ισχυρά με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα. Ο υπολογισμός των τιμών των προβολών γίνεται στον παρακάτω πίνακα για όλες τις εξεταζόμενες ιδιότητες και τις 2 κύριες συνιστώσες.

**Πίνακας 3.8:** Τιμές των προβολών των ιδιοτήτων στις 2 κύριες συνιστώσες.

Variable	Factor coordinates of the variables, based on correlations (Q10 DIATHRHSH 10%..)				
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
MDD	0.492118	0.688902	0.283811	-0.438368	-0.102564
PDI	-0.193757	-0.858845	0.042106	-0.470823	0.037374
Zeta	-0.564293	-0.073919	0.811108	0.129411	-0.038283
ESI	-0.882841	0.176885	-0.280145	-0.084062	-0.322112
% RCoQ10	-0.786534	0.497092	-0.100275	-0.156784	0.315640

Έτσι, παρατηρείται ότι ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) έχει αρνητική συνεισφορά στη δεύτερη κύρια συνιστώσα. Ο δείκτης σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων (ESI) έχει αρνητική συνεισφορά στην πρώτη κύρια συνιστώσα. Επιπλέον, το ποσοστό διατήρησης του CoQ<sub>10</sub> έχει αρνητική συνεισφορά στην πρώτη κύρια συνιστώσα.

Έπειτα, παρατίθεται το διάγραμμα που απεικονίζει τις θέσεις των δειγμάτων σε σχέση με τις κύριες συνιστώσες.



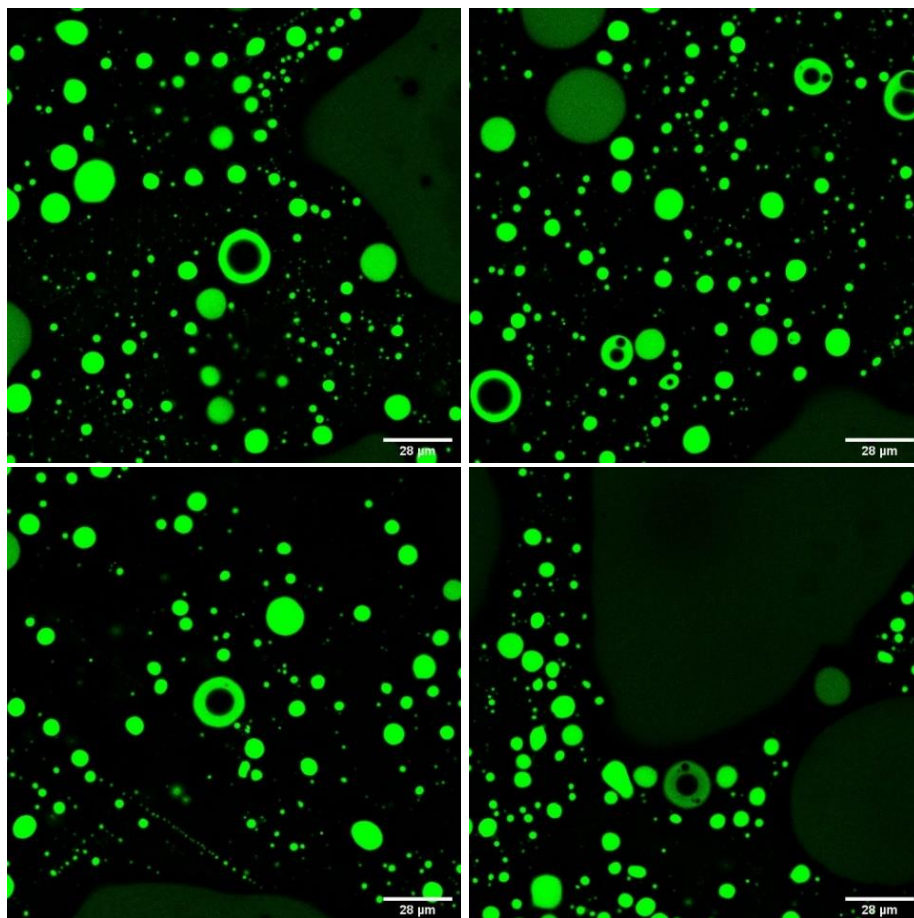
**Εικόνα 3.10:** Γραφική απεικόνιση των δειγμάτων με ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα νανογαλακτώματα με EVOO 10%.

Τα δείγματα 1 έως 10 έχουν ως γαλακτωματοποιητή το Tween 20 (κόκκινο χρώμα) και τα 11 έως 20 τη λεκιθίνη (κίτρινο χρώμα). Παρατηρείται ότι τα δείγματα με τη λεκιθίνη (18, 19 και 20) έχουν μεγάλες τιμές PDI σχεδόν καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, οπότε και δεν έχουν καλή διασπορά των σταγονιδίων τους. Επιπλέον, τα δείγματα με το Tween 20 και τη λεκιθίνη που αποθηκεύτηκαν στο περιβάλλον (4, 5, 14 και 15) στις 30 και 40 ημέρες αποθήκευσης έχουν μικρές τιμές ESI και RCoQ<sub>10</sub>%, οπότε και έχουν αρχίσει να διασπώνται. Αντίθετα, τα δείγματα με τη λεκιθίνη στις 10 ημέρες αποθήκευσης (12 και 17), και στις δύο θερμοκρασίες διατήρησης, έχουν μεγάλες τιμές ESI και RCoQ<sub>10</sub>%, πράγμα αναμενόμενο καθώς δεν έχουν προλάβει ακόμα να διασπαστούν και τα σταγονίδια συγκρατούν το βιοδραστικό συστατικό.

### 3.3 Διπλά Γαλακτώματα

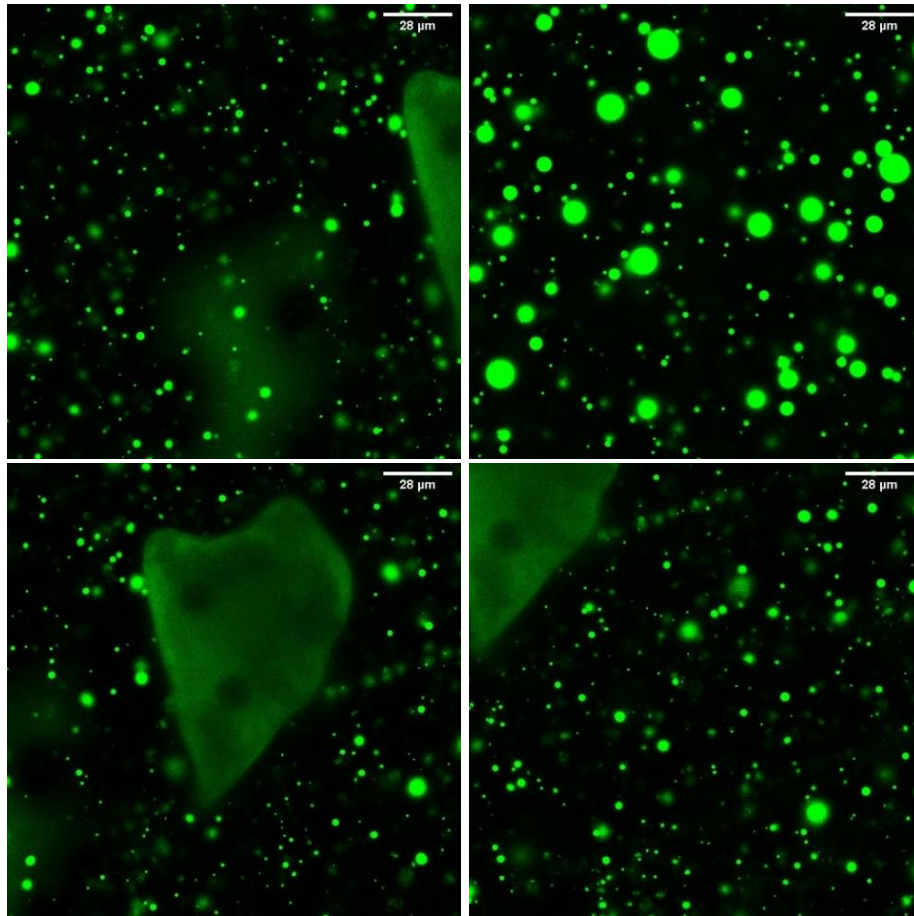
Μετά τη μελέτη των νανογαλακτωμάτων με τη χρήση φυσικών γαλακτωματοποιητών και μιγμάτων χημικών και φυσικών γαλακτωματοποιητών και τον εμπλουτισμό τους με ένα λιπόφιλο βιοδραστικό συστατικό, διερευνήθηκε το πεδίο των διπλών γαλακτωμάτων. Η βιβλιογραφική αναζήτηση έδειξε ότι τα διπλά γαλακτώματα o/w/o έχουν μελετηθεί λιγότερο από τα w/o/w γαλακτώματα, ενώ βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές στα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τα φάρμακα. Στα εν λόγω συστήματα μπορούν να ενσωματωθούν λιπόφιλα συστατικά στην εσωτερική φάση του ελαίου, όπως είναι και το συνένζυμο Q<sub>10</sub>. Επίσης, αυτά τα συστήματα συμβάλλουν στη διατήρηση του flavor των τροφίμων. Συνεπώς, φάνηκε ενδιαφέρουσα η μελέτη o/w/o νανογαλακτωμάτων.

Η επιλογή των περιεκτικότητων του ελαίου και των γαλακτωματοποιητών έγινε με βάση παλαιότερα και τρέχοντα πειράματα του εργαστηρίου, ενώ επιχειρήθηκε η μελέτη όσο το δυνατόν περισσότερων τύπων γαλακτωματοποιητών. Ωστόσο, τα διπλά γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν δεν είναι εμπλουτισμένα με κάποιο βιοδραστικό συστατικό. Παρακάτω, παρατίθενται εικόνες με τη μορφολογία και τη δομή των διπλών γαλακτωμάτων o<sub>1</sub>/w/o<sub>2</sub>, όπως προέκυψαν από το συνεστιακό ανάστροφο μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ.



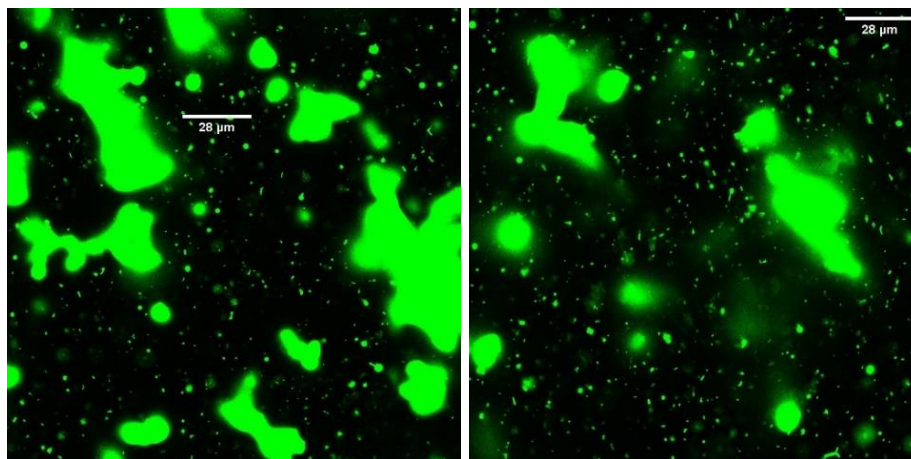
**Εικόνα 3.11:** Απεικόνιση CLSM των γαλακτωμάτων  $o_1/w/o_2$  που παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητή το Tween 20.

Η Εικόνα 3.11 δείχνει τη δομή των διπλών γαλακτωμάτων με γαλακτωματοποιητή το Tween 20. Συγκεκριμένα, φαίνεται μία τυπική δομή διπλών γαλακτωμάτων, με μικρά σταγονίδια ελαίου εντός των σταγονιδίων νερού. Επιπλέον, μερικά σταγονίδια νερού εμφανίζονται να έχουν παραπάνω από ένα σταγονίδια ελαίου, πράγμα που οφείλεται σε συνένωση (coalescence) δύο ή περισσότερων σταγονιδίων του  $o_1/w$  νανογαλακτώματος και σχηματισμό ενός μόνο μεγαλύτερου σταγονιδίου. Αντίστοιχα, στις περιπτώσεις που υπάρχουν μεγάλα σταγονίδια ελαίου στο εσωτερικό των σταγονιδίων νερού, υποδηλώνεται μία πιθανή συνένωση των σταγονιδίων ελαίου.



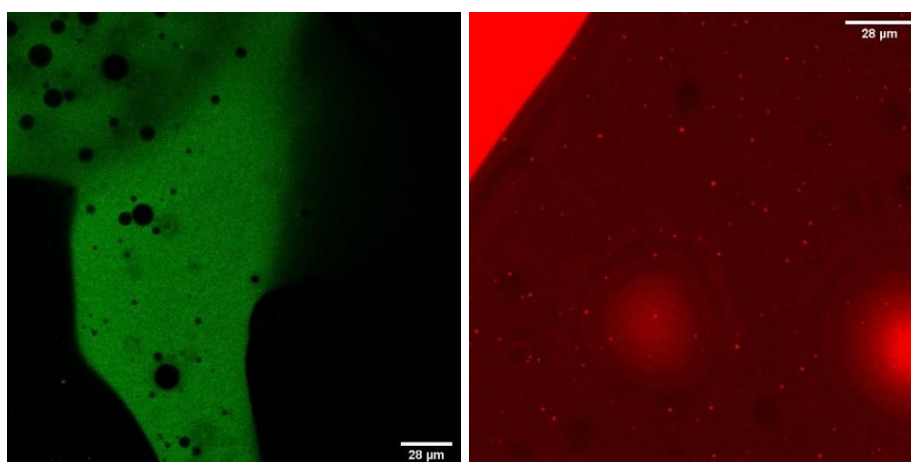
**Εικόνα 3.12:** Απεικόνιση CLSM των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη.

Η Εικόνα 3.12 δείχνει τη δομή των γαλακτωμάτων με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη. Από τις απεικονίσεις, δεν φαίνεται να έχει σχηματιστεί διπλό γαλάκτωμα, καθώς παρατηρούνται μικρά σταγονίδια νερού. Επιπλέον, στο δείγμα παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ιζήματος του γαλακτωματοποιητή, πράγμα που φαίνεται και στις απεικονίσεις.



**Εικόνα 3.13:** Απεικόνιση CLSM των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητή τη λεκιθίνη.

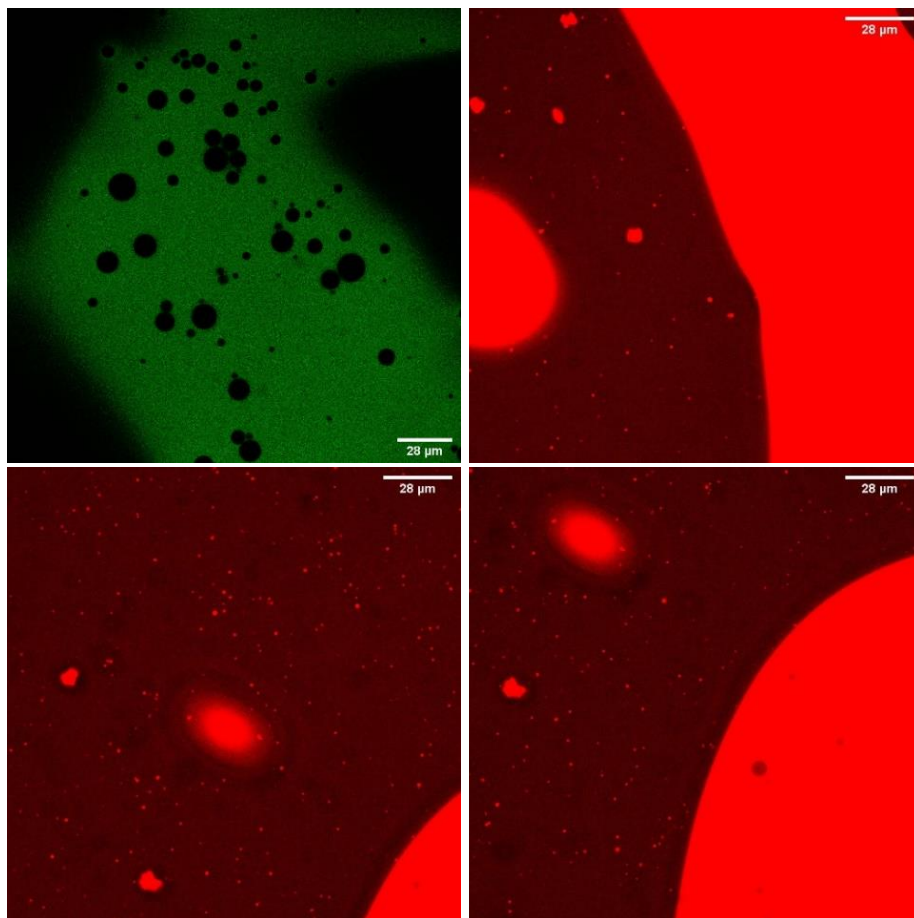
Η Εικόνα 3.13 δείχνει τη δομή των γαλακτωμάτων με γαλακτωματοποιητή τη λεκιθίνη. Σε όλες τις απεικονίσεις, δεν παρατηρείται ο σχηματισμός ενός διπλού γαλακτώματος, ενώ μερικά σταγονίδια νερού έχουν συνενωθεί προς το σχηματισμό μίας μεγαλύτερης μάζας νερού.



**Εικόνα 3.14:** Απεικόνιση CLSM των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης.

Η Εικόνα 3.14 δείχνει τη δομή των γαλακτωμάτων με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης. Από τις απεικονίσεις, δεν παρατηρούνται μόρια του γαλακτωματοποιητή όπως στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε μόνη της η καζεΐνη. Ωστόσο, δεν φαίνεται να έχουν σχηματιστεί σταγόνες ελαίου-σε-νερό και οι σταγόνες του νερού δεν είναι καλοσχηματισμένες. Αντιθέτως, στα δείγματα αυτά παρατηρήθηκαν και μεγάλες επιφάνειες νερού με ενσωματωμένα μόρια ελαίου χωρίς όμως να έχουν μία ομοιόμορφη σφαιρική δομή.





**Εικόνα 3.15:** Απεικόνιση CLSM των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης.

Η Εικόνα 3.15 δείχνει τη δομή των διπλών γαλακτωμάτων με γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης. Σε όλες τις απεικονίσεις, δεν παρατηρείται ο σχηματισμός ενός διπλού γαλακτώματος, ενώ μερικά σταγονίδια νερού έχουν υποστεί κροκίδωση (flocculation), αφού δύο ή και περισσότερα σταγονίδια είναι σε επαφή και σχηματίζουν ενιαία και μεγαλύτερα σταγονίδια, διατηρώντας την ακεραιότητά τους.

Τέλος, όσον αφορά τα δείγμα με γαλακτωματοποιητή το μίγμα καζεΐνης και λεκιθίνης, δεν κατάφερε να ληφθεί καμία απεικόνιση λόγω του σχηματισμού μεγάλου ιζήματος από τους γαλακτωματοποιητές, οδηγώντας στο διαχωρισμό των δύο φάσεων και τελικώς στη διάσπαση του γαλακτώματος.

## Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η δυνατότητα παρασκευής και διατήρησης νανογαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό, χρησιμοποιώντας ως λιπαρή φάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Ως γαλακτωματοποιητές, χρησιμοποιήθηκαν ένας χημικός, το Tween 20, δύο φυσικοί, η λεκιθίνη και η καζεΐνη, και μίγματα αυτών. Έτσι, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ιδιοτήτων των νανογαλακτωμάτων με βάση το είδος και την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή. Επιπλέον, έγινε αποθήκευση των δειγμάτων σε δύο θερμοκρασίες (περιβάλλον και ψύξη) και μελετήθηκε η διατηρησιμότητά τους για 8 εβδομάδες. Στη συνέχεια, μετά από επιλογή των καλύτερων συστημάτων, ενσωματώθηκε το συνένζυμο Q<sub>10</sub> στη λιπαρή τους φάση και πραγματοποιήθηκε εκ νέου μελέτη τους στις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης για διάστημα 40 ημερών.

Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι είναι εφικτή η παρασκευή νανογαλακτωμάτων ο/w με χρήση φυσικών και μιγμάτων φυσικών και χημικών γαλακτωματοποιητών. Μελετήθηκαν δύο περιεκτικότητες ελαίου, 5% και 10% κατά βάρος τελικού μίγματος, ενώ όσον αφορά τους γαλακτωματοποιητές δοκιμάστηκε η προσθήκη τους σε περιεκτικότητες 3% και 5% για EVOO 5% και 8% και 10% για EVOO 10%. Η παρασκευή του νανογαλακτώματος με περιεκτικότητα καζεΐνης 10% και EVOO 10% δεν ήταν εφικτή. Το ίδιο πρόβλημα παρατηρήθηκε και στο νανογαλάκτωμα με το μίγμα Tween 20 και καζεΐνης 10% και EVOO 10%. Πιο συγκεκριμένα, μετά την εφαρμογή των δύο σταδίων ομογενοποίησης (υψηλή ταχύτητα και υπέρηχοι), στην επιφάνεια των γαλακτωμάτων υπήρχαν μικρά σταγονίδια ελαίου (κηλίδες).

Οι ιδιότητες που μετρήθηκαν την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων (ιξώδες, θολότητα, δείκτης διάθλασης, μέση διάμετρος σταγονιδίων, δείκτης πολυδιασποράς, ζ-Δυναμικό) δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές, ανάλογα με το είδος και την περιεκτικότητα των γαλακτωματοποιητών. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές ιξώδους στα δείγματα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη, κάτι που ήταν αναμενόμενο. Γενικά, τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητές τη λεκιθίνη και το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης είχαν μικρές τιμές ιξώδους και μικρή μέση διάμετρο σταγονιδίων. Σε περιεκτικότητα ελαίου 5% κατά βάρος τελικού μίγματος, τόσο η καζεΐνη όσο και η λεκιθίνη σε μίγματα με το Tween 20 σχημάτισαν νανογαλακτώματα με χαμηλή θολότητα, μικρή μέση διάμετρο σταγονιδίων και μικρό δείκτη πολυδιασποράς, οπότε και υψηλή σταθερότητα. Σε περιεκτικότητα ελαίου 10% κατά βάρος τελικού μίγματος, το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης σχημάτισε νανογαλάκτωμα με ιδιαίτερα χαμηλή θολότητα, μικρή μέση διάμετρο σταγονιδίων και μικρό δείκτη πολυδιασποράς, οπότε και υψηλή σταθερότητα.

Μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στα δείγματα κατά την αποθήκευσή τους. Πρώτον, διαπιστώθηκε ότι η χρήση της καζεΐνης ως γαλακτωματοποιητή δεν συνέβαλε στη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων, καθώς αυτά διασπάστηκαν στις 4 ή 5 εβδομάδες αποθήκευσής τους, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αντίθετα, η χρήση της λεκιθίνης ως

γαλακτωματοποιητή έδωσε εξίσου καλά αποτελέσματα με το Tween 20 κατά τη διατήρηση των δειγμάτων. Πρέπει να τονιστεί ότι το μίγμα γαλακτωματοποιητών (Tween 20 και λεκιθίνης) και στις δύο περιεκτικότητες EVOO δεν παρουσίασε αύξηση της MDD και ο ESI ήταν 99% ακόμα και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης, οπότε και ήταν τα καλύτερα συστήματα. Δεύτερον, διαπιστώθηκε ότι οι μικρότερες περιεκτικότητες γαλακτωματοποιητών, 3% για EVOO 5% και 8% για EVOO 10%, βοήθησαν στη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων στο διάστημα των 8 εβδομάδων αποθήκευσής τους. Τούτο επιβεβαιώθηκε και από τις μέσες τιμές του ζ-Δυναμικού που ήταν  $-7,2\text{ mV}$  για τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 3% κ.β. και  $-1,1\text{ mV}$  για εκείνα με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 5% κ.β. Τρίτον, η θερμοκρασία αποθήκευσης έπαιξε σημαντικό ρόλο, ιδιαίτερα στα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή την καζεΐνη, τα οποία διασπάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και διατηρήθηκαν πολύ καλά υπό ψύξη. Τούτη η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και από τις τιμές του PDI, αφού τα νανογαλακτώματα που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είχαν μεγάλη αύξηση του PDI (τιμές μεγαλύτερες του 0,4) στη διάρκεια των 8 εβδομάδων, ενώ εκείνα που αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη διατήρησαν σταθερό τον PDI (τιμές μικρότερες του 0,4). Ακόμα και στις τιμές του ζ-Δυναμικού έπαιξε ρόλο η θερμοκρασία αποθήκευσης, αφού τα νανογαλακτώματα που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία ψύξης είχαν μεγαλύτερη απόλυτη τιμή, άρα και μεγαλύτερη σταθερότητα. Τέταρτον, οι πρώτες 4 εβδομάδες αποθήκευσης εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τις υπόλοιπες 4 στις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων. Παραδείγματος χάριν, τα νανογαλακτώματα με EVOO 10% είχαν μέσες τιμές MDD  $275\text{ nm}$  την ημέρα παρασκευής και  $355\text{ nm}$  την 8<sup>η</sup> εβδομάδα και PDI 0,35 την ημέρα παρασκευής και 0,43 την 8<sup>η</sup> εβδομάδα. Τέλος, τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητές την καζεΐνη και τη λεκιθίνη εμφάνισαν και μικροβιακή αλλοίωση στη σχηματιζόμενη κρέμα (creaming), οπότε και προτείνεται η προσθήκη κάποιου συντηρητικού στο τελικό προϊόν.

Μετά τη μελέτη των αποτελεσμάτων των μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων, επιλέχθηκαν τα καλύτερα – ως προς το είδος και την περιεκτικότητα των γαλακτωματοποιητών – συστήματα για ενσωμάτωση του βιοδραστικού συστατικού. Έγινε, λοιπόν, επιλογή 6 συστημάτων, με γαλακτωματοποιητές το Tween 20, τη λεκιθίνη και τα 2 μίγματα χημικού και φυσικών γαλακτωματοποιητών. Ως βιοδραστικό επιλέχθηκε το CoQ<sub>10</sub>, ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και της σωματικής απόδοσης μέσω της παραγωγής ATP. Η χαμηλή υδατοδιαλυτότητά του περιορίζει τη βιοδιαθεσιμότητά του, οπότε κρίθηκε απαραίτητη η ενσωμάτωσή του σε ένα νανογαλάκτωμα o/w. Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα κατά τη διατήρησή τους έδειξε ότι το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης είχε τα καλύτερα αποτελέσματα, με χαμηλό ESI και MDD. Ωστόσο, η διατηρησιμότητα του CoQ<sub>10</sub> ήταν εξίσου καλή σε όλα τα συστήματα. Το ποσοστό διατήρησης του CoQ<sub>10</sub> (RCoQ<sub>10</sub>%) ήταν 97% στις 10 ημέρες αποθήκευσης και 79% στις 40 ημέρες, για τα δείγματα με περιεκτικότητα EVOO 5%. Αντίστοιχα καλά ποσοστά διατήρησης είχαν και τα νανογαλακτώματα με περιεκτικότητα ελαίου 10%.



Ακόμη, μελετήθηκε η δυνατότητα παρασκευής διπλών γαλακτωμάτων ο<sub>1</sub>/w/ο<sub>2</sub> με τη χρήση φυσικών και μιγμάτων φυσικών και χημικών γαλακτωματοποιητών. Το νανογαλάκτωμα που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερική φάση ήταν ένα ο<sub>1</sub>/w νανογαλάκτωμα με περιεκτικότητα EVOO 5% κ.β. και γαλακτωματοποιητή το μίγμα Tween 20 και λεκιθίνης σε περιεκτικότητα 5% κ.β. Από όλους τους γαλακτωματοποιητές που δοκιμάστηκαν, μόνο το Tween 20 συνέβαλε στο σχηματισμό διπλού γαλακτώματος, απουσία ιζήματος γαλακτωματοποιητή και με καλοσχηματισμένα σταγονίδια. Περαιτέρω διερεύνηση, ωστόσο, πρέπει να γίνει και στα μίγματα χημικών και φυσικών γαλακτωματοποιητών.

Καταλήγοντας, ωφέλιμο θα ήταν να πραγματοποιηθούν περισσότερες έρευνες στη χρήση φυσικών και μιγμάτων χημικών και φυσικών γαλακτωματοποιητών. Άλλα είδη, άλλες περιεκτικότητες και άλλες αναλογίες μιγμάτων θα ήταν ένα πρώτο στάδιο μελέτης. Επιπλέον, καθώς η λεκιθίνη αποτελείται από μίγματα διαφορετικών φωσφολιπιδίων, με τα πλέον κοινά να είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) και η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), πρέπει να διερευνηθεί η γαλακτωματοποιητική δράση και άλλων ειδών λεκιθίνης. Η λεκιθίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλους φυσικούς γαλακτωματοποιητές για το σχηματισμό γαλακτωμάτων, για παράδειγμα πρωτεΐνες. Οι σαπωνίνες, όντας υδατοδιαλυτά μικρά αμφίφιλα μόρια, έχουν υδρόφιλες ομάδες σακχάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι σαπωνίνες τύπου quillaja είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στο σχηματισμό σταθερών γαλακτωμάτων με μικρά σταγονίδια σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η μελέτη παρασκευής γαλακτωμάτων με γαλακτωματοποιητή κάποια σαπωνίνη (Ozturk & McClements, 2016).

Η μελέτη και η χρήση των φυσικών γαλακτωματοποιητών πρέπει να γίνει και στα άλλα είδη γαλακτωμάτων, όπως είναι τα w/o γαλακτώματα. Επιπλέον, θα πρέπει να δοκιμαστεί η χρήση άλλων γνωστών βιοδραστικών συστατικών στον εμπλουτισμό, καθώς και περισσότερων θερμοκρασιών αποθήκευσης. Ένα επόμενο στάδιο στην παρούσα διπλωματική εργασία, είναι η ενσωμάτωση των νανογαλακτωμάτων σε κάποιο τρόφιμο και η μελέτη της διατήρησης της βιταμίνης στο τελικό προϊόν. Κρίνεται σημαντική και η μελέτη του τρόπου εμπλουτισμού του τροφίμου με το μελετώμενο νανογαλάκτωμα.

Όπως και σε άλλα πολλαπλά γαλακτώματα, η σταθερότητα των διπλών γαλακτωμάτων ο/w/o μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση μίγματος λιπόφιλων γαλακτωματοποιητών ή διαφορετικών ελαίων. Βιβλιογραφικά (Jafari et al., 2017), αναφέρεται ότι η χρήση ελαίου στην εξωτερική φάση που περιέχει στεατίνη (ή στεαρίνη ή στεατικό οξύ) συμβάλλει στη σταθερότητα του διπλού γαλακτώματος, καθώς η γαλακτωματοποίησή του απαιτεί ένα στάδιο. Εκτός από τις εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, έχουν χρησιμοποιηθεί γαλακτώματα ο/w/o για την παρασκευή μικροσφαιριδίων με υδρόφοβα φάρμακα και την ενθυλάκωση και ελεγχόμενη απελευθέρωση ρετινόλης σε καλλυντικά.



## Βιβλιογραφία

- Balakrishnan, P., Lee, B. J., Oh, D. H., Kim, J. O., Lee, Y. I., Kim, D. D., ... Choi, H. G. (2009). Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q 10 by self-emulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 374(1–2), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.03.008>
- Belhaj, N., Dupuis, F., Arab-Tehrany, E., Denis, F. M., Paris, C., Lartaud, I., & Linder, M. (2012). Formulation, characterization and pharmacokinetic studies of coenzyme Q10 PUFA's nanoemulsions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(2), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.06.008>
- Boskou, D. (2006). Culinary Applications. *Olive Oil: Chemistry and Technology: Second Edition*, 243–248. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50016-X>
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive Oil Composition. In *Olive Oil: Chemistry and Technology: Second Edition* (Second Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50008-0>
- Cheuk, S. Y., Shih, F. F., Champagne, E. T., Daigle, K. W., Patindol, J. A., Mattison, C. P., & Boue, S. M. (2015). Nano-encapsulation of coenzyme Q10 using octenyl succinic anhydride modified starch. *Food Chemistry*, 174, 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.031>
- Cho, H. T., Salvia-Trujillo, L., Kim, J., Park, Y., Xiao, H., & McClements, D. J. (2014). Droplet size and composition of nutraceutical nanoemulsions influences bioavailability of long chain fatty acids and Coenzyme Q10. *Food Chemistry*, 156, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.084>
- Dickinson, E., Ritzoulis, C., & Povey, M. J. W. (1999). Stability of emulsions containing both sodium caseinate and Tween 20. *Journal of Colloid and Interface Science*, 212(2), 466–473. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.6078>
- Dormandy, T. L. (1980). Free-radical reaction in biological systems. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, Vol. 62, pp. 188–194.
- Fryd, M. M., & Mason, T. G. (2012). Advanced Nanoemulsions. *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol. 63, pp. 493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032210-103436>
- Georgalaki, M. D., Sotiroidis, T. G., & Xenakis, A. (1998). *The Presence of Oxidizing Enzyme Activities.pdf*. 155–159.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.08.010>

- Hanson, J. A., Chang, C. B., Graves, S. M., Li, Z., Mason, T. G., & Deming, T. J. (2008). Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides. *Nature*, 455(7209), 85–88. <https://doi.org/10.1038/nature07197>
- Heusch, R., Ag, B., & Republic, F. (2005). Emulsions. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Hidalgo, F. J., Alaiz, M., & Zamora, R. (2001). Determination of peptides and proteins in fats and oils. *Analytical Chemistry*, 73(3), 698–702. <https://doi.org/10.1021/ac000876o>
- Horne, D. S. (2003). Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. {Colloids} and {Surfaces} {A}: Physicochemical and {Engineering} {Aspects}, 213(2), 255-263. *Dairy Journal*, 8(3), 171–177.
- Jafari, S. M., Paximada, P., Mandala, I., Assadpour, E., & Mehrnia, M. A. (2017). 2 - Encapsulation by nanoemulsions. In *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5/00002-1>
- Katsouli, M., Giannou, V., & Tzia, C. (2018). A Comparative Study of O/W Nanoemulsions Using Extra Virgin Olive or Olive-Pomace Oil: Impacts on Formation and Stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(10), 1341–1353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aocs.12091>
- Katsouli, M., & Tzia, C. (2019). Development and Stability Assessment of Coenzyme Q10-Loaded Oil-in-Water Nanoemulsions Using as Carrier Oil: Extra Virgin Olive and Olive-Pomace Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 12(1), 54–76. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2193-3>
- Korkmaz, E., Gokce, E. H., & Ozer, O. (2013). Development and evaluation of coenzyme Q10 loaded solid lipid nanoparticle hydrogel for enhanced dermal delivery. *Acta Pharmaceutica*, 63(4), 517–529. <https://doi.org/10.2478/acph-2013-0039>
- Kumar, D. D., Mann, B., Pothuraju, R., Sharma, R., Bajaj, R., & Minaxi. (2016). Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. *Food and Function*, 7(1), 417–424. <https://doi.org/10.1039/c5fo00924c>
- Levine, I. N. (2002). *Physical Chemistry* (5th ed.). [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00245-8)
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics Condensed Matter*, 18(41). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>
- McClements, D. J. (2005). Principles, Practicies, and Techniques. In *Food Emulsions* (Vol. 2).
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297–2316. <https://doi.org/10.1039/c0sm00549e>

- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions : Impact of Molecular Environment on Chemical. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, Biological fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
- Onoue, S., Uchida, A., Nakamura, T., Kuriyama, K., Hatanaka, J., Tanaka, T., Miyoshi H., Seto Y., Yamada, S. (2015). Self-nanoemulsifying particles of coenzyme Q10 with improved nutraceutical potential. *PharmaNutrition*, 3(4), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.05.001>
- Ostertag, F., Weiss, J., & McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 388(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089>
- Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008>
- Perugini, L., Cinelli, G., Cofelice, M., Ceglie, A., Lopez, F., & Cuomo, F. (2018). Effect of the coexistence of sodium caseinate and Tween 20 as stabilizers of food emulsions at acidic pH. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 168, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.003>
- Polychniatou, V., & Tzia, C. (2016). Study of the Emulsifying Ability of Olive Oil Endogenous Compounds in Co-surfactant Free Olive Oil w/o Nanoemulsions with Food Grade Non-ionic Surfactants. *Food and Bioprocess Technology*, 9(5), 882–891. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1668-8>
- Polychniatou, V., & Tzia, C. (2018). Evaluation of surface-active and antioxidant effect of olive oil endogenous compounds on the stabilization of water-in-olive-oil nanoemulsions. *Food Chemistry*, 240, 1146–1153. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.044>
- PubChem Database. (2019). Polysorbate 20. Retrieved from National Center for Biotechnology Information website: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polysorbate-20>

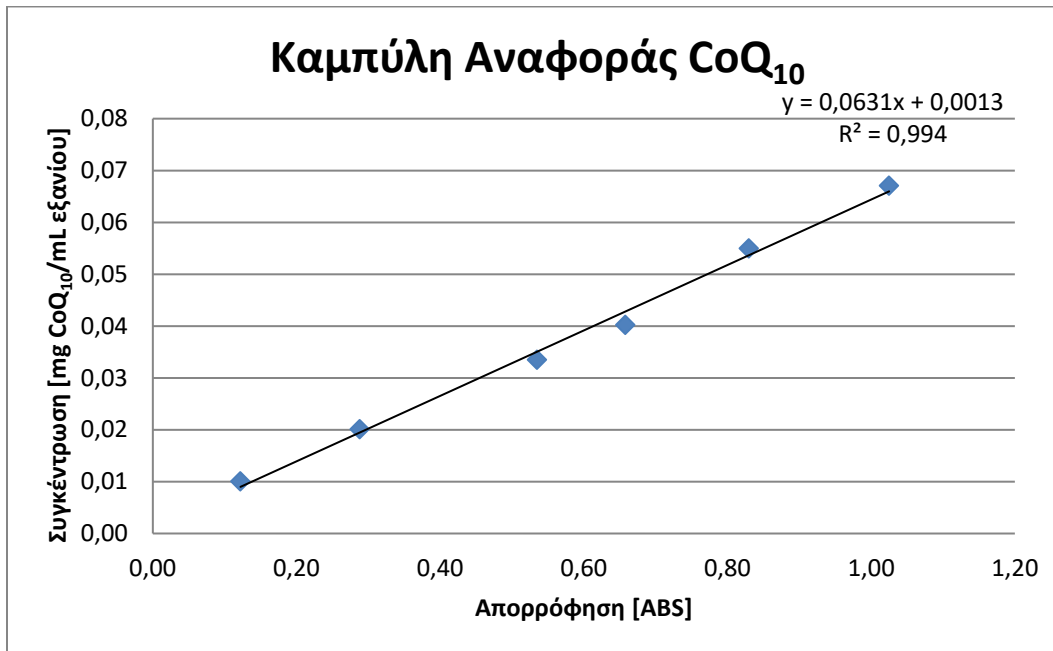
- Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1413–1423. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.004>
- Rashidi, L., & Khosravi-Darani, K. (2011). The applications of nanotechnology in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 723–730. <https://doi.org/10.1080/10408391003785417>
- Robins, M. M., Watson, A. D., & Wilde, P. J. (2002). Emulsions - Creaming and rheology. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(5–6), 419–425. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00089-4)
- Rydhag, L., & Wilton, I. (1981). The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(8), 830–837. <https://doi.org/10.1007/BF02665591>
- Saini, R. (2011). Coenzyme Q10: The essential nutrient. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3), 466–467. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.84471>
- Salway, J. G. (2006). *Ιατρική Βιοχημεία με μια Ματιά* (2η Έκδοση). Blackwell Publishing.
- Schuster, S., Bernewitz, R., Guthausen, G., Zapp, J., Greiner, A. M., Köhler, K., & Schuchmann, H. P. (2012). Analysis of W1/O/W2 double emulsions with CLSM: Statistical image processing for droplet size distribution. *Chemical Engineering Science*, 81, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.06.059>
- Shin, J. Y., Shin, J. Il, Kim, J. S., Yang, Y. S., Hwang, Y., Yang, J. S., Shin, D., Seo, J. H., Jin, Y. S., Park, Y. S., Hwang, J. S., Kweon, D. H. (2009). Assembly of Coenzyme Q10 nanostructure resembling nascent discoidal high density lipoprotein particle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(2), 217–221. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.140>
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 34–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>
- Silva, W., Torres-Gatica, M. F., Oyarzun-Ampuero, F., Silva-Weiss, A., Robert, P., Cofrades, S., & Gimenez, B. (2018). Double emulsions as potential fat replacers with gallic acid and quercetin nanoemulsions in the aqueous phases. *Food Chemistry*, 253, 71–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.128>
- Stark, A. H., & Madar, Z. (2013). Olive oil as a functional food: Nutritional and health benefits. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*, 60(6), 677–714. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_18)
- Su, D., & Zhong, Q. (2016). Lemon oil nanoemulsions fabricated with sodium caseinate and Tween 20 using phase inversion temperature method. *Journal of Food Engineering*, 171, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.040>

- Surh, J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.07.004>
- Tang, S. Y., Manickam, S., Wei, T. K., & Nashiru, B. (2012). Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 330–345. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.07.001>
- Tanno, H. (2005). Lecithin. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Taylor, P. (1998). Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 75(2), 107–163. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00035-9)
- Tenbohlen, S., & Koch, M. (2010). Aging performance and moisture solubility of vegetable oils for power transformers. *IEEE Transactions on Power Delivery*, 25(2), 825–830. <https://doi.org/10.1109/TPWRD.2009.2034747>
- Thanatukorn, P., Kawai, K., Hayakawa, M., Hayashi, M., & Kajiwara, K. (2009). Improvement of the oral bioavailability of coenzyme Q10 by emulsification with fats and emulsifiers used in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.03.006>
- Tsimidou, M., Blekas, G., & Boskou, D. (2003). Olive Oil. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, (1999), 4252–4260. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01347-X>
- Walker, R. (2015). *Fish Oil Nano emulsions: Optimization of Physical and Chemical Stability for Food System Applications*. 19.
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science and Technology*, 22(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.003>
- Xue, J., & Zhong, Q. (2014). Thyme oil nanoemulsions coemulsified by sodium caseinate and lecithin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9900–9907. <https://doi.org/10.1021/jf5034366>
- Zhang, Y., He, S., Li, Y., & Tang, H. (2017). The physical stability and digestibility of  $\beta$ -carotene in oil-in-water sodium caseinate nanoemulsion. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 864–871. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9457-2>
- Κατσούλη, Μ. (2015). *Νανογαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο και ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών*. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Πολυμένης, Σ., & Λαμπρακόπουλος, Σ. (Eds.). (2015). Φυσικοχημεία ΙΙ. In *Κολλοειδή Συστήματα* (pp. 43–50). Αθήνα: Τομέας Επιστήμης & Τεχνικής των Υλικών, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Τζιά, Κ., Ταούκης, Π., & Ωραιοπούλου, Β. (2009). *ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ-ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΡΕΟΛΟΓΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.





## Παράρτημα



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς συνενζύμου Q<sub>10</sub>.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Univariate Tests of Significance for Viscosity (Blank1.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	396.2563	1	396.2563	668.4485	0.001493
Emulsifier	304.5061	2	152.2531	256.8372	0.003878
% w/w	0.4704	1	0.4704	0.7935	0.467029
Error	1.1856	2	0.5928		

Πίνακας 2: Αποτελέσματα Duncan's test για το ιξώδες ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Duncan test; variable Viscosity (Blank1.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Test Error: Between MS = .59280, df = 2.0000				
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}
		2.9400	18.200	3.2400
1	1		0.002437	0.734593
2	2	0.002437		0.002924
3	3	0.734593	0.002924	

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10%.

Univariate Tests of Significance for Viscosity (Blank EVOO 10%.st Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	468.2896	1	468.2896	32520.11	0.003530
Emulsifier	262.9608	2	131.4804	9130.58	0.007400
% w/w	0.5184	1	0.5184	36.00	0.105137
Error	0.0144	1	0.0144		

Πίνακας 4: Αποτελέσματα Duncan's test για το ιξώδες ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10%.

Duncan test; variable Viscosity (Blank EVOO 10%.sta Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .01440, df = 1.0000				
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}
		4.2600	23.700	4.1400
1	1		0.004946	0.545859
2	2	0.004946		0.003525
3	3	0.545859	0.003525	

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ANOVA για τη θολότητα των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Univariate Tests of Significance for Turbidity (Spreadshee Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	30,28507	1	30,28507	533,6560	0,001869
Emulsifier	2,35208	2	1,17604	20,7231	0,046034
% w/w	0,50925	1	0,50925	8,9736	0,095708
Error	0,11350	2	0,05675		

Πίνακας 6: Αποτελέσματα Duncan's test για το θολότητα ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Duncan test; variable Turbidity (Spreadsheet Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,05675, df = 2,0000				
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}
		3,1265	1,8930	1,7205
1	1		0,035575	0,025305
2	2	0,035575		0,544492
3	3	0,025305	0,544492	

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ANOVA για τη θολότητα των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10%.

Univariate Tests of Significance for Turbidity (Spreadsheet) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	123,9808	1	123,9808	48,00900	0,091249
Emulsifier	2,8219	2	1,4110	0,54637	0,691263
% w/w	4,6570	1	4,6570	1,80331	0,407489
Error	2,5824	1	2,5824		

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη διάθλασης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Univariate Tests of Significance for R.I. (Blank1.stat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	10.86115	1	10.86115	1660726	0.000001
Emulsifier	0.00000	2	0.00000	0	0.868911
% w/w	0.00003	1	0.00003	4	0.181956
Error	0.00001	2	0.00001		

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη διάθλασης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10%.

Univariate Tests of Significance for R.I. (Blank EVOO 10%.stat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7.425807	1	7.425807	3788677	0.000327
Emulsifier	0.000085	2	0.000043	22	0.149866
% w/w	0.000006	1	0.000006	3	0.324987
Error	0.000002	1	0.000002		

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο σταγονιδίων (MDD) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Univariate Tests of Significance for MDD (Blank1.stat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	571774.1	1	571774.1	174.0709	0.005696
Emulsifier	26709.6	2	13354.8	4.0657	0.197404
% w/w	1987.4	1	1987.4	0.6051	0.518064
Error	6569.4	2	3284.7		

**Πίνακας 11:** Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο σταγονιδίων (MDD) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10%.

Univariate Tests of Significance for MDD (Blank EVOO 10%.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	457314,1	1	457314,1	268,7612	0,038785
Emulsifier	60238,6	2	30119,3	17,7010	0,165744
% w/w	1314,1	1	1314,1	0,7723	0,541015
Error	1701,6	1	1701,6		

**Πίνακας 12:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Univariate Tests of Significance for PDI (Blank1.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0.618246	1	0.618246	815.6280	0.001224
Emulsifier	0.015100	2	0.007550	9.9604	0.091237
% w/w	0.003456	1	0.003456	4.5594	0.166278
Error	0.001516	2	0.000758		

**Πίνακας 13:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10%.

Univariate Tests of Significance for PDI (Blank EVOO 10%.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0.565504	1	0.565504	2209.000	0.013543
Emulsifier	0.002811	2	0.001405	5.489	0.288934
% w/w	0.001024	1	0.001024	4.000	0.295167
Error	0.000256	1	0.000256		

**Πίνακας 14:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5%.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Blank1.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	26.55711	1	26.55711	0.853267	0.453146
Emulsifier	50.57464	2	25.28732	0.812469	0.551734
% w/w	26.28013	1	26.28013	0.844367	0.455155
Error	62.24810	2	31.12405		

**Πίνακας 15:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10%.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Blank EVOO 10%.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0.001503	1	0.001503	0.001084	0.979048
Emulsifier	0.702870	2	0.351435	0.253468	0.814615
% w/w	0.805506	1	0.805506	0.580961	0.585390
Error	1.386506	1	1.386506		

**Πίνακας 16:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη σταθερότητας (ESI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for ESI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	472105.0	1	472105.0	107802.1	0.000000
Emulsifier	18.6	2	9.3	2.1	0.133552
% w/w	1.5	1	1.5	0.3	0.567383
Temperature	0.0	1	0.0	0.0	0.957948
Week	36.9	3	12.3	2.8	0.051715
Error	175.2	40	4.4		

**Πίνακας 17:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη σταθερότητας (ESI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτοματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for ESI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	698577.1	1	698577.1	284241.0	0.000000
Emulsifier	49.7	1	49.7	20.2	0.000032
% w/w	21.7	1	21.7	8.8	0.004241
Temperature	15.7	1	15.7	6.4	0.014183
Week	97.5	8	12.2	5.0	0.000098
Error	147.5	60	2.5		

**Πίνακας 18:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά την διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 2.4577, df = 60.000			
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}
		97.670	99.332
1	1		0.000138
2	3	0.000138	

**Πίνακας 19:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 2.4577, df = 60.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
		99.050	97.952
1	1		0.004373
2	2	0.004373	

**Πίνακας 20:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 2.4577, df = 60.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
		98.034	98.968
1	1		0.014290
2	2	0.014290	

**Πίνακας 21:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς την εβδομάδα αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.4577, df = 60.000										
Cell No.	Week	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		100.00	100.00	99.023	99.023	98.896	98.271	97.516	97.516	96.000
1	1		1.000000	0.245471	0.217350	0.206010	0.051879	0.006221	0.005622	0.000000
2	2	1.000000		0.263141	0.245471	0.217479	0.056093	0.006768	0.006221	0.000000
3	3	0.245471	0.263141		1.000000	0.872666	0.372193	0.090891	0.083334	0.000000
4	4	0.217350	0.245471	1.000000		0.881161	0.390375	0.096814	0.090891	0.000000
5	5	0.206010	0.217479	0.872666	0.881161		0.428539	0.112932	0.100797	0.000000
6	6	0.051879	0.056093	0.372193	0.390375	0.428539		0.369366	0.339002	0.020000
7	7	0.006221	0.006768	0.090891	0.096814	0.112932	0.369366		1.000000	0.110000
8	8	0.005622	0.006221	0.083334	0.090891	0.100797	0.339002	1.000000		0.130000

**Πίνακας 22:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη σταθερότητας (ESI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for ESI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	311194.8	1	311194.8	53009.85	0.000000
Emulsifier	38.4	2	19.2	3.27	0.051132
% w/w	30.0	1	30.0	5.12	0.030640
Temperature	3.0	1	3.0	0.52	0.478067
Week	47.0	3	15.7	2.67	0.064140
Error	187.9	32	5.9		

**Πίνακας 23:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.st) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5.8705, df = 32.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
1	1	99.583	98.062
2	2	0.060768	

**Πίνακας 24:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη σταθερότητας (ESI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for ESI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	680426.3	1	680426.3	185662.8	0.000000
Emulsifier	246.6	1	246.6	67.3	0.000000
% w/w	41.9	1	41.9	11.4	0.001279
Temperature	9.1	1	9.1	2.5	0.120828
Week	231.7	8	29.0	7.9	0.000000
Error	219.9	60	3.7		

**Πίνακας 25:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά την διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3.6649, df = 60.000			
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}
1	1	95.362	99.064
2	3	0.000109	0.000109

**Πίνακας 26:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3.6649, df = 60.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
1	1	97.976	96.450
2	2	0.001396	0.001396



**Πίνακας 27:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς την εβδομάδα αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable ESI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3.6649, df = 60.000										
Cell No.	Week	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		100.00	100.00	98.063	98.063	96.819	95.493	95.493	95.493	95.493
1	1		1.000000	0.059406	0.047497	0.002728	0.000067	0.000069	0.000070	0.000065
2	2	1.000000		0.068116	0.059406	0.003222	0.000069	0.000070	0.000075	0.000067
3	3	0.059406	0.068116		1.000000	0.198944	0.015317	0.017556	0.019470	0.012672
4	4	0.047497	0.059406	1.000000		0.226233	0.017556	0.019470	0.021127	0.015317
5	5	0.002728	0.003222	0.198944	0.226233		0.197006	0.213585	0.225178	0.171286
6	6	0.000067	0.000069	0.015317	0.017556	0.197006		1.000000	1.000000	1.000000
7	7	0.000069	0.000070	0.017556	0.019470	0.213585	1.000000		1.000000	1.000000
8	8	0.000070	0.000075	0.019470	0.021127	0.225178	1.000000	1.000000		1.000000
9	9	0.000065	0.000067	0.012672	0.015317	0.171286	1.000000	1.000000	1.000000	

**Πίνακας 28:** Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο σταγονιδίων (MDD) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for MDD (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4897807	1	4897807	2791.830	0.000000
Emulsifier	227961	2	113980	64.971	0.000000
% w/w	22421	1	22421	12.780	0.000933
Temperature	2431	1	2431	1.386	0.246083
Week	6881	3	2294	1.307	0.285358
Error	70173	40	1754		

**Πίνακας 29:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.st Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1754.3, df = 40.000				
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}
		349.83	384.43	224.04
1	1		0.024652	0.000116
2	2	0.024652		0.000061
3	3	0.000116	0.000061	

**Πίνακας 30:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των ναογαλακτωμάτων με EVOO 5% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.st Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1754.3, df = 40.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
		297.82	341.05
1	1		0.001059
2	2	0.001059	

**Πίνακας 31:** Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (MDD) των ναογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for MDD (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5714482	1	5714482	3914.739	0.000000
Emulsifier	260179	1	260179	178.237	0.000000
% w/w	70635	1	70635	48.389	0.000000
Temperature	1680	1	1680	1.151	0.287717
Week	13999	8	1750	1.199	0.315203
Error	87584	60	1460		

**Πίνακας 32:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των ναογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1459.7, df = 60.000			
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}
		341.84	221.61
1	1		0.000109
2	3	0.000109	

**Πίνακας 33:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή των ναογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1459.7, df = 60.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
		250.40	313.04
1	1		0.000109
2	2	0.000109	

**Πίνακας 34:** Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο σταγονιδίων (MDD) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3791248	1	3791248	3342.305	0.000000
Emulsifier	364327	2	182163	160.592	0.000000
% w/w	1081	1	1081	0.953	0.336254
Temperature	5530	1	5530	4.875	0.034539
Week	4889	3	1630	1.437	0.250334
Error	36298	32	1134		

**Πίνακας 35:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς το είδος του γαλακτοματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.st Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1134.3, df = 32.000				
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}
		383.46	436.36	206.98
1	1		0.000658	0.000134
2	2	0.000658		0.000062
3	3	0.000134	0.000062	

**Πίνακας 36:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.st Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1134.3, df = 32.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
		335.20	311.69
1	1		0.034655
2	2	0.034655	

**Πίνακας 37:** Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (MDD) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7624513	1	7624513	9209.553	0.000000
Emulsifier	567219	1	567219	685.137	0.000000
% w/w	10561	1	10561	12.756	0.000707
Temperature	9670	1	9670	11.680	0.001140
Week	62357	8	7795	9.415	0.000000
Error	49674	60	828		

**Πίνακας 38:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 827.89, df = 60.000			
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}
1	1	414.17	236.66
2	3	0.000109	

**Πίνακας 39:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 827.89, df = 60.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
1	1	313.31	337.53
2	2	0.000830	

**Πίνακας 40:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 827.89, df = 60.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
1	1	337.01	313.83
2	2	0.001258	

**Πίνακας 41:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς την εβδομάδα αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable MDD (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 827.89, df = 60.000										
Cell No.	Week	{1} 275.23	{2} 293.78	{3} 301.90	{4} 309.98	{5} 328.45	{6} 354.02	{7} 353.59	{8} 356.97	{9} 354.84
1	1		0.202299	0.084117	0.029206	0.001067	0.000024	0.000029	0.000019	0.000021
2	2	0.202299		0.574456	0.294335	0.029559	0.000274	0.000266	0.000178	0.000257
3	3	0.084117	0.574456		0.576807	0.085577	0.001343	0.001238	0.000927	0.001298
4	4	0.029206	0.294335	0.576807		0.204109	0.005690	0.005016	0.004298	0.005707
5	5	0.001067	0.029559	0.085577	0.204109		0.097695	0.085833	0.081060	0.098677
6	6	0.000024	0.000274	0.001343	0.005690	0.097695		0.975947	0.848889	0.955253
7	7	0.000029	0.000266	0.001238	0.005016	0.085833	0.975947		0.833884	0.936167
8	8	0.000019	0.000178	0.000927	0.004298	0.081060	0.848889	0.833884		0.882474
9	9	0.000021	0.000257	0.001298	0.005707	0.098677	0.955253	0.936167	0.882474	

**Πίνακας 42:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5.640637	1	5.640637	2100.041	0.000000
Emulsifier	0.044699	2	0.022349	8.321	0.000952
% w/w	0.039646	1	0.039646	14.761	0.000427
Temperature	0.018526	1	0.018526	6.897	0.012174
Week	0.008147	3	0.002716	1.011	0.397908
Error	0.107439	40	0.002686		

**Πίνακας 43:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.st) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00269, df = 40.000				
Cell No.	Emulsifier	{1} .37888	{2} .30425	{3} .34528
1	1		0.000361	0.074307
2	2	0.000361		0.030873
3	3	0.074307	0.030873	

**Πίνακας 44:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτοματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.st Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00269, df = 40.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
1	1	.31406	.37154
2	2	0.000529	0.000529

**Πίνακας 45:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.st Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00269, df = 40.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
1	1	.36245	.32316
2	2	0.012290	0.012290

**Πίνακας 46:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτοματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	9.593295	1	9.593295	4311.350	0.000000
Emulsifier	0.048594	1	0.048594	21.839	0.000017
% w/w	0.002151	1	0.002151	0.967	0.329502
Temperature	0.033670	1	0.033670	15.132	0.000254
Week	0.045985	8	0.005748	2.583	0.017072
Error	0.133508	60	0.002225		

**Πίνακας 47:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς το είδος του γαλακτοματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτοματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά την διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00223, df = 60.000			
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}
1	1	.39100	.33904
2	3	0.000124	0.000124

**Πίνακας 48:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00223, df = 60.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
1	1	.38665	.34340
2	2	0.000359	0.000359

**Πίνακας 49:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς την εβδομάδα αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00223, df = 60.000										
Cell No.	Week	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		.35600	.36644	.37038	.35550	.32313	.34419	.36606	.38362	.41988
1	1		0.680520	0.585443	0.983261	0.210647	0.641190	0.671300	0.305677	0.018380
2	2	0.680520		0.868073	0.678317	0.113006	0.409937	0.987471	0.497562	0.040920
3	3	0.585443	0.868073		0.582307	0.087711	0.340545	0.865154	0.576472	0.050648
4	4	0.983261	0.678317	0.582307		0.201027	0.633351	0.676908	0.305802	0.018989
5	5	0.210647	0.113006	0.087711	0.201027		0.375543	0.109695	0.029549	0.000479
6	6	0.641190	0.409937	0.340545	0.633351	0.375543		0.405917	0.155345	0.006089
7	7	0.671300	0.987471	0.865154	0.676908	0.109695	0.405917		0.504937	0.044160
8	8	0.305677	0.497562	0.576472	0.305802	0.029549	0.155345	0.504937		0.129669
9	9	0.018380	0.040920	0.050648	0.018989	0.000479	0.006089	0.044160	0.129669	

**Πίνακας 50:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for PDI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4.804225	1	4.804225	2076.246	0.000000
Emulsifier	0.101345	2	0.050672	21.899	0.000001
% w/w	0.002610	1	0.002610	1.128	0.296157
Temperature	0.005452	1	0.005452	2.356	0.134608
Week	0.003731	3	0.001244	0.537	0.660018
Error	0.074045	32	0.002314		

**Πίνακας 51:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.st Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00231, df = 32.000				
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}
		.33244	.48700	.35200
1	1		0.000062	0.326765
2	2	0.000062		0.000134
3	3	0.326765	0.000134	

**Πίνακας 52:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for PDI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.: Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	9.734710	1	9.734710	3822.791	0.000000
Emulsifier	0.004317	1	0.004317	1.695	0.197896
% w/w	0.000000	1	0.000000	0.000	0.995361
Temperature	0.017128	1	0.017128	6.726	0.011921
Week	0.073536	8	0.009192	3.610	0.001748
Error	0.152790	60	0.002546		

**Πίνακας 53:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00255, df = 60.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
		.38312	.35228
1	1		0.012032
2	2	0.012032	



**Πίνακας 54:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς την εβδομάδα αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable PDI (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00255, df = 60.000										
Cell No.	Week	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		.36050								
1	1		0.500132	0.866902	0.082007	0.792907	0.228440	0.211223	0.645005	0.021452
2	2	0.500132		0.586416	0.225948	0.639721	0.076825	0.067058	0.287352	0.004099
3	3	0.866902	0.586416		0.103580	0.909763	0.189184	0.171201	0.556628	0.015847
4	4	0.082007	0.225948	0.103580		0.114449	0.004737	0.003933	0.034116	0.000109
5	5	0.792907	0.639721	0.909763	0.114449		0.167111	0.149011	0.504381	0.013063
6	6	0.228440	0.076825	0.189184	0.004737	0.167111		0.921508	0.410076	0.223132
7	7	0.211223	0.067058	0.171201	0.003933	0.149011	0.921508		0.387115	0.231565
8	8	0.645005	0.287352	0.556628	0.034116	0.504381	0.410076	0.387115		0.053900
9	9	0.021452	0.004099	0.015847	0.000109	0.013063	0.223132	0.231565	0.053900	

**Πίνακας 55:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	815.572	1	815.5723	20.96480	0.000045
Emulsifier	151.189	2	75.5944	1.94320	0.156531
% w/w	447.919	1	447.9192	11.51405	0.001569
Temperature	295.373	1	295.3730	7.59275	0.008780
Week	67.104	3	22.3681	0.57499	0.634798
Error	1556.079	40	38.9020		

**Πίνακας 56:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.st) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 38.902, df = 40.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
		-7.177	-1.067
1	1		0.001688
2	2	0.001688	

**Πίνακας 57:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 3h.st)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 38.902, df = 40.000				
Cell No.	Temperature	{1}	{2}	
1	1	-1.641	-6.603	
2	2	0.008905		0.008905

**Πίνακας 58:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτοματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1129.852	1	1129.852	26.19690	0.000003
Emulsifier	97.329	1	97.329	2.25669	0.138283
% w/w	90.071	1	90.071	2.08841	0.153624
Temperature	187.288	1	187.288	4.34249	0.041440
Week	246.711	8	30.839	0.71503	0.677305
Error	2587.753	60	43.129		

**Πίνακας 59:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτοματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 5% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 43.129, df = 60.000				
Cell No.	Temperature	{1}	{2}	
1	1	-2.349	-5.574	
2	2	0.041527		0.041527

**Πίνακας 60:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά την αποθήκευσή τους για 3 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 3h.s)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	141.4210	1	141.4210	8.366218	0.006822
Emulsifier	263.8100	2	131.9050	7.803267	0.001737
% w/w	79.1713	1	79.1713	4.683634	0.038022
Temperature	111.0679	1	111.0679	6.570581	0.015271
Week	26.9355	3	8.9785	0.531152	0.664175
Error	540.9221	32	16.9038		

**Πίνακας 61:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRSHH mexri 3h.sl Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 16.904, df = 32.000				
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}
1	1	-0.9904	0.948418	0.009974
2	2	0.948418		0.008868
3	3	0.009974	0.008868	

**Πίνακας 62:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRSHH mexri 3h.sl Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 16.904, df = 32.000				
Cell No.	% w/w	{1}	{2}	
1	1	-3.675	0.171147	
2	2	0.171147		

**Πίνακας 63:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης κατά τη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% για 3 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRSHH mexri 3h.sl Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 16.904, df = 32.000				
Cell No.	Temperature	{1}	{2}	
1	1	-1.266	0.015397	
2	2	0.015397		

**Πίνακας 64:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRSHH mexri 8h T20-L Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	381.7971	1	381.7971	30.56303	0.000001
Emulsifier	109.5071	1	109.5071	8.76609	0.004390
% w/w	80.2280	1	80.2280	6.42229	0.013898
Temperature	108.9110	1	108.9110	8.71837	0.004492
Week	117.0326	8	14.6291	1.17106	0.331485
Error	749.5273	60	12.4921		

**Πίνακας 65:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς το είδος του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 12.492, df = 60.000			
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}
		-1.070	-3.536
1	1		0.004527
2	3	0.004527	

**Πίνακας 66:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς την περιεκτικότητα % κ.β. του γαλακτωματοποιητή των νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 12.492, df = 60.000			
Cell No.	% w/w	{1}	{2}
		-3.358	-1.247
1	1		0.014005
2	2	0.014005	

**Πίνακας 67:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% και γαλακτωματοποιητές το Tween 20 και τη λεκιθίνη κατά τη διατήρησή τους για 8 εβδομάδες.

Duncan test; variable Zeta (Blank EVOO 10% DIATHRHSH mexri 8h T20-L.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 12.492, df = 60.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
		-1.073	-3.533
1	1		0.004627
2	2	0.004627	

**Πίνακας 68:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη σταθερότητας (ESI) των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά την αποθήκευσή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for ESI (Q10 DIATHRHSH 5%.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	391426.2	1	391426.2	180051.3	0.000000
Emulsifier	35.3	3	11.8	5.4	0.004084
Temperature	0.9	1	0.9	0.4	0.513891
Days	36.0	4	9.0	4.1	0.008400
Error	67.4	31	2.2		

**Πίνακας 69:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς το σύστημα του γαλακτωματοποιητή των εμπλουτισμένων ναογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά την διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable ESI (Q10 DIATHRHSH 5%.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.1740, df = 31.000					
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}	{4}
		99.487	98.696	97.507	100.00
1	1		0.239215	<b>0.007136</b>	0.442741
2	2	0.239215		0.081331	0.069764
3	3	<b>0.007136</b>	0.081331		<b>0.001223</b>
4	4	0.442741	0.069764	<b>0.001223</b>	

**Πίνακας 70:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς τις ημέρες αποθήκευσης των εμπλουτισμένων ναογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable ESI (Q10 DIATHRHSH 5%.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.1740, df = 31.000						
Cell No.	Days	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		100.00	100.00	98.528	98.528	97.555
1	1		1.000000	0.076100	0.067341	<b>0.004661</b>
2	2	1.000000		0.067341	0.054898	<b>0.004008</b>
3	3	0.076100	0.067341		1.000000	0.196712
4	4	0.067341	0.054898	1.000000		0.222358
5	5	<b>0.004661</b>	<b>0.004008</b>	0.196712	0.222358	

**Πίνακας 71:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη σταθερότητας (ESI) των εμπλουτισμένων ναογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά την αποθήκευσή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for ESI (Q10 DIATHRHSH 10%.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	<b>196179.5</b>	<b>1</b>	<b>196179.5</b>	<b>250270.0</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier	3.2	1	3.2	4.1	0.065025
Temperature	3.5	1	3.5	4.5	0.054073
Days	<b>17.3</b>	<b>4</b>	<b>4.3</b>	<b>5.5</b>	<b>0.007980</b>
Error	10.2	13	0.8		

**Πίνακας 72:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη σταθερότητας ως προς τις ημέρες αποθήκευσης των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable ESI (Q10 DIATHRHSH 10%.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .78387, df = 13.000						
Cell No.	Days	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		100.00	100.00	99.318	97.942	97.942
1	1		1.000000	0.319702	0.009944	0.008932
2	2	1.000000		0.296020	0.008932	0.007657
3	3	0.319702	0.296020		0.055979	0.046728
4	4	0.009944	0.008932	0.055979		1.000000
5	5	0.008932	0.007657	0.046728	1.000000	

**Πίνακας 73:** Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (MDD) των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for MDD (Q10 DIATHRHSH 5%.s) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1448868	1	1448868	5424.805	0.000000
Emulsifier	67025	3	22342	83.651	0.000000
Temperature	258	1	258	0.966	0.333231
Days	1417	4	354	1.326	0.282243
Error	8280	31	267		

**Πίνακας 74:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς το σύστημα του γαλακτωματοποιητή των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable MDD (Q10 DIATHRHSH 5%.st) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 267.08, df = 31.000					
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}	{4}
		194.33	183.07	249.51	134.37
1	1		0.133694	0.000136	0.000062
2	2	0.133694		0.000062	0.000136
3	3	0.000136	0.000062		0.000056
4	4	0.000062	0.000136	0.000056	

**Πίνακας 75:** Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (MDD) των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for MDD (Q10 DIATHRHSH 10%.s					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1006120	1	1006120	2535.381	0.000000
Emulsifier	48393	1	48393	121.949	0.000000
Temperature	49	1	49	0.124	0.730141
Days	1112	4	278	0.701	0.605078
Error	5159	13	397		

**Πίνακας 76:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων ως προς το σύστημα του γαλακτοματοποιητή των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable MDD (Q10 DIATHRHSH 10%.s)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 396.83, df = 13.000			
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}
1	1	273.48	0.000182
2	2	0.000182	

**Πίνακας 77:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for PDI (Q10 DIATHRHSH 5%.s					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3.515897	1	3.515897	1131.850	0.000000
Emulsifier	0.091779	3	0.030593	9.849	0.000102
Temperature	0.001729	1	0.001729	0.557	0.461222
Days	0.006957	4	0.001739	0.560	0.693397
Error	0.096296	31	0.003106		

**Πίνακας 78:** Αποτελέσματα Duncan's test για το δείκτη πολυδιασποράς ως προς το σύστημα του γαλακτοματοποιητή των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable PDI (Q10 DIATHRHSH 5%.sta					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = .00311, df = 31.000					
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}	{4}
1	1	.27170	0.726566	0.000299	0.525779
2	2	0.726566		0.000586	0.356239
3	3	0.000299	0.000586		0.000102
4	4	0.525779	0.356239	0.000102	

**Πίνακας 79:** Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for PDI (Q10 DIATHRHSH 10%.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3.403125	1	3.403125	4032.763	0.000000
Emulsifier	0.002163	1	0.002163	2.563	0.133371
Temperature	0.000320	1	0.000320	0.379	0.548659
Days	0.009013	4	0.002253	2.670	0.079726
Error	0.010970	13	0.000844		

**Πίνακας 80:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Q10 DIATHRHSH 5%.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2222.097	1	2222.097	100.4053	0.000000
Emulsifier	2301.212	3	767.071	34.6600	0.000000
Temperature	1.548	1	1.548	0.0700	0.793138
Days	186.358	4	46.589	2.1051	0.103985
Error	686.069	31	22.131		

**Πίνακας 81:** Αποτελέσματα Duncan's test για το ζ-Δυναμικό ως προς το σύστημα του γαλακτωματοποιητή των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable Zeta (Q10 DIATHRHSH 5%.st; Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 22.131, df = 31.000					
Cell No.	Emulsifier	{1}	{2}	{3}	{4}
		-2.154	-5.455	-1.844	-20.36
1	1		0.126861	0.884132	0.000062
2	2	0.126861		0.114163	0.000136
3	3	0.884132	0.114163		0.000056
4	4	0.000062	0.000136	0.000056	



**Πίνακας 82:** Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-Δυναμικό (Zeta Potential) των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for Zeta (Q10 DIATHRSH 10%.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1.588788	1	1.588788	7.820856	0.015128
Emulsifier	0.034213	1	0.034213	0.168414	0.688208
Temperature	0.011045	1	0.011045	0.054369	0.819259
Days	2.035543	4	0.508886	2.505005	0.093339
Error	2.640919	13	0.203148		

**Πίνακας 83:** Αποτελέσματα ANOVA για τη διατηρησιμότητα του CoQ<sub>10</sub> των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for % RCoQ10 (Q10 DIATHRSH 5%.sta Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	332742.7	1	332742.7	7619.774	0.000000
Emulsifier	180.2	3	60.1	1.376	0.268526
Temperature	40.0	1	40.0	0.917	0.345770
Days	2215.4	4	553.9	12.683	0.000003
Error	1353.7	31	43.7		

**Πίνακας 84:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη διατηρησιμότητα του CoQ<sub>10</sub> ως προς τις ημέρες αποθήκευσης των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 5% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable % RCoQ10 (Q10 DIATHRSH 5%.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 43.668, df = 31.000						
Cell No.	Days	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		100.00	96.713	93.390	86.748	79.180
1	1		0.327626	0.066746	0.000677	0.000034
2	2	0.327626		0.322435	0.006914	0.000070
3	3	0.066746	0.322435		0.053322	0.000275
4	4	0.000677	0.006914	0.053322		0.029067
5	5	0.000034	0.000070	0.000275	0.029067	

**Πίνακας 85:** Αποτελέσματα ANOVA για τη διατηρησιμότητα του CoQ<sub>10</sub> των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Univariate Tests of Significance for % RCoQ10 (Q10 DIATHRHSH 10%.s Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	161750.8	1	161750.8	3260.862	0.000000
Emulsifier	0.0	1	0.0	0.001	0.978726
Temperature	289.5	1	289.5	5.837	0.031140
Days	2263.2	4	565.8	11.406	0.000339
Error	644.8	13	49.6		

**Πίνακας 86:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη διατηρησιμότητα του CoQ<sub>10</sub> ως προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable % RCoQ10 (Q10 DIATHRHSH 10%.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 49.604, df = 13.000			
Cell No.	Temperature	{1}	{2}
1	1	86.126	93.736
2	2	0.031283	

**Πίνακας 87:** Αποτελέσματα Duncan's test για τη διατηρησιμότητα του CoQ<sub>10</sub> ως προς τις ημέρες αποθήκευσης των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με EVOO 10% κατά τη διατήρησή τους για 40 ημέρες.

Duncan test; variable % RCoQ10 (Q10 DIATHRHSH 10%.s Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 49.604, df = 13.000						
Cell No.	Days	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1	1	100.00	98.785	96.571	79.904	74.394
2	2	0.811193		0.524829	0.002303	0.000396
3	3	0.524829	0.664034		0.003026	0.000533
4	4	0.002303	0.003026	0.005413		0.000945
5	5	0.000396	0.000533	0.000945	0.288700	