



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟ/ΝΑΝΟ-ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ
ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Βασιλική Η. Πολυχνιάτου

ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΕΜΠ

vpolychniatou@gmail.com

Αθήνα, 2024

Εξεταστική Επιτροπή

Κωνσταντίνα Τζιά

Βασιλική Ωραιοπούλου

Πέτρος Ταούκης

Μαγδαληνή Κροκίδα

Ιωάννα Μαντάλα

Κωνσταντίνος Κορδάτος

Ευαγγελία Παυλάτου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, Άρθρο 202)

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Κωνσταντίνας Τζιά. Η συμβολή της Καθηγήτριας Κ. Τζιά ήταν ανεκτίμητη, καθώς συνέβαλε καθοριστικά σε κάθε στάδιο της διαδικασίας, μέχρι και την ολοκλήρωσή της. Η καθοδήγηση και η υποστήριξή της αποτέλεσαν τον πυρήνα για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της διαδρομής. Την ευχαριστώ από καρδιάς για την καθοδήγηση, τις συμβουλές, την υποστήριξη, την υπομονή της και τις ηθικές αρχές που μου δίδαξε καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής. Η επιστημονική εμπειρία και οι ακαδημαϊκές γνώσεις της, καθώς και η στοχευμένη καθοδήγησή της, αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες στον σχεδιασμό και την υλοποίηση των πειραμάτων, καθώς και στη μελέτη, διόρθωση και ολοκλήρωση της ερευνητικής εργασίας μου.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής την καθηγήτρια Βασιλική Ωραιοπούλου και τον καθηγητή Πέτρο Ταούκη για τη συμμετοχή στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή μου. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια Ευαγγελία Παυλάτου (ΕΜΠ), η οποία με καθοδήγησε στη δυναμική σκέδασης φωτός, την καθηγήτρια Μαγδαληνή Κροκίδα (ΕΜΠ), τον καθηγητή Κωνσταντίνο Κορδάτο (ΕΜΠ), και την καθηγήτρια Ιωάννα Μαντάλα (ΓΠΑ) για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω ειλικρινή και προσωπική ευγνωμοσύνη για την ουσιώδη και πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε η Δρ. Β. Γιάννου. Οι γνώσεις της και η μεγάλη εμπειρία της συνέβαλαν στην επίλυση κάθε προβλήματος που παρουσιάστηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Εκτός από αυτό, θέλω να την ευχαριστήσω από καρδιάς και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την ηθική της υποστήριξη και την ουσιώδη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Ήταν διαθέσιμη ανά πάσα στιγμή και μου παρείχε πολύτιμες γνώσεις σε όλους τους τομείς με ευχαρίστηση και προθυμία.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Δερμενσολούγλου, Δρ. Ε. Γώγου, την επίκουρη καθηγήτρια Φ. Τσιρώνη και τον Δρ. Δ. Τσιμογιάννη για την υποστήριξή τους σε όλους τους τομείς, και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες και φίλους, Π. Σφακιανάκη, Δρ. Μ. Κατσούλη, Δρ. Σ. Χανιώτη, Δρ. Δ. Λεμπέση, Δρ. Χ. Χρανιώτη, Π. Σιαμανδούρα, Δρ. Γ. Φρακολάκη για το ευχάριστο κλίμα, την συμπαράσταση και τη συμβολή τους να ξεπεράσω κάθε εμπόδιο καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την εταιρεία Μινέρβα Α.Ε. για την δωρεάν παραχώρηση των πρώτων υλών.

Ολοκληρώνοντας, θέλω να ευχαριστήσω θερμά και ολόψυχα τους γονείς και τον αδελφό μου που χωρίς την αμέριστη ηθική υποστήριξή τους δεν θα μπορούσα να υλοποιήσω αυτήν τη διατριβή. Εξίσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύζυγό μου Αντώνη και τις κόρες μου Ηλιάνα και Δήμητρα που με μεγάλη κατανόηση μου έδωσαν τη δύναμη και την έμπνευση να ολοκληρώσω τη διατριβή μου.

Αθήνα, Μάιος 2024

Βασιλική Πολυχινιάτου

Στις κόρες μου, Ηλιάνα και Δήμητρα

Περίληψη

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη βιομηχανία τροφίμων, συμπληρωμάτων και φαρμακευτικών προϊόντων. Λόγω του μικρού μεγέθους σωματιδίων τους μπορούν να οδηγήσουν σε συστήματα χορήγησης βιοδραστικών συστατικών με υψηλή οπτική διαύγεια, καλή κινητική σταθερότητα και υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Η επίτευξη όμως μίας τέτοιας επαρκώς σταθερής δομής έναντι της κινητικής αποσταθεροποίησης και της οξειδωσης καθιστά έναν στόχο/πρόκληση κατά τη διαμόρφωση ενός δομημένου γαλακτώματος.

Τα γαλακτώματα τύπου νερό-σε-έλαιο (ν/ε) γενικώς παρουσιάζουν χαμηλή σταθερότητα λόγω της υψηλής κινητικότητας των σταγονιδίων νερού, τα οποία μπορούν εύκολα να κατακρημνιστούν, να κροκιδωθούν ή να συνενωθούν.

Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι ορισμένες πολυφαινόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο επηρεάζουν τόσο τις ιδιότητες διασποράς όσο και την οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωματοποιημένων συστημάτων ελαιόλαδου ν/ε. Η αποτελεσματικότητά τους να παρατείνουν τόσο την οξειδωτική όσο και την κολλοειδή σταθερότητα των γαλακτωμάτων έχει συσχετιστεί με τις επιφανειακές τους ιδιότητες και την ικανότητά τους να συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια νερού/ελαίου. Ωστόσο, λίγες είναι μέχρι τώρα οι μελέτες που διερευνούν τη σχέση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων αυτών των ενώσεων τόσο σε μοντέλα όσο και σε πραγματικά συστήματα γαλακτωμάτων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των ιδιαίτερων συνθηκών επίτευξης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ν/ε με βάση το ελαιόλαδο, καθώς και της δυνατότητας ενσωμάτωσης φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου σε αυτά, επιδιώκοντας ταυτόχρονα τη διερεύνηση και την αναπαραγωγή των κολλοειδών σχηματισμών που από τη φύση του περιέχει το παρθένο ελαιόλαδο πρόσφατης παραγωγής.

Αρχικά διερευνήθηκαν οι τεχνικές και οι συνθήκες ομογενοποίησης/παρασκευής που μπορούν να οδηγήσουν στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτώματος με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επιλέχθηκαν δύο τεχνικές παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε δύο χρόνους έκθεσης (10 ή 20 min): ομογενοποίηση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε διάφορες ταχύτητες περιστροφής (8000 rpm, 10000 rpm, 12000 rpm), και ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων υψηλής ισχύος (150, 225, 300 W). Οι δοκιμές έδειξαν ότι η ομογενοποίηση με υψηλή ταχύτητα ήταν αποτελεσματικότερη από την ομογενοποίηση με υπέρηχους. Παρά τη μικρότερη μέση διάμετρο των σταγονιδίων με υπέρηχους

(45,6 nm σε σχέση με 114,4 nm με υψηλής ταχύτητα), η χρήση υπερήχων επέδειξε υψηλό βαθμό πολυδιασποράς, επηρεάζοντας αρνητικά το Δείκτη Σταθερότητας Γαλακτώματος - ESI, (ESI%= 96-100%, σε αντίθεση με την ομογενοποίηση με υψηλή ταχύτητα ESI%=99-100%). Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) με υπέρηχους ήταν περίπου 6 φορές μεγαλύτερος από την ομογενοποίηση υψηλής ταχύτητας. Η θολότητα και το χρώμα των γαλακτωμάτων κυμάνθηκαν αντιστοίχως με τον PDI. Η τεχνική ομογενοποίησης με υψηλή ταχύτητα με 12.000 rpm για 20 min θεωρήθηκε η καλύτερη για περαιτέρω έρευνα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη για επίτευξη συστημάτων ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, χωρίς προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας, αλλά με χρήση μη ιονικών γαλακτωματοποιητών, εγκεκριμένων για τη χρήση τους στην παραγωγή τροφίμων (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 20 και Span 80). Ακολούθησε η κατασκευή τριαδικών διαγραμμάτων φάσης με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή και πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ελεγχόμενη προσθήκη νερού σε μίγμα ελαίου-γαλακτωματοποιητή (τιτλοδότηση) με σκοπό να προσδιοριστεί το φάσμα των αναλογιών των τριών συστατικών που με ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν μικρο/νανο-γαλάκτωμα. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε αρχικά ότι είναι εφικτή η παρασκευή σταθερών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο χωρίς την προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας. Συγκεκριμένα, ο γαλακτωματοποιητής Span 20 αποδείχθηκε ότι έχει την πιο αποτελεσματική γαλακτωματοποιητική ικανότητα - προσθήκη 27,3% w/w αυτού οδήγησε σε ομογενοποίηση 8,39% w/w νερού.

Έπειτα, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με συγκεκριμένες αναλογίες γαλακτωματοποιητή (2%, 4%, 6%, 8% και 10% w/w) και 2% w/w αναλογία υδατικής φάσης. Οι αναλογίες 2% και 4% w/w Span 20 και Tween 20 επέδειξαν 100% σταθερότητα. Οι γαλακτωματοποιητές Tween 20, Tween 40 και Span 20 είχαν τις χαμηλότερες Μέσες Τιμές Διαμέτρου Σταγονιδίων (MDD), με το Tween 40 να επιτυγχάνει τις μικρότερες MDD (45 nm σε 6% w/w). Οι περισσότεροι γαλακτωματοποιητές εμφάνισαν χαμηλό PDI (0,1-10,2). Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με Span 20 και Tween 60 είχαν υψηλότερο ιξώδες. Όσον αφορά στην οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωμάτων αποδείχθηκε ότι ο γαλακτωματοποιητής Span 80 είχε την καλύτερη προστατευτική δράση, ακολουθούμενος από τον Tween 80. Συγκεκριμένα ο Αριθμός Υπεροξειδίων (Α.Υ. σε $\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) στο τέλος της χρονικής διάρκειας παρατήρησης ήταν 20,25 και 20,52 αντίστοιχα για αναλογία γαλ/τή 10% w/w σε αντίθεση με το τυφλό δείγμα που έδωσε τιμή Α.Υ., 32,84 στον ίδιο χρόνο.

Στη συνέχεια, με βάση τους αποτελεσματικότερους γαλακτωματοποιητές (Tween 20 και Span 20), μελετήθηκε η ενσωμάτωση των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου: κερσετίνη, απιγενίνη, t-

σινναμικό οξύ, και γαλλικό οξύ στην υδατική φάση σε αναλογία 1% w/w, καθώς και η επίδρασή τους στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Όπως και στην προηγούμενη σειρά πειραμάτων, κατασκευάστηκαν ψευδο-τριαδικά διαγράμματα φάσης, και μελετήθηκε η κινητική και οξειδωτική σταθερότητα καθώς οι φυσικοχημικές ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε προκαθορισμένες αναλογίες των τριών συστατικών. Προέκυψε ότι όλα τα συστατικά που δοκιμάστηκαν πλην της κερσετίνης, βελτίωσαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωση υδατικής φάσης (1% w/w γαλλικό οξύ) που επιτεύχθηκε στα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα ήταν 8,99 % w/w με την προσθήκη 30,1% w/w Span 20, και 8,82% w/w με προσθήκη 34,8% w/w Tween 20. Η προσθήκη των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου σε συνδυασμό με τους γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Span 20 δεν είχε σημαντική επίδραση στα διαγράμματα φάσης των μελετώμενων συστημάτων. Ακολούθησε η παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με γνωστές αναλογίες νερού (2% w/w τελικού γαλακτώματος) και γαλακτωματοποιητή (0, 2, 4, 6, 8 και 10% w/w τελικού γαλακτώματος) για κάθε φαινολικό συστατικό. Το γαλλικό οξύ, η απιγενίνη και το trans-σινναμικό οξύ λειτούργησαν συνεργιστικά με τους γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Span 20, επιμηκύνοντας την κινητική σταθερότητά τους, βελτιώνοντας παράλληλα τις ιδιότητές τους. Η αποτελεσματικότητα των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου ήταν: γαλλικό οξύ (LogP = 0.7) > trans-σινναμικό οξύ (LogP = 1.59) > απιγενίνη (LogP = 2.1) > κερσετίνη (LogP = 1.81). Η κατάταξη αυτή συμφωνεί με τη σειρά του συντελεστή κατανομής τους (LogP), εκτός από την περίπτωση της κερσετίνης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο αμφιφιλικός χαρακτήρας των συστατικών αυτών τα οδήγησε να τοποθετηθούν στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων και να σταθεροποιήσουν το γαλακτωμα. Η κερσετίνη λόγω της εξαιρετικά χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό δεν κρίθηκε αποτελεσματική και τα μικρο/νανο-γαλακτώματα στο οποία ενσωματώθηκε παρουσίασαν χαμηλή σταθερότητα, υψηλή θολότητα και υψηλή μέση τιμή σταγονιδίων. Υψηλότερη σταθερότητα επέδειξε ο συνδυασμός του γαλακτωματοποιητή Tween 20 σε αναλογία 4% και 5% w/w και γαλλικού οξέος ενσωματωμένου στην υδατική φάση. Η μικρότερη τιμή MDD που επιτεύχθηκε ήταν 39,7 nm με προσθήκη 8 % w/w Span 20 και γαλλικού οξέος στην υδατική φάση. Όλα τα υπό εξέταση γαλακτώματα παρουσίασαν MDD < 500nm, επομένως χαρακτηρίστηκαν ως μικρο/νανο-γαλακτώματα. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου μείωσε το δείκτη PDI και τη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, με εξαίρεση την κερσετίνη. Οι βελτιωμένες αυτές ιδιότητες των μικρο/νανογαλακτωμάτων επαληθεύονται και από τις υψηλότερες απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού που μετρήθηκαν στα γαλακτώματα που περιείχαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου.

Η μελέτη οξειδωσης που πραγματοποιήθηκε απέδειξε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τεσσάρων φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου, ενώ επιβεβαίωσε την προστατευτική δράση των γαλακτωματοποιητών στην οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Το γαλλικό οξύ αποδείχτηκε ότι είχε τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε μελέτη παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με χρήση του γαλακτωματοποιητή Tween 20 (0, 2, 4, και 6% w/w τελικού γαλακτώματος), αναλογία νερού (2% w/w τελικού γαλακτώματος) και βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ή το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της φύσης του ελαίου στη σταθερότητα και στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Από τη μελέτη προέκυψε ότι τα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα με χρήση εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου υπερτερούν σημαντικά σε κινητική σταθερότητα, όσο και σε οξειδωτική σταθερότητα, εκείνων που παρασκευάστηκαν με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Αποδεικνύεται ότι αυτό οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση των μικρο-συστατικών που περιέχονται στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως βάση παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτώματος. Αποδείχτηκε ακόμη ότι τα μικρο-συστατικά αυτά έχουν επιφανειοδραστικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οδηγώντας σε ανώτερα, πιο σταθερά μικρο/νανο-γαλακτώματα. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση τα δύο έλαια με προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween 20 (2 και 4% w/w) και υδατικής φάσης 2% w/w. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εμφάνισαν μεγαλύτερο δείκτη σταθερότητας, και ειδικότερα σε συνθήκες αποθήκευσης 40 °C. Η ελάχιστη τιμή MDD που επιτεύχθηκε ήταν 99,2 nm με συνθήκες παρασκευής 4% w/w Tween 20 και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ως βάση, σε σύγκριση με 110,7 nm με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Επιπλέον, το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ως βάση οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, κάτι που αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερης σταθερότητας. Αντίστοιχα κινήθηκαν και οι τιμές της θολότητας.

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχαν μεγαλύτερο αρχικό Α.Υ. σε σχέση με εκείνα που παρασκευάστηκαν με εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Παρόλα αυτά, αυτό οφείλεται στο ότι το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, κατά τις διαδικασίες του εξευγενισμού, απαλλάσσεται από το μεγαλύτερο μέρος των ουσιών που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του Αριθμού των Υπεροξειδίων. Ωστόσο, παρότι θα αναμενόταν ένα έλαιο με αρχικά υψηλότερο αριθμό υπεροξειδίων να οξειδωθεί με ταχύτερο ρυθμό απ' ότι ένα έλαιο με πολύ χαμηλή συγκέντρωση υπεροξειδίων, παρατηρήθηκε ότι η οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εξελίχθηκε με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με εκείνο των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Ενδεικτικά, το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με 4% w/w Tween 20

και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχε τιμή A.Y. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$), 12,3 στην αρχή της μελέτης και στο τέλος του χρόνου παρατήρησης στους 40°C, η τιμή εξελίχθηκε σε 17,4. Αντίστοιχα, το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με 4% w/w Tween 20 και εξευγενισμένο ελαιόλαδο είχε τιμή A.Y. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$), 4,8 στην αρχή της μελέτης και στο τέλος του χρόνου παρατήρησης στους 40°C, η τιμή εξελίχθηκε σε 12,7.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη μελέτη της κινητικής και οξειδωτικής σταθερότητας μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση τόσο το εξευγενισμένο όσο και το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με γαλακτωματοποιητή Tween 20 (αναλογίες 0%, 2%, 4% και 6% w/w), αναλογία υδατικής φάσης 2% w/w και προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου (γαλλικό, βανιλικό και συριγγικό οξύ σε αναλογία 1% w/w στην υδατική φάση), που πλαισιώθηκε με προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των παρασκευαζόμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων καθώς και της επιφανειακής τάσης των επιμέρους φάσεων. Προέκυψε ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο που περιείχαν 4% w/w Tween 20, εμφάνισαν παρόμοια ή και ανώτερα χαρακτηριστικά με τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο που περιείχαν 6% w/w Tween 20. Τα ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου είχαν εξαιρετικές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, αυξάνοντας σημαντικά το ESI% των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα, το βανιλικό οξύ αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το γαλλικό και το συριγγικό οξύ. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και γαλακτωματοποιητή 6% w/w παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές MDD από εκείνα με 4% w/w γαλακτωματοποιητή. Το βανιλικό οξύ και πάλι αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το γαλλικό και το συριγγικό οξύ (μικρότερη τιμή MDD με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, 4% Tween 20 w/w και ενσωμάτωση του βανιλικού οξέος στην υδατική φάση). Αντίστοιχα κινήθηκε και η μεταβολή του δείκτη PDI. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της θολότητας, με το βανιλικό οξύ να είναι το πιο αποτελεσματικό. Οι τιμές της θολότητας κυμάνθηκαν από 135 NTU μέχρι 2551 NTU και αντιστοιχούσαν στο μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με προσθήκη βανιλικού οξέος και στο τυφλό γαλάκτωμα χωρίς προσθήκη γαλακτωματοποιητή και φαινολικού συστατικού αντιστοίχως.

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχε χαμηλότερη επιφανειακή τάση σε σχέση με το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, γεγονός που διευκολύνει την παρασκευή γαλακτώματος. Επιπλέον, η προσθήκη του γαλακτωματοποιητή Tween 20, μείωσε περαιτέρω την επιφανειακή τάση των δύο ελαίων. Η προσθήκη των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου μείωσε επίσης την επιφανειακή τάση της υδατικής φάσης, το οποίο αποδεικνύει τις επιφανειοδραστικές τους ιδιότητες. Το γαλλικό οξύ μείωσε την επιφανειακή τάση του απιονισμένου νερού κατά 17,9%, το βανιλικό οξύ κατά 18,4% και το συριγγικό κατά 19,7%. Από τα αποτελέσματα αυτά και μόνο θα ήταν αναμενόμενο, το συριγγικό οξύ να είναι

το πιο αποτελεσματικό στη σταθεροποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε σχέση με τα άλλα δύο εξεταζόμενα φαινολικά οξέα. Ωστόσο, οι προσδιορισμοί ESI%, MDD, PDI και θολότητας απέδειξαν ότι το βανιλικό και στη συνέχεια το γαλλικό οξύ ήταν τα πιο αποτελεσματικά.

Η μελέτη οξειδωτικής σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυσμένης οξείδωσης των παραπάνω γαλακτωμάτων έδειξε ότι ο ρυθμός μεταβολής του Α.Υ. των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον των αντίστοιχων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο, τουλάχιστον για το διάστημα των πρώτων 10 ημερών λόγω του πλήθους αντιοξειδωτικών μικρο-συστατικών που περιέχονται φυσικά στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στην υδατική φάση μείωσε σημαντικά τη σταθερά ρυθμού μεταβολής Α.Υ. των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα το γαλλικό οξύ ($k(d-1) = 1,2714$) αποδείχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το συριγγικό ($k(d-1) = 1,3445$) και μετά από το βανιλικό οξύ ($k(d-1) = 1,3813$). Τα συμπεράσματα της μελέτης της οξειδωτικής σταθερότητας με βάση το Α.Υ. επιβεβαιώθηκαν από την τεχνική προσδιορισμού οξειδωτικής σταθερότητας με χρήση του αντιδραστήρα Oxitest®. Η ενσωμάτωση των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου επηρέασε σημαντικά την οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Όπως και στον προσδιορισμό Α.Υ., το γαλλικό οξύ ($IP(h) = 14,87$) αποδείχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό συστατικό ακολουθούμενο από το συριγγικό ($IP(h) = 14,43$) και το βανιλικό οξύ ($IP(h) = 13,66$). Τέλος τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μελετήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των περιεχόμενων Ολικών Φαινολικών Συστατικών (Ο.Φ.Σ.) σε επιταχυσμένες συνθήκες οξείδωσης και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg γαλλικού οξέος/kg γαλακτώματος (mg GAE/kg). Κατά το τέλος της χρονικής διάρκειας παρατήρησης για τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, το γαλλικό οξύ (95,1 mg GAE/kg) προέκυψε ως το πιο προστατευτικό έναντι της οξείδωσης ακολουθούμενο από το συριγγικό (77,2 mg GAE/kg) και μετά από το βανιλικό οξύ (61,7 mg GAE/kg). Τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού μεταβολής του Α.Υ., αποδεικνύοντας την άμεση συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών και οξειδωσιμότητας του ελαίου.

Τέλος, με βάση τα προηγούμενα συμπεράσματα, πραγματοποιήθηκε μία μελέτη εύρεσης μαθηματικών πολυωνυμικών μοντέλων 2^{ου} βαθμού, με μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (RSM), για την πρόβλεψη των ιδιοτήτων του τελικού μικρο/νανο-γαλακτώματος (MDD, PDI, θολότητας και ESI) συναρτήσει των επιπέδων των ανεξάρτητων μεταβλητών (της αναλογίας γαλακτωματοποιητή:2%, 4%, 6% w/w γαλακτώματος και γαλλικού οξέος: 0%, 0,5%, 1% w/w υδατικής φάσης). Οι προκύπτουσες εξισώσεις αποδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές με τον συντελεστή συσχέτισης R² να ισούται με

0,993, 0,968, 0,997 και 0,989 αντιστοίχως. Οι ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάστηκαν σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και του γαλλικού οξέος. Η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή βελτίωσε τις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων έως την αναλογία των 6% w/w. Η αύξηση της αναλογίας του γαλλικού οξέος οδήγησε σε βελτίωση των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, επαληθεύοντας τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του γαλλικού οξέος.

Οι συνδυασμοί παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ενσωμάτωση γαλλικού οξέος που μπορεί να οδηγήσουν σε μικρο/νανο-γαλακτώματα με τις πιο επιθυμητές ιδιότητες είναι: 3,14-4,45% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το MDD, 2,95-4,56% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το PDI, 2,35%-5,21% Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για τη θολότητα και 3,21-5,25% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το ESI.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας παρέχουν πληροφορίες για τον σχεδιασμό και την παρασκευή βελτιστοποιημένων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ν/ε, με ενσωματωμένα βιοδραστικά φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου χαρακτηριζόμενα από υψηλή σταθερότητα και επιθυμητές ιδιότητες.

Title of Dissertation:

Formulation of micro/nano-emulsions based on olive oil and study of their properties

Vasiliki Polychniatou, PhD, 2024

Dissertation directed by: Professor Constantina Tzia

Laboratory of Food Chemistry and Technology,
School of Chemical Engineering,
National Technical University of Athens

Abstract

Micro/nano-emulsions are of particular interest in the food, supplement and pharmaceutical industries. Due to their small particle size, they can act as delivery systems of bioactive ingredients with high optical clarity, good kinetic stability and high bioavailability. However, achieving such a sufficiently stable structure against kinetic destabilization and oxidation makes it a challenge when formulating a structured emulsion.

Water-in-oil (w/o) emulsions generally exhibit low stability due to the high mobility of water droplets, which can easily precipitate, flocculate or coalesce.

Recent studies have confirmed that certain polyphenols contained naturally in olive oil affect both the kinetic and the oxidative stability of olive oil emulsified w/o systems. Their effectiveness in prolonging both the oxidative and colloidal stability of emulsions has been related to their surface-active properties and their ability to accumulate at the water/oil interface. However, there are very limited studies so far investigating the relationship between antioxidant activity and surfactant properties of these compounds in both model and real emulsion systems.

The purpose of this thesis was to investigate the conditions for obtaining micro/nano-emulsions based on olive oil, as well as the effect of incorporating olive oil phenolic compounds of olive oil into them, seeking to investigate and reproduce the colloidal formations that are naturally contained in the recently produced virgin olive oil.

Initially, the homogenization/preparation techniques and conditions that can lead to the preparation of micro/nano-emulsion with desired characteristics were investigated. Two micro/nano-emulsion preparation techniques were chosen at two exposure times (10 or 20 min): homogenization using a high-speed homogenizer at various rotation speeds (8000rpm, 10000rpm, 12000rpm), and homogenization using high-power ultrasound (150, 225, 300W). Tests showed that high-speed homogenization was more effective than ultrasonic homogenization. Despite the smaller mean droplet diameter achieved with ultrasound (45.6 nm compared to 114.4 nm with high speed), the use of ultrasound showed a high degree of polydispersity, negatively affecting the Emulsion Stability Index - ESI, (ESI%=96-100 %, in contrast to high-speed homogenization ESI%=99-100%). The polydispersity index (PDI) with sonication was about 6 times higher than high speed homogenization. The turbidity and color of the emulsions varied accordingly with the PDI. The high-speed homogenization method at 12,000 rpm for 20 min was considered the best option for further investigation.

Subsequently, a study was carried out to achieve w/o micro/nano-emulsion systems, based on refined olive oil, without the addition of a co-surfactant, but using food grade non-ionic emulsifiers (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 20 and Span 80). This was followed by the construction of ternary phase diagrams with predetermined concentrations of emulsifier. Tests were carried out with the controlled addition of water to an oil-emulsifier mixture (titration) to determine the range of proportions of the three components that, by mixing them, can yield a micro/nano-emulsion. From this study it initially emerged that it is possible to prepare stable micro/nano-emulsions based on refined olive oil without the addition of a co-surfactant. In particular, Span 20 emulsifier was shown to have the most effective emulsifying capacity - addition of 27.3% w/w of this resulted in homogenization of 8.39% w/w water.

Then, micro/nano-emulsions were prepared with specific emulsifier ratios (2%, 4%, 6%, 8% and 10% w/w) and 2% w/w aqueous phase ratio. 2% and 4% w/w Span 20 and Tween 20 ratios demonstrated 100% stability. The emulsifiers Tween 20, Tween 40 and Span 20 had the lowest Mean Droplet Diameter (MDD) values, with Tween 40 achieving the lowest MDD (45 nm at 6% w/w). Most emulsifiers showed low PDI (0.1-10.2). Micro/nano-emulsions prepared with Span 20 and Tween 60 had higher viscosity. Regarding the oxidative stability of the emulsions, it was shown that Span 80 showed the best protective effect, followed by Tween 80. Specifically, the Peroxide Value (PV) in (meqO₂ kg⁻¹) at the end of the observation period was 20.25 and 20.52 respectively for a 10% w/w emulsifier ratio in contrast to the blank which gave an PV value in (meqO₂ kg⁻¹) of 32.84 at the same conditions.

Then, based on the most effective emulsifiers (Tween 20 and Span 20), the incorporation of the phenolic olive oil compounds (quercetin, apigenin, trans-cinnamic acid, and gallic acid in the aqueous phase at a ratio of 1% w/w) was studied, as well as their effect on the micro/nano-emulsions properties. As in the previous series of experiments, pseudo-ternary phase diagrams were constructed, and subsequently the kinetic and oxidative stability as well as the physicochemical properties of the micro/nano-emulsions were determined. It was concluded that all tested phenolic compounds except quercetin improved the quality characteristics of the emulsions. Specifically, in the emulsions containing gallic acid, the maximum aqueous phase concentration achieved in the prepared micro/nano-emulsions was 8.99 % w/w with the addition of 30.1% w/w Span 20, and 8.82 % w/w with the addition of 34.8% w/w Tween 20. The addition of the remaining phenolic compounds in combination with the emulsifiers Tween 20 and Span 20 had no significant effect on the phase diagrams of the studied systems.

This study was followed by the preparation of micro/nano-emulsions with known proportions of water (2% w/w final emulsion) and emulsifier (0, 2, 4, 6, 8 and 10% w/w final emulsion) for each endogenous component. Gallic acid, apigenin and trans-cinnamic acid functioned synergistically with Tween 20 and Span 20 emulsifiers, extending their kinetic stability while improving their properties. The efficacy of phenolic olive oil compounds was: gallic acid (LogP = 0.7) > trans-cinnamic acid (LogP = 1.59) > apigenin (LogP = 2.1) > quercetin (LogP = 1.81). This ranking agrees with the order of their partition coefficient (LogP), except in the case of quercetin, leading to the conclusion that the amphiphilic nature of these compounds led them to be placed at the droplet interface and stabilize the emulsion. Quercetin due to its extremely low solubility in water was not considered effective and the micro/nano-emulsions in which it was incorporated showed low stability, high turbidity and mean droplet diameter values. Regarding the ESI index, better stability was achieved by the combination of the emulsifier Tween 20 at a ratio of 4% and 5% w/w and gallic acid incorporated in the aqueous phase. The lowest Mean Droplet Diameter (MDD) value achieved was 39.7 nm with the addition of 8% w/w Span 20 and gallic acid in the aqueous phase.

Successively, a study was carried out on the preparation of micro/nano-emulsions using the emulsifier Tween 20 (0, 2, 4, and 6% w/w final emulsion), water ratio (2% w/w final emulsion) and as a continuous phase extra virgin olive oil or refined olive oil. The aim was to investigate the effect of the oil phase on the stability and properties of micro/nano-emulsions. The study showed that the prepared micro/nano-emulsions based on extra virgin olive oil were significantly superior in kinetic stability, as well as in oxidative stability, to those prepared based on refined olive oil. This was probably due to the increased concentration of micro-compounds contained in the extra virgin olive oil, which was

used as a base for the preparation of micro/nano-emulsion. More specifically, micro/nano-emulsions were prepared based on the two oils with the addition of an emulsifier Tween 20 (2 and 4% w/w) and an aqueous phase of 2% w/w. Micro/nano-emulsions based on extra virgin olive oil showed a higher stability index, especially at storage conditions of 40 °C. The minimum MDD value achieved was 99.2 nm with preparation conditions of 4% w/w Tween 20 and extra virgin olive oil as base, compared to 110.7 nm based on refined olive oil. In addition, extra virgin olive oil as a base resulted in lower PDI values of the micro/nano-emulsions, which is an indication of greater stability. The turbidity values also varied accordingly.

Micro/nano-emulsions prepared with refined olive oil had a lower initial PV than those prepared with extra virgin olive oil. This is because refined olive oil, during the refining process, is released from most of the substances that contribute to the formation of Peroxide Value. However, although an oil with an initially higher number of peroxides would be expected to oxidize at a faster rate than an oil with a very low concentration of peroxides, it was observed that the oxidation of micro/nano-emulsions with extra virgin olive oil progressed at a slower rate than that of micro/nano-emulsions based on refined olive oil. As an example, the emulsion prepared with 4% w/w Tween 20 and extra virgin olive oil had a PV value in ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) of 12.3 at the beginning of the study and at the end of the observation time at 40°C, the value evolved to 17.4. Respectively, the emulsion prepared with 4% w/w Tween 20 and refined olive oil had a PV value in ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) of 4.8 at the beginning of the study and at the end of the observation time at 40°C, the value evolved to 12.7.

Next, an extensive study of the kinetics and oxidative stability of micro/nano-emulsions based on refined and extra virgin olive oil with emulsifier Tween 20 (proportions of 0%, 2%, 4% and 6% w/w), ratio of aqueous phase 2% w/w and addition of olive oil phenolic compounds (gallic, vanillic and syringic acids at a ratio of 1% w/w in the aqueous phase) was performed, which was framed by determining the physicochemical properties of the prepared micro/nano-emulsions as well as the surface tension of the individual phases.

It was found that the micro/nano-emulsions based on extra virgin olive oil containing 4% w/w Tween 20 showed similar or even superior characteristics to micro/nano-emulsions based on refined olive oil containing 6% w/w Tween 20. The incorporated phenolic compounds of olive oil had excellent surfactant properties, significantly increasing the ESI% of the micro/nano-emulsions. Specifically, vanillic acid proved to be the most effective, followed by gallic and syringic acid. Micro/nano-emulsions based on extra virgin olive oil and 6% w/w emulsifier showed higher MDD values than those with 4% w/w emulsifier. Vanillic acid again proved to be the most effective, followed by gallic and syringic acids (smaller MDD value with extra virgin olive oil, 4% Tween 20 w/w and incorporation of vanillic acid in

the aqueous phase). The PDI values also varied accordingly. The addition of the phenolic olive oil compounds resulted in a significant reduction in turbidity, with vanillic acid being the most effective. The turbidity values ranged from 135 NTU to 2551 NTU and corresponded to the micro/nano-emulsion based on extra virgin olive oil with the addition of vanillic acid and the blank emulsion without the addition of emulsifier and phenolic component, respectively.

Extra virgin olive oil showed a lower surface tension than refined olive oil, which facilitated emulsion preparation. Also, the addition of the emulsifier Tween 20, further reduced the surface tension of the two oils. The addition of the three phenolic compounds of olive oil also reduced the surface tension of the aqueous phase, which confirms their surfactant properties. Gallic acid reduced the surface tension of deionized water by 17.9%, vanillic acid by 18.4%, and syringic acid by 19.7%. From these results, one could expect that syringic acid would be the most effective in stabilizing micro/nano-emulsions compared to the other two phenolic acids examined. However, ESI%, MDD, PDI and turbidity measurements showed that vanillic acid was the most effective followed by gallic acid.

The oxidative stability study in conditions of accelerated oxidation of the above emulsions showed that the rate of change of PV of micro/nano-emulsions based on extra virgin olive oil was significantly lower than the one of the corresponding micro/nano-emulsions based on refined olive oil, due to the antioxidant micro-compounds naturally contained in extra virgin olive oil. The addition of the olive oil phenolic compounds to the aqueous phase significantly reduced the rate of change of PV of the studied micro/nano-emulsions. Specifically, gallic acid ($k(d-1) = 1.2714$) proved to be the most effective, followed by syringic acid ($k(d-1) = 1.3445$) and then vanillic acid ($k(d-1) = 1.3813$). The conclusions of the oxidative stability study based on PV were confirmed by the rapid oxidative stability technique using the Oxitest[®] reactor. As in the PV study, gallic acid (IP (h)= 14.87) proved to be the most effective antioxidant component followed by syringic acid (IP (h)= 14.43) and vanillic acid (IP (h)= 13.66). Finally, the micro/nano-emulsions were studied in terms of the concentration of Total Phenolic Components (TFP) in accelerated oxidation conditions and the results were expressed as mg of gallic acid/Kg of emulsion (mg GAE/kg). At the end of the observation period for the micro/nano-emulsions prepared with extra virgin olive oil, gallic acid (95.1 mg GAE/kg) emerged as the most effective against oxidation followed by syringic acid (77.2 mg GAE/kg) and vanillic acid (61.7 mg GAE/kg). These conclusions are in agreement with the results of the PV study, demonstrating the direct correlation between the concentration of phenolic components and the oxidation of the oil.

Finally, based on the previous conclusions, a study was carried out to develop 2nd degree mathematical polynomial models, using Response Surface Methodology (RSM), to predict the properties of the final

micro/nano-emulsion (MDD, PDI, turbidity and ESI) as a function of the levels of the independent variables (of the ratio of emulsifier:2%, 4%, 6% w/w emulsion and gallic acid: 0%, 0.5%, 1% w/w aqueous phase). The resulting equations were found to be statistically significant with the R^2 correlation coefficient equal to 0.993, 0.968, 0.997 and 0.989 respectively. The properties of micro/nano-emulsions were significantly affected by the ratio of emulsifier and gallic acid. Increasing the emulsifier ratio led to improved micro/nano-emulsions properties up to a ratio of 6% w/w. In addition higher proportions of gallic acid led to an improvement in the properties of the micro/nano-emulsions, verifying the surfactant properties of gallic acid.

The micro/nano-emulsion preparation combinations incorporating gallic acid that can lead to micro/nano-emulsions with the most desirable properties are: 3.14-4.45% w/w Tween 20 and 1% w/w gallic acid for MDD, 2.95-4.56% w/w Tween 20 and 1% w/w gallic acid for PDI, 2.35%-5.21% Tween 20 and 1% w/w gallic acid for turbidity and 3.21-5.25% w/w Tween 20 and 1% w/w gallic acid for ESI.

The results of this research provide information for the design and preparation of optimized n/e micro/nano-emulsions, with integrated bioactive olive oil phenolic compounds characterized by high stability and desirable properties.

Πρόλογος	5
Περίληψη	9
Περιεχόμενα.....	23
Κατάλογος Εικόνων	28
Κατάλογος Διαγραμμάτων	29
Κατάλογος Πινάκων.....	32
Εισαγωγή	35
1. Μικρο/νανο-γαλακτώματα τροφίμων.....	39
1.1 Εισαγωγή	39
1.2 Ταξινόμηση γαλακτωμάτων	40
1.2.1 Τύποι γαλακτωμάτων	40
1.2.2 Μικρο/νανο-γαλακτώματα.....	42
1.3 Συστατικά μικρο/νανο-γαλακτωμάτων τροφίμων.....	47
1.3.1 Λιπαρή φάση	48
1.3.2 Υδατική φάση	49
1.3.3 Γαλακτωματοποιητές.....	49
1.3.4 Συν-επιφανειοδραστικές ουσίες	62
1.3.5 Σταθεροποιητές	63
1.3.6 Άλλα συστατικά	64
1.4 Σχηματισμός μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των σταγονιδίων.....	64
1.4.1 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των σταγονιδίων	64
1.4.2 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	65
1.4.3 Δυνάμεις van der Waals	66
1.4.4 Στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις αλληλοεπικάλυψης	67
1.5 Σχηματισμός και μέθοδοι παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	68
1.5.1 Ο ρόλος του γαλακτωματοποιητή στο σχηματισμό μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	70
1.5.2 Τεχνικές παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	71
1.6 Ιδιότητες μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	86
1.6.1 Μέγεθος σταγονιδίων	86

1.6.2	Φορτίο σταγονιδίων	87
1.6.3	Οπτική Εμφάνιση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	88
1.6.4	Αγωγιμότητα μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	89
1.6.5	Ρεολογικές ιδιότητες μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	89
1.7	Σταθερότητα Γαλακτωμάτων	89
1.7.1	Κολλοειδής σταθερότητα και μηχανισμοί αποσταθεροποίησης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	89
1.7.2	Οξειδωτική σταθερότητα μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	92
1.7.3	Επίδραση των αντιοξειδωτικών στην οξείδωση των λιπιδίων.....	95
1.7.4	Προσδιορισμός οξείδωσης γαλακτωμάτων	99
1.7.5	Συμπεράσματα σχετικά με την οξείδωση των γαλακτωμάτων.....	100
1.8	Μέθοδοι μέτρησης ιδιοτήτων και σταθερότητας μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	101
1.8.1	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	101
1.8.2	Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM).....	101
1.8.3	Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM).....	102
1.8.4	Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	102
1.8.5	ζ-δυναμικό	103
1.8.6	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC).....	104
1.8.7	Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)	104
1.8.8	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός	104
1.8.9	Περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)	105
1.8.10	Σκέδαση ακτίνων Χ μικρής γωνίας (SAXS).....	105
1.8.11	Μέτρηση ρεολογικής συμπεριφοράς.....	105
1.8.12	Δείκτης διάθλασης.....	106
1.9	Εφαρμογές των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	106
1.9.1	Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως συστήματα μικροεγκλεισμού	106
1.9.2	Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως φυσικά συντηρητικά.....	109
1.9.3	Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως ενεργά επικαλυπτικά τροφίμων	111
1.9.4	Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως συστήματα χορήγησης βιοδραστικών συστατικών.....	112
1.9.5	Εφαρμογές των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στην αγορά των τροφίμων	114
1.10	Ασφάλεια των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και νομοθετικό πλαίσιο	115
1.10.1	Ασφάλεια των νανοϋλικών στα τρόφιμα	116
1.10.2	Νομοθετικό πλαίσιο της χρήσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στα τρόφιμα	120
2.	Ελαιόλαδο και φαινολικές ενώσεις ως συστατικά των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	125
2.1.1	Ελαιόλαδο.....	125

2.1.2	Είδη και χαρακτηρισμός του ελαιόλαδου	127
2.1.3	Μέθοδοι προσδιορισμού της οξειδωτικής σταθερότητας του ελαιόλαδου	131
2.1.4	Παρθένο ελαιόλαδο ως λειτουργικό τρόφιμο	136
2.1.5	Σύσταση ελαιόλαδου	137
2.2	Φαινολικές ενώσεις ελαιόλαδου και ενσωμάτωση σε γαλακτώματα	142
2.2.1	Πολυφαινόλες.....	142
2.2.2	Φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο	148
2.2.3	Πολυφαινόλες και οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιόλαδου	150
2.2.4	Αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολών	151
2.2.5	Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών και επίδραση στην ανθρώπινη υγεία	152
2.2.6	Παρασκευή γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο ως φορείς εγκλεισμού πολυφαινολών	153
2.2.7	Επιλεγμένα βιοδραστικά συστατικά	155
3.	Πειραματική Επεξεργασία	165
3.1	Σκοπός	165
3.2	Υλικά, συσκευές και μέσα για την παρασκευή νανογαλα-κτωμάτων	167
3.2.1	Υλικά	167
3.2.2	Συσκευές και μέσα.....	168
3.3	Πειραματική διαδικασία	169
3.3.1	Λήψη δεδομένων για σχεδίαση διαγραμμάτων φάσης.....	169
3.3.2	Παρασκευή γαλακτωμάτων με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας	169
3.3.3	Παρασκευή γαλακτωμάτων με ομογενοποιητή υπερήχων	170
3.3.4	Πειράματα επιταχυμένης οξείδωσης	170
3.4	Αναλύσεις - Μέθοδοι	170
3.4.1	Μέτρηση σταθερότητας	170
3.4.2	Προσδιορισμός μεγέθους σταγονιδίων, διασποράς και ζ-δυναμικού γαλακτώματος 171	
3.4.3	Προσδιορισμός θολότητας	171
3.4.4	Προσδιορισμός ρεολογικής συμπεριφοράς.....	171
3.4.5	Προσδιορισμός δείκτη διάθλασης γαλακτώματος με βάση το ελαιόλαδο	172
3.4.6	Προσδιορισμός χρώματος	172
3.4.7	Μέτρηση Επιφανειακής τάσης	172
3.4.8	Προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίων (Α.Υ.).....	172
3.4.9	Προσδιορισμός ολικών Φαινολικών Συστατικών (ΟΦΣ).....	173
3.4.10	Προσδιορισμός οξειδωτικής σταθερότητας.....	174

3.4.11	Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	175
3.5	Σχεδιασμός πειραμάτων	176
4.	Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	181
4.1	1 ^η σειρά πειραμάτων: Μελέτη της επίδρασης των μεθόδων ομογενοποίησης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο.....	181
4.1.1	Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)	183
4.1.2	Προσδιορισμός Δυναμικής Σκέδασης Φωτός των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	184
4.1.3	Προσδιορισμός δείκτη πολυδιασποράς (PDI).....	185
4.1.4	Προσδιορισμός ζ-δυναμικού της διεπιφάνειας	186
4.1.5	Προσδιορισμός Θολότητας	187
4.1.6	Προσδιορισμός χρώματος μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	188
4.2	2 ^η σειρά πειραμάτων: Μελέτη της επίδρασης του είδους και της αναλογίας γαλακτωματοποιητή στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο.....	190
4.2.1	Διαγράμματα φάσης.....	192
4.2.2	Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)	194
4.2.3	Προσδιορισμός Δυναμικής σκέδασης φωτός	195
4.2.4	Προσδιορισμός Θολότητας	198
4.2.5	Προσδιορισμός Χρώματος.....	199
4.2.6	Προσδιορισμός ρεολογικής συμπεριφοράς.....	200
4.2.7	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)	201
4.2.8	Προσδιορισμός Οξειδωτικής Σταθερότητας	204
4.3	3 ^η σειρά πειραμάτων: Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο και ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου	206
4.3.1	Διαγράμματα φάσης.....	207
4.3.2	Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)	209
4.3.3	Προσδιορισμός δυναμικής σκέδασης φωτός.....	211
4.3.4	Προσδιορισμός Θολότητας	214
4.3.5	Προσδιορισμός Χρώματος.....	216
4.3.6	Προσδιορισμός ρεολογικής συμπεριφοράς.....	217
4.3.7	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)	218
4.3.8	Προσδιορισμός Οξειδωτικής Σταθερότητας	220
4.4	4 ^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση της επίδρασης του ελαίου βάσης στη σταθερότητα και τις ιδιότητες ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	222
4.4.1	Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)	222

4.4.2	Προσδιορισμός δυναμικής σκέδασης φωτός.....	224
4.4.3	Προσδιορισμός Θολότητας	226
4.4.4	Προσδιορισμός Οξειδωτικής Σταθερότητας	227
4.5	5 ^η σειρά πειραμάτων: Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο και εξευγενισμένο ελαιόλαδο με ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου	229
4.5.1	Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)	230
4.5.2	Προσδιορισμός Δυναμικής σκέδασης φωτός	231
4.5.3	Προσδιορισμός Θολότητας	234
4.5.4	Συσχέτιση φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	235
4.5.5	Προσδιορισμός Επιφανειακής τάσης.....	236
4.5.6	Μελέτη οξείδωσης.....	238
4.6	6 ^η σειρά πειραμάτων: Αριστοποίηση σταθερότητας και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με χρήση της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης.....	243
4.6.1	Κεντρικός σχεδιασμός της 6 ^{ης} πειραματικής σειράς	243
4.6.2	Αποτελέσματα	244
4.6.3	Προσαρμογή του μοντέλου	245
4.6.4	Ερμηνεία του μοντέλου επιφανειακής απόκρισης	248
4.6.5	Αριστοποίηση των προβλεπόμενων μοντέλων	249
5.	Συμπεράσματα - Προτάσεις - Προκλήσεις	251
5.1	Συμπεράσματα	251
5.2	Προτάσεις.....	259
5.3	Προκλήσεις.....	260
6.	Βιβλιογραφία	263

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση γαλακτωμάτων μορφής πάνω αριστερά) έλαιο-σε-νερό (ε/ν) – (ο/w), πάνω δεξιά) νερό-σε-έλαιο (ν/ε) – (w/o), κάτω αριστερά) νερό-σε-έλαιο-σε νερό (ν/ε/ν) – (w/o/w) και κάτω δεξιά) έλαιο-σε νερό-σε έλαιο (ε/ν/ε) – (ο/w/o). με μπλε χρώμα συμβολίζεται το νερό, με κίτρινο το έλαιο και με σκούρο μπλε τα μόρια γαλακτωματοποιητή (Moghassemi et al., 2022).	41
Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων αποτελούμενων από έλαιο, νερό, επιφανειοδραστική ουσία και συν-επιφανειοδραστική ουσία (Pieckowski et al., 2022).	43
Εικόνα 1.3 Τα συστατικά των γαλακτωμάτων χωροθετούνται στη λιπαρή φάση, την υδατική φάση και τη διπλοστοιβάδα ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με το εγγύς μικροπεριβάλλον τους (McClements, 2016a).	48
Εικόνα 1.4 Απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού (αριστερά) και της σταθεροποίησης (δεξιά) ενός γαλακτώματος από γαλακτωματοποιητή (McClements, Lu and Grossmann, 2022).	50
Εικόνα 1.5 Τυπικές μορφές κολλοειδών που σχηματίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να εμφανιστούν πιο πολύπλοκες δομές (McClements, 2016a).	52
Εικόνα 1.6 Δομές διαμόρφωσης βιοπολυμερών: τυχαία σπείρα, γραμμική περιτυλιγμένη σπείρα και σφαιρική (κατά σειρά εμφάνισης) (McClements, 2016b).	59
Εικόνα 1.7 Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων τύπων ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων (McClements, 2016a).	65
Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων van der Waals (McClements, 2016a).	66
Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη γαλακτωματοποίηση. Τα σταγονίδια παριστάνονται με λεπτές γραμμές και η επιφανειοδραστική ουσία με πιο παχιές ή διακεκομμένες γραμμές (Tadros, 2013b).	70
Εικόνα 1.10 Ταξινόμηση διαφόρων προσεγγίσεων και τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό μικρο/νανο-γαλακτώματος (Chaudhari, Patel and Kumar, 2023).	72
Εικόνα 1.11 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (McClements, 2016a).	74
Εικόνα 1.12 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποιητή πίεσης (McClements, 2016a).	75
Εικόνα 1.13 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποίησης με υπέρηχους (McClements, 2016a).	77
Εικόνα 1.14 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποίησης με μικρορευστοποιητή (McClements, 2016a).	78

Εικόνα 1.15 Σχηματική απεικόνιση της γαλακτωματοποίησης με τις μεθόδους PIT και PIC (Ohtani and Rasert, 2014).....	80
Εικόνα 1.16 Απεικόνιση του φωτός που διαπερνά ένα μικρο/νανο-γαλάκτωμα ε/ν, δίνοντας διαφανή όψη (Sneha and Kumar, 2022).....	88
Εικόνα 1.17 Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη φυσική αποσταθεροποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (διαχωρισμός φάσης): βαρυτικός διαχωρισμός, κροκίδωση, συνένωση και ωρίμανση Ostwald (Aswathanarayan and Vittal, 2019b).	90
Εικόνα 1.18 Αρχή λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός (Zetasizer) (Ahmad and Nollet, 2021).	103
Εικόνα 2.1: Η ανατομία του καρπού της ελιάς αποκαλύπτει συνήθως έναν σπόρο ωοειδούς σχήματος στον πυρήνα του καρπού (Kiritsakis & Shahidi, 2017).	126
Εικόνα 2.2: Η Veraison είναι μία κρίσιμη περίοδος στη διαδικασία ωρίμανσης, κατά την οποία το χρώμα των ελιών αλλάζει από πράσινο σε μαύρο, περνώντας από διάφορες αποχρώσεις του μωβ και του ροζ (bravoleum, 2023).	127
Εικόνα 2.3: Η διαδικασία εξαγωγής επηρεάζει την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και, κατά συνέπεια, την αντιοξειδωτική του δράση. Το ελαιόλαδο είναι ένα μείγμα εξευγενισμένου και παρθένου ελαιόλαδου (Preedy, 2020).	135
Εικόνα 2.4: Χημική δομή της ελευροπαΐνης (a), της αγλυκόνης (b), της υδροξυτυροσόλης (c), της ελεασίνης (d), της ελαιοκανθάλης (e) (Bucciantini et al., 2021).	148
Εικόνα 2.5: Συντακτικός τύπος του γαλλικού οξέος.....	156
Εικόνα 2.6: Συντακτικός τύπος του βανιλικού οξέος	157
Εικόνα 2.7: Συντακτικός τύπος του συριγγικού οξέος.....	159
Εικόνα 2.8: Συντακτικός τύπος κερσετίνης.....	161
Εικόνα 2.9: Συντακτικός τύπος της απιγενίνης.....	162
Εικόνα 2.10: Συντακτικός τύπος του trans-σινναμικού οξέος.....	163

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 4.1 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στη Μέση Διάμετρο Σταγονιδίων (MDD), (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.	185
Διάγραμμα 4.2 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στο δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.	186

Διάγραμμα 4.3 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	188
Διάγραμμα 4.4. Μερικά τριαδικά διαγράμματα φάσης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ελαιόλαδο - νερό και χημικούς γαλακτωματοποιητές στους 40 °C. Η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά και η συγκέντρωση του νερού από κάτω προς τα πάνω (α. Tween 20, β. Tween 40, γ. Tween 60, δ. Tween 80, ε. Span 20, ζ. Span 80 αντιστοίχως).....	193
Διάγραμμα 4.5 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	196
Διάγραμμα 4.6 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στο Δείκτη Πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	197
Διάγραμμα 4.7 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στο ζ-δυναμικό (mV) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	198
Διάγραμμα 4.8 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στη θολότητα (NTU) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	199
Διάγραμμα 4.9 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στο χρώμα (E) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	200
Διάγραμμα 4.10 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στο ιξώδες (cP) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	201
Διάγραμμα 4.11 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. ...	203
Διάγραμμα 4.12 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (score plot) των δειγμάτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	203
Διάγραμμα 4.13 Ψευδο-τριαδικά διαγράμματα φάσης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξευγενισμένο ελαιόλαδο – νερό –γαλ/τή με 2 διαφορετικούς γαλακτωματοποιητές και 4 φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου στους 40° C. Η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά και η συγκέντρωση του νερού από κάτω προς τα πάνω. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου είναι διαλυμένα στην υδατική φάση σε συγκέντρωση 1% w/w. (α. Tween 20 – νερό, b. Tween 20-κερσετίνη, c. Tween 20-απιγενίνη, d. Tween 20-trans-σινναμικό οξύ, e. Tween 20-γαλλικό οξύ, f. Span 20 – νερό, g. Span 20-κερσετίνη, h. Span 20-απιγενίνη, i. Span 20-trans-σινναμικό οξύ, j. Span 20-γαλλικό οξύ).....	208
Διάγραμμα 4.14 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου	212

Διάγραμμα 4.15 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο Δείκτη Πολυδιασποράς PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών ελαιόλαδου	213
Διάγραμμα 4.16 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο ζ-δυναμικό (mV) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου	214
Διάγραμμα 4.17 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη θολότητα (NTU) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου	215
Διάγραμμα 4.18 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο χρώμα (E) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου	216
Διάγραμμα 4.19 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο ιξώδες (cP) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου	217
Διάγραμμα 4.20 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. ...	219
Διάγραμμα 4.21 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (score plot) των δειγμάτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	219
Διάγραμμα 4.22 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	225
Εικόνα 4.23 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων	226
Διάγραμμα 4.24 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	227
Διάγραμμα 4.25 Μεταβολή τιμής A. Υ (Αριθμού Υπεροξειδίων) του περιεχόμενου ελαίου των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση επί 40 ημέρες στους 40°C	228
Διάγραμμα 4.26 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), την τελευταία ημέρα αποθήκευσης που υποδεικνύει την έκταση του βαρυτικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 25 °C για 2 μήνες (8 εβδομάδες)	231
Διάγραμμα 4.27 Επίδραση της σύστασης γαλακτώματος στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	232
Διάγραμμα 4.28 Επίδραση της σύστασης γαλακτώματος στο Δείκτη Πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	233
Διάγραμμα 4.29 Επίδραση της σύστασης γαλακτώματος στη θολότητα (NTU) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.....	234
Διάγραμμα 4.30 Διερεύνηση της συσχέτισης των δειγμάτων βάσει των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιώντας τη στατιστική μέθοδο ανάλυσης συσταδιοποίησης (Cluster Analysis, Ward's	

method). Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν ως εξής: Ο πρώτος χαρακτήρας αντιστοιχεί στο έλαιο που χρησιμοποιήθηκε ως βάση (E: εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, R: Εξευγενισμένο ελαιόλαδο), ο δεύτερος χαρακτήρας αντιστοιχεί στο φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου που ενσωματώθηκε στην υδατική φάση (B: τυφλό, G: γαλλικό οξύ, V: βανιλικό οξύ, S: συριγγικό οξύ) και ο τρίτος χαρακτήρας αντιστοιχεί στην αναλογία γαλακτωματοποιητή (0: 0%, 2: 2%, 4: 4%, 6: 6%). 236	
Διάγραμμα 4.31 Μεταβολή τιμής Α.Υ. των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ) εκφρασμένη ως mg O ₂ / Kg περιεχόμενου ελαίου. 239	
Διάγραμμα 4.32 Μεταβολή Ολικών Φαινολικών Συστατικών των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ) εκφρασμένη ως mg γαλλικού οξέος/ Kg γαλακτώματος. 241	
Διάγραμμα 4.33 Επίδραση της αναλογίας γαλλικού οξέος και γαλακτωματοποιητή στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (α) MDD (nm) (β) PDI (γ) Θολότητα (NTU) και (δ) ESI (%). 249	

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Σύγκριση τυπικών χαρακτηριστικών των μακρο-, νανο- και μικρο- γαλακτωμάτων όσον αφορά στο μέγεθος και στη μορφή των διεσπαρμένων σωματιδίων, στη σταθερότητα, στις μεθόδους παρασκευής και στο βαθμό πολυδιασποράς των γαλακτωμάτων. 45	
Πίνακας 1.2 Προσεγγιστικές τιμές HLB για τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα επιφανειοδραστικά στη βιομηχανία τροφίμων (McClements, 2016a). 54	
Πίνακας 1.3 Αριθμοί/δείκτες υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας ομάδων για τον υπολογισμό του αριθμού HLB των γαλακτωματοποιητών (McClements, 2016a). 56	
Πίνακας 1.4 Παραδείγματα βιοπολυμερών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Jafari, 2017). 61	
Πίνακας 1.5 Εγκεκριμένες συν-επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Deen, Skovgaard and Pedersen, 2011). 63	
Πίνακας 1.6 Γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (προσαρμοσμένος από Ashaolu, 2021) 83	
Πίνακας 1.7 Παραδείγματα εφαρμογών των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ως φορείς μικροεγκλεισμού για βιοδραστικά συστατικά 108	

Πίνακας 1.8 Σημαντικές πρόσφατες εξελίξεις στις εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων (MEs) και των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ως φυσικά συντηρητικά τροφίμων	109
Πίνακας 1.9 Σημαντικές πρόσφατες εξελίξεις των εφαρμογών μικρογαλακτωμάτων και μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε ενεργές συσκευασίες τροφίμων	111
Πίνακας 1.10 Σημαντικές πρόσφατες εξελίξεις στις εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων και των νανογαλακτωμάτων ως συστήματα χορήγησης βιοδραστικών σε τρόφιμα.	113
Πίνακας 2.1: Ποιοτικές παράμετροι του ελαιόλαδου ανάλογα με την κατηγορία του (τροποποιημένο από ΕΕ 1348/2013)	133
Πίνακας 2.2 Παραδείγματα γαλακτωμάτων ν/ε με βάση το ελαιόλαδο εμπλουτισμένου με πολυφαινόλες.	154
Πίνακας 3.1 Σειρές πειραμάτων	176
Πίνακας 4.1 Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%), που υποδεικνύει τον βαθμό βαρυτικού διαχωρισμού των παρασκευασμένων γαλακτωμάτων κατά την τελευταία ημέρα της αποθήκευσης για 2 μήνες στους 25 °C. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05)	184
Πίνακας 4.2 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στο ζ-δυναμικό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05)	187
Πίνακας 4.3 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στο χρώμα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05)	189
Πίνακας 4.4 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), υποδεικνύοντας την έκταση του βαρυτικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 25 οC για 2 μήνες (8 εβδομάδες). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων.....	194
Πίνακας 4.5 Μεταβολή τιμής Α.Υ. (οξειδωτική σταθερότητα) του περιεχόμενου ελαίου των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση στους 40 °C για 40 ημέρες. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων (max SD=0,18).	204
Πίνακας 4.6 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), υποδεικνύοντας την έκταση του βαρυτικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μήνες (8 εβδομάδες). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων (max SD=0,2).	210

Πίνακας 4.7 Μεταβολή τιμής Α.Υ. (οξειδωτική σταθερότητα) του περιεχόμενου ελαίου των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση επί 40 ημέρες στους 40°C. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων(max SD=0,16).....	220
Πίνακας 4.8 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), υποδεικνύοντας την έκταση του βαρυτικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 25 °C και 40 °C για 6 εβδομάδες (max SD=0,2).....	223
Πίνακας 4.9. Επιφανειακή τάση των επιμέρους φάσεων που περιέχονται στα μελετώμενα μικρο/νανο-γαλακτώματα.....	237
Πίνακας 4.10 Ρυθμός μεταβολής του Α.Υ. (k, d-1) των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05)	240
Πίνακας 4.11 Οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ) εκφρασμένη ως σημείο επαγωγής (IP, h). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (P<0,05).....	242
Πίνακας 4.12 Κεντρικός σχεδιασμός της 6ης πειραματικής σειράς (αριστοποίηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και ενσωμάτωση της υδατικής φάσης με φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου) με χρήση της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης, όπου παρουσιάζονται οι κωδικοποιημένες και οι πραγματικές τιμές των μεταβλητών.	244
Πίνακας 4.13 Αποτελέσματα των προσδιορισμών των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν βάσει του σχεδιασμού RSM: Αναλογία γαλλικού οξέος (X1); Αναλογία γαλ/τή (X2).	245
Πίνακας 4.14 Ανάλυση διακύμανσης των επιφανειακών αποκρίσεων των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με την ενσωμάτωση γαλλικού οξέος.	246
Πίνακας 4.15 Προβλεπόμενες και μετρούμενες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (αποκρίσεων) για τις βέλτιστες παραμέτρους σύστασης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ενσωμάτωση γαλλικού οξέος στην υδατική φάση.....	250

Η γνώση της επιστήμης και της τεχνολογίας των γαλακτωμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις βιομηχανίες των τροφίμων, των λειτουργικών τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών. Πρώτον, πολλά φυσικά και μεταποιημένα τρόφιμα αποτελούνται εν μέρει ή εξ ολοκλήρου από γαλακτώματα ή βρίσκονται σε κατάσταση γαλακτωματοποίησης κατά τη διάρκεια της παραγωγής τους, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος, της μαγιονέζας, του παγωτού, του βουτύρου και της μαργαρίνης. Δεύτερον, τα γαλακτώματα χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο ως συστήματα χορήγησης λειτουργικών συστατικών τροφίμων, για την παρασκευή προϊόντων διατροφής που προάγουν την ανθρώπινη υγεία.

Οι σύγχρονες καταναλωτικές τάσεις απαιτούν την ενίσχυση των τροφίμων με λειτουργικά συστατικά (όπως οι αντιοξειδωτικές ουσίες και οι βιταμίνες) και την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών (όπως κορεσμένα λίπη, ζάχαρη και αλάτι). Επιπλέον, οι ίδιες τάσεις οδηγούν σε παραγωγή τροφίμων με φυσικό χαρακτήρα, «βιολογικά», και με μειωμένη κατά το δυνατό την προσθήκη συνθετικών πρόσθετων (όπως τεχνητές αντιμικροβιακές, χρωστικές και αρωματικές ουσίες). Προκειμένου να επιτευχθούν αυτοί οι στόχοι, δημιουργήθηκε μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη τροφίμων με ενσωματωμένα βιοενεργά συστατικά, όπως οι βιταμίνες, φυσικά αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά συστατικά, φυσικές χρωστικές κ.α.. Η νανοτεχνολογία αποτελεί βασική τεχνολογία στην ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων χορήγησης καθώς ο σχεδιασμός της δομής των τροφίμων στη νανοκλίμακα επιτρέπει την τροποποίηση των χαρακτηριστικών τους σε μακροσκοπική κλίμακα, συμπεριλαμβανομένων των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της υφής, των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, της διάρκειας αποθήκευσης και της λειτουργικότητάς τους.

Νανοσωματιδιακές δομές όπως τα μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα νερού-σε-έλαιο (ν/ε) θεωρούνται χρήσιμα εργαλεία με μεγάλη δυναμική στον τομέα των τροφίμων για τη χορήγηση λιπόφιλων λειτουργικών συστατικών, καθώς λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των μικυλλίων που περιέχουν αποτελούν εξαιρετικούς φορείς χορήγησης, ενώ χαρακτηρίζονται από υψηλή οπτική καθαρότητα και κινητική σταθερότητα. Ωστόσο, η επίτευξη κατάλληλης δομής και συνθηκών παρασκευής σταθερών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων τύπου νερό-σε-έλαιο (ν/ε), με κινητική και οξειδωτική σταθερότητα, συνιστά πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων. Τα ν/ε μικρο- και νανο-γαλακτώματα, παρουσιάζουν ιδιαίτερη δυσκολία στην παρασκευή τους λόγω της υψηλής κινητικότητας των διασπαρμένων υδατικών κατά βάση σωματιδίων που οδηγούν σε φαινόμενα συσσωμάτωσης, συνάθροισης, αποκορύφωσης ή καταβύθισης.

Για να υπερκεραστούν αυτά τα εμπόδια, προστίθενται συνήθως χημικοί γαλακτωματοποιητικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες, ώστε να αυξηθεί η διάρκεια ζωής των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Αυτά τα συμβατικά επιφανειοδραστικά και αντιοξειδωτικά συστατικά, παρά το γεγονός ότι είναι αποτελεσματικά, όσον αφορά το κόστος και τη σταθερότητα των παραγόμενων τροφίμων, τείνουν να αντικαθίστανται τελευταία από φυσικές ουσίες λόγω της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σε θέματα υγείας και ασφάλειας. Οι σχετικές μελέτες επικεντρώνονται κατά κύριο λόγο σε ορισμένες ενδογενείς βιοενεργές ενώσεις που περιέχονται στα ακατέργαστα έλαια και έχουν πολικό ή και αμφιφιλικό χαρακτήρα. Πιο συγκεκριμένα, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί σε μικρο-συστατικά που περιέχονται στο παρθένο ελαιόλαδο και ιδιαίτερα στις πολυφαινόλες του. Οι πολυφαινόλες είναι γνωστές ουσίες που συχνά προστίθενται στα τρόφιμα λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί ότι δείγματα ελαιόλαδου που λαμβάνονται απευθείας ή αμέσως μετά τη διαδικασία μηχανικής ανάκτησης, χωρίς περαιτέρω διήθηση, ενδέχεται να περιέχουν μικρά εναιωρήματα νερού και σωματιδίων. Δεδομένου ότι το νερό είναι πρακτικώς μη αναμίξιμο με έλαια, μπορεί να θεωρηθεί ότι αυτά τα μικροσταγονίδια νερού σταθεροποιούνται ως κolloειδείς δομές από δευτερεύουσες ενδογενείς αμφίφιλες ουσίες που διαθέτουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Μελέτες που προσπαθούν να προσδιορίσουν τους μηχανισμούς σχηματισμού αυτών των φυσικών κolloειδών συστημάτων επιβεβαίωσαν ότι ορισμένες πολυφαινόλες του ελαιόλαδου εμφανίζουν τόσο επιφανειοδραστικές όσο και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Όμως, εξακολουθούν να υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες που έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων αυτών των ενώσεων σε μοντέλα ή σε πραγματικά συστήματα τροφίμων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της δυνατότητας και των συνθηκών επίτευξης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο (ν/ε), καθώς και της δυνατότητας ενσωμάτωσης ενδογενών συστατικών του ελαιόλαδου σε αυτά, επιδιώκοντας ταυτόχρονα τη διερεύνηση και την αναπαραγωγή των κolloειδών σχηματισμών που από τη φύση του περιέχει το παρθένο ελαιόλαδο πρόσφατης παραγωγής.

Το ελαιόλαδο επιλέχθηκε ως κύριο συστατικό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας και της μεγάλης σταθερότητάς του στην οξείδωση. Πλεονεκτεί σε σύγκριση με άλλα φυτικά έλαια, καθώς παραλαμβάνεται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικές μεθόδους, με αποτέλεσμα να διατηρούνται τα μοναδικά οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και να διασώζονται τα πολύτιμα συστατικά του. Έτσι με τις φυσικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες ορισμένων εκ των συστατικών του, σε συνδυασμό με την ισορροπημένη σύνθεση των λιπαρών του οξέων και το ιδιαίτερο βιταμινικό του περιεχόμενο (τοκοφερόλες, καροτένια), το ελαιόλαδο και ειδικά το παρθένο, έχει θετική επίδραση στην υγεία και ως εκ τούτου θεωρείται φυσικό λειτουργικό τρόφιμο. Επιπλέον το ελαιόλαδο επιλέχθηκε ως βάση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων καθώς αποτελεί σημαντικό εθνικό

προϊόν, και επομένως είναι χρήσιμο η ελληνική έρευνα και η βιομηχανία τροφίμων να αναπτύσσουν μελέτες παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με αυτό. Τα φαινορικά συστατικά του ελαιόλαδου που εξετάστηκαν, επιλέχθηκαν τόσο για τις βιοδραστικές τους ιδιότητες, που τα καθιστούν ωφέλιμα για την ανθρώπινη υγεία, όσο και για τις αμφιφιλικές τους ιδιότητες με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής γαλακτωματοποιητικής τους δράσης.

Μικρο/νανο- γαλακτώματα τροφίμων

1.1 Εισαγωγή

Τα γαλακτώματα αποτελούνται από δύο μη αλληλοδιαλυόμενα (μη αναμίξιμα) υγρά συστατικά (φάσεις), που βρίσκονται υπό τη μορφή διεσπαρμένων σφαιρικών σταγονιδίων του ενός συστατικού στο άλλο, κατά τρόπο που να μην δημιουργείται διαχωρισμός των φάσεων. Στη βιομηχανία τροφίμων, τα δύο μη αναμίξιμα υγρά συνήθως είναι: έλαιο και νερό (McClements, 2016a).

Τα συμβατικά (μακρο-) γαλακτώματα είναι εγγενώς θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα, καθώς η διεπιφάνεια μεταξύ του ελαίου και του νερού είναι ασταθής και συνεπώς καταρρέει σύντομα. Ωστόσο, τα γαλακτώματα τροφίμων συχνά απαιτείται να παραμένουν σταθερά για παρατεταμένες περιόδους, έχοντας διάρκεια ζωής που συνήθως φτάνει αρκετούς μήνες ή και περισσότερο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται κατ' ανάγκη διάφορες ουσίες για τη διαμόρφωση (σηματισμό) και σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων και την απόκτηση συγκεκριμένων ιδιοτήτων.

Η συμπεριφορά των γαλακτωμάτων τροφίμων καθορίζεται κυρίως από τα τρία βασικά συστατικά τους: το έλαιο (λιπαρή φάση), το νερό (υδατική φάση) και το διεπιφανειακό υλικό που περιβάλλει τα σταγονίδια και χρησιμοποιείται με σκοπό τη σταθεροποίηση του συστήματος. Ωστόσο, τα περισσότερα γαλακτώματα τροφίμων είναι πιο σύνθετα από ότι τα απλά συστήματα τριών συστατικών που ήδη αναφέρθηκαν παραπάνω. Η υδατική φάση μπορεί να περιέχει ποικιλία υδατοδιαλυτών συστατικών, μεταξύ των οποίων σάκχαρα, άλατα, οξέα, βάσεις, αλκοόλες, επιφανειοδραστικές ουσίες, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Η λιπαρή φάση περιέχει συνήθως ένα σύνθετο μίγμα λιποδιαλυτών συστατικών, όπως τριγλυκερίδια, μονο-γλυκερίδια, δι-γλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, στερόλες και βιταμίνες. Η διεπιφάνεια μπορεί να αποτελείται από πρωτεΐνες ή γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους όπως μονο-γλυκερίδια, εστέρες λιπαρών οξέων, φωσφολιπίδια ή μίγματα τέτοιων συστατικών (Ahmad and Leo M.L. Nollet, 2021).

Ακόμη, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα γαλακτώματα που προορίζονται ως συστατικά για την παραγωγή πιο σύνθετων τροφίμων υποβάλλονται συνήθως σε διεργασίες με έντονες μεταβολές θερμοκρασίας και πίεσης, όπως και μηχανικής ανάδευσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, της χρήσης τους και γενικότερα του χειρισμού τους, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές

στις ιδιότητές τους. Ως εκ τούτου, θεωρείται αναγκαίος ο έλεγχος των παραγόντων που επηρεάζουν τη μορφολογία ενός γαλακτώματος, ώστε να είναι δυνατός ο σχεδιασμός γαλακτωμάτων με προκαθορισμένες ιδιότητες και η πρόβλεψη της διάρκειας ζωής τους (Sjöblom, 2001).

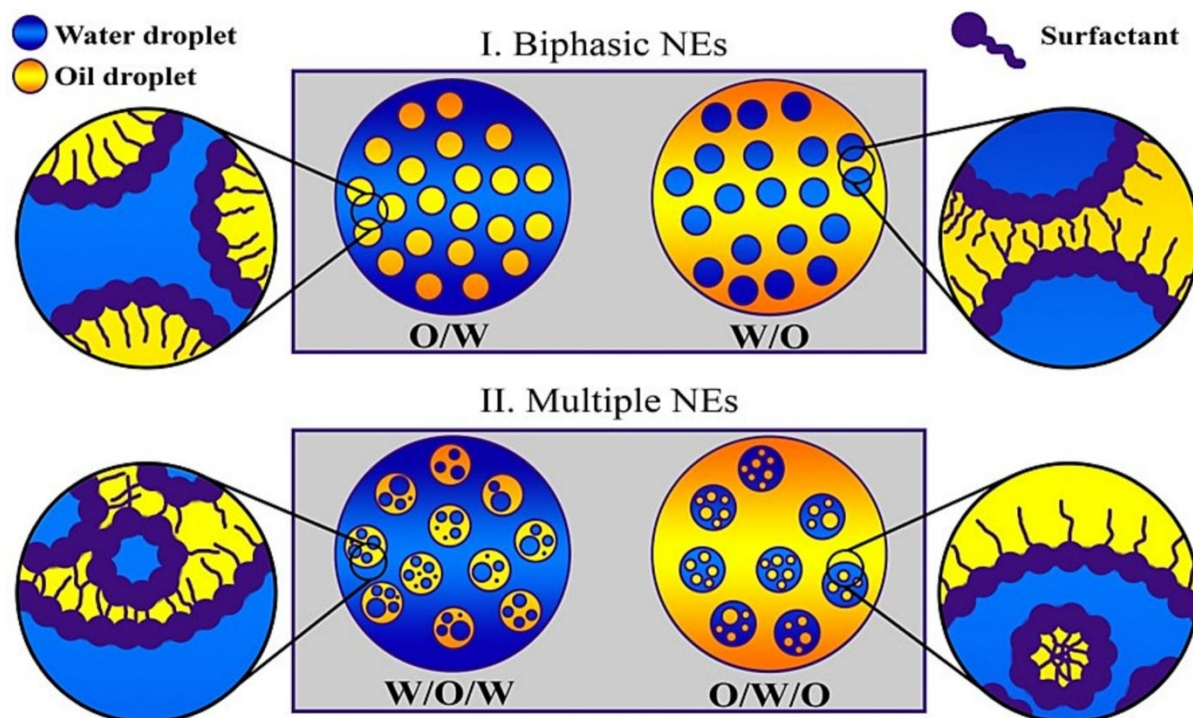
Επιπλέον, τελευταία, οι καταναλωτές έχουν δείξει μία προτίμηση για ελάχιστα επεξεργασμένα προϊόντα με πιο φυσικά πρόσθετα και συστατικά που αντιπροσωπεύουν οφέλη για την υγεία, όπως ένζυμα, πρεβιοτικά, προβιοτικά, αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά που εμφανίζονται φυσικά ως διαλυτά εκχυλίσματα ή αιθέρια έλαια που λαμβάνονται γενικώς από φυτά. Η νανοτεχνολογία προσφέρει λύση σε αυτά τα αιτήματα μέσω της τεχνολογίας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που μπορεί να οδηγήσει στη βελτίωση της λειτουργικότητας διαφόρων συστατικών, τροποποιώντας τη διαλυτότητά τους, μειώνοντας τη συγκέντρωση των ουσιών και ενισχύοντας τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητά τους ή ακόμη και ελέγχοντας την απελευθέρωσή τους (Jafari, 2020).

1.2 Ταξινόμηση γαλακτωμάτων

1.2.1 Τύποι γαλακτωμάτων

Τα γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την κατανομή της υδατικής και της λιπαρής φάσης. Συστήματα που αποτελούνται από σταγονίδια ελαίου διασκορπισμένα σε μία συνεχή υδατική φάση ονομάζονται γαλακτώματα ελαίου-σε-νερό ή ε/ν (oil/water – o/w) (όπως π.χ. γάλα, κρέμα γάλακτος, μαγιονέζα, ποτά, σούπες και σάλτσες). Τα γαλακτώματα ε/ν είναι κατά βάση ρευστά, αν και μπορεί να περιέχουν κρυσταλλική φάση λιπαρού. Η σταθερότητα αυτών των γαλακτωμάτων μπορεί να διατηρηθεί με προσθήκη γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους, πρωτεϊνών, πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (μικύλλια καζεΐνης, λεκιθίνη κ.α.) ή μίγματα αυτών (Marzuki, Wahab and Hamid, 2019).

Από την άλλη πλευρά, τα συστήματα που αποτελούνται από σταγονίδια νερού διασκορπισμένα σε συνεχή φάση ελαίου ονομάζονται γαλακτώματα νερού-σε-έλαιο ή ν/ε (water/oil – w/o) (όπως π.χ. μαργαρίνη και βούτυρο). Η σταθερότητά τους εξαρτάται περισσότερο από τις ιδιότητες της λιπαρής ύλης και των επιφανειοδραστικών συστατικών, παρά από τις ιδιότητες της υδατικής φάσης. Σημαντικοί παράγοντες για τα γαλακτώματα αυτά είναι η κρυσταλλικότητα της ελαιώδους φάσης, η προσρόφηση του γαλακτωματοποιητή στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων καθώς και η παρουσία τυχόν παραγόντων που αυξάνουν το ιξώδες της υδατικής φάσης στα σταγονίδια (Najan, 2023).



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση γαλακτωμάτων μορφής πάνω αριστερά) έλαιο-σε-νερό (ε/ν) –(o/w), πάνω δεξιά) νερό-σε-έλαιο (ν/ε) – (w/o), κάτω αριστερά) νερό-σε-έλαιο-σε νερό (ν/ε/ν) – (w/o/w) και κάτω δεξιά) έλαιο-σε νερό-σε έλαιο (ε/ν/ε) – (o/w/o). με μπλε χρώμα συμβολίζεται το νερό, με κίτρινο το έλαιο και με σκούρο μπλε τα μόρια γαλακτωματοποιητή (Moghassemi et al., 2022).

Σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατόν να παρασκευαστούν πολλαπλά ή σύνθετα γαλακτώματα όπως γαλακτώματα νερό-σε έλαιο-σε-νερό (ν/ε/ν ή w/o/w) και έλαιο-σε νερό-σε έλαιο (ε/ν/ε ή o/w/o), παρουσία κατάλληλων επιφανειοδραστικών ουσιών. Τα πολλαπλά γαλακτώματα είναι πολύπλοκα συστήματα, στα οποία συνυπάρχουν γαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (ε/ν) και νερού-σε-έλαιο (ν/ε), όπου τα σταγονίδια της διεσπαρμένης σε αυτά φάσης περιέχουν ακόμη μικρότερα διεσπαρμένα σταγονίδια (Ding *et al.*, 2018). Τα πολλαπλά γαλακτώματα παρουσιάζουν, ανά περίπτωση, πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών γαλακτωμάτων και έχουν βρει διάφορες εφαρμογές στη βιομηχανία, κατά κύριο λόγο ως μέσα μικροεγκλεισμού για προστασία ευαλλοίωτων συστατικών όπως σε τρόφιμα (βιοδραστικά και αντιοξειδωτικά συστατικά), φάρμακα (φορείς για αντικαρκινικούς παράγοντες, ορμόνες, στεροειδή κτλ.), καλλυντικά (παρασκευή κρεμών με εύκολη εφαρμογή και εγκλεισμένα δραστικά συστατικά) και σε άλλες βιομηχανικές χρήσεις (Pricharan and Klinkesorn, 2014; Muschiolik and Dickinson, 2017; Evageliou, Panagoroulou and Mandala, 2019).

Παραδείγματα εφαρμογών είναι ο μικροεγκλεισμός βιοδραστικών όπως η κερκετίνη, ο σίδηρος (Chouaibi *et al.*, 2019; Ilyasoglu Buyukkestelli and El, 2019), πεπτίδια (Ying *et al.*, 2021), επιγαλλοκατεχίνη (Evageliou, Panagoroulou and Mandala, 2019) κ.λπ. Παράλληλα τα διπλά γαλακτώματα έχουν

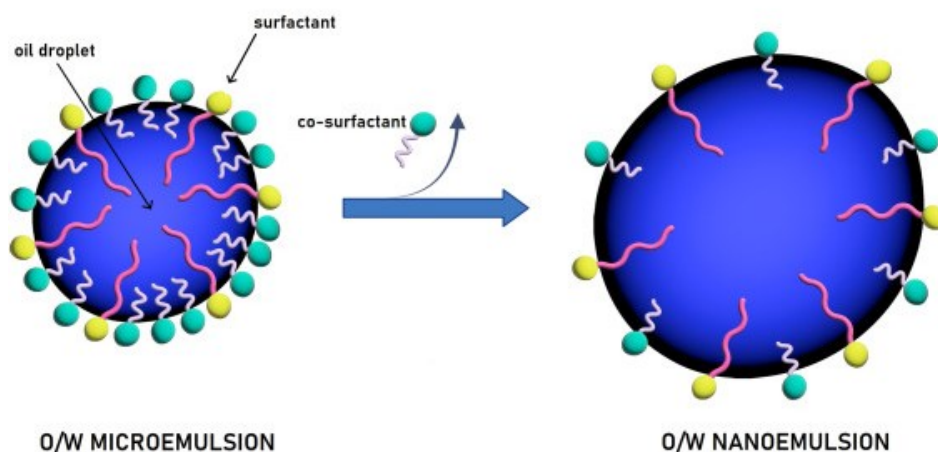
χρησιμοποιηθεί και για την ανάπτυξη προϊόντων με μειωμένα λιπαρά (Eisinaite *et al.*, 2017) και χαμηλής σακχαρόζης (Ilyasoglu Buyukkestelli and El, 2021), γεγονός που ανοίγει νέους ορίζοντες για την ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων. Πρόσφατα, η εφαρμογή διπλών γαλακτωμάτων έχει επίσης εισαχθεί στη φαρμακοβιομηχανία για ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων (Lagrecia *et al.*, 2020). Ωστόσο, η σταθερότητα αυτών των αναπτυγμένων γαλακτωμάτων περιορίζει την εμπορική τους χρήση. Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για τον μικροεγκλεισμό διαφόρων θρεπτικών συστατικών μέσω διπλών γαλακτωμάτων. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η διπλή γαλακτωματοποίηση είναι μία αποτελεσματική διαδικασία γαλακτωματοποίησης για την παρασκευή ποικίλων προϊόντων τροφίμων. Ωστόσο, οι προκαταρκτικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η μακροπρόθεσμη σταθερότητα των διπλών γαλακτωμάτων εξακολουθεί να είναι ένα κρίσιμο ζήτημα που περιορίζει τη χρήση τους σε βιομηχανική κλίμακα. Ως αποτέλεσμα, θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες για την ανάπτυξη νέων τρόπων βελτίωσης της ικανότητας και της σταθερότητας των διπλών γαλακτωμάτων για εμπορική επεξεργασία (Kumar *et al.*, 2022).

1.2.2 Μικρο/νανο-γαλακτώματα

Άλλη μία βασική διάκριση των γαλακτωμάτων γίνεται με βάση τη θερμοδυναμική τους σταθερότητα και το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης. Σε κάποια τρόφιμα είναι επιθυμητό να παρασκευάζονται κολλοειδείς διασπορές που περιέχουν πολύ μικρά σωματίδια νανοκλίμακας ($d < 500$ nm) καθώς πλεονεκτούν σχετικά έναντι των συμβατικών μακρο-γαλακτωμάτων (συνήθως $d > 1\mu\text{m}$). Πρώτον, διότι αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα όσον αφορά στη συσσωμάτωση των σωματιδίων και στο βαρυτικό διαχωρισμό. Δεύτερον, τα διεσπαρμένα σωματίδια, λόγω του μικρού μεγέθους τους, προκαλούν περιορισμένη σκέδαση του φωτός, οπότε είναι κατάλληλα για ενσωμάτωση σε προϊόντα που λόγω σχεδιασμού πρέπει να είναι οπτικώς διαυγή ή ελαφρώς θολά. Τρίτον, μπορούν να σχεδιαστούν με τέτοιο τρόπο, ώστε να έχουν συγκεκριμένες ρεολογικές ιδιότητες, π.χ. χαρακτηριστικά υψηλού ιξώδους ή πηκτής. Τέταρτον, μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα ορισμένων βιοδραστικών ουσιών εγκλεισμένων εντός της εσωτερικής φάσης (Anton and Vandamme, 2011).

Οι δύο συνηθέστεροι τύποι κολλοειδών διασπορών που περιέχουν σωματίδια διαμέτρου 0-500 nm είναι τα «μικρογαλακτώματα» και τα «νανογαλακτώματα». Υπάρχουν πολλές δομικές ομοιότητες μεταξύ των δύο αυτών τύπων κολλοειδών διασπορών όπως επίσης και μερικές σημαντικές διαφορές. Για το λόγο αυτό δικαιολογείται η μεγάλη σύγχυση σχετικά με την ακριβή φύση των διαφορετικών συστημάτων και την τυχόν εσφαλμένη ταξινόμηση των κολλοειδών διασπορών που αναφέρεται στην επιστημονική βιβλιογραφία (Rao and McClements, 2012; Jafari, 2019).

Ο κύριος λόγος, ωστόσο, για τη σύγχυση ανάμεσα στα μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα οφείλεται στα προθέματα που χρησιμοποιούνται για τον ορισμό τους. Ο όρος «μικρο-» αντιστοιχεί συνήθως σε μεγέθη 10^{-6} , ενώ ο όρος «νανο-» σε 10^{-9} , σύμφωνα με τον οποίο τα νανογαλακτώματα θα έπρεπε να περιέχουν μικρότερα σταγονίδια από τα μικρογαλακτώματα. Στην πράξη, όμως, συμβαίνει το αντίθετο - τα σταγονίδια σε ένα μικρογαλάκτωμα είναι μικρότερα από τα αντίστοιχα σε ένα νανογαλάκτωμα. Ο λόγος της συγκεκριμένης (ασαφούς) ορολογίας είναι απόρροια της ιστορικής εξέλιξης του πεδίου της επιστήμης των γαλακτωμάτων. Τα μικρογαλακτώματα ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στις αρχές του 1940 από τους Hoar και Schulman (Hoar and Schulman, 1943), ενώ ο όρος «νανογαλάκτωμα» εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1993 από τους Nakajima *et al.* (Nakajima, H., Tomomasa, S., Okabe, 1993). Κατά συνέπεια, ο όρος «μικρογαλάκτωμα» είχε καθιερωθεί στο χώρο της επιστήμης των κolloειδών αρκετά πριν την εισαγωγή του όρου «νανογαλάκτωμα». Πράγματι, ο όρος «νανογαλάκτωμα» έχει γίνει δημοφιλής κατά τα τελευταία 10 χρόνια, γεγονός που μπορεί εν μέρει τουλάχιστον να αποδοθεί στο αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον τομέα της νανοτεχνολογίας (Rao and McClements, 2011b).



Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων αποτελούμενων από έλαιο, νερό, επιφανειοδραστική ουσία και συν-επιφανειοδραστική ουσία (Pieckowski *et al.*, 2022).

Επομένως είναι σημαντικό να προσδιορίζεται επακριβώς το είδος της προς μελέτη κolloειδούς διασποράς, καθώς είναι καθοριστικό για τις μεθόδους που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή, καθώς και για τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα και τις φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες αυτής (McClements, 2012).

1.2.2.1 Μικρογαλακτώματα

Τα μικρογαλακτώματα, είναι θερμοδυναμικά σταθερά διαυγή ισοτροπικά διαλύματα με μέγεθος σταγονιδίων που κυμαίνεται από 5 έως 100 nm τα οποία προκύπτουν από την αυθόρμητη αναδιάταξη των υδρόφοβων ή υδρόφιλων τμημάτων των επιφανειοδραστικών μορίων. Έχουν την τάση, επιπλέον, να επαναγαλακτωματοποιούνται αυθόρμητως σε περίπτωση διαχωρισμού, ενώ παρέχουν τη μέγιστη επιφάνεια αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο νερό και τη λιπαρή φάση (Lin *et al.*, 2018).

Μπορούν να σχηματίσουν μία, δύο, τρεις ή περισσότερες χωριστές (διακριτές) φάσεις οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους και μπορούν να εναλλάσσονται αντιστρεπτά μεταξύ τους (bicontinuous). Οι εν λόγω φάσεις μπορεί να έχουν ως βάση νερό ή έλαιο ανάλογα με τις συγκεντρώσεις, τη φύση και τις διευθετήσεις των υπαρχόντων μορίων. Τα μόρια των προστιθέμενων γαλακτωματοποιητών σε ένα μικρογαλάκτωμα ε/ν οργανώνονται έτσι, ώστε τα μη πολικά άκρα τους να συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας έναν υδρόφοβο πυρήνα, μειώνοντας έτσι τη θερμοδυναμικά επιβαρυνόμενη επιφάνεια επαφής μεταξύ μη πολικών ομάδων και νερού. Αντίστοιχα, στα μικρογαλακτώματα ν/ε τα πολικά άκρα των επιφανειοδραστικών συστατικών συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας έναν υδρόφιλο πυρήνα. Οι εσωτερικές δομές που σχηματίζονται μπορεί να είναι σφαιροειδείς (π.χ. μικύλλια ή αναστροφή μικύλλια), κυλινδρικού τύπου (όπως μικύλλια ράβδου ή μικρών αγγείων), επίπεδες (π.χ., ελασματοειδείς δομές) ή πιο σπάνια σπογγώδεις (π.χ. ασυνεχείς) δομές (Rao and McClements, 2011b).

Για τη μελέτη τους και την ακριβή ταυτοποίηση των σχηματιζόμενων δομών εντός ενός συστήματος μικρογαλακτώματος υπό ορισμένες συνθήκες απαιτούνται κατάλληλες τεχνικές και αναλυτικές μέθοδοι, όπως είναι η μικροσκοπία (π.χ. ηλεκτρονικό μικροσκόπιο), οι μέθοδοι σκέδασης (π.χ. φωτός, ακτίνων X ή νετρονίων), η ηλεκτρική αγωγιμότητα, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός και η ρεολογία (McClements, 2019).

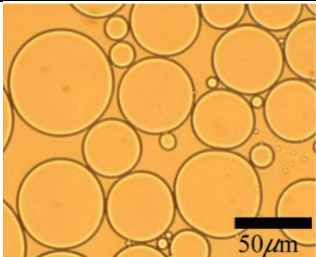
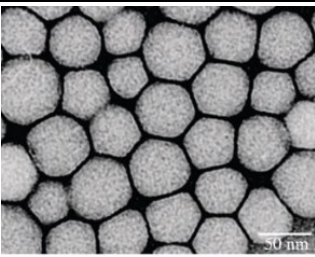
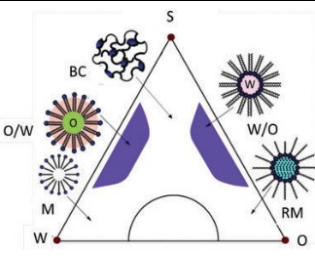
Τα μικρογαλακτώματα έχουν πολυάριθμες εφαρμογές σε ευρύ φάσμα τομέων, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων των φαρμάκων, των καλλυντικών της πετρελαϊκής βιομηχανίας, ενώ αναφέρονται συνεχώς και νέες εφαρμογές. Μπορούν να λειτουργήσουν ως μικροαντιδραστήρες για τη μεταφορά αρωμάτων στα τρόφιμα, ως μέσο διαλυτοποίησης μη διαλυτών συστατικών στη συνεχή φάση και ως σύστημα διανομής για θρεπτικά συστατικά, και αρωματικές και χρωστικές ουσίες στα τρόφιμα (Lin *et al.*, 2018).

Τα μικρογαλακτώματα παρασκευάζονται κατά βάση με μεθόδους χαμηλής ενέργειας όπως η αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση, η αναστροφή φάσης λόγω θερμοκρασίας και η αναστροφή φάσης λόγω σύνθεσης. Αυτές οι μεθοδολογίες βασίζονται στον αυθόρμητο σχηματισμό σταγονιδίων στη μεμβράνη διεπαφής του ελαίου και της υδατικής φάσης και βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη φύση των

επιφανειοδραστικών ουσιών συμπεριλαμβανομένης της διαλυτότητάς τους, της υδρόφιλης-λιποφιλικής ισορροπίας (HLB) και της μοριακής τους γεωμετρίας (Garavand *et al.*, 2021).

Για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων απαιτείται λιγότερη ενέργεια σε σχέση με τα νανογαλακτώματα. Ωστόσο, απαιτείται η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης επιφανειοδραστικών συστατικών, γεγονός που αποτελεί και τον κύριο περιοριστικό παράγοντα για την ευρύτερη εφαρμογή των μικρογαλακτωμάτων στα τρόφιμα. Πολλές επιφανειοδραστικές ουσίες είναι ακατάλληλες για χρήση ως συστατικά τροφίμων, ενώ άλλες μπορούν να προστεθούν μόνο σε χαμηλές αναλογίες για λόγους πρακτικούς, αισθητικούς ή/και νομοθετικών απαιτήσεων. Επίσης λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των σταγονιδίων τους δεν είναι δυνατός ο εγκλεισμός μεγαλομοριακών ουσιών (McClements, 2012).

*Πίνακας 1.1 Σύγκριση τυπικών χαρακτηριστικών των μακρο-, νανο- και μικρο- γαλακτωμάτων όσον αφορά στο μέγεθος και στη μορφή των διεσπαρμένων σωματιδίων, στη σταθερότητα, στις μεθόδους παρασκευής και στο βαθμό πολυδιασποράς των γαλακτωμάτων (Gupta *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2021).*

Κατηγορία γαλακτώματος	Μακρογαλάκτωμα	Νανογαλάκτωμα	Μικρογαλάκτωμα
Απεικόνιση			
Διάμετρος διεσπαρμένων σταγονιδίων	>1-100 μm	20-500 nm	1-100 nm
Μορφή διεσπαρμένων σταγονιδίων	Σφαιρικό	Σφαιρικό	Σφαιρικό, ελασματοειδείς δομές
Σταθερότητα	Θερμοδυναμικά μη σταθερό - Περιορισμένη κινητική σταθερότητα	Θερμοδυναμικά μη σταθερό, Κινητική σταθερότητα	Θερμοδυναμική και κινητική σταθερότητα
Συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή	Σχετικά χαμηλή	Μέτρια (<10%)	Υψηλή (10-20%)
Βαθμός πολυδιασποράς	>40%	<10-20%	<10%

Εμφάνιση	Θολή	Διαυγής ή σχεδόν διαυγής	Διαυγής
Μέθοδος παρασκευής	Υψηλής και χαμηλής ενέργειας	Υψηλής και χαμηλής ενέργειας	Χαμηλής ενέργειας
Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH	Σταθερό έναντι μεταβολών της θερμοκρασίας και του pH	Σταθερό έναντι μεταβολών της θερμοκρασίας και του pH	Ευαίσθητο σε αλλαγές της θερμοκρασίας και του pH

1.2.2.2 Νανογαλακτώματα

Τα νανογαλακτώματα μπορούν να θεωρηθούν ως συμβατικά γαλακτώματα με πολύ μικρό μέγεθος διεσπαρμένων σωματιδίων. Μπορεί να είναι τύπου ε/ν (o/w) ή και ν/ε (w/o), ανάλογα με το αν η λιπαρή φάση βρίσκεται διεσπαρμένη σε συνεχή φάση νερού ή αντιστρόφως. Τα νανογαλακτώματα ορίζονται ως οι θερμοδυναμικά ασταθείς κολλοειδείς διασπορές, αποτελούμενες από δύο μη αλληλοδιαλυόμενα υγρά, με το ένα εξ αυτών να διασκορπίζεται στο δεύτερο ως μικρά σφαιρικά σταγονίδια ($d < 500 \text{ nm}$) (Gupta *et al.*, 2016; Dasgupta and Ranjan, 2018a). Άλλοι ερευνητές προτείνουν ότι τα νανογαλακτώματα μπορεί να έχουν μέγεθος σταγονιδίων μεταξύ 10-100 nm (Pathak, 2017). Η Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) έχει ορίσει τα νανογαλακτώματα ως μία διασπορά αποτελούμενη από νερό, έλαιο και επιφανειοδραστικό/α που αποτελείται από ένα ισοτροπικό σύστημα με διάμετρο διεσπαρμένης περιοχής στη νανοκλίμακα με χρήση μηχανικών δυνάμεων (Marzuki, Wahab and Hamid, 2019)

Τα νανογαλακτώματα εμφανισιακά, είναι διαυγή έως γαλακτώδη ανάλογα με το μέγεθος των διασκορπιζόμενων σταγονιδίων και τη διαφορά των δεικτών διάθλασης μεταξύ συνεχούς και διεσπαρμένης φάσης. Το ορατό φως, διερχόμενο στη δομή των γαλακτωμάτων, με επανειλημμένες διελεύσεις του μέσα από τη συνεχή φάση και τα σταγονίδια, υπόκειται σε πολλαπλή διάθλαση οφειλόμενη στη διαφορά των δεικτών διάθλασης και στην ανάκλαση στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων. Το αποτέλεσμα είναι μερική ή ολική σκέδαση του φωτός. Όταν όμως τα διεσπαρμένα σταγονίδια έχουν μικρό μέγεθος, πολύ μικρότερο των μηκών κύματος του διερχομένου φωτός, η διάθλαση περιορίζεται ή αναστέλλεται και το γαλάκτωμα εμφανίζεται διαυγές. Αυτό ακριβώς συμβαίνει με τα μικρο- και τα νανο - γαλακτώματα (Chavda, 2017).

Θεωρητικά, τα νανογαλακτώματα θα μπορούσαν να σχηματιστούν από απλή ανάμιξη ελαίου και νερού χωρίς τη χρήση επιφανειοδραστικού συστατικού. Στην πράξη όμως, αυτό το σύστημα θα ήταν εξαιρετικά ασταθές, οπότε απαιτείται η προσθήκη μίας επιφανειοδραστικής ουσίας προκειμένου να διευκολυνθεί ο σχηματισμός του νανογαλακτώματος και να εξασφαλιστεί η κινητική του σταθερότητα κατά την αποθήκευση. Μερικές φορές χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός επιφανειοδραστικών

ουσιών για τον σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των νανογαλακτωμάτων (Rao and McClements, 2011a).

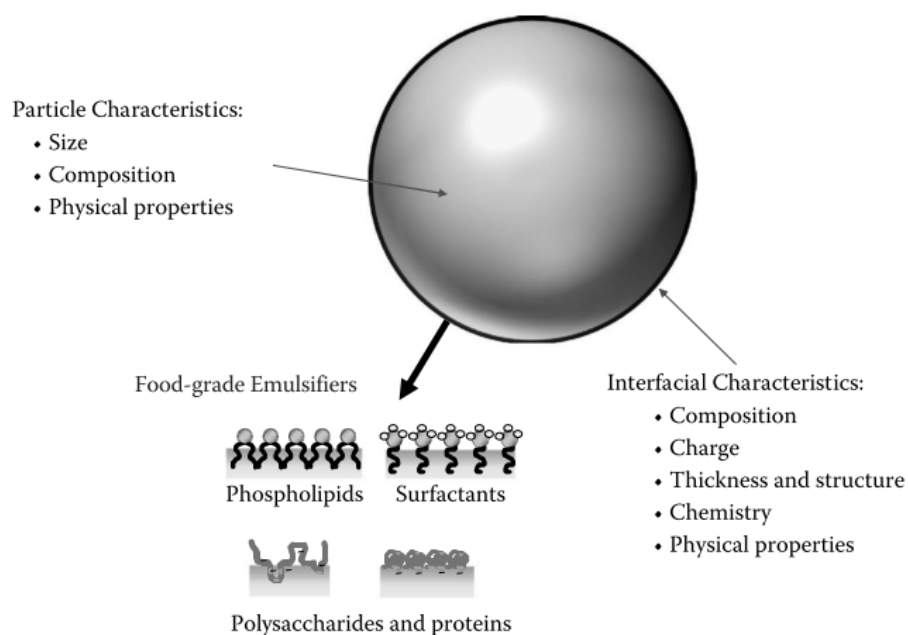
Συνεπώς, ένα νανογαλάκτωμα παρασκευάζεται συνήθως χρησιμοποιώντας τα ίδια συστατικά όπως ένα μικρογαλάκτωμα: έλαιο, νερό, επιφανειοδραστικό και πιθανώς συν-επιφανειοδραστικό συστατικό. Οι δομές των σωματιδίων σε ένα νανογαλάκτωμα είναι επίσης πολύ παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται σε ένα μικρογαλάκτωμα: στα ϵ/ν νανογαλακτώματα τα μη πολικά άκρα των επιφανειοδραστικών μορίων προσανατολίζονται στον υδρόφοβο πυρήνα που σχηματίζεται από τη λιπαρή φάση, ενώ τα πολικά άκρα των επιφανειοδραστικών μορίων προεξέχουν στην περιβάλλουσα υδατική φάση. Το αντίστροφο συμβαίνει στην περίπτωση των ν/ϵ νανογαλακτωμάτων (McClements, 2012).

Η μεγάλη διαφορά μεταξύ ενός νανογαλακτώματος και ενός μικρογαλακτώματος έγκειται στη θερμοδυναμική τους σταθερότητα. Τα μικρογαλακτώματα είναι συστήματα ισορροπίας (δηλαδή, θερμοδυναμικά σταθερά), ενώ τα νανογαλακτώματα είναι συστήματα μη θερμοδυναμικής ισορροπίας με αυθόρμητη τάση να διαχωρίζονται οι φάσεις που τα απαρτίζουν. Παρόλα αυτά, με κατάλληλο σχεδιασμό στη σύσταση και στη μέθοδο παρασκευής, μπορεί να επιτευχθεί για τα νανογαλακτώματα υψηλή κινητική σταθερότητα για αρκετό χρόνο. Επίσης διαφέρουν σημαντικά στον τρόπο που αντιδρούν στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και κατά την αραίωση. Η μορφολογία των μικρογαλακτωμάτων επηρεάζεται έντονα και μπορεί ακόμη και να καταστραφεί από διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και από τυχόν αραιώσεις, ενώ τα σταγονίδια των νανογαλακτωμάτων εκδηλώνουν σταθερότητα σε ανάλογες συνθήκες. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν τα γαλακτώματα χρησιμοποιούνται ως συστατικά άλλων τροφίμων (Anton and Vandamme, 2011).

Ακόμη, τα νανογαλακτώματα μπορούν να παρασκευαστούν με ένα μεγαλύτερο εύρος επιφανειοδραστικών συστατικών σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα, καθώς όπως προαναφέρθηκε για το σχηματισμό των μικρογαλακτωμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο επιφανειοδραστικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους (Chavda, 2017).

1.3 Συστατικά μικρο/νανο-γαλακτωμάτων τροφίμων

Τα νανογαλακτώματα διαμορφώνονται με ανάμιξη τουλάχιστον τριών συστατικών: έλαιο, νερό και γαλακτωματοποιητή. Τα χαρακτηριστικά, η συγκέντρωση και ο τρόπος ανάμιξης των κύριων αυτών συστατικών καθορίζουν τις τελικές του ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Salvia-Trujillo *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.3 Τα συστατικά των γαλακτωμάτων χωροθετούνται στη λιπαρή φάση, την υδατική φάση και τη διπλοστιβάδα ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με το εγγύς μικρο-περιβάλλον τους (McClements, 2016a).

1.3.1 Λιπαρή φάση

Τα λίπη και τα έλαια είναι μη πολικές ενώσεις, διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, και αδιάλυτες ή ελάχιστα διαλυτές στο νερό (McClements, 2016a). Η λιπαρή φάση στα νανογαλακτώματα τροφίμων, είτε προέρχεται από ζωικές ή φυτικές πηγές, αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια. Τα λίπη και έλαια περιέχουν ακόμη μικρές ποσότητες από διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια, πολικά λιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και άλλα μικροσυστατικά. Τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου ελαίου, όπως το ιξώδες, η πυκνότητα, ο δείκτης διάθλασης και η επιφανειακή τάση, επηρεάζουν το σχηματισμό και τη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Tadros, 2016). Σύμφωνα με τους ερευνητές, όσο χαμηλότερο είναι το ιξώδες και η επιφανειακή τάση της λιπαρής φάσης, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των παραγόμενων σταγονιδίων, διότι διευκολύνεται ο σχηματισμός των σταγονιδίων κατά την ομογενοποίηση (Jafari *et al.*, 2008; McClements, 2016).

Επιπλέον, τα λίπη και έλαια είναι ουσιώδη θρεπτικά συστατικά και προκαλούν χαρακτηριστική λιπαρή αίσθηση στο στόμα (υφή) σε προϊόντα όπως η κρέμα, το βούτυρο και το τυρί. Η λιπαρή φάση χρησιμοποιείται επίσης ως διαλύτης για πιο λιπόφιλους γαλακτωματοποιητές, για λιποδιαλυτά θρεπτικά συστατικά (π.χ. λιποδιαλυτές βιταμίνες, απαραίτητα λιπαρά οξέα), για χρωστικές και για αρωματικές ενώσεις (Sjöblom, 2001).

1.3.2 Υδατική φάση

Η σύνθεση της υδατικής φάσης παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Η υδατική φάση ενός μικρο/νανο-γαλακτώματος αποτελείται από έναν πολικό διαλύτη και κάποιον συνδιαλύτη. Η σύστασή της καθορίζει την πολικότητα, τη ρεολογία, τη συμπεριφορά φάσης, τη διεπιφανειακή τάση και την ιοντική ισχύ του μικρο/νανο-γαλακτώματος (Aswathanarayan and Vittal, 2019a). Στην υδατική φάση μπορεί να ενσωματωθεί ένα μεγάλο εύρος υδατοδιαλυτών συστατικών, όπως ιχνοστοιχεία, οξέα, βάσεις, αρωματικές ουσίες, συντηρητικά, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά συστατικά, σάκχαρα, επιφανειοδραστικές ουσίες κ.α. (McClements, 2016a). Το pH και η ιοντική ισχύς της υδατικής φάσης επηρεάζει άμεσα τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σταγονιδίων, επιδρώντας στη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Η προσθήκη τροποποιητών υφής πριν από την ομογενοποίηση έχει αναφερθεί ότι μειώνει το μέγεθος των διασπαρμένων σταγονιδίων που παράγονται κατά την ομογενοποίηση, λόγω της αύξησης των διασπαστικών τάσεων διάτμησης των συσσωματωμάτων της διασκορπιζόμενης φάσης (Qian and McClements, 2011). Επιπλέον, η ενσωμάτωση τροποποιητών υφής στην υδατική φάση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επιμηκύνει τη μακροπρόθεσμη σταθερότητά τους μέσω επιβράδυνσης του βαρυτικού διαχωρισμού και των συγκρούσεων των σταγονιδίων. Τα σταγονίδια με χαμηλότερα ιξώδη απαιτούν μικρότερο χρόνο ομογενοποίησης προκειμένου να παραμορφωθούν και να διασπαστούν, και έτσι είναι ευκολότερο να μορφοποιηθούν κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης (Tadros, 2016). Διάφορες άλλες ουσίες μπορεί να προστεθούν στην υδατική φάση, με σκοπό να επιτευχθούν οι επιθυμητές ιδιότητες του μικρο/νανο-γαλακτώματος, όπως υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά που μειώνουν την ταχύτητα οξείδωσης των λιπιδίων στα μικρο/νανο-γαλακτώματα. Κατά συνέπεια, υπάρχουν σημαντικά περιθώρια όσον αφορά το σχεδιασμό του σχηματισμού, της σταθερότητας και των λειτουργικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων μέσω ελέγχου της σύνθεσης της υδατικής τους φάσης (Manzoor *et al.*, 2023).

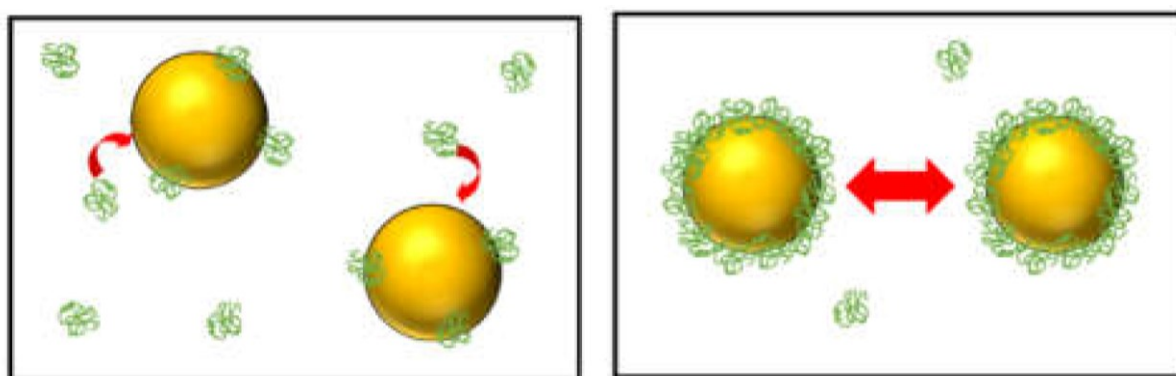
1.3.3 Γαλακτωματοποιητές

Η βιομηχανία τροφίμων απαιτεί την παραγωγή γαλακτωμάτων τα οποία να είναι κινητικά σταθερά για συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Για την παράταση του χρόνου ζωής τους χρησιμοποιούνται γαλακτωματοποιητές. Ένας επιτυχημένος σχεδιασμός μικρο/νανο-γαλακτώματος περιλαμβάνει τη χρήση γαλακτωματοποιητών που θα προσροφηθούν καταλλήλως στη διεπιφάνεια της διεσπαρμένης φάσης, οδηγώντας σε περαιτέρω διάσπαση των σταγονιδίων και παρεμποδίζοντας τη συνένωση ή την κροκίδωσή τους (Kralova and Sjöblom, 2009; McClements, 2016a). Αρκετοί γαλακτωματοποιητές χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων που κατηγοριοποιούνται ως επιφανειοδραστικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους, και ως βιοπολυμερή (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες). Χρησιμοποιούνται

επίσης σύνθετοι πολυμερικοί γαλακτωματοποιητές με προσαρμοσμένο μέγεθος, υδροφοβικότητα, ευαίσθητες ομάδες στο φως (π.χ. τροποποιημένο αζωβενζόλιο) ή σε άλατα, και πολλαπλά πολυμερή. Έτσι καθίσταται δυνατή η παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που μπορούν να σταθεροποιηθούν ή να αποσταθεροποιηθούν ως απόκριση σε φυσικές ή χημικές αλλαγές (Gurpta *et al.*, 2016; Sneha and Kumar, 2022).

Ο βασικός λόγος που προστίθενται οι γαλακτωματοποιητές στα διαλύματα είναι για να μειωθεί η ενδοεπιφανειακή ελεύθερη ενέργεια. Η ελεύθερη ενδοεπιφανειακή ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας είναι η ενέργεια που απαιτείται για τη ρήξη της διεπιφάνειας. Η ενέργεια αυτή, που αναφέρεται και ως επιφανειακή ή διεπιφανειακή τάση (γ), δίνεται σε $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ή $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Η προσρόφηση των επιφανειοδραστικών μορίων στη διεπιφάνεια μειώνει την επιφανειακή τάση. Ο βαθμός προσρόφησης μίας επιφανειοδραστικής ουσίας στη διεπιφάνεια εξαρτάται από τη δομή του επιφανειοδραστικού αυτής και τη φύση των δύο φάσεων που διαχωρίζονται από τη διεπιφάνεια.

Ο ρόλος ενός γαλακτωματοποιητή δεν περιορίζεται, ωστόσο, μόνο στην προσρόφηση στη διεπιφάνεια και στη μείωση της διεπιφανειακής τάσης, αλλά και στη δημιουργία ενός σταθερού, συνεκτικού και ιξωδοελαστικού υμενίου που περιβάλλει τα διεσπαρμένα σταγονίδια και εμποδίζει τη συνένωσή τους, όταν αυτά συγκρούονται. Ακόμη, ανάλογα με το τελικό προϊόν και τη φύση του γαλακτωματοποιητή, οι γαλακτωματοποιητές εμφανίζουν επιπλέον λειτουργίες όπως η τροποποίηση της κρυστάλλωσης των λιπαρών, η αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά του τροφίμου, ο εγκλεισμός ουσιών κ.α. (McClements, 2022).



Εικόνα 1.4 Απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού (αριστερά) και της σταθεροποίησης (δεξιά) ενός γαλακτώματος από γαλακτωματοποιητή (McClements, Lu and Grossmann, 2022).

Κατά την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, η επιλογή του κατάλληλου γαλακτωματοποιητή είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία. Για να επιτευχθεί σταθεροποίηση είναι απαραίτητη η πλήρης κάλυψη της επιφάνειας των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης με γαλακτωματοποιητή, λόγω δε της

αθροιστικά μεγάλης αυτής επιφάνειας, καθίσταται αναγκαία η χρήση σημαντικών ποσοτήτων γαλακτωματοποιητή. Επομένως για την επιλογή γαλακτωματοποιητή προκειμένου να παρασκευαστούν μικρο/νανο-γαλακτώματα προοριζόμενα για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων θα πρέπει κατ' αρχήν να ληφθούν υπόψη τα ακόλουθα:

- να είναι όσο το δυνατόν αποτελεσματικοί, ώστε να χρησιμοποιηθούν οι μικρότερες δυνατές ποσότητες,
- να αποτελούν εγκεκριμένες ουσίες για χρήση ως πρόσθετα τροφίμων ή ως βοηθητικές ύλες για παρασκευή τροφίμων,
- να επιτρέπεται η παρουσία τους στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις στο τρόφιμο,
- να μην επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων στις συγκεντρώσεις αυτές ή η όποια υπάρχουσα επίδραση να είναι ανεκτή,
- να μην επιβαρύνουν σημαντικά το κόστος της παραγωγής των τελικών προϊόντων.

Ο τύπος του γαλακτωματοποιητή που θα επιλεγεί εξαρτάται ακόμη και από την εφαρμοζόμενη τεχνική ομογενοποίησης. Τα επιφανειοδραστικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους γενικώς λειτουργούν αποτελεσματικά στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ανεξαρτήτως της χρησιμοποιούμενης τεχνικής ομογενοποίησης. Αντιθέτως, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες δεν είναι τυπικά κατάλληλοι γαλακτωματοποιητές για τη διαμόρφωση σταγονιδίων χαμηλής διαμέτρου, όταν χρησιμοποιείται χαμηλής ενέργειας τεχνική ομογενοποίησης, ενώ γενικότερα, είναι λιγότερο αποτελεσματικοί στην παραγωγή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με τεχνικές υψηλής ενέργειας (Henry *et al.*, 2009). Ωστόσο, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, ως βιοπολυμερή, έχουν το πλεονέκτημα ότι θεωρούνται περισσότερο φιλικά συστατικά προς τον καταναλωτή (Jafari, 2017).

Παρακάτω παρατίθενται οι γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στη βιομηχανία τροφίμων για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

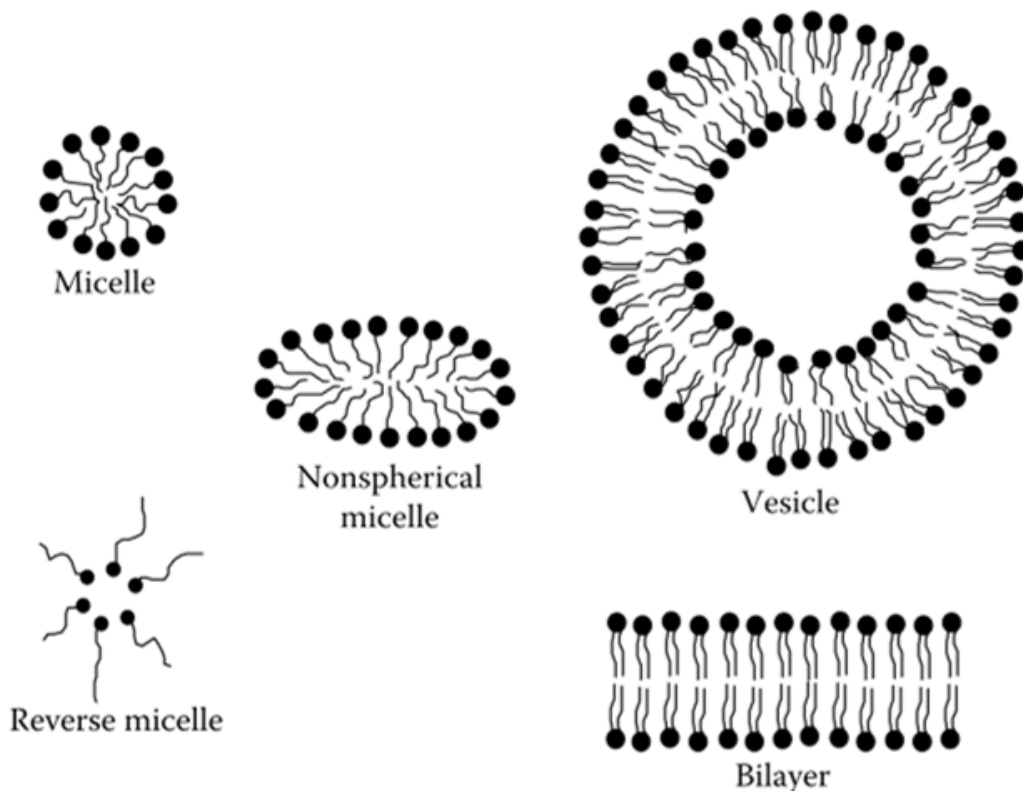
1.3.3.1 Γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους

Οι γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε σχηματισμό μικρότερων σταγονιδίων σε σχέση με τα βιοπολυμερή π.χ. πρωτεΐνες. Αυτοί οι γαλακτωματοποιητές διαθέτουν μία μικρο-υδρόφιλη ομάδα και μία ή περισσότερες λιπόφιλες υδρογονανθρακικές αλυσίδες οι οποίες αποτελούνται από φωσφολιπίδια, μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια, οξικούς εστέρες, εστέρες πολυγλυκερόλης, εστέρες σακχαρόζης, εστέρες σορβιτάνης και πολυσορβικούς εστέρες προπυλενογλυκό-

λης λιπαρών οξέων (Varzakas and Tzia, 2014). Πρόκειται για αμφιφιλικά μόρια που συνήθως συνίστανται από μία ευθεία ή διακλαδισμένη υδρογονανθρακική αλυσίδα με 8-18 άτομα άνθρακα, η οποία συνδέεται σε ένα πολικό ή ιονικό τμήμα (υδρόφιλο). Η υδρόφιλη ομάδα μπορεί να είναι:

- ιοντική, και συγκεκριμένα κατιοντική όταν έχει αρνητικό φορτίο, και ανιοντική όταν έχει αρνητικό φορτίο.
- επαμφοτερίζουσα όταν διαθέτει κατιοντικές και ανιοντικές λειτουργικές ομάδες και το καθαρό φορτίο τους εξαρτάται από το pH.
- μη ιοντική που ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες κατηγορίες καθώς δεν διαθέτει φορτίο.

Η υδρογονανθρακική αλυσίδα αλληλεπιδρά ασθενώς με τα μόρια νερού σε υδατικό περιβάλλον, ενώ η υδρόφιλη πολική ή ιονική ομάδα αλληλεπιδρά ισχυρά με μόρια νερού μέσω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου ή διπόλου-ιόντος. Αυτή η ισχυρή αλληλεπίδραση με τα μόρια του νερού καθιστά το επιφανειοδραστικό διαλυτό στο νερό. Η ισορροπία μεταξύ των υδρόφοβων και υδρόφιλων τμημάτων του μορίου προσδίδει σε αυτές τις ουσίες τις ειδικές ιδιότητές τους (McClements, 2016a).



Εικόνα 1.5 Τυπικές μορφές κολλοειδών που σχηματίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να εμφανιστούν πιο πολύπλοκες δομές (McClements, 2016a)

Οι γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους, κατά τη διαλυτοποίησή τους στη συνεχή φάση δημιουργούν διαφορετικές θερμοδυναμικά σταθερές κολλοειδείς δομές. Τέτοιες δομές είναι τα μικύλλια, τα ανάστροφα μικύλλια, οι διπλοστοιβάδες και τα κυστίδια (Εικόνα 1.4). Η κινητήρια δύναμη για το σχηματισμό των δομών αυτών είναι ο περιορισμός ή και αποκλεισμός της επαφής μεταξύ της υδρογονανθρακικής αλυσίδας και του νερού, γεγονός που επιφέρει μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Σε συστήματα ε/ν οι επιφανειοδραστικές υδρόφοβες ομάδες κατευθύνονται προς το εσωτερικό του συσσωματώματος και οι ομάδες των πολικών κεφαλών κατευθύνονται προς τη συνεχή υδατική φάση δημιουργώντας μικύλλια. Αντίστοιχα συμβαίνει στα συστήματα ν/ε, όπου δημιουργούνται μικύλλια γαλακτωματοποιητή διεσπαρμένα στη λιπαρή φάση που συχνά αναφέρονται και ως αντίστροφα μικύλλια. Τα σχηματιζόμενα μικύλλια βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία καθώς τα μόρια της επιφανειοδραστικής ουσίας μετακινούνται συνεχώς από τη συνεχή φάση στη διεπιφάνεια του μικυλλίου και από τη διεπιφάνεια στη συνεχή φάση. Ο ρυθμός αυτής της διεργασίας προσρόφησης/εκρόφησης ποικίλλει, ανάλογα με τη δομή του επιφανειοδραστικού μορίου, ενώ εξαρτάται από τις συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και συγκέντρωσης αλάτων και άλλων ουσιών (Tadros, 2005; Jafari, 2017).

Έτσι, σε δεδομένη θερμοκρασία, πίεση και συγκέντρωση, ο αριθμός των μονομερών που προσροφώνται στη διεπιφάνεια λιπαρού/ύδατος και ο αριθμός των μονομερών και μικυλλίων που υπάρχουν στο διάλυμα σταθεροποιείται υπό συνθήκες ισορροπίας. Η συγκέντρωση μονομερών και μικυλλίων μεταβάλλεται με συνθήκες ισορροπίας όπως πίεση, θερμοκρασία, παρουσία άλλης επιφανειοδραστικής ουσίας και συγκέντρωση άλατος. Προκειμένου να γίνει επιλογή του κατάλληλου γαλακτωματοποιητή μικρού μοριακού βάρους, χρησιμοποιούνται ορισμένοι εμπειρικοί κανόνες. Σύμφωνα με τον κανόνα του Bancroft, η καταλληλότητα ενός γαλακτωματοποιητή εξαρτάται από τη διαλυτότητά του στη συνεχή φάση. Επομένως ένας πιο υδρόφιλος γαλακτωματοποιητής είναι κατάλληλος για γαλακτώματα τύπου ε/ν και αντιστρόφως. Μία άλλη χρήσιμη μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο για την εκτίμηση της καταλληλότητας ενός γαλακτωματοποιητή είναι η υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία (HLB), η οποία περιγράφει την αναλογία υδρόφιλων προς λιπόφιλων ομάδων σε ένα μόριο (Salvia-Trujillo *et al.*, 2017).

Ο υπολογισμός του αριθμού HLB γίνεται με χρήση μίας ημιεμπειρικής μεθόδου που χρησιμοποιείται ευρέως για την κατάταξη των επιφανειοδραστικών ουσιών. Κάθε επιφανειοδραστική ουσία χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό HLB, σύμφωνα με τη χημική της δομή. Υψηλή τιμή HLB αντιστοιχεί σε υψηλή αναλογία των υδρόφιλων ομάδων ως προς τις λιπόφιλες, ενώ χαμηλή τιμή HLB στο αντίστροφο. Η αναλογία των υδρόφιλων ομάδων ως προς τις λιπόφιλες εισήχθη πρώτη φορά από τον Griffin για την εταιρεία Atlas Powder Company στην Αμερική. Σύμφωνα με τον Griffin, η θεωρία του

αριθμού HLB καθορίζει την ισορροπία μεταξύ υδρόφιλων και υδρόφοβων τμημάτων του επιφανειοδραστικού μορίου σε σχέση με την αντοχή και την αποτελεσματικότητά του, και μπορεί να οριστεί από τη σχέση:

$$HLB = 20 \frac{M_o}{M}$$

Εξίσωση 1-1

όπου M_o είναι το κλάσμα του μοριακού βάρους που αντιστοιχεί στο υδρόφιλο τμήμα του μορίου του γαλακτωματοποιητή και το M είναι το μοριακό βάρος. Η κλίμακα είναι μεταξύ του 0 και του 20.

Πίνακας 1.2 Προσεγγιστικές τιμές HLB για τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα επιφανειοδραστικά στη βιομηχανία τροφίμων (McClements, 2016a).

Ελληνική ονομασία γαλ/τή	Αγγλική ονομασία γαλ/τή	HLB
Θεικό λαυρύλιο νατρίου	Sodium lauryl sulphate	40
Στεατοϋλο-2-γαλακτυλικό νάτριο	Sodium stearoyl lactylate	22
Ελαϊκό κάλιο	Potassium oleate	20
Μονοεστέρας σακχαρόζης	Sucrose monoester	20
Ελαϊκό νάτριο	Sodium oleate	18
Μονολαυρική πολυοξυαιθυλενο (20)σορβιτάνη	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)	16,7
Μονοπαλμιτική πολυοξυαιθυλενο (20)σορβιτάνη	Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate (Tween 40)	15,6
Μονοελαϊκή πολυοξυαιθυλενο (20)σορβιτάνη	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80)	15
Μονολαυρική σακχαρόζη	Sucrose monolaurate	15
Μονοστεατική πολυοξυαιθυλενο (20)σορβιτάνη	Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate (Polysorbate 20)	14,9
Μονοελαϊκή δεκαγλυκερόλη	Decaglycerol monooleate	14
Μονοστεατική δεκαγλυκερόλη	Decaglycerol monostearate	14
Αιθοξυλιωμένο μονογλυκερίδιο	Ethoxylated monoglyceride	13
Διελαϊκή γλυκερίνη	Decaglycerol dioleate	12
Τριστεατική Πολυοξυαιθυλενο (20)σορβιτάνη	Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate	11
Τριελαϊκός εστέρας πολυοξυαιθυλενο(20) σορβιτάνης	Polyoxyethylene (20) sorbitan trioleate	10,5
Διελαϊκός εστέρας εξαγλυκερόλης	Hexaglycerol dioleate	9

Μονολαυρική σορβιτάνη	Sorbitan monolaurate	8,6
DATEM	DATEM	8
Λεκιθίνη σόγιας	Soy lecithin	8
Εξαελαϊκή δεκαγλυκερόλη	Decaglycerol hexaoleate	7
Μονοστεατικό άλας τριγλυκερίνης	Triglycerol monostearate	7
Μονοπαλμιτική σορβιτάνη	Sorbitan monopalmitate	6,7
Μονολαυρικός εστέρας	Glycerol monolaurate	5,2
Στεατούλο-2-γαλακτικό ασβέστιο	Calcium stearoyl lactylate	5,1
Τριεστέρας σακχαρόζης	Sucrose triester	5
Μονοστεατική σορβιτάνη	Sorbitan monostearate	4,7
Μονοστεατικό άλας προπυλενο-γλυκε- ρόλης	Propylene glycol monolaurate	4,5
Μονοελαϊκή σορβιτάνη	Sorbitan monooleate	4,3
Μονοστεατική γλυκερίνη	Glycerol monostearate	3,8
Μονοελαϊκή γλυκερίνη	Glycerol monoleate	3,4
Μονοστεατικό άλας προπυλενο-γλυκε- ρόλης	Propylene glycol monostearate	3,4
Μονολαυρική σορβιτάνη	Sorbitan monolaurate (Span 20)	8,6
Μονοστεατική σορβιτάνη	Sorbitan monostearate (Span 60)	4,7
Τριστεατική σορβιτάνη	Sorbitan tristearate (Span 65)	2,1
Μονοελαϊκή σορβιτάνη	Sorbitan monooleate (Span 80)	4,3
Τριελαϊκός εστέρας σορβιτάνης	Sorbitan trioleate (Span 85)	1,8
Διελαϊκός εστέρας γλυκερόλης	Glycerol dioleate	1,8
ACETEM	ACETEM	1,5
Ελαϊκό οξύ	Oleic acid	1

Όπως αναφέρθηκε ο αριθμός HLB μίας επιφανειοδραστικής ουσίας ορίζεται με αυστηρά μαθηματικό τρόπο, με βάση τον αριθμό και τον τύπο των υδρόφιλων και λιπόφιλων ομάδων που περιέχει. Εντούτοις, κατά τη χρήση του, διατήρησε μεν την αρχική του σημασία, ως αριθμητικός δείκτης που πληροφορεί για τη γαλακτωματοποιητική συμπεριφορά της ουσίας, αλλά προκειμένου οι πληροφορίες να γίνουν πιο αξιόπιστες, επινοήθηκαν και άλλοι τρόποι προσδιορισμού ή εκτίμησής του, όπως ο εμπειρικός με βάση πειραματικές μετρήσεις του σημείου θόλωσης.

Ένας άλλος ευρέως χρησιμοποιούμενος ημιεμπειρικός τρόπος για τον υπολογισμό του HLB είναι:

$$HLB = 7 + \sum \text{Πλήθος υδρόφιλων μονάδων} - \sum \text{Πλήθος λιπόφιλων ομάδων} \quad \text{Εξίσωση 1-2}$$

Με βάση την παραπάνω σχέση έχουν υπολογιστεί τιμές HLB για αρκετές επιφανειοδραστικές ουσίες τροφίμων. Αν και φαινομενικά δεν φαίνεται η παραπάνω σχέση να έχει κάποια θερμοδυναμική βάση, στην πραγματικότητα έχει αποδειχθεί ότι η διαφορά των αθροισμάτων αντιστοιχεί στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των ομάδων, όταν σχηματίζεται το μικύλλιο.

Για την εκτίμηση του αριθμού HLB επιφανειοδραστικών ουσιών έχουν καταρτιστεί πίνακες, στους οποίους αντιστοιχίζονται κατηγορίες ουσιών και χαρακτηριστικές πολυατομικές ή μη ομάδες με αριθμητικούς δείκτες - μέτρα του υδρόφιλου χαρακτήρα τους.

Πίνακας 1.3 Αριθμοί/δείκτες υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας ομάδων για τον υπολογισμό του αριθμού HLB των γαλακτωματοποιητών (McClements, 2016a).

Υδρόφιλη ομάδα	Αριθμός ομάδας	Λιπόφιλη ομάδα	Αριθμός ομάδας
-SO ₄ ⁻ Na ⁺	38,7	-CH-	0,475
-COO ⁻ H ⁺	21,2	-CH ₂ -	0,475
Τριτοταγής αμίνη	9,4	-CH ₃	0,475
Εστέρας σορβιτάνης	6,8	-CH=	0,475
Γλυκερινεστέρας	5,25		
-COOH	2,1		
-OH	1,9		
-O-	1,3		
-(CH ₂ -CH ₂ -O)-	0,33		

Κατ' επέκταση, ο δείκτης HLB, πληροφορώντας για την πολικότητα της ουσίας, αποτελεί χρήσιμη ένδειξη για τη διαλυτότητα του επιφανειοδραστικού, είτε σε έλαιο είτε/και σε νερό. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί ο τύπος του γαλακτώματος που μπορεί το επιφανειοδραστικό να σταθεροποιεί:

- Επιφανειοδραστικά με χαμηλή τιμή HLB (3-6) είναι κατά κύριο λόγο υδρόφοβα, διαλύονται εκλεκτικά σε έλαιο και σταθεροποιούν γαλακτώματα τύπου ν/ε, σχηματίζοντας αντίστροφα μικύλλια στο έλαιο.
- Επιφανειοδραστικά με υψηλή τιμή HLB (10-18) είναι κυρίως υδρόφιλα, διαλύονται εκλεκτικά στο νερό και σταθεροποιούν γαλακτώματα τύπου ε/ν, σχηματίζοντας μικύλλια στο νερό.

- Επιφανειοδραστικά με ενδιάμεσες τιμές HLB (7-9) δεν έχουν καμία ιδιαίτερη προτίμηση στο νερό ή στο έλαιο και θεωρούνται καλά «μέσα διαβροχής».
- Επιφανειοδραστικά με τιμές HLB <3 (πολύ υδρόφοβα) και με τιμές HLB >18 (πολύ υδρόφιλα) δεν αναπτύσσουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικές ιδιότητες και δεν συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Η σταθερότητα του γαλακτώματος, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιου είδους επιφανειοδραστικές ουσίες, είναι περιορισμένη (Peng *et al.*, 2019).

Έχει αναφερθεί πως η μέγιστη σταθερότητα γαλακτώματος εμπειρικά επιτυγχάνεται για γαλακτώματα ε/ν με τη χρήση επιφανειοδραστικών με τιμή HLB περίπου 10-12, και για ν/ε γαλακτώματα με τιμή HLB περίπου 3-5. Παρακάτω περιγράφονται οι κύριες ομάδες γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων (Tadros, 2016).

1.3.3.1.1 Λεκιθίνη

Οι λεκιθίνες είναι φυσικές επιφανειοδραστικές ουσίες που μπορεί να εξαχθούν από ποικιλία πηγών, συμπεριλαμβανομένων των σπόρων σόγιας, του κραμβέλαιου και του αυγού (Faergemand and Krog, 2003). Η λεκιθίνη σόγιας είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο επιφανειοδραστικό συστατικό στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί να εξαχθεί οικονομικά κατά την επεξεργασία του ακατέργαστου σογιέλαιου (Stauffer, 1999). Οι φυσικές λεκιθίνες περιέχουν ένα σύνθετο μίγμα διαφορετικών τύπων φωσφολιπιδίων και άλλων λιπιδίων, αν και δυνητικά μπορούν να κλασματοποιηθούν για να σχηματίσουν πιο καθαρά συστατικά που εμπλουτίζονται με συγκεκριμένα κλάσματα. Τα πιο κοινά φωσφολιπίδια στη λεκιθίνη είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) και η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI). Οι υδρόφιλες ομάδες κεφαλής αυτών των μορίων είναι είτε ανιοντικές (PI) είτε επαμφοτερίζουσες (PC και PE), ενώ οι λιπόφιλες ομάδες ουράς αποτελούνται από δύο λιπαρά οξέα. Η φυσική λεκιθίνη έχει μέτρια χαρακτηριστικά διαλυτότητας και αριθμό HLB (~ 8), πράγμα που σημαίνει ότι δεν είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τη σταθεροποίηση είτε γαλακτωμάτων ν/ε είτε ε/ν, όταν χρησιμοποιείται μεμονωμένα, αλλά μπορεί να είναι αποτελεσματική, όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες επιφανειοδραστικές ουσίες (McClements, 2016a).

1.3.3.1.2 Μονο-γλυκερίδια και δι-γλυκερίδια

Τα μονο- και διγλυκερίδια είναι μονο- και διεστέρες γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Παρασκευάζονται γενικώς με μερική υδρόλυση τριγλυκεριδίων (γλυκερόλυση) ή μερική εστεροποίηση γλυκερόλης. Αυτές οι διαδικασίες παράγουν ένα σύνθετο μίγμα μονοακυλογλυκεριδίων, διακυλογλυκεριδίων, τριακυλογλυκεριδίων, γλυκερόλης και ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία συνήθως αναφέρονται ως μονοδιγλυκερίδια. Τα μονογλυκερίδια διαθέτουν λιπόφιλο χαρακτήρα και ως εκ τούτου έχουν

χαμηλό αριθμό HLB (3-6). Οι κύριες εφαρμογές των μονο- και διγλυκεριδίων στα τρόφιμα είναι συνήθως σε προϊόντα με βάση το λίπος, όπως μαργαρίνη, αλειφόμενα προϊόντα, λίπη αρτοποιίας και μίγματα κέικ. Σε γαλακτώματα γαλακτοκομικών προϊόντων, τα μονο- και διγλυκερίδια χρησιμοποιούνται σε παγωτό και ανασυσταμένο γάλα, σε συνδυασμό με υδροκολλοειδή. Τα μονογλυκερίδια χρησιμοποιούνται επίσης σε τρόφιμα χωρίς λιπαρά ή με χαμηλά λιπαρά (McClements, 2022).

1.3.3.1.1.3 Εστέρες οργανικών οξέων με μονο- και δι-γλυκερίδια

Τα μονογλυκερίδια μπορούν να εστεροποιηθούν με διάφορα οργανικά οξέα (π.χ. οξικό, κιτρικό, διακετυλο-τρυγικό και γαλακτικό οξύ) για να σχηματίσουν επιφανειοδραστικές ουσίες με διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες. Τα οργανικά οξέα μπορούν να εστεροποιηθούν σε μία ή αμφότερες τις ελεύθερες υδροξυλομάδες των μονογλυκεριδίων. Τα πιο κοινά παραδείγματα αυτού του τύπου είναι τα ακετυλιωμένα μονογλυκερίδια (ACETEM), τα γαλακτυλιωμένα μονογλυκερίδια (LACTEM), τα μονογλυκερίδια διακετυλοτρυγικού οξέος (DATEM) και οι εστέρες μονογλυκεριδίων του κιτρικού οξέος (CITREM). Κάθενα από αυτά τα επιφανειοδραστικά μπορεί να παρασκευαστεί με υδρογονανθρακικές αλυσίδες διαφορετικού μήκους και βαθμού ακορεστότητας. Το ACETEM και το LACTEM είναι μη ιοντικά λιποδιαλυτά επιφανειοδραστικά με χαμηλό αριθμό HLB, ενώ τα DATEM και CITREM είναι υδατοδιαλυτά επιφανειοδραστικά με μέτριες ή υψηλές τιμές HLB (McClements, 2016a).

1.3.3.1.1.4 Γαλακτυλιωμένοι εστέρες λιπαρών οξέων

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες μπορεί να παραχθούν με εστεροποίηση γαλακτικού οξέος με λιπαρά οξέα παρουσία υδροξειδίου του νατρίου ή ασβεστίου. Το στεαροϋλ-γαλακτικό νάτριο (SSL) είναι ανιοντική υδατοδιαλυτή επιφανειοδραστική ουσία με μέσο αριθμό HLB, ενώ το στεαροϋλ-λακτυλικό ασβέστιο (CSL) είναι ανιοντική λιποδιαλυτή επιφανειοδραστική ουσία με χαμηλό αριθμό HLB. Τα εμπορικά συστατικά SSL περιέχουν συχνά ένα σημαντικό κλάσμα ελεύθερων λιπαρών οξέων, το οποίο περιορίζει τη διαλυτότητα στο νερό σε τιμές pH κάτω από 4 ή 5 (McClements, 2016a).

1.3.3.1.1.5 Εστέρες πολυολών με λιπαρά οξέα.

Από την εστεροποίηση πολυολών με λιπαρά οξέα μπορεί να παραχθούν επιφανειοδραστικά με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Οι τύποι πολυόλης και λιπαρών οξέων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του επιφανειοδραστικού προσδιορίζουν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Οι πολυόλες οι οποίες συνηθέστερα εστεροποιούνται με λιπαρά οξέα είναι: πολυγλυκερόλη, προπυλενογλυκόλη, σορβιτάνη, η πολυοξυ-αιθυλενο σορβιτάνη και σακχαρόζη. Τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αυτών των τύπων επιφανειοδραστικών μπορούν να ποικίλλουν σε μήκος αλυσίδας (τυπικά 12-18 άτομα άνθρακα) και βαθμό ακορεστότητας. Η διαλυτότητα και οι λειτουργικές ιδιότητες των πολυολικών εστέρων λιπαρών οξέων εξαρτώνται από τα σχετικά μεγέθη των

υδρόφιλων και λιπόφιλων τμημάτων των μορίων. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες με μεγάλες ομάδες κεφαλής πολυόλης τείνουν να είναι διασκορπίσιμες στο νερό και έχουν υψηλό αριθμό HLB (π.χ. πολυγλυκερόλη και πολυοξυαιθυλενο-εστέρες σορβιτάνης), ενώ εκείνες με μικρές ομάδες κεφαλής πολυόλης τείνουν να είναι περισσότερο λιποδιαλυτές και έχουν χαμηλό αριθμό HLB (π.χ. εστέρες προπυλενογλυκόλης). Οι εστέρες λιπαρών οξέων σορβιτάνης είναι ένα από τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα λιποδιαλυτά μη ιοντικά επιφανειοδραστικά, τα οποία συχνά διατίθενται υπό την εμπορική ονομασία "**Span**[™]". Από την άλλη πλευρά, οι εστέρες πολυοξυαιθυλενικής σορβιτάνης είναι ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα υδατοδιαλυτά μη ιοντικά επιφανειοδραστικά, τα οποία συχνά διατίθενται υπό τις εμπορικές ονομασίες "**Polysorbate**[™]" ή "**Tween**[™]". Αυτά τα λιποδιαλυτά και υδατοδιαλυτά επιφανειοδραστικά συχνά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό για τη βελτίωση της συνολικής σταθερότητας των γαλακτωμάτων (McClements, 2016a).

1.3.3.1.2 Βιοπολυμερή

Οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες είναι και τα δύο φυσικά απαντώμενα βιοπολυμερή. Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή αμινοξέων, ενώ οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή μονοσακχαριτών. Οι λειτουργικές ιδιότητες των βιοπολυμερών τροφίμων (π.χ. διαλυτότητα, επιφανειακή δραστηριότητα, πάχυνση και ζελατινοποίηση) προσδιορίζονται από τα μοριακά τους χαρακτηριστικά (π.χ. μοριακό βάρος, στερεοχημική διαμόρφωση, ευλυγισία, πολικότητα, υδροφοβικότητα και αλληλεπιδράσεις). Τα χαρακτηριστικά αυτά καθορίζονται από τον τύπο, τον αριθμό και την ακολουθία των μονομερών που αποτελούν την αλυσίδα του πολυμερούς. Τα μονομερή ποικίλλουν ανάλογα με την πολικότητά τους (ιοντική, πολική, μη πολική ή αμφιφιλική), τις φυσικές τους διαστάσεις, τις μοριακές αλληλεπιδράσεις και τις περιεχόμενες ενεργές χημικές ομάδες. Τα βιοπολυμερή είναι ομοπολυμερή, εάν περιέχουν μόνο ένα τύπο μονομερούς (π.χ. αμυλόζη ή κυτταρίνη), ή ετεροπολυμερή, εάν περιέχουν διαφορετικούς τύπους μονομερών (π.χ. αραβικό κόμμι, πηκτίνη και πρωτεΐνες) (Chen, 2015).



Εικόνα 1.6 Δομές διαμόρφωσης βιοπολυμερών: τυχαία σπείρα, γραμμική περιτυλιγμένη σπείρα και σφαιρική (κατά σειρά εμφάνισης) (McClements, 2016b).

Τόσο οι πρωτεΐνες όσο και οι πολυσακχαρίτες έχουν ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών γύρω από τα οποία η αλυσίδα του πολυμερούς μπορεί να περιστραφεί σε ορισμένες καθορισμένες γωνίες. Δεδομένου ότι τα βιοπολυμερή περιέχουν σχετικά μεγάλους αριθμούς μονομερών (τυπικά μεταξύ 20 και 20.000) και ότι είναι δυνατή η περιστροφή γύρω από τους συνδέσμους της αλυσίδας, μπορεί να προκύψει μεγάλος αριθμός διαφορετικών στερεοχημικών διαμορφώσεων σε διάλυμα. Στην πράξη, τα βιοπολυμερή τείνουν να υιοθετούν καλά καθορισμένες διαμορφώσεις στην προσπάθεια ελαχιστοποίησης της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος ανάλογα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η εν λόγω διαμόρφωση καθορίζεται από μία λεπτή ισορροπία φυσικοχημικών φαινομένων, συμπεριλαμβανομένων υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων van der Waals και διαμορφωτικής εντροπίας. Καθώς τα περισσότερα τρόφιμα είναι ασταθή συστήματα, ένα βιοπολυμερές μπορεί να παγιδευτεί σε μετασταθή κατάσταση, εάν δεν έχει προσδοθεί στο σύστημα η απαραίτητη ενέργεια ενεργοποίησης, ώστε να επιτευχθεί μία πιο θερμοδυναμικά σταθερή κατάσταση. Οι διαμορφώσεις που οι αλυσίδες βιοπολυμερών τείνουν να υιοθετούν σε υδατικά διαλύματα ανήκουν σε τρεις κατηγορίες: σφαιρικές, ραβδόμορφες περιελιγμένες σπείρες (coiled coil) και τυχαίες σπείρες (random coils) (Εικόνα 1.5).

Τα σφαιροειδή βιοπολυμερή έχουν σχετικά άκαμπτες συμπαγείς δομές, τα ραβδόμορφα βιοπολυμερή έχουν αρκετά άκαμπτες εκτεταμένες δομές (συχνά ελικοειδείς) και τα βιοπολυμερή τυχαίας σπείρας έχουν εξαιρετικά δυναμικές και εύκαμπτες δομές. Τα βιοπολυμερή ταξινομούνται επίσης σύμφωνα με το βαθμό διακλάδωσης της αλυσίδας. Οι περισσότερες πρωτεΐνες αποτελούνται από γραμμικές αλυσίδες, ενώ οι πολυσακχαρίτες μπορεί να έχουν γραμμική (π.χ. αμυλόζη) ή διακλαδισμένη (π.χ. αμυλοπηκτίνης) αλυσίδα. Στην πράξη, πολλά βιοπολυμερή δεν έχουν αποκλειστικά ένα τύπο διαμόρφωσης, αλλά διαθέτουν μερικές περιοχές που είναι περιελιγμένες σπείρες, ραβδόμορφες ή σφαιροειδείς. Τα βιοπολυμερή σε διάλυμα μπορεί να υπάρχουν ως μεμονωμένα μόρια ή μπορούν να υπάρχουν ως υπερμοριακές δομές που συνδέονται με ένα ή περισσότερα μόρια του ίδιου ή διαφορετικού είδους. Τα βιοπολυμερή τέλος μπορεί να υποστούν μεταβάσεις από μία διαμόρφωση σε άλλη ή από μία κατάσταση συσσωμάτωσης σε άλλη, εάν το περιβάλλον τους μεταβληθεί, για παράδειγμα μετά από μεταβολή του pH, της ιοντικής ισχύος, της σύνθεσης του διαλύτη ή της θερμοκρασίας. Η κατάσταση διαμόρφωσης και συσσωμάτωσης των βιοπολυμερών διαδραματίζει μείζονα ρόλο στον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών τους, επομένως είναι σημαντικό κατά την ανάπτυξη ενός τροφίμου να είναι γνωστά τα μοριακά χαρακτηριστικά των περιεχόμενων βιοπολυμερών (McClements, 2016b).

Πολλά γαλακτώματα τροφίμων σταθεροποιούνται από επιφανειοδραστικά βιοπολυμερή που προσροφώνται στις επιφάνειες των σταγονιδίων και σχηματίζουν προστατευτικές μεμβράνες. Μερικά από

αυτά τα λειτουργικά βιοπολυμερή αποτελούν φυσικά συστατικά σύνθετων συστατικών τροφίμων που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα (π.χ. γάλα, αυγά, κρέας, ψάρι και αλεύρι), ενώ άλλα έχουν απομονωθεί από το φυσικό τους περιβάλλον και ενδεχομένως τροποποιηθεί πριν διατεθούν ως πρόσθετα τροφίμων (π.χ. συμπυκνώματα πρωτεϊνών και αμφιφιλικά υδροκολλοειδή) (Hui, 2006).

Οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες προσδίδουν καλή σταθερότητα γαλακτώματος είτε με ηλεκτροστατική είτε με στερεοχημική σταθεροποίηση. Ωστόσο, λόγω του μεγέθους των μορίων τους, τα βιοπολυμερή, όταν προσροφώνται στη διεπιφάνεια οδηγούν σε σημαντική αύξηση του μεγέθους των σταγονιδίων και για το λόγο αυτό δεν συνηθίζεται η χρήση τους για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Jafari, 2017).

Πίνακας 1.4 Παραδείγματα βιοπολυμερών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Jafari, 2017).

Πολυσακχαρίτες	Λίπη και κηροί	Πρωτεΐνες	Συνθετικά συστατικά
<ul style="list-style-type: none"> • Αραβικό κόμμι • Τροποποιημένα άμυλα • Μαλτοδεξτρίνες • Αλγινικά • Πηκτίνη • Καραγεννάνη • Χιτοζάνη • Κυκλοδεξτρίνες • Σωματίδια αμύλου • Παράγωγα κυτταρίνης 	<ul style="list-style-type: none"> • Υδρογονωμένα φυτικά έλαια • Κερί μέλισσας • Λεκιθίνη • Τριγλυκερίδια μεσαίας αλυσίδας (MCT) • Βεσενικός γλυκερυλεστέρας 	<ul style="list-style-type: none"> • Ζελατίνη • Πρωτεΐνες ορού γάλακτος • Καζεΐνικό νάτριο • Πρωτεΐνες σόγιας • Γλουτένη • Καζεΐνες • Ινοσίνη μεταξιού 	<ul style="list-style-type: none"> • Paclitaxel • mPEG5000-b-p • Πολυακρυλονιτρίλιο • Πολυκαπρολακτόνη • Πολυγαλακτικό οξύ

1.3.3.1.3 Βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες και βιο-γαλακτωματοποιητές

Οι φυσικές βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες είναι χαμηλού μοριακού βάρους επιφανειοδραστικές ουσίες που έχουν τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα συστατικά στο ίδιο μόριο (Abd-ElSalam and Murugan, 2022). Επομένως, μπορούν να απορροφηθούν στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού μειώνοντας τη διεπιφανειακή τάση και δημιουργώντας ένα προστατευτικό στρώμα (Abd-ElSalam and Murugan, 2022). Τα γλυκολιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες είναι βιοεπιφανειοδραστικά που προέρχονται από φυτικά υλικά. Αυτά τα μικρά μόρια επιφανειοδραστικής ουσίας μπορούν επίσης να απομονωθούν από φυσικές πηγές όπως τα αυγά και μπορούν να παραχθούν με ζύμωση βακτηρίων, ζυμομυκήτων και

μυκήτων. Μερικά παραδείγματα βιοεπιφανειοδραστικών περιλαμβάνουν τα σοφορολιπίδια, ραμνολιπίδια και τη σουρφακτίνη (Shu et al., 2018; Silva et al., 2019). Οι φυσικοί βιο-γαλακτωματοποιητές είναι επιφανειοδραστικές ουσίες υψηλού μοριακού βάρους που μπορούν να απομονωθούν από φυτά, ζώα και μικροβιακές πηγές όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιποπολυσακχαρίτες και λιποπρωτεΐνες καθώς και τα μείγματά τους. Επιπλέον, άλλοι φυσικοί γαλακτωματοποιητές περιλαμβάνουν υδροφοβίνες και μαννοπρωτεΐνες.

Η υψηλή τοξικότητα και ο σοβαρός οικολογικός αντίκτυπος πολλών επιφανειοδραστικών ουσιών που βασίζονται σε χημικά έχουν στρέψει το ενδιαφέρον προς τις βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες και τους βιο-γαλακτωματοποιητές. Το ενδιαφέρον για τα σκευάσματα επιφανειοδραστικών τροφίμων και η προτίμηση των καταναλωτών για προϊόντα «πράσινης ετικέτας» έναντι αυτών που περιέχουν συνθετικά ή χημικά πρόσθετα έχουν αυξηθεί σταθερά (Sarubbo et al., 2022). Οι βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν μία αναμφισβήτητη προοπτική για την αντικατάσταση των χημικών επιφανειοδραστικών ουσιών με τεράστια σημασία για τα σκευάσματα τροφίμων. Ωστόσο, η εμπορευματοποίηση της παραγωγής των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών και των βιο-γαλακτωματοποιητών έχει συχνά περιοριστεί από πολλές προκλήσεις, όπως η βελτιστοποίηση των παραμέτρων ζύμωσης, το υψηλό κόστος παραγωγής και οι χαμηλές αποδόσεις, που είχαν τεράστιο αντίκτυπο στην ευρύτερη υιοθέτησή τους σε διαφορετικούς κλάδους, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων. Ωστόσο, ο κυριότερος περιορισμός σχετικά με την πρόσβαση των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών και των βιο-γαλακτωματοποιητών δεν είναι η έλλειψη οικονομικών μεθόδων βιομηχανικής παραγωγής, αλλά η απροθυμία όσον αφορά την πιθανή ασφάλειά τους, καθώς και τους πιθανούς μικροβιακούς κινδύνους που μπορεί να σχετίζονται με αυτά. Οι περισσότερες έρευνες σχετικά με τη χρήση των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών και των βιο-γαλακτωματοποιητών στην παραγωγή τροφίμων έχουν περιοριστεί σε επιδείξεις και δεν διαθέτουν ολοκληρωμένη αξιολόγηση της ασφάλειας και της ανάλυσης κινδύνου, η οποία έχει περιορίσει την υιοθέτησή τους για ποικίλες εφαρμογές που σχετίζονται με τα τρόφιμα (Sharma et al., 2023).

Επομένως είναι σαφές ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα καθώς και νομοθετική ρύθμιση προκειμένου να υιοθετηθεί η χρήση των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών και των βιο-γαλακτωματοποιητών στη βιομηχανία τροφίμων (Sarubbo et al., 2022)

1.3.4 Συν-επιφανειοδραστικές ουσίες

Η προσθήκη ενός γαλακτωματοποιητή συχνά δεν επαρκεί για να μειώσει την επιφανειακή τάση της διεπιφάνειας ελαίου/νερού σε βαθμό που να μπορεί να παρασκευαστεί μικρο/νανο-γαλάκτωμα. Για

το λόγο αυτό προστίθενται συν-επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι ουσίες αυτές έχουν τάση να προσροφώνται στη διεπιφανειακή μεμβράνη, μειώνοντας περαιτέρω την επιφανειακή τάση και ρυθμίζοντας το ιξώδες της συνεχούς φάσης (Manzoor *et al.*, 2023).

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ως συν-επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί αλκοόλες μεσαίου μήκους αλυσίδας και σε μικρότερο βαθμό, αμίνες και οξέα.

Οι αλκοόλες μεσαίου μήκους, που συνήθως προστίθενται ως συν-επιφανειοδραστικές ουσίες, έχουν ως συνέπεια τη μείωση της επιφανειακής τάσης της διεπιφάνειας, αυξάνοντας έτσι την εντροπία του συστήματος. Οι αλκοόλες μεσαίας αλυσίδας αυξάνουν επίσης την κίνηση της ελεύθερης ομάδας του γαλακτωματοποιητή και επιτρέπει επίσης να εισέλθει περισσότερη διεσπαρμένη φάση στο εσωτερικό του σταγονιδίου (Ahmad *et al.*, 2021).

Ωστόσο, δεν είναι όλες οι συν-επιφανειοδραστικές ουσίες εγκεκριμένες για προϊόντα προοριζόμενα για ανθρώπινη κατανάλωση, καθώς ορισμένες εξ αυτών ενδέχεται να εκδηλώσουν τοξικότητα και να προκαλέσουν ερεθισμούς (Cho *et al.*, 2008). Επιπλέον, είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε αποσταθεροποίηση του μικρο/νανο-γαλακτώματος κατά την αραίωση, λόγω μετανάστευσης της συν-επιφανειοδραστικής ουσίας από τη διεπιφάνεια στη συνεχή φάση (Fanun, 2009).

Πίνακας 1.5 Εγκεκριμένες συν-επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Deen, Skovgaard and Pedersen, 2011).

A/A	Συν-επιφανειοδραστικές ουσίες
1	Προπυλενογλυκόλη, γλυκερίνη
2	Πολυαιθυλενογλυκόλη
3	Plurol oleique CC497
4	Λαυρογλυκόλη 90
5	Τρανσκοσόλη
6	Αιθανόλη
7	Προπανολόλη
8	Σορβιτόλη
9	Καρβιτόλη

1.3.5 Σταθεροποιητές

Οι σταθεροποιητές είναι ουσίες που συμπληρωματικά με τους γαλακτωματοποιητές προστίθενται συχνά στα γαλακτώματα. Ο κύριος ρόλος τους στα γαλακτώματα τροφίμων είναι να παρέχουν στο προϊόν επιθυμητά χαρακτηριστικά υφής και αίσθησης στο στόμα και να βελτιώνουν τη σταθερότητα

του γαλακτώματος αυξάνοντας το ιξώδες της συνεχούς φάσης και κατά συνέπεια μειώνοντας την ταχύτητα κίνησης των περιεχομένων σωματιδίων, όπως τα διεσπαρμένα σταγονίδια και οι φυσαλίδες αέρα (McClements, 2016a). Οι πιο συνήθεις σταθεροποιητές που χρησιμοποιούνται στα γαλακτώματα είναι υδροκολλοειδή, όπως αραβικό κόμμι, πηκτίνες, ξανθάνη, τροποποιημένο άμυλο, αλγινικά άλατα, γαλακτομαννάνες και χιτοζάνη. Μερικά από αυτά παρουσιάζουν ιδιότητες γαλακτωματοποίησης, λόγω των μη πολικών χημικών ομάδων είτε λόγω της παρουσίας πρωτεϊνικών ομάδων που τους επιτρέπουν να δρουν στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού (Jafari, 2017).

1.3.6 Άλλα συστατικά

Τα γαλακτώματα τροφίμων είναι πολύπλοκα συστήματα και μπορεί να περιέχουν επίσης άλατα, σάκχαρα, χρωστικές, αρωματικές ύλες, αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά συστατικά. Αυτά τα συστατικά ενδεχομένως να επηρεάσουν την κολλοειδή δομή του γαλακτώματος. Τα άλατα, λόγω του ιοντικού τους χαρακτήρα, είναι ίσως τα πιο σημαντικά συστατικά, καθώς μπορούν να επηρεάσουν τη διαλυτότητα άλλων λειτουργικών συστατικών όπως των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών. Τα άλατα επηρεάζουν επίσης την ηλεκτροστατική κολλοειδή σταθερότητα μεταξύ των σωματιδίων. Τα σάκχαρα είναι δυνατόν να μειώσουν τη διηλεκτρική σταθερά της συνεχούς φάσης, η οποία επηρεάζει τις κολλοειδείς αλληλεπιδράσεις, ενώ ορισμένα σάκχαρα, όπως η τρεχαλόζη, είναι γνωστό ότι παρέχουν προστασία στις πρωτεΐνες έναντι της μετουσίωσης κατά τη θέρμανση ή την ξήρανση. Οι αρωματικές ουσίες, οι χρωστικές και τα συντηρητικά υπάρχουν συνήθως σε σχετικά χαμηλά επίπεδα και γενικώς δεν επηρεάζουν τα φυσικά χαρακτηριστικά του συστήματος. Ωστόσο, ορισμένα συστατικά μπορεί μεταναστεύσουν από τη μία φάση στην άλλη (Varzakas, Polychniatou and Tzia, 2015).

1.4 Σχηματισμός μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των σταγονιδίων

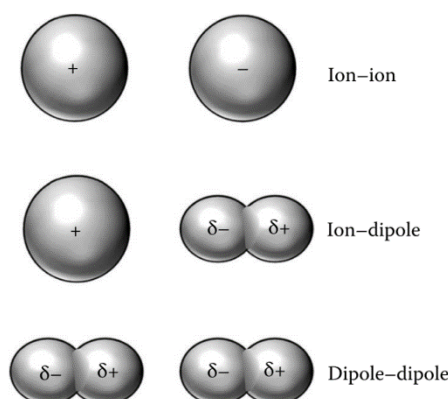
1.4.1 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των σταγονιδίων

Οι κολλοειδείς αλληλεπιδράσεις καθορίζουν εάν τα σταγονίδια μέσα σε ένα γαλάκτωμα θα παραμένουν ως ξεχωριστές οντότητες ή αν συνδέονται μεταξύ τους. Επίσης καθορίζουν τα χαρακτηριστικά των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται, για παράδειγμα, το μέγεθος, το σχήμα, το πορώδες και την παραμορφωσιμότητά τους. Πολλές από τις φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων τροφίμων καθορίζονται από τη χωρική κατανομή των σταγονιδίων, το βαθμό συσσωμάτωσής τους και τη φύση των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων, όπως η σταθερότητα, η υφή, η

εμφάνιση, η αίσθηση στο στόμα και η πέψη. Υπάρχουν τρεις κύριες δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των σταγονιδίων γαλακτώματος οι οποίες αναλύονται παρακάτω (McClements, 2016a).

1.4.2 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ των μοριακών δομών που διαθέτουν μόνιμο ηλεκτρικό φορτίο, όπως τα ιόντα και τα πολικά μόρια (Sneha and Kumar, 2022). Τα ιόντα είναι ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια ατόμων ή ομάδων χημικά ενωμένων ατόμων με προσθήκη ή αφαίρεση ηλεκτρονίων. Ένα πολικό μόριο δεν έχει καθαρό φορτίο (στο σύνολό του το μόριο είναι ηλεκτρικά ουδέτερο), αλλά λειτουργεί ως ηλεκτρικό δίπολο λόγω της ανισοκατανομής των φορτίων μέσα σε αυτό. Ορισμένα άτομα έλκουν τα ηλεκτρόνια που είναι δεσμευμένα από ομοιοπολικούς δεσμούς εντονότερα από άλλα άτομα (Atkins and De Paula, 2010), λόγω αυξημένης ηλεκτραρνητικότητας. Σε τέτοια περίπτωση το ηλεκτραρνητικότερο άτομο αποκτά σημειακό αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο (q^-), ενώ στο άλλο συνδεδεμένο ή στα άλλα συνδεδεμένα, χαμηλής ηλεκτραρνητικότητας, κατανέμεται αντίστοιχο θετικό φορτίο (q^+). Εάν τα σημειακά φορτία εντός ενός μορίου κατανέμονται συμμετρικά, το μόριο δεν εκδηλώνει πολικότητα (π.χ. CCl_4). Το αντίθετο συμβαίνει αν τα φορτία κατανέμονται ασύμμετρα, οπότε το μόριο εμφανίζει πολικότητα (Israelachvili, 2011).



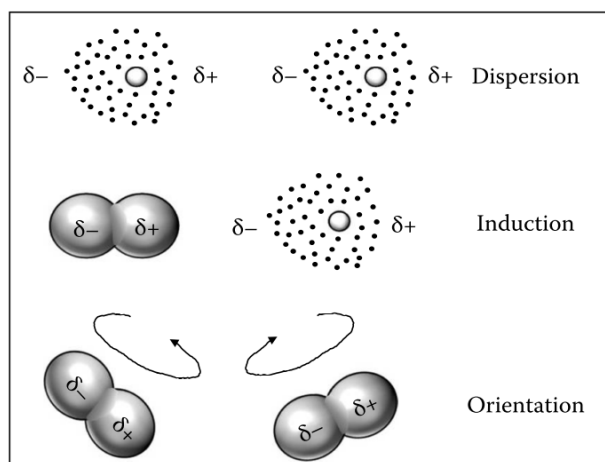
Εικόνα 1.7 Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων τύπων ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων (McClements, 2016a).

Χαρακτηριστική περίπτωση πολικότητας λόγω ασυμμετρίας μορίου είναι αυτή του μορίου του νερού (H_2O), στο οποίο τα τρία άτομα δεν βρίσκονται επί ευθείας, αλλά σχηματίζουν γωνία $104,50^\circ$ με κορυφή το οξυγόνο. Η ισχύς ενός διπόλου χαρακτηρίζεται από τη διπολική του ροπή $\mu=q|$, όπου l είναι η απόσταση μεταξύ δύο φορτίων q^+ και q^- . Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση και η απόσταση των σημειακών ηλεκτρικών φορτίων, τόσο μεγαλύτερη είναι η διπολική ροπή του μορίου (Sneha and

Kumar, 2022). Οι διαφορετικοί τύποι ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης που μπορεί να συμβούν ανάμεσα σε μονίμως φορτισμένα μοριακά είδη (ιόν-ιόν, δίπολο-ιόν, δίπολο-δίπολο) φαίνονται στην Εικόνα 1.6.

1.4.3 Δυνάμεις van der Waals

Οι δυνάμεις van der Waals είναι ελκτικές διαμοριακές δυνάμεις και έχουν ηλεκτροστατικό χαρακτήρα. Αναπτύσσονται σε όλα τα σωματίδια είτε έχουν ιοντική, πολική ή μη πολική φύση. Η ισχύς των δυνάμεων van der Waals είναι ασθενής (περίπου 1% της ισχύος ενός ομοιοπολικού δεσμού), ωστόσο σε κολλοειδή συστήματα όπου τα διεσπαρμένα σωματίδια εμφανίζουν σημαντικές διαστάσεις έχουν ιδιαίτερη σημασία (Abd-Elsalam and Murugan, 2022). Συνήθως χωρίζονται σε τρία είδη δυνάμεων, εξαρτώμενες από την πόλωση των μορίων (Εικόνα 1.8):



Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων van der Waals (McClements, 2016a).

Δυνάμεις διασποράς: Οι δυνάμεις αυτές προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός στιγμιαίου διπόλου και ενός διπόλου που προκαλείται σε ένα γειτονικό μόριο λόγω της παρουσίας του στιγμιαίου διπόλου. Τα ηλεκτρόνια σε ένα μόριο μετακινούνται συνεχώς, οδηγώντας σε ανομοιόμορφη κατανομή στο χώρο των αρνητικά φορτισμένων ηλεκτρονίων με συνέπεια, το μόριο να αποκτήσει στιγμιαία πολικότητα, σχηματίζοντας στιγμιαίο δίπολο. Το στιγμιαίο δίπολο παράγει ηλεκτρικό πεδίο που διεγείρει ένα γειτονικό μόριο, καθιστώντας και αυτό δίπολο. Συνεπώς, υπάρχει μία στιγμιαία ελκτική δύναμη μεταξύ των δύο διπόλων. Η έλξη μεταξύ των μορίων είναι πεπερασμένη, το δε συνολικό φορτίο στα μεμονωμένα μόρια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση είναι μηδενικό.

Επαγωγικές δυνάμεις: Οι δυνάμεις αυτές προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός σταθερού διπόλου και ενός διπόλου που προκαλείται σε ένα γειτονικό μόριο παρουσία του μόνιμου διπόλου. Ένα μόνιμο δίπολο προκαλεί αλλοίωση της κατανομής των ηλεκτρονίων ενός γειτονικού μορίου που οδηγεί στο σχηματισμό ενός επαγόμενου διπόλου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του μόνιμου διπόλου και του επαγόμενου διπόλου οδηγεί σε ελκτική δύναμη μεταξύ των μορίων.

Δυνάμεις προσανατολισμού: Οι δυνάμεις αυτές προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο μόνιμων διπόλων που περιστρέφονται συνεχώς. Η περιστροφή και ο προσανατολισμός γειτονικών διπόλων επηρεάζεται από τις ασθενείς ελκτικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Όταν η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο διπόλων είναι αρκετά ισχυρή ώστε να προκαλέσει μόνιμη ευθυγράμμιση, υπάρχει το φαινόμενο ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου που περιγράφηκε παραπάνω.

Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals είναι πολύ σημαντικές για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μη πολικών μορίων, όπου οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν συμβάλλουν σημαντικά. Πράγματι, η δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των οργανικών υγρών διέπονται σε μεγάλο βαθμό από τις αλληλεπιδράσεις van der Waals μεταξύ των μορίων (Sneha and Kumar, 2022).

1.4.4 Στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις αλληλοεπικάλυψης

Όταν δύο άτομα ή μόρια έλθουν τόσο κοντά, ώστε τα ηλεκτρόνιά τους να αλληλεπικαλύπτονται, αναπτύσσεται εξαιρετικά μεγάλη απωστική δύναμη μεταξύ τους. Αυτή η στερεοχημική δύναμη αλληλοεπικάλυψης έχει πολύ μικρό εύρος δράσης και αυξάνεται κατά πολύ όταν η απόσταση μεταξύ δύο μορίων γίνεται μικρότερη από το άθροισμα των ακτίνων τους ($\sigma = r_1 + r_2$). Σε μεγαλύτερες αποστάσεις, η στερεοχημική δύναμη αλληλοεπικάλυψης είναι αμελητέα, ενώ σε μικρότερες αποστάσεις, λαμβάνει χώρα μία απότομη αύξηση του δυνητικού ζεύγους αλληλεπίδρασης, πράγμα που σημαίνει ότι τα μόρια αντιδρούν έντονα το ένα με το άλλο (de Melo Barbosa *et al.*, 2019; Sneha and Kumar, 2022). Η ισχυρή απώθηση που προκύπτει από τη στερεοχημική επικάλυψη καθορίζει το πραγματικό μέγεθος και το σχήμα των ατόμων και των μορίων και καθορίζει πόσο κοντά μπορούν να έρθουν μεταξύ τους και επομένως, έχει ισχυρή επίδραση στη χωρική κατανομή των μορίων σε υγρά και στερεά (McClements, 2016a).

1.5 Σχηματισμός και μέθοδοι παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Για να παρασκευαστεί ένα γαλάκτωμα απαιτούνται δύο μη αναμίξιμα (ή αλληλοδιαλυόμενα) υγρά, εκ των οποίων το ένα συνήθως είναι νερό, επιφανειοδραστική ουσία και ενέργεια. Η ενέργεια αποδίδεται στο σύστημα κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Αν και ο όρος «ομογενοποίηση» έχει ευρύτερη έννοια, εντούτοις επικράτησε η χρήση του για τον χαρακτηρισμό της διαδικασίας ανάμιξης δύο μη αναμίξιμων υγρών, με διασκορπισμό του ενός στο άλλο, προς σχηματισμό γαλακτώματος, καθώς και για τη μείωση του μεγέθους των διεσπαρμένων σταγονιδίων σε ένα ήδη υπάρχον γαλάκτωμα. Αντίστοιχα χαρακτηρίζεται «ομογενοποιητής» το σύστημα ή η συσκευή με την οποία εκτελούνται οι ως άνω διαδικασίες. Η τεχνική γαλακτωματοποίησης μπορεί να είναι απλώς μία μορφή ανάμιξης. Ο σχηματισμός του γαλακτώματος προϋποθέτει ότι η ενέργεια που μεταδίδεται στο σύστημα ξεπερνά την αντίσταση για αύξηση της διεπιφάνειας μεταξύ των δύο υγρών, που προκαλείται λόγω του διασκορπισμού του ενός υγρού στο άλλο, αντίσταση η οποία προκύπτει από τη διεπιφανειακή τάση των συστατικών. Θεωρητικά, το έργο που απαιτείται για να παραχθεί ένα γαλάκτωμα είναι ισοδύναμο προς το γινόμενο της διεπιφανειακής τάσης των επιφανειών και της νεο-σχηματιζόμενης επιφάνειας.

Η συνολική ελεύθερη ενέργεια για τη δημιουργία γαλακτώματος (ΔG), υπό σταθερή θερμοκρασία, μπορεί να υπολογιστεί από την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta G = \Delta A\gamma - T\Delta S$$

Εξίσωση 1-3

Όπου ΔA είναι η αύξηση της διεπιφάνειας, γ η επιφανειακή τάση, T η απόλυτη θερμοκρασία και ΔS η μεταβολή της εντροπίας.

Η τιμή της ΔG είναι θετική, καθώς το γινόμενο $\Delta A\gamma$ είναι πάντα θετικό και επειδή η τιμή της εντροπίας διασποράς $T\Delta S$, είναι κατά πολύ μικρότερη της ενέργειας που απαιτείται για την διάνοιξη της διεπιφάνειας. Αυτό σημαίνει ότι η δημιουργία γαλακτώματος είναι μία μη-αυθόρμητη διαδικασία και ως εκ τούτου απαιτείται ενέργεια για να πραγματοποιηθεί. Κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης λαμβάνουν χώρα διάφορες διεργασίες όπως είναι η διάρρηξη των σταγονιδίων, η προσρόφηση του γαλακτωματοποιητή στη διεπιφάνεια και η σύγκρουση των σταγονιδίων μεταξύ τους. Όλες οι παραπάνω διεργασίες λαμβάνουν χώρα πολλαπλές φορές κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης και ο χρόνος διάρκειάς τους είναι εξαιρετικά μικρός (Tadros, 2018).

Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων με μεγάλο μέγεθος σταγονιδίων (μακρογαλακτώματα) είναι σχετικά εύκολος. Για το λόγο αυτό απαιτείται συνήθως χαμηλή παροχή ενέργειας. Αντίθετα η δημιουργία

μικρών σταγονιδίων όπως συμβαίνει στα μικρο/νανο-γαλακτώματα είναι δύσκολη, γιατί απαιτεί μεγαλύτερη παροχή ενέργειας και μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή. Η πρόσθετη ενέργεια που απαιτείται μπορεί να δικαιολογηθεί με βάση την πίεση Laplace (ΔP_L) (Tadros, 2016). Η διεπιφανειακή δύναμη που είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση ενός σταγονιδίου σε σφαιρικό σχήμα χαρακτηρίζεται από την πίεση Laplace, η οποία ενεργεί διαμέσου της διεπιφάνειας ελαίου-νερού προς το κέντρο του σταγονιδίου, έτσι ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη πίεση εντός του σταγονιδίου σε σχέση με το εξωτερικό του (McClements, 2016a):

$$\Delta P_L = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad \text{Εξίσωση 1-4}$$

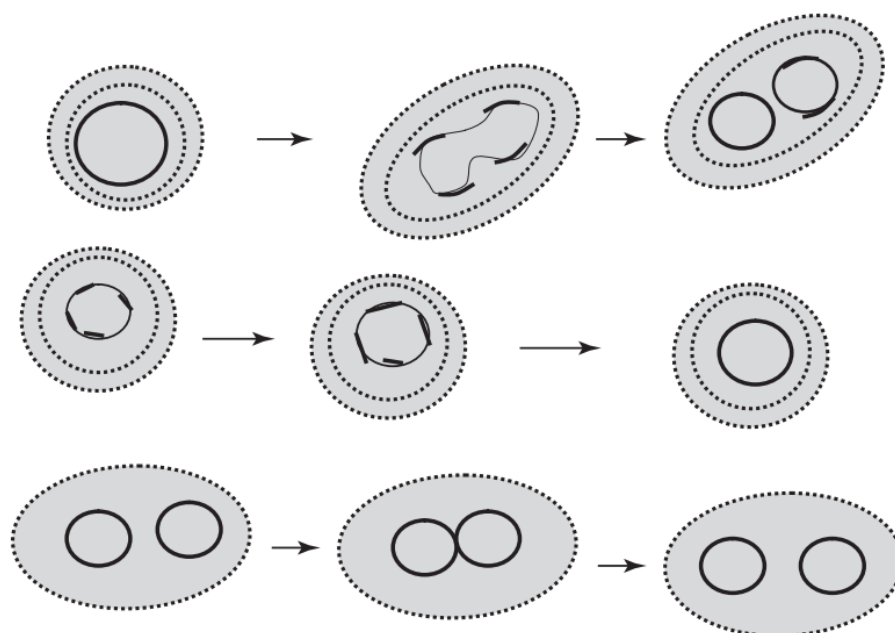
Όπου R_1 και R_2 είναι οι κύριες ακτίνες καμπυλότητας του σταγονιδίου.

Να σημειωθεί ότι το σφαιρικό σχήμα εξασφαλίζει τη μικρότερη δυνατή επιφάνεια για ίδιο όγκο, επομένως και την ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας σχηματισμού του σταγονιδίου.

Στα σφαιρικά σταγονίδια $R = R_1 = R_2$, οπότε ο παραπάνω τύπος διαμορφώνεται όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta P_L = \frac{2\gamma}{R} \quad \text{Εξίσωση 1-5}$$

Προκειμένου να παραμορφωθεί και να διαρρηχθεί ένα σταγονίδιο κατά την ομογενοποίηση, είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί μία εξωτερική δύναμη που να είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τη διεπιφανειακή δύναμη που συγκρατεί το σταγονίδιο. Κατά τη διεργασία αυτήν, τα σταγονίδια αποκτούν ελλειψοειδή ή ωοειδή μορφή που αυξάνει την πίεση Laplace. Η εξίσωση 1.5 υποδεικνύει ότι η πίεση που απαιτείται για να διασπαστεί ένα σταγονίδιο αυξάνεται καθώς αυξάνεται η διεπιφανειακή τάση ή μειώνεται το μέγεθος των σταγονιδίων. Δεδομένου ότι η ενέργεια αυτή μεταδίδεται γενικά από το περιβάλλον υγρό μέσω της ανάδευσης, απαιτείται υψηλότερη καταπόνηση άρα και ενέργεια για την παραγωγή μικρότερων σταγονιδίων (Tadros, 2018).



Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη γαλακτωματοποίηση. Τα σταγονίδια παριστάνονται με λεπτές γραμμές και η επιφανειοδραστική ουσία με πιο παχιές ή διακεκομμένες γραμμές (Tadros, 2013b).

1.5.1 Ο ρόλος του γαλακτωματοποιητή στο σχηματισμό μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

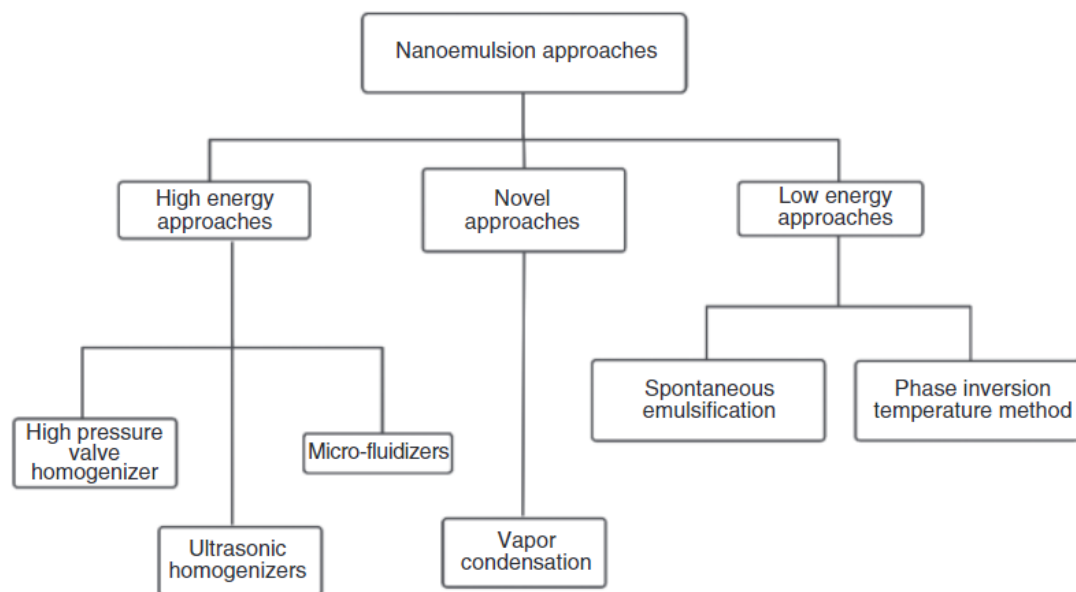
Η ευκολία με την οποία διασπάται ένα σταγονίδιο κατά την ομογενοποίηση αυξάνεται καθώς μειώνεται η διεπιφανειακή τάση (Εξίσωση 1.5). Συνεπώς, η μορφοποίηση σταγονιδίων με μικρότερα μεγέθη μπορεί να διευκολυνθεί παρουσία γαλακτωματοποιητών, καθώς οι τελευταίοι έχουν την ιδιότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση της διεπιφάνειας. Για παράδειγμα, η προσθήκη ενός γαλακτωματοποιητή που μειώνει τη διεπιφανειακή τάση από τα 50 στα 5 mN m⁻¹ οδηγεί σε δραστική μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων που παράγονται υπό όμοιες συνθήκες στρωτής ροής. Εντούτοις, σημειώνεται ότι δεν επιτυγχάνεται υποδεκαπλασιασμός του μεγέθους τους, όπως θεωρητικά θα αναμενόταν ίσως, καθώς υπεισέρχονται διάφοροι άλλοι παράγοντες που καθορίζουν επίσης την αποτελεσματικότητα των γαλακτωματοποιητών στη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων. Πρώτον, πρέπει να ληφθεί υπόψη ο ρυθμός με τον οποίο ένας γαλακτωματοποιητής προσροφάται στην επιφάνεια των σταγονιδίων κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Αμέσως μετά τον σχηματισμό τους, τα σταγονίδια έχουν χαμηλή συγκέντρωση προσροφημένου γαλακτωματοποιητή στην επιφάνειά τους, και κατά συνέπεια είναι δυσκολότερη η διάσπασή τους λόγω της σχετικά υψηλής επιφανειακής

τάσης. Με τον χρόνο συσσωρεύεται μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτωματοποιητή στη διεπιφάνεια, η οποία μειώνει την ενδοεπιφανειακή τάση, και ως εκ τούτου διευκολύνει τη διάσπαση του σταγονιδίου (Ashaolu, 2021a). Έτσι, όσο ταχύτερα προσροφάται ο γαλακτωματοποιητής στην επιφάνεια των σταγονιδίων κατά την ομογενοποίηση, τόσο μικρότερα είναι τα σταγονίδια που παράγονται. Δεύτερον, οι γαλακτωματοποιητές έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν το ιξώδες της διεπιφάνειας των σταγονιδίων του γαλακτώματος, γεγονός που παρεμποδίζει τη περαιτέρω διάσπασή τους και οδηγεί σε μεγαλύτερα μεγέθη σταγονιδίων από εκείνα που αναμένονταν με βάση τη διεπιφανειακή τάση ισορροπίας. Αυτά τα δύο φαινόμενα εν μέρει αντιπροσωπεύουν την κακή συσχέτιση μεταξύ μεγέθους σταγονιδίων και διεπιφανειακής τάσης ισορροπίας που συχνά αναφέρεται στη βιβλιογραφία (McClements, 2016a).

Παρακάτω ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με παραδείγματα συστημάτων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που έχουν παρασκευαστεί στη βιβλιογραφία κάνοντας χρήση των παραπάνω κατηγοριών γαλακτωματοποιητών.

1.5.2 Τεχνικές παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας διαφορετικές ή συνδυασμένες τεχνικές ομογενοποίησης. Όπως έχει αναφερθεί, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα αποτελούνται από μικρού μεγέθους σταγονίδια με μεγάλη επιφάνεια, και για να δημιουργηθεί τέτοια αυξημένη επιφάνεια απαιτείται ενέργεια που παρέχεται από εξωτερικές πηγές (Marzuki, Wahab and Hamid, 2019). Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μπορούν να παρασκευαστούν σε ένα μόνο βήμα, αλλά πιο συχνά ακολουθείται ένας αριθμός διαδοχικών σταδίων. Στην αρχή παρασκευάζονται ξεχωριστές διασπορές ελαίου και νερού που περιέχουν τα λιπόφιλα και υδρόφιλα συστατικά, αντίστοιχα. Τα λιποδιαλυτά επιφανειοδραστικά και άλλα βιοδραστικά συστατικά, όπως οι λιπόφιλες βιταμίνες που πρόκειται να συμπεριληφθούν στα τελικά γαλακτώματα, προστίθενται στο έλαιο, ενώ υδατοδιαλυτά επιφανειοδραστικά και άλλα υδρόφιλα συστατικά, όπως σάκχαρα, άλατα αντιοξειδωτικά, προστίθενται στην υδατική φάση. Το μέσο μέγεθος σταγονιδίων καθορίζεται από τη μέθοδο παρασκευής, τις συνθήκες λειτουργίας και τους χρησιμοποιούμενους γαλακτωματοποιητές (Ahmad and Nollet, 2021). Γενικώς, διακρίνονται δύο κύριες κατηγορίες τεχνικών παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, που είναι γνωστές ως προσεγγίσεις υψηλής ενέργειας ή χαμηλής ενέργειας ανάλογα με τις απαιτήσεις παροχής ενέργειας (Tadros, 2018).



Εικόνα 1.10 Ταξινόμηση διαφόρων προσεγγίσεων και τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό μικρο/νανο-γαλακτώματος (Chaudhari, Patel and Kumar, 2023).

1.5.2.1 Τεχνικές παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων υψηλής ενέργειας

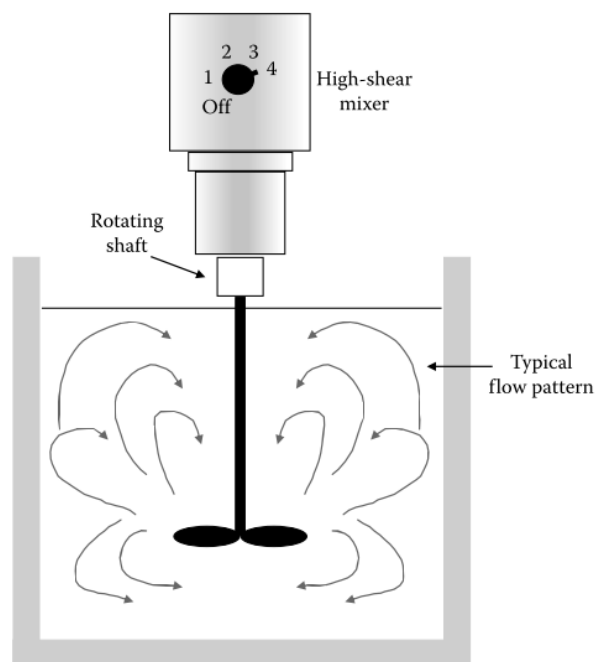
Κατά την παρασκευή ενός γαλακτώματος είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος των σταγονιδίων και την ομοιομορφία τους ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις ενεργειακές απαιτήσεις. Οι τεχνικές υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούν υψηλή μηχανική ενέργεια για τη διάσπαση των σταγονιδίων και συνήθως περιλαμβάνουν τη χρήση συγκεκριμένων συσκευών. Το κύριο πλεονέκτημά τους είναι ότι με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί η κατανομή μεγέθους και η σύνθεση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Walker, Decker and McClements, 2015). Οι τεχνικές υψηλής ενέργειας μπορούν να εφαρμοστούν σε γαλακτώματα με μεγάλο εύρος συστατικών, τα οποία με τη σειρά τους ορίζουν τη σταθερότητα, τη ρεολογία και τις οργανοληπτικές ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Τα βασικά μειονεκτήματά τους περιλαμβάνουν: τη χημική υποβάθμιση λόγω της έντονης μηχανικής διαδικασίας, καθώς επίσης ότι για να αναπαραχθούν σε μεγάλη κλίμακα απαιτείται εξελιγμένος εξοπλισμός και προσεκτική προσέγγιση (Chime, Kenechukwu and Attama, 2014). Η πραγματική ποσότητα ενέργειας ανά μονάδα όγκου που καταναλώνεται κατά την ομογενοποίηση είναι πολύ υψηλή, κυμαινόμενη από περίπου 2×10^7 J/m³ έως 3×10^8 J/m³ ανάλογα με το κλάσμα όγκου και το μέγεθος των σταγονιδίων. Από την ενέργεια αυτή, μόνο μικρό ποσοστό δαπανάται για τη διάρρηξη των σταγονιδίων. Σε ένα ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (HPH), περίπου το 99,8% της ενέργειας, μετατρέπεται σε θερμότητα (Jafari, 2017). Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί ότι οι τεχνικές υψηλής ενέργειας από μόνες τους δεν αρκούν για την παραγωγή σταγονιδίων μικρού μεγέθους (<100

nm), ενώ η χρήση φυσικών γαλακτωματοποιητών μεγάλου μοριακού βάρους εμποδίζει τον σχηματισμό πολύ μικρών σταγονιδίων

1.5.2.1.1 Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας

Στη βιομηχανία τροφίμων οι πιο συχνά χρησιμοποιημένες συσκευές για την ομογενοποίηση μίας λιπαρής και μίας υδατικής φάσης είναι οι ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας. Ανάλογα με την κλίμακα παραγωγής, στην ασυνεχή διεργασία ομογενοποίησης με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας το έλαιο, το νερό και τα άλλα συστατικά τοποθετούνται για να ομογενοποιηθούν σε ένα περιέκτη κατάλληλου όγκου για εργαστηριακή ή βιομηχανική χρήση. Στη συνέχεια τα συστατικά αναδεύονται με μία κεφαλή ανάμιξης η οποία περιστρέφεται σε υψηλή ταχύτητα (τυπικά έως 8000 rpm/min). Τα διάφορα συστατικά μπορούν να προστεθούν στην αρχή της διαδικασίας ή διαδοχικά, με σκοπό τη βελτίωση της διασποράς ή/και τη μείωση του χρόνου ομογενοποίησης (Jafari, 2017).

Η ταχύτερη περιστροφή της κεφαλής ανάμιξης προκαλεί την εμφάνιση διατμητικής τάσης μεγάλης ισχύος που αναπτύσσεται μεταξύ των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης και του αναμίκτη για την επίτευξη της ομογενοποίησης. Η ταχύτητα αυτή διαταράσσει τις επιφάνειες του ελαίου και του νερού, ωθώντας τα δύο υγρά να ενωθούν και να σχηματίσουν μικρά σταγονίδια. Ο σχεδιασμός της κεφαλής ανάμιξης καθορίζει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ομογενοποίησης. Για το λόγο αυτό είναι διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός διαφόρων τύπων κεφαλών ανάμιξης, αναλόγως με τη διεργασία και τις διάφορες καταστάσεις, 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 μειώσουν το χρόνο ομογενοποίησης, ή/και να εξασφαλίσουν πιο ομοιόμορφη ανάμιξη. Η αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης μπορεί επίσης να αυξηθεί με περιστροφή του περιέκτη, κατάλληλα διαμορφωμένου, με φορά αντίθετη αυτής με την οποία περιστρέφεται η κεφαλή ανάμιξης. Η ανάμιξη γενικώς οδηγεί σε 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 (Wang *et al.*, 2023).



Εικόνα 1.11 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (McClements, 2016a).

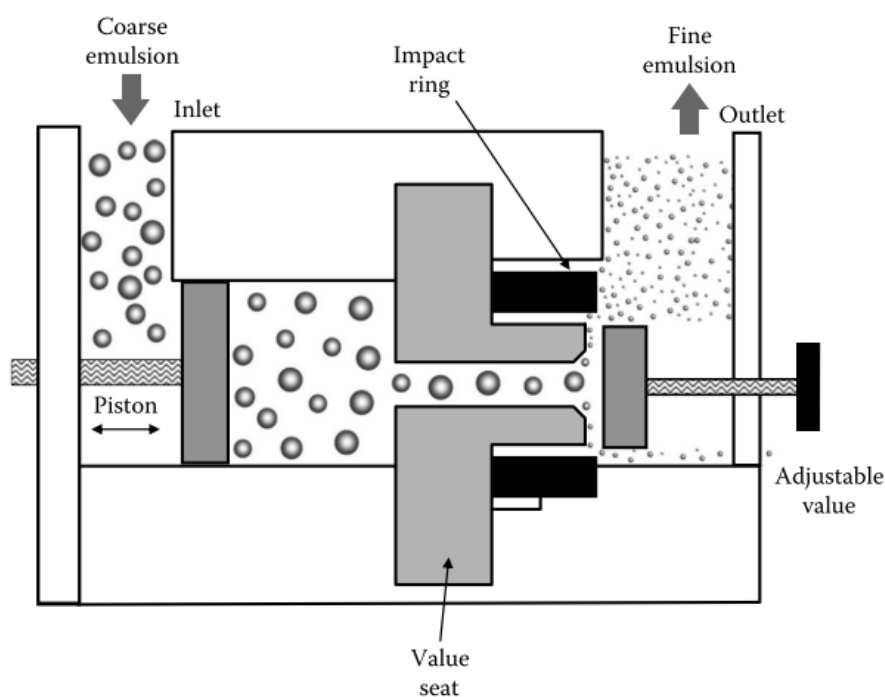
Οι ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την παρασκευή γαλακτωμάτων με χαμηλό ή μέτριο ιξώδες. Το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται συνήθως, όταν ο χρόνος ομογενοποίησης ή η ταχύτητα περιστροφής της κεφαλής ανάμιξης αυξάνεται, έως ότου φτάσει σε ένα κατώτατο όριο το οποίο εξαρτάται από τη φύση και τη συγκέντρωση των συστατικών που χρησιμοποιούνται. Οι βιομηχανικοί ομογενοποιητές συχνά σχεδιάζονται έτσι, ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική ενσωμάτωση φυσαλίδων αέρα κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, επειδή αυτό μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις σχετικά με την επεξεργασία και τις ιδιότητες των γαλακτωμάτων, ενώ μπορεί να επιταχύνει και τα φαινόμενα οξειδωσης.

Ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας χρησιμοποιούνται επίσης για να δημιουργήσουν ένα αρχικό προ-γαλάκτωμα τροφίμων και να εξασφαλίσουν την αποτελεσματική διασπορά και τη διάλυση των συστατικών στο γαλάκτωμα, ιδιαίτερα των στερεών συστατικών (McClements, 2016a).

1.5.2.1.2 Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης

Οι ομογενοποιητές υψηλής πίεσης μπορούν να ταξινομηθούν σε ομογενοποιητές ενός σταδίου και σε ομογενοποιητές δύο σταδίων. Η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ομογενοποίηση των δύο σταδίων, καθώς επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα ομογενοποίησης, γιατί τα πιθανά συσσωματώματα τα οποία μπορεί να προκύψουν κατά την ομογενοποίηση ενός σταδίου αποφεύγονται με τη χρήση της δεύτερης βαθμίδας ομογενοποίησης. Η ομογενοποίηση ενός σταδίου χρησιμοποιείται

για ομογενοποίηση προϊόντων υψηλού ιξώδους, ενώ η ομογενοποίηση δύο σταδίων χρησιμοποιείται σε προϊόντα με υψηλό περιεχόμενο σε λιπαρά και σε εκείνα που είναι επιθυμητή η υψηλή απόδοση ομογενοποίησης. Η ταξινόμηση αυτών των συστημάτων γίνεται μέσω της γεωμετρίας και του σχεδιασμού του ακροφυσίου και με βάση την κατεύθυνση της ροής. Η κατάταξη με βάση τη ροή είναι πιο χρήσιμη από ότι σύμφωνα με το σχεδιασμό του ακροφυσίου, αφού η διεύθυνση της ροής είναι καθοριστική για την αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης με συσκευές υψηλής πίεσης (Abd-El salam and Murugan, 2022). Το ακατέργαστο γαλάκτωμα αντλείται μέσω μίας κεντρικής εισόδου, εκτρέπεται και στη συνέχεια περνά μέσα από το διάκενο μεταξύ της έδρας και της βαλβίδας. Καθώς το αρχικό προ-γαλάκτωμα περνά μέσα από τη βαλβίδα, υπόκειται σε συνδυασμό έντονης διάτμησης και σπηλαιώσης, και σε συνθήκες τυρβώδους ροής, με αποτέλεσμα τα μεγάλα σταγονίδια να διασπώνται σε μικρότερα. Για μία κλασική αντλία, η πίεση ομογενοποίησης προσδιορίζεται από τη δύναμη που ενεργεί αξονικά στο κάτω άκρο της κινητής βαλβίδας και κυμαίνεται από 5 έως 50 Μpa (McClements, 2016a).



Εικόνα 1.12 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποιητή πίεσης (McClements, 2016a).

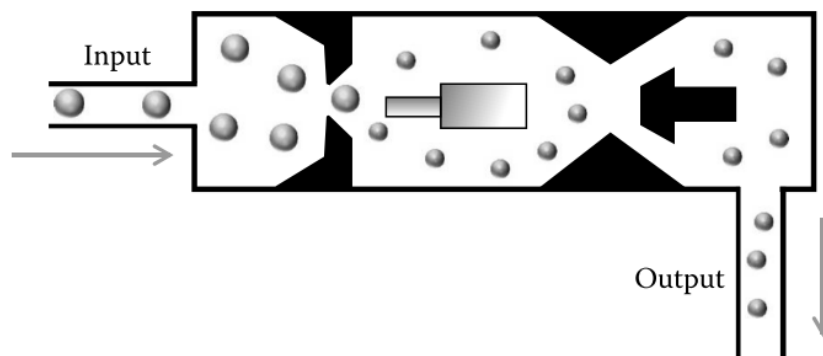
1.5.2.1.3 Συστήματα υπερήχων

Τα συστήματα υπερήχων χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη βιομηχανία τροφίμων αλλά κυρίως σε εργαστηριακό επίπεδο για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (N. Li *et al.*, 2022). Οι

υπέρηχοι μπορούν να δημιουργηθούν είτε μηχανικά ή ηλεκτρικά (αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο). Ο ευρέως χρησιμοποιημένος τύπος συστήματος παράγει παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο υψηλής συχνότητας, το οποίο με κατάλληλη διάταξη προκαλεί μηχανική δόνηση της ίδιας συχνότητας (Mason *et al.*, 2006). Οι δονήσεις αυτές προκαλούν την εμφάνιση φαινομένων σπηλαιώσης και έντονης τυρβώδους ροής στο υπό ομογενοποίηση μίγμα (Leong, Ashokkumar and Kentish, 2011). Η σπηλαιώση είναι ο σχηματισμός και η κατάρρευση των φυσαλίδων αέρα σε ένα ρέον υγρό. Όταν η σπηλαιώση λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια μεταξύ δύο μη αναμειγμένων υγρών, η μία φάση διασπείρεται στην άλλη με άμεσο αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώματος. Κατά τη γαλακτωματοποίηση, οι υπέρηχοι εκπέμπονται από συγκεκριμένους μετατροπείς στο εξωτερικό τοίχωμα του δοχείου ή μέσω κυλινδρικών κεφαλών δονήσεων υπερήχων στο βυθισμένο υγρό.

Οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των ομογενοποιητών υπερήχων είναι η ένταση, η διάρκεια και η συχνότητα των υπερηχητικών κυμάτων (Abbas *et al.*, 2013; Tang, Shridharan and Sivakumar, 2013). Είναι δυνατόν να σχηματιστεί γαλάκτωμα χρησιμοποιώντας κύματα υπερήχων με συχνότητες μέχρι περίπου 5 MHz, ωστόσο η αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης μειώνεται με την αύξηση της συχνότητας. Για το λόγο αυτόν, οι περισσότερες εμπορικές συσκευές χρησιμοποιούν υπέρηχους με συχνότητες μεταξύ 20 και 50 kHz. Το μέγεθος των σταγονιδίων που παράγονται κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης μπορεί να μειωθεί αυξάνοντας την ένταση ή τη διάρκεια της ομογενοποίησης υπερήχων. Για σταθερή ένταση, το μέγεθος των σταγονιδίων συνήθως μειώνεται με αύξηση του χρόνου ομογενοποίησης. Για σταθερό χρόνο ομογενοποίησης, το μέγεθος των σταγονιδίων τείνει να μειώνεται με την αύξηση της έντασης των υπερήχων (McClements, 2016a). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος των σταγονιδίων κατά την ομογενοποίηση με υπέρηχους είναι: ο σχεδιασμός της χρησιμοποιούμενης συσκευής (π.χ. ασυνεχής ή συνεχής διεργασία), θερμοκρασία, αναλογία φάσεων, τύπος και συγκέντρωση επιφανειοδραστικών ουσιών, ιξώδες των επιμέρους φάσεων κ.α. (Abbas *et al.*, 2013).

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 προετοιμαστεί πρώτα ένα αρχικό προ-γαλάκτωμα πριν από την εφαρμογή των υπερήχων. Η διάμετρος των σταγονιδίων, μετά την επεξεργασία με υπέρηχους, κυμαίνεται από 0,1 έως 0,6 μm (Chaiyasit *et al.*, 2008; Xenakis, Papadimitriou and Sotiroudis, 2010).



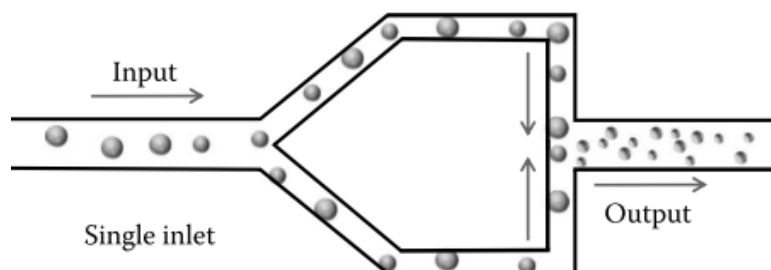
Εικόνα 1.13 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποίησης με υπέρηχους (McClements, 2016a).

Παρότι η χρήση των υπερήχων είναι απλή, δεν χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανικό επίπεδο καθώς ο έλεγχος της διεργασίας είναι δύσκολος και έχει μικρό βαθμό απόδοσης. Η εφαρμογή των υπερήχων δεν οδηγεί σε βέλτιστη κατανομή σταγονιδίων και για αυτόν το λόγο συνήθως χρησιμοποιείται συνδυαστικά με άλλες μεθόδους. Ακόμη, οι υπέρηχοι υψηλής έντασης (με ισχύ > 10 W) είναι ικανοί να τροποποιήσουν τις ιδιότητες του υλικού μέσω του οποίου διαδίδονται, δημιουργώντας αύξηση πίεσης, θερμοκρασίας και διατμητικής τάσης. Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσουν τροποποιήσεις στη δομή των πρωτεϊνών που πιθανώς να υπάρχουν στα γαλακτώματα όπως επίσης και αλλαγές στη σύνθεση και τη δομή των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης (Varzakas, Polychniatou and Tzia, 2015).

1.5.2.1.4 Μικρορευστοποιητές

Η μικρορευστοποίηση είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται είτε για ομογενοποίηση ενός σταδίου ή δύο σταδίων και είναι ικανή να δημιουργήσει αποτελεσματικά γαλακτώματα με εξαιρετικά μικρό μέγεθος σταγονιδίων. Ο μικρορευστοποιητής αποτελείται συνήθως από μία είσοδο για το ρευστό, μία διάταξη άντλησης, και ένα θάλαμο αλληλεπίδρασης που περιέχει δύο κανάλια μέσω των οποίων τα υγρά ρέουν και αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους (Εικόνα 1.13). Τα ρευστά που εισάγονται μέσα στον ομογενοποιητή επιταχύνονται εντός των καναλιών χρησιμοποιώντας τη συσκευή άντλησης, με σκοπό να προσκρούσουν πάνω σε μία στερεή επιφάνεια. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται έντονες διατμητικές τάσεις που αναγκάζουν τα υγρά να αναμιχθούν μεταξύ τους και να σχηματισθούν σταγονίδια. Χαρακτηριστικό πλεονέκτημα ενός μικρορευστοποιητή είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων σε ένα προϋπάρχον γαλάκτωμα. Εναλλακτικά, η τεχνική ομογενοποίησης με μικρορευστοποιητή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία γαλακτωμάτων αναμιγνύοντας απευθείας την υδατική και τη λιπαρή φάση (Ozturk and Turasan, 2021). Σε αυτήν την περίπτωση, η λιπαρή και η υδατική φάση κινούνται μέσω διαφορετικών καναλιών του συστήματος κατ' αντιστροφή με υψηλές ταχύτητες, η δε διασπορά γίνεται κατά τη συνάντηση των ροών. Αυτό

έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται γαλακτώματα με εξαιρετικά μικρά σταγονίδια, καθώς όσες περισσότερες φορές περνά το γαλάκτωμα από το μικρορευστοποιητή, τόσο μειώνεται η διάμετρος των σταγονιδίων. Επίσης με αύξηση της πίεσης μπορούν να παραχθούν γαλακτώματα με ακόμη μικρότερα σταγονίδια, καθώς η μεταβολή της πίεσης επιταχύνει τα υγρά διαμέσου των καναλιών και ωθεί τα μεγαλύτερα σταγονίδια να διασπαστούν σε μικρότερα (Varzakas, Polychniatou and Tzia, 2015)



Εικόνα 1.14 Σχηματική απεικόνιση ομογενοποίησης με μικρορευστοποιητή (McClements, 2016a).

Ο μικρορευστοποιητής είναι διαθέσιμος τόσο για μικρής κλίμακας εργαστηριακές εφαρμογές όσο και εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας. Ένας βιομηχανικής κλίμακας μικρορευστοποιητής λειτουργεί σε πιέσεις που ανέρχονται έως 275 MPa. Παρόμοια μέγιστη πίεση λειτουργίας μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση εργαστηριακών μοντέλων, τα οποία να παράγουν γαλακτώματα με πολύ μικρά σταγονίδια, δηλαδή, μικρότερα από 0,1 μm (McClements, 2016a).

1.5.2.2 Μέθοδοι παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων χαμηλής ενέργειας

Παρότι οι μέθοδοι παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων υψηλής ενέργειας είναι αρκετά απλές, θεωρούνται μη αποδοτικές ως προς την απόδοση και το ενεργειακό τους κόστος. Για το λόγο αυτόν έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι σχηματισμού μικρο/νανο-γαλακτώματος χαμηλής ενέργειας που απαιτούν όμως προσεκτικό έλεγχο των σχεδιαστικών μεταβλητών της παρασκευής τους (σύνθεση - συγκέντρωση επιφανειοδραστικών και συν-επιφανειοδραστικών συστατικών, ρυθμός προσθήκης συστατικών, ταχύτητα ανάμιξης, θερμοκρασία). Με αυτές τις μεθόδους, αξιοποιείται η αποθηκευμένη ενέργεια του συστήματος και η παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτώματος λαμβάνει χώρα όταν η μεταβολή της εντροπίας, που ευνοεί τη διασπορά, είναι υψηλότερη από την ενέργεια που απαιτείται για την αύξηση της επιφάνειας διασποράς.

Η επιτυχία της γαλακτωματοποίησης χαμηλής ενέργειας εξαρτάται από τις ιδιότητες των επιφανειοδραστικών ουσιών και της διεσπαρμένης φάσης. Τα βασικά τους πλεονεκτήματα είναι η χαμηλή κα-

τανάλωση ενέργειας και η μεγαλύτερη δυνατότητα αναπαραγωγής σε μεγάλη κλίμακα, καθώς το κόστος είναι χαμηλότερο και απαιτείται η χρήση απλών μεθόδων παρασκευής. Τα μειονεκτήματα της γαλακτωματοποίησης χαμηλής ενέργειας, είναι η απαίτηση για μεγάλη ποσότητα επιφανειοδραστικών συστατικών. Επιπλέον, οι φυσικοί μεγαλομοριακοί γαλακτωματοποιητές, όπως πρωτεΐνες ή πολυσακχαρίτες, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν με αυτές τις μεθόδους ομογενοποίησης. Αυτοί οι τελευταίοι παράγοντες περιορίζουν την εφαρμογή των μεθόδων χαμηλής ενέργειας (Walker, Decker and McClements, 2015; Ahmad and Leo M.L. Nollet, 2021).

Οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Η μία βασίζεται στην αναστροφή φάσης που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γαλακτωματοποίησης είτε λόγω θερμοκρασίας (PIT), είτε λόγω συγκέντρωσης (PIC), και η άλλη είναι η μέθοδος αυθόρμητης γαλακτωματοποίησης (Ohtani and Rasert, 2014).

1.5.2.2.1 Αναστροφή φάσης λόγω θερμοκρασίας (PIT)

Η μέθοδος αναστροφής φάσης λόγω θερμοκρασίας είναι μία τεχνική παρασκευής γαλακτώματος χαμηλής ενέργειας που βασίζεται στη μεταβολή της καμπυλότητας των επιφανειοδραστικών ουσιών λόγω της μεταβολής της υδρόφιλης και λιπόφιλης συμπεριφοράς του γαλακτωματοποιητή με τη θερμοκρασία. Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε επιφανειοδραστικές ουσίες ευαίσθητες σε μεταβολές της θερμοκρασίας, δηλαδή μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες τύπου πολυοξυαιθυλενίου (Ohtani and Rasert, 2014).

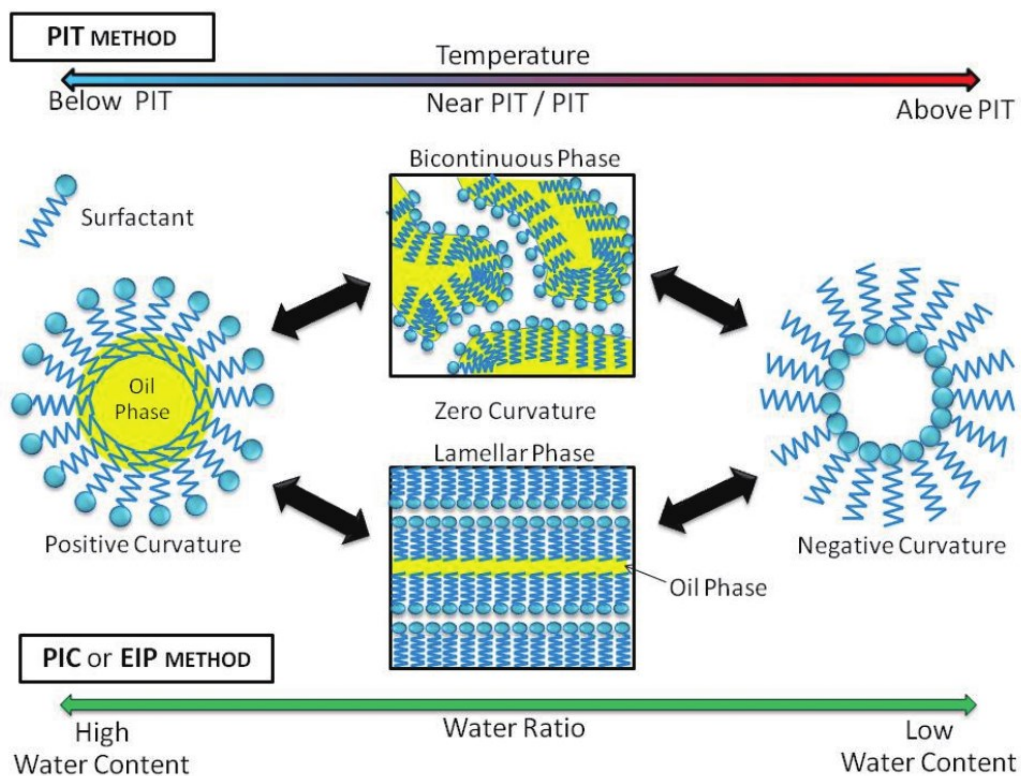
Για την παρασκευή ενός μικρο/νανο-γαλακτώματος με τη μέθοδο PIT, το έλαιο, το νερό και τα μη ιοντικά επιφανειοδραστικά αναμειγνύονται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύονται ελαφρά. Στη συνέχεια, το μείγμα θερμαίνεται σταδιακά. Ως αποτέλεσμα, η HLB του επιφανειοδραστικού μεταβάλλεται προοδευτικά. Η υδροφιλικότητα ενός μη ιοντικού επιφανειοδραστικού μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας, εξαιτίας της αύξησης της κινητικότητας των μορίων νερού που έχουν προσροφηθεί στις πολικές κεφαλές του επιφανειοδραστικού.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.13, σε θερμοκρασίες κάτω από το PIT, το τριαδικό σύστημα (νερό/μη ιονικό επιφανειοδραστικό/έλαιο) έχει τη μορφή μακρογαλακτώματος και οι υδροφιλικές κεφαλές του μη ιοντικού επιφανειοδραστικού είναι έντονα ενυδατωμένες και έχουν σχετικά μεγάλο όγκο, σε σύγκριση με το λιπόφιλο τμήμα του επιφανειοδραστικού. Σε χαμηλή θερμοκρασία, η μονοστοιβάδα του επιφανειοδραστικού παρουσιάζει μία μεγάλη θετική αυθόρμητη καμπυλότητα (κυρτή) ως προς την υδατική φάση σχηματίζοντας ένα γαλάκτωμα ε/ν. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αφύδρωση των υδρόφιλων κεφαλών και οι επιφανειοδραστικές ουσίες καθίστανται σταδιακά λιποφιλικές.

Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται περαιτέρω, οι κεφαλές του μη ιοντικού επιφανειοδραστικού αφυδατώνονται και η καμπυλότητα γίνεται αρνητική (κοίλη) ως προς στην υδατική φάση, μεταβάλλοντας τη μορφή του γαλακτώματος σε ν/ε.

Αυτό σημαίνει ότι οι αλλαγές στη θερμοκρασία προκαλούν μεταβολή της υδροφιλικότητας των κεφαλών της επιφανειοδραστικής ουσίας και μία επακόλουθη αλλαγή στην καμπυλότητα της διεπιφάνειας. Κατά την PIT ή τη μεσαία θερμοκρασία, η αυθόρμητη καμπυλότητα φτάνει κοντά στο μηδέν (ούτε κυρτή ούτε κοίλη) και εμφανίζεται ένα μικρο-γαλακτώμα ή μία υγρή στρωματική κρυσταλλική περιοχή. Η διεπιφανειακή τάση στο σημείο αυτό είναι πολύ μικρή και ως εκ τούτου παράγονται γαλακτώματα με πολύ μικρό μέγεθος σταγονιδίων.

Στη θερμοκρασία PIT, αυτά τα μικρά σταγονίδια δεν είναι σταθερά καθώς τείνουν να συσσωματωθούν με άλλα και να σχηματίσουν μακρογαλακτώμα. Έτσι, αν και είναι δυνατόν να σχηματιστούν γαλακτώματα κοντά στη θερμοκρασία PIT, αυτά είναι πολύ ασταθή. Για την παραγωγή σταθερών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, απαιτείται η θερμοκρασία διατήρησης να απέχει αρκετά από το σημείο PIT (Ohtani and Rasert, 2014).



Εικόνα 1.15 Σχηματική απεικόνιση της γαλακτωματοποίησης με τις μεθόδους PIT και PIC (Ohtani and Rasert, 2014)

Το σημείο PIT μπορεί να προσδιοριστεί επισημαίνοντας την αλλαγή στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων όπως η αγωγιμότητα, το ιξώδες η δυναμική σκέδασης φωτός και η θολότητα (Rao και McClement, 2010). Η αγωγιμότητα του συστήματος μειώνεται και η θολότητα αυξάνεται καθώς το μικρο/νανο-γαλάκτωμα μεταβαίνει από σύστημα ελαίου σε νερό σε σύστημα νερού σε έλαιο ή το αντίστροφο. Η θερμοκρασία στην οποία αλλάζουν δραστικά αυτές οι ιδιότητες είναι η PIT (Pathak, 2017).

1.5.2.3 Αναστροφή φάσης λόγω Σύστασης (Phase inversion Composition PIC)

Ο σχηματισμός του μικρο/νανο-γαλακτώματος με τεχνική PIC είναι παρόμοιος με την τεχνική PIT. Σε αυτήν την τεχνική παρατηρείται μία μετάπτωση στην αυθόρμητη καμπυλότητα, η οποία γίνεται με την τροποποίηση του κλάσματος όγκου του νερού και όχι της θερμοκρασίας. Αυτή η μετάπτωση αναφέρεται και ως καταστροφική αναστροφή φάσης (Jafari, 2019).

Για την παρασκευή ενός γαλακτώματος ϵ/ν με τη μέθοδο PIC, η επιφανειοδραστική ουσία διαλύεται στη λιπαρή φάση και στη συνέχεια προστίθεται στο μίγμα σταδιακά η υδατική φάση. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται αρχικά ένα γαλάκτωμα τύπου ν/ϵ . Καθώς συνεχίζεται η προσθήκη νερού, ο όγκος της υδατικής φάσης αυξάνεται σταδιακά και το γαλάκτωμα αναστρέφεται σε γαλάκτωμα ϵ/ν (Ohtani and Rasert, 2014). Παρόλο που η γαλακτωματοποίηση είναι μία αυθόρμητη διαδικασία, οι κινητήριες δυνάμεις είναι μικρές και το σύστημα απαιτεί πολύ χρόνο για να ισορροπήσει (Pathak, 2017).

Το σημείο αναστροφής του γαλακτώματος προσδιορίζεται με μέτρηση της αγωγιμότητάς του. Αν αναστραφεί γαλάκτωμα τύπου ν/ϵ σε ϵ/ν , θα παρατηρηθεί μία οξεία αύξηση της αγωγιμότητας. Αντιθέτως, αν ένα γαλάκτωμα τύπου ϵ/ν αναστραφεί σε ν/ϵ , θα παρατηρηθεί μία οξεία μείωση της αγωγιμότητας (McClements, 2022).

Για τη μέθοδο PIC, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες, ενώ για τη μέθοδο PIT μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες (Ohtani and Rasert, 2014).

1.5.2.4 Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση

Η αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφόρων φυσικοχημικών μηχανισμών. Πραγματική αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση λαμβάνει χώρα, όταν δύο μη αναμίξιμα υγρά έρχονται σε επαφή και στη συνέχεια γαλακτωματοποιούνται χωρίς εξωτερική παροχή ενέργειας, είτε θερμική ή μηχανική. Για διευκόλυνση της τεχνικής αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαλύτες

είτε παρουσία είτε απουσία επιφανειοδραστικών ουσιών. Όταν η αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση συμβαίνει μόνο με τη χρήση ελαίου, νερού και ενός αναμίξιμου με το νερό διαλύτη χωρίς επιφανειοδραστικό, ονομάζεται «φαινόμενο του ούζου», από το γνωστό ελληνικό ποτό (Ganachaud and Katz, 2005). Σε συστήματα τροφίμων, όπου η χρήση διαλύτη δεν συνιστάται λόγω κόστους, οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και περιορισμούς ασφάλειας, η αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση περιλαμβάνει την προσθήκη μίας λιπαρής φάσης, που περιέχει έλαιο και υδρόφιλο επιφανειοδραστικό, στην υδατική φάση (που περιέχει νερό και πιθανώς συν-επιφανειοδραστική ουσία).

Κατά την ανάμιξη των δύο φάσεων, πραγματοποιείται διάχυση των αναμίξιμων με το νερό συστατικών (διαλύτης, επιφανειοδραστική ή/και συν-επιφανειοδραστική ουσία) από τη λιπαρή φάση στην υδατική φάση (για να ληφθούν νανοσταγονίδια ε/ν), με αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση της περιοχής αλληλεπίδρασης των συστατικών, και την παραγωγή μετασταθούς γαλακτώματος.

Πρακτικά, η τεχνική της αυθόρμητης γαλακτωματοποίησης συνήθως υλοποιείται με τιτλοδότηση μίας λιπαρής φάσης (έλαιο + υδρόφιλο επιφανειοδραστικό συστατικό) σε υδατική φάση (που αποτελείται αρχικά μόνο από νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα). Εάν βελτιστοποιηθούν τόσο η σύνθεση του συστήματος (επιφανειοδραστική ουσία και τύπος και συγκέντρωση ελαίου) όσο και οι συνθήκες προετοιμασίας (θερμοκρασία, ρυθμός ανάδευσης, ρυθμός προσθήκης), μπορούν να σχηματιστούν μικρά σταγονίδια ελαίου (<100 nm). Οι πειραματικές συνθήκες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την απόκτηση σταγονιδίων στη νανοκλίμακα με αυτήν την αυθόρμητη μέθοδο γαλακτωματοποίησης σχετίζονται με πολύ υψηλή αναλογία διαλύτη/έλαιο. Η διάχυση των διαλυτών είναι επομένως ακόμη πιο έντονη και η αναταραχή που δημιουργείται προκαλεί σχηματισμό νανοσταγονιδίων (Manzoor et al., 2023).

Οι ιδιότητες του γαλακτώματος σε αυτή τη διαδικασία γαλακτωματοποίησης επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η επιφανειακή τάση, το ιξώδες της λιπαρής φάσης, η υδροφιλική λιποφιλική ισορροπία του γαλακτωματοποιητή, η υδατοδιαλυτότητα του οργανικού διαλύτη, η περιοχή μετάπτωσης φάσης, η συγκέντρωση και η μοριακή δομή του γαλακτωματοποιητή. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου γαλακτωματοποίησης είναι η απαίτηση υψηλής συγκέντρωσης επιφανειοδραστικών ουσιών. Η χρήση τέτοιων υψηλών συγκεντρώσεων επιφανειοδραστικών ουσιών δεν συνιστάται στη βιομηχανία τροφίμων λόγω υψηλού κόστους και νομοθετικών και οργανοληπτικών περιορισμών (Pathak, 2017).

Πίνακας 1.6 Συνθήκες και σύσταση για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (προσαρμοσμένος από Ashaolu, 2021)

Είδος γαλ/τή	Μέθοδος ομογενοποίησης	Ποσοστό λιπαρής φάσης w/w	Ποσοστό γαλ/τή w/w	Λιπαρή φάση	Μέγεθος σταγονιδίων (nm)	Αναφορά
<i>α. Μη-ιοντικοί γαλακτωματοποιητές</i>						
<i>Tween 20</i>	Μικρορευστοποιητής/Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	0.03, 1	1, 10	Ηλιέλαιο	117–280	(Mao <i>et al.</i> , 2010)
	Μικρορευστοποιητής	4	1.5	Αραβοσιτέλαιο, Miglyol 812 και έλαιο πορτοκαλιού	140–170	(Qian and McClements, 2011)
	Μικρορευστοποιητής	5	1–10	Καλαμποκέλαιο	113–143	(Qian and McClements, 2011)
	Μικρορευστοποιητής	0.3	0.5	β-καροτένιο σε εξάνιο	40–260	(Tan and Nakajima, 2005)
	Μικρορευστοποιητής	10	1	Έλαιο θυμαριού/έλαιο Miglyol 812	160–176	(Chang, McLandsborough and McClements, 2012)
				Έλαιο θυμαριού/καλαμποκέλαιο	170–196	
	Υπέρηχοι	15	5.6	Έλαιο λιναρόσπορου	135	(Kentish <i>et al.</i> , 2008)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	3	4–12	β-Καροτένιο σε έλαιο MCT	160–184	(Yuan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Polysorbate 20</i>	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	3	4–12	β-Καροτένιο σε έλαιο MCT	161–174	(Yuan <i>et al.</i> , 2008)
	Μικρορευστοποιητής	5	0.5	Έλαιο θυμαριού/καλαμποκέλαιο	164–196	(Ziani <i>et al.</i> , 2011)
<i>Tween 80</i>	Υπέρηχοι	6	6–24	Έλαιο βασιλικού	29–41	(Ghosh, Mukherjee and Chandrasekaran, 2013)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	20/4/1	1	PCL-υγρό/Λιποειδές S-75/α-τοκοφερόλη	170	(Hoeller, Sperger and Valenta, 2009)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	3	4–12	Έλαιο MCT	157–178	(Yuan <i>et al.</i> , 2008)

	Μικρορευστοποιητής	10	1	Έλαιο λεμονιού	217–296	(Rao and McClements, 2011b)
<i>Laureth-7(L7)</i>	Μέθοδος χαμηλής ενέργειας	40–80	4–10	Ισοεξαδεκάνιο	26–1277	(Peng <i>et al.</i> , 2010)
<i>Μονολαυρική δεκα-γλυκερόλη</i>	Μικρορευστοποιητής / Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	0.03, 1	1, 10	β-Καροτένιο σε ηλιέλαιο	115–279	(Mao <i>et al.</i> , 2010)
<i>Παλμιτική σακχαρόζη</i>	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	8/2, 10	1	d-Λιμονένιο, trans-κινναμαλδεΐδη, καρβακρόλη σε ηλιέλαιο	130–168	(Donsi <i>et al.</i> , 2012)
<i>Λαυρική σακχαρόζη</i>	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	20/4/1	1	PCL-υγρό/λιποειδές S-75/α-τοκοφερόλη	161	(Hoeller, Sperger and Valenta, 2009)
<i>Μονοπαλμιτική σακχαρόζη</i>	Μικρορευστοποιητής	10	1–20	Έλαιο λεμονιού	15–120	(Rao and McClements, 2011b)
b. Ιοντικοί γαλακτωματοποιητές						
<i>Pluronic F-68</i>	Υπέρηχοι	25	1–2.5	Ελαιόλαδο	379	(Wulff-Pérez <i>et al.</i> , 2009)
	Υπέρηχοι			Σησαμέλαιο	368	
	Υπέρηχοι			Σογιέλαιο	380	
<i>Δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο</i>	Μικρορευστοποιητής			Λάδι σιλικόνης	150	(Graves <i>et al.</i> , 2005)
	Μικρορευστοποιητής	5	1–10	Αραβοσιτέλαιο/οκταδεκάνιο	92–131	(Qian and McClements, 2011)
c. Πολυσακχαρίτες						
<i>Οκτενυληλεκτρικό αμυλονάτριο</i>	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	10	15	Neobee 1053	140	(Donsi <i>et al.</i> , 2012)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης			Neobee 1095	130	
	Μικρορευστοποιητής / Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	1	10	β-Καροτένιο σε ηλιέλαιο	262–674	(Mao <i>et al.</i> , 2010)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	12	12	Έλαιο μέντας/έλαιο MCT	184–228	(Liang <i>et al.</i> , 2012)
<i>Μαλτοδεξτρίνη/H-Cap</i>	Μικρορευστοποιητής / Υπέρηχοι	5, 10, 15	30/10 (40)	Ιχθυέλαιο	174–274	(Jafari, 2017)

<i>d. Πρωτεΐνες</i>						
<i>Πρωτεΐνη μπιζελιού</i>	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	8, 10	3	Ηλιέλαιο	184–218	(Donsi <i>et al.</i> , 2012)
<i>Πρωτεΐνη σόγιας</i>	Μικρορευστοποιητής	0.1	1	β-Καροτένιο σε εξάνιο	196	Chu <i>et al.</i> (2007)
<i>Συμπυκνωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος</i>	Μικρορευστοποιητής; / Υπέρηχοι	0.1; 20, 25	1; 10	β-Καροτένιο σε εξάνιο. d-λιμονένιο	145; 125–387	Chu <i>et al.</i> (2007), Jafari <i>et al.</i> (2006)
<i>Απομονώματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος</i>	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	15, 30, 45	4.3	Φυσικέλαιο	146–236	(Cortés-Muñoz, Chevalier-Lucia and Dumay, 2009)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	10	1	Καλαμποκέλαιο	75–121	(Lee and McClements, 2010)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	0.03, 1	1, 10	β-Καροτένιο σε ηλιέλαιο	160–373	(Relkin, Jung and Ollivon, 2009; Mao <i>et al.</i> , 2010)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	20	4.5	α-Τοκοφερόλη σε φοινικέλαιο	200–500	(Relkin, Jung and Ollivon, 2009)
<i>β-Λακτογλοβουλίνη (β-Ig)</i>	Μικρορευστοποιητής	5	1–10	Αραβοσιτέλαιο/οκταδεκάνιο	162	(Qian and McClements, 2011)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	20	1	Έλαιο σόγιας	350	(Sarkar <i>et al.</i> , 2009)
	Μικρορευστοποιητής	10	1	Αραβοσιτέλαιο	181	(Ahmed <i>et al.</i> , 2012)
<i>Καζεϊνικό νάτριο</i>	Μικρορευστοποιητής	0.05–0.3	0.5–5	β-Καροτένιο σε εξάνιο	17	Chu <i>et al.</i> (2007)
	Μικρορευστοποιητής	5	1–10	Αραβοσιτέλαιο/οκταδεκάνιο	179	(Qian and McClements, 2011)
	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης	40	3.6	α-Τοκοφερόλη/ τριακυλογλυκερόλες χαμηλής τήξης	255–416, 293–304	(Relkin, Jung and Ollivon, 2009)

1.6 Ιδιότητες μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα έχουν ιδιαίτερες ιδιότητες όπως μικρό μέγεθος σταγονιδίων, σημαντική σταθερότητα, διαυγή έως σχεδόν διαυγή εμφάνιση και ρυθμιζόμενη ρεολογία. Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν τα μικρο/νανο-γαλακτώματα ελκυστικά για πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμεύσουν ως δομικά στοιχεία για σχεδιασμό προηγμένων προϊόντων με μοναδικές ιδιότητες (Gurta *et al.*, 2016). Παρακάτω αναλύονται οι ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

1.6.1 Μέγεθος σταγονιδίων

Οι πιο σημαντικές ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων καθορίζονται από το μέγεθος και την κατανομή των περιεχόμενων σταγονιδίων, καθώς αυτά επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής, την εμφάνιση, την υφή και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των γαλακτωμάτων. Συνεπώς είναι σημαντικό να μπορεί να ελέγχεται, να προβλέπεται και να εκτιμάται το μέγεθος των σωματιδίων. Το μέγεθος σταγονιδίου ενός μονοδισπαρμένου γαλακτώματος μπορεί να χαρακτηριστεί αποκλειστικά από τη διάμετρο ή την ακτίνα του σωματιδίου. Τα μονοδισπαρμένα γαλακτώματα παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται για βασικές μελέτες, καθώς οι ιδιότητές τους ερμηνεύονται ευκολότερα σε σχέση με τα πολυδισπαρμένα. Ωστόσο, στα πραγματικά γαλακτώματα τροφίμων ο έλεγχος και ο προσδιορισμός του μεγέθους των σταγονιδίων αποτελεί πολύπλοκη διαδικασία. Σε μερικές περιπτώσεις, είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την πλήρη κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις αρκεί η γνώση του μέσου όρου και του εύρους της κατανομής των σωματιδίων (Liu *et al.*, 2019).

Για αυτό το λόγο θα πρέπει να προσδιορίζεται με ακριβή και αξιόπιστο τρόπο η συγκέντρωση των σταγονιδίων στα γαλακτώματα. Η συγκέντρωση σταγονιδίων συνήθως περιγράφεται με όρους του κλάσματος όγκου της δισπαρμένης φάσης (Φ), η οποία είναι ίση με τον όγκο των σταγονιδίων γαλακτώματος (V_D) διαιρούμενο με το συνολικό όγκο του γαλακτώματος (V_E):

$$\Phi = \frac{V_D}{V_E}$$

Εξίσωση 1-6

Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι πιο εύκολο να εκφράζεται η συγκέντρωση σταγονιδίων σε όρους του κλάσματος μάζας φάσης διασποράς (Φ_m), η οποία είναι ίση με τη μάζα των σταγονιδίων γαλακτώματος (M_D) διαιρούμενο με τη συνολική μάζα του γαλακτώματος (M_E):

$$\Phi_m = \frac{MD}{ME}$$

Εξίσωση 1-7

Το κλάσμα μάζας και το κλάσμα όγκου συνδέονται μεταξύ τους μέσω των ακόλουθων εξισώσεων:

$$\varphi_m = \varphi \left[\varphi + (1 - \varphi) \frac{\rho_1}{\rho_2} \right]^{-1}$$

Εξίσωση 1-8

$$\varphi = \varphi_m \left[\varphi_m + (1 - \varphi_m) \frac{\rho_1}{\rho_2} \right]^{-1}$$

Εξίσωση 1-9

Όπου, ρ_1 και ρ_2 είναι οι πυκνότητες της συνεχούς και διεσπαρμένης φάσης αντιστοίχως. Όταν οι πυκνότητες των δύο φάσεων είναι ίσες, το κλάσμα μάζας είναι ίσο με το κλάσμα όγκου.

Το κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης ενός γαλακτώματος είναι γενικώς γνωστό, επειδή η συγκέντρωση των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του ελέγχεται προσεκτικά. Παρόλα αυτά, λαμβάνουν χώρα τοπικές μεταβολές των τιμών της συγκέντρωσης μέσα στα γαλακτώματα, όταν για παράδειγμα τα σταγονίδια συσσωρεύονται είτε στην κορυφή ή στο κάτω μέρος ενός γαλακτώματος λόγω βαρυτικού διαχωρισμού. Επιπλέον, το κλάσμα όγκου ενός γαλακτώματος μπορεί να ποικίλλει κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των τροφίμων, για παράδειγμα, αν ένας αναμίκτης δεν λειτουργεί αποτελεσματικά. Κατά συνέπεια, είναι συχνά σημαντικό να προσδιορίζεται με αναλυτικές τεχνικές μέτρησης το κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης.

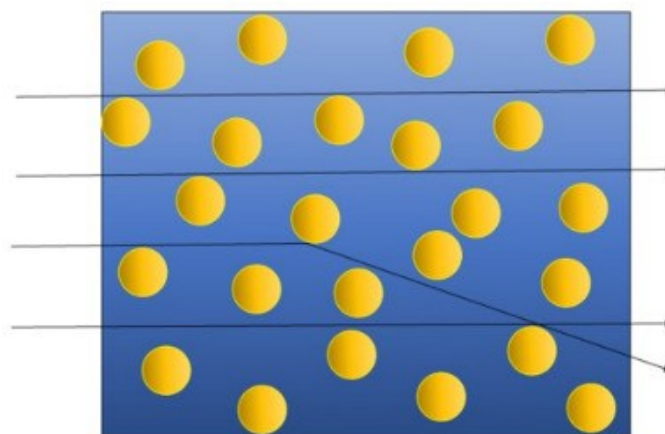
Η πιο απλή μέθοδος μέτρησης της διαμέτρου των σταγονιδίων είναι μέσω δυναμικής σκέδασης του φωτός. Πιο συγκεκριμένα μία πηγή φωτός εκπέμπει ακτινοβολία με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά η οποία, όταν συναντά τα σωματίδια που διέρχονται από ένα θάλαμο μέτρησης, σκεδαζείται προς διάφορες κατευθύνσεις ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία ανιχνεύεται με ανιχνευτές τοποθετημένους περιμετρικά του θαλάμου μέτρησης, το σήμα των οποίων μεταφράζεται σε καμπύλη κατανομής των σωματιδίων ανάλογα με το μέγεθός τους (McClements, 2016a).

1.6.2 Φορτίο σταγονιδίων

Οι φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων τροφίμων καθορίζονται από την ένταση και το είδος του ηλεκτρικού φορτίου των σταγονιδίων. Η προέλευση του φορτίου οφείλεται συνήθως στην προσρόφηση των μορίων ιοντικού γαλακτωματοποιητή (Liu *et al.*, 2019). Οι επιφανειοδραστικές ουσίες περιέχουν υδρόφιλες ομάδες οι οποίες μπορεί να είναι ουδέτερες, θετικά φορτισμένες, ή αρνητικά φορτισμένες. Κατά συνέπεια, τα σταγονίδια του γαλακτώματος μπορεί να έχουν ηλεκτρικό φορτίο που εξαρτάται από τον τύπο των επιφανειοδραστικών μορίων και επηρεάζει σημαντικά τις φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων της εμφάνισης, της ρεολογίας, της γεύσης και της σταθερότητας. Οι ηλεκτρικές ιδιότητες ενός σταγονιδίου χαρακτηρίζονται συνήθως από την πυκνότητα φορτίου επιφάνειας (σ), το επιφανειακό δυναμικό (ψ_0) ή /και το ζ-δυναμικό (McClements and Rao, 2011).

1.6.3 Οπτική Εμφάνιση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Η οπτική εμφάνιση των γαλακτωμάτων εξαρτάται από το είδος των συστατικών, δηλαδή το χρώμα και τη διαφορά του δείκτη διάθλασής τους, καθώς και το μέγεθος και τη κατανομή των διεσπαρμένων σταγονιδίων. Ένα γαλάκτωμα είναι αδιαφανές και συνήθως αποκτά το χρώμα της συνεχούς φάσης, όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι μεταξύ 0,5-5 μm , και υπάρχει σημαντική διαφορά στο δείκτη διάθλασης της συνεχούς και ασυνεχούς φάσης. Ένα γαλάκτωμα μπορεί να είναι διαυγές, είτε όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι μικρότερο από το μήκος κύματος του ορατού φωτός (400-700 nm), είτε όταν το γαλάκτωμα έχει ρυθμιστεί έτσι, ώστε οι δύο φάσεις να έχουν κατά το δυνατό ίσο δείκτη διάθλασης. Θεωρητικά, αν επιτευχθεί η ανάμιξη μίας λιπαρής φάσης με μία υδατική η οποία έχει τον ίδιο δείκτη διάθλασης, αυτό θα οδηγήσει σε παρασκευή διαυγούς γαλακτώματος. Οι οπτικές ιδιότητες των συμβατικών γαλακτωμάτων (τα οποία είναι συνήθως θολά ή αδιαφανή) χαρακτηρίζονται τυπικά με μετρήσεις ανάκλασης, ενώ η διαύγεια εκφράζεται με όρους φωτεινότητας (L^*). Οι οπτικές ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων χαρακτηρίζονται με χρήση φασματοφωτόμετρου και η διαύγειά τους εκφράζεται με όρους θολότητας.



Εικόνα 1.16 Απεικόνιση του φωτός που διαπερνά ένα μικρο/νανο-γαλάκτωμα ε/ν, δίνοντας διαφανή όψη

(Sneha and Kumar, 2022).

Το μέγεθος των σταγονιδίων στα μικρο/νανο-γαλακτώματα είναι πολύ μικρότερο από το μήκος κύματος του φωτός. Το μικρό μέγεθος σταγονιδίων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων διασκορπίζει ασθενώς το κύμα φωτός και παράγει δείκτη διάθλασης περίπου 1,36–1,40 που είναι πιο κοντά στον δείκτη διάθλασης του νερού (1,33) και παράγει οπτικά διαφανή ή ελαφρώς θολά διαλύματα ακόμη και σε μεγάλες διαφορές του δείκτη διάθλασης των φάσεων (Bhattacharjee and Bhattacharjee, 2019). Αυτή η ιδιότητα καθιστά τα μικρο/νανο-γαλακτώματα πλεονεκτικά σε περιπτώσεις που οι καταναλωτές ζητούν το τελικό προϊόν γαλακτώματος να είναι οπτικά διαφανές ή ελαφρώς θολό (Sneha and Kumar, 2022).

1.6.4 Αγωγιμότητα μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Η αγωγιμότητα θεωρείται μία ακόμη μέθοδος για την αναγνώριση του είδους του μικρο/νανο-γαλακτώματος. Η αγωγιμότητα ενός γαλακτώματος εξαρτάται από την αγωγιμότητα της συνεχούς φάσης. Έτσι ένα γαλάκτωμα έλαιο-σε-νερό μπορεί να είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού, εφόσον η συνεχής φάση είναι αγωγίμη, ενώ ένα γαλάκτωμα νερού-σε-έλαιο είναι κακός αγωγός (Abd-Elsalam and Murugan, 2022).

1.6.5 Ρεολογικές ιδιότητες μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μπορεί να έχουν σημαντικά διαφορετικές ρεολογικές ιδιότητες από τα συμβατικά γαλακτώματα με την ίδια περιεκτικότητα διεσπαρμένης φάσης, λόγω του σχετικά μικρού μεγέθους των σταγονιδίων (Bhattacharjee and Bhattacharjee, 2019). Το ιξώδες τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, κυριότεροι από τους οποίους είναι:

1. Το ιξώδες της συνεχούς φάσης. Κατά κύριο λόγο στη διαμόρφωση του ιξώδους ενός γαλακτώματος κυριαρχεί εκείνο της συνεχούς φάσης.
2. Η αναλογία συνεχούς και ασυνεχούς φάσης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της ασυνεχούς φάσης σε σχέση με τη συνεχή προκαλεί αύξηση του ιξώδους. Ακόμη η αύξηση του όγκου της ασυνεχούς φάσης προκαλεί αύξηση του ιξώδους. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από τη συγκέντρωση μεγάλου αριθμού σωματιδίων στο γαλάκτωμα.
3. Το μέγεθος σταγονιδίων. Μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων προκαλεί μικρή αύξηση του ιξώδους του γαλακτώματος.
4. Ο τύπος και η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή (McClements and Rao, 2011).

1.7 Σταθερότητα Γαλακτωμάτων

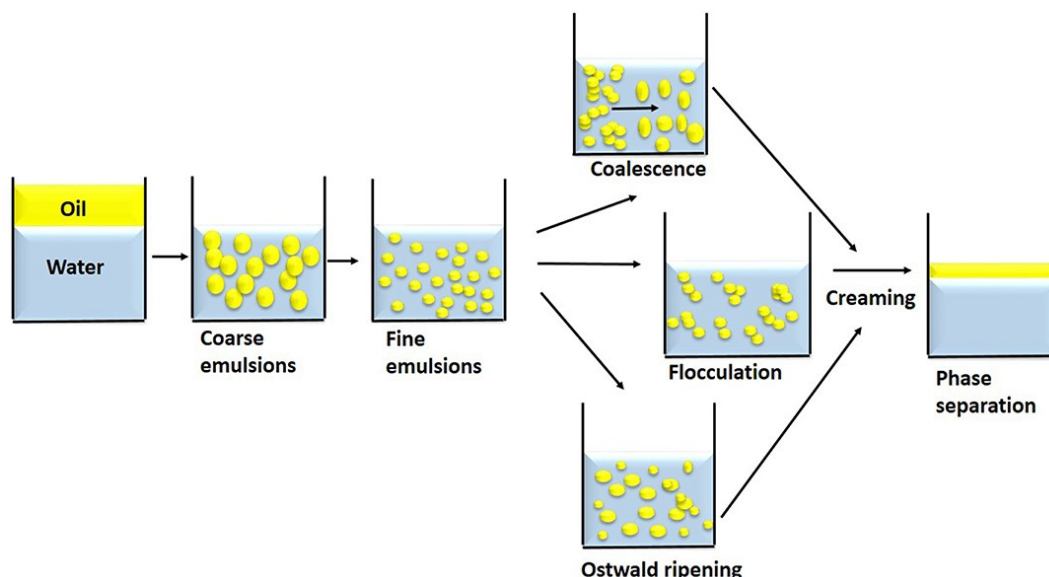
1.7.1 Κολλοειδής σταθερότητα και μηχανισμοί αποσταθεροποίησης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Γενικώς σταθερότητα των γαλακτωμάτων θεωρείται η ικανότητά τους να ανθίστανται σε οποιαδήποτε αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους ως προς τον χρόνο (McClements, 2011). Τα γαλακτώματα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι από θερμοδυναμική άποψη ασταθή συστήματα και μετά από επαρκή χρόνο θα διαχωριστούν σε δύο διακριτές φάσεις, τη λιπαρή και την υδατική φάση. Συγκεκριμένα, η σταθερότητα των γαλακτωμάτων καθορίζεται από πλήθος αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των σταγονιδίων όπως ηλεκτροστατικές δυνάμεις, δυνάμεις Van der Waals και

στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στα προσροφημένα μόρια, ενώ σε ορισμένα συστήματα σημαντικό ρόλο παίζουν οι δυνάμεις ενυδάτωσης και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι απωστικές ανάμεσα στα σταγονίδια που προσεγγίζουν μεταξύ τους και οφείλονται στην αλληλοεπικάλυψη των διπλοστοιβάδων των φορτισμένων σταγονιδίων (διπλοστοιβάδα Helmholtz-Smolouckofki). Οι διπλοστοιβάδες αυτές σχηματίζονται από τη φορτισμένη επιφάνεια των σταγονιδίων, λόγω ιόντων που προσροφώνται σε αυτή, και τα αντίθετα φορτισμένα ιόντα του γαλακτωματοποιητή που την περιβάλλουν. Όταν το μέγεθος των ελκτικών δυνάμεων γίνει μεγαλύτερο των απωστικών, τότε το γαλάκτωμα καταστρέφεται (McClements, 2016a).

Έτσι, έχει μεγάλη σημασία ο προσδιορισμός των φυσικών και χημικών μηχανισμών που ευθύνονται για την αστάθεια των γαλακτωμάτων.

Οι κύριοι μηχανισμοί αποσταθεροποίησης του μικρο/νανο-γαλακτώματος είναι ο βαρυτικός διαχωρισμός (αποκορύφωση/καθίζηση), η κροκίδωση, η συνένωση, η ωρίμανση κατά Ostwald και η αναστροφή φάσης (Ahmad and Leo M. L. Nollet, 2021).



Εικόνα 1.17 Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη φυσική αποσταθεροποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (διαχωρισμός φάσης): βαρυτικός διαχωρισμός, κροκίδωση, συνένωση και ωρίμανση Ostwald (Aswathanarayan and Vittal, 2019b).

1.7.1.1 Βαρυτικός διαχωρισμός (Αποκορύφωση - Καθίζηση)

Ο βαρυτικός διαχωρισμός είναι η διαδικασία κατά την οποία τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσης κινούνται προς τα πάνω (αποκορύφωση), λόγω της μικρότερης πυκνότητάς τους, ή προς τα κάτω (καθίζηση), λόγω της υψηλότερης πυκνότητάς τους σε σχέση με το περιβάλλον υγρό. Έτσι, η διεσπαρμένη φάση διαχωρίζεται από το γαλάκτωμα. Ο ρυθμός αποκορύφωσης (ή ο ρυθμός καθίζησης για

τις πιο πυκνές διασκορπισμένες φάσεις από τη συνεχή φάση) μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση του Stokes.

$$u = 2r^2(\rho - \rho_0) \frac{g}{9\eta} \quad \text{Εξίσωση 1-10}$$

όπου, το u είναι ο συντελεστής αποκορύφωσης (ή αντίστοιχα καθίζησης), r είναι η ακτίνα του σταγονιδίου, ρ είναι η πυκνότητα του σταγονιδίου, ρ_0 είναι η πυκνότητα του μέσου διασποράς, η είναι το ιξώδες του μέσου διασποράς (συνεχής φάση), και g είναι η τοπική επιτάχυνση λόγω της βαρύτητας. Η διαφορά πυκνότητας, $(\rho - \rho_0)$, είναι αρνητική για την αποκορύφωση ενός γαλακτώματος ε/ν , αλλά θετική για ένα γαλάκτωμα ν/ε . Η εξίσωση του Stokes δείχνει ότι το φαινόμενο της αποκορύφωσης αναστέλλεται από μικρή διάμετρο σταγονιδίων, από συνεχή φάση με εξαιρετικά υψηλό ιξώδες και με την ύπαρξη μικρής διαφοράς πυκνότητας μεταξύ των φάσεων ελαίου και νερού (Ahmad and Leo M. L. Nollet, 2021).

1.7.1.2 Κροκίδωση (flocculation)

Κατά την κροκίδωση, δύο ή περισσότερα σταγονίδια ενώνονται μεταξύ τους λόγω ασθενών ελκτικών αλληλεπιδράσεων και σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα που κινείται ως ενιαία οντότητα διατηρώντας την ακεραιότητά του. Αυτός ο σχηματισμός συστάδας συμβαίνει συνήθως όταν οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις (van der Waals, υδρόφοβες δυνάμεις) μεταξύ σταγονιδίων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων υπερσχύουν των απωστικών αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας (ηλεκτροστατικές και στερικές δυνάμεις) από μέσα από διάφορους μηχανισμούς (Manzoor *et al.*, 2023).

1.7.1.3 Συνένωση (coalescence)

Η συνένωση είναι η διαδικασία κατά την οποία πολλά μικρά σταγονίδια συγχωνεύονται για να σχηματίσουν ένα μεγαλύτερο σταγονίδιο και αυτό επηρεάζεται από την επιφανειακή δραστηριότητα και την ποσότητα του επιφανειοδραστικού που χρησιμοποιείται στο μικρο/νανο-γαλάκτωμα. Η δυνατότητα των επιφανειοδραστικών ουσιών να προσροφώνται γρήγορα στην επιφάνεια των νεοσχηματισμένων σταγονιδίων καθορίζει τον ρυθμό συνένωσης. Γαλακτωματοποιητές όπως η απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος και η παλμική σακχαρόζη έχουν την ικανότητα να αποτρέπουν την αστάθεια στο μικρο/νανο-γαλάκτωμα λόγω της συνένωσης. Επίσης, μικρο/νανο-γαλακτώματα με υψηλή συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή εμφανίζουν μηχανικό εμπόδιο στη συνένωση μειώνοντας την ελεύθερη διεπιφανειακή ενέργεια (Manzoor *et al.*, 2023). Η εκτεταμένη συνένωση σταγονιδίων μπορεί τελικά να οδηγήσει στο σχηματισμό μίας ξεχωριστής στοιβάδας ελαίου στην κορυφή του γαλακτώματος, η οποία είναι γνωστή ως “oiling-off” (McClements, 2016a).

1.7.1.4 Ωρίμανση Ostwald (Ostwald ripening)

Η ωρίμανση Ostwald, είναι μία διαδικασία που εξαρτάται από τη διάχυση των μορίων της διεσπαρμένης φάσης μέσω της συνεχούς φάσης. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα μεγαλύτερα σταγονίδια αναπτύσσονται εις βάρος των μικρότερων σταγονιδίων λόγω της μεταφοράς μάζας στη διεσπαρμένη φάση μέσω της συνεχούς φάσης. Η αντιστροφή φάσης είναι η διαδικασία όπου η ανταλλαγή συμβαίνει μεταξύ της φάσης διασποράς και του μέσου. Τα ε/ν γαλακτώματα μετατρέπονται σε ν/ε και αντιστρόφως. Σε πολλές περιπτώσεις, η αναστροφή φάσης περνά μέσα από μία μεταβατική κατάσταση όπου παράγονται πολλαπλά γαλακτώματα. Οι μηχανισμοί αστάθειας, που μπορεί να συμβούν σε ένα γαλάκτωμα, μπορεί να δράσουν συνεργιστικά, προκαλώντας ο ένας τον άλλο. Για παράδειγμα, μία συσσωμάτωση των σταγονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία αποβουτύρωση. Ως αποτέλεσμα, στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πιο σημαντική η πρόληψη της συσσωμάτωσης των σταγονιδίων, έναντι της αποκορύφωσης (McClements, 2016a).

Η αλλαγή στη μέση διάμετρο σταγονιδίων (d) με το χρόνο (t), λόγω της ωρίμανσης Ostwald ενός γαλακτωματοποιημένου λιπιδίου ενός συστατικού στο σύστημα σταθερής κατάστασης, καθορίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$d^3 - d_0^3 = \omega = \frac{32}{9} \alpha c D t \quad \text{Εξίσωση 1-11}$$

όπου το ω , αντιπροσωπεύει το ρυθμό ωρίμανσης Ostwald, α ($= 2\gamma V_m / RT$), γ είναι η διεπιφανειακή τάση, V_m είναι ο μοριακός όγκος του λιπιδίου, R είναι η σταθερά του αερίου, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία, c είναι η υδατοδιαλυτότητα του λιπιδίου και D είναι ο συντελεστής διάχυσης του λιπιδίου στο νερό (Karthik, Ezhilarasi and Anandharamakrishnan, 2017).

1.7.2 Οξειδωτική σταθερότητα μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Η υποβάθμιση της ποιότητας των γαλακτωμάτων οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην οξείδωση της λιπαρής τους φάσης (δηλαδή των περιεχόμενων λιπιδίων). Η αντίσταση ενός γαλακτώματος στην οξείδωση περιγράφεται από τον όρο οξειδωτική σταθερότητα.

Οι αρχικές διεργασίες οξείδωσης των λιπιδίων είναι οι ίδιες στα γαλακτώματα όπως και στα καθαρά έλαια. Ωστόσο, τα γαλακτώματα είναι πιο πολύπλοκα συστήματα. Τα προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων μπορούν να αντιδράσουν με τον γαλακτωματοποιητή και άλλα συστατικά που υπάρχουν στο γαλάκτωμα. Για παράδειγμα, εάν υπάρχουν πρωτεΐνες, μπορούν να σχηματιστούν αλδεΐδες Strecker (Hidalgo & Zamora, 2004· Thomsen et al., 2013). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η οξείδωση συμβαίνει γρηγορότερα στα γαλακτώματα παρά στα καθαρά έλαια. Αυτό μπορεί να αποδοθεί είτε στις συνθήκες γαλακτωματοποίησης και/ή στη μεγαλύτερη επιφάνεια διεπαφής που είναι διαθέσιμη στα γα-

λακτώματα σε σύγκριση με το καθαρό έλαιο. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γαλακτωματοποίησης, το έλαιο μπορεί να εκτεθεί στον αέρα (οξυγόνο) ή σε υψηλή θερμοκρασία, γεγονός που θα αυξήσει την οξείδωση. Εάν χρησιμοποιούνται υπέρηχοι ως μέθοδος γαλακτωματοποίησης, η ακουστική σπηλαιώση μπορεί να οδηγήσει σε άμεση παραγωγή ελεύθερων ριζών (Jana et al., 1990; Riesz & Kondo, 1992).

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι ένα διεπιφανειακό φαινόμενο καθώς ξεκινά στις διεπιφάνειες μεταξύ ελαίου και νερού, όπου τα ακόρεστα λιπαρά οξέα στην ελαιώδη φάση και τα προοξειδωτικά όπως τα ιόντα μετάλλων στην υδατική φάση μπορούν να αλληλεπιδράσουν. Έτσι, η μεγάλη επιφανειακή περιοχή μεταξύ του ελαίου και της υδατικής φάσης που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης θα οδηγήσει σε αυξημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιδρώντων, οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να αυξήσουν τον ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Τα προοξειδωτικά μέταλλα, το οξυγόνο και τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά μπορούν να διαχέονται μέσω της υδατικής φάσης για να φτάσουν στα σταγονίδια ελαίου ή στη διεπιφάνεια ελαίου/νερού. Για το λόγο αυτό, η οξείδωση επηρεάζεται σημαντικά από τις διαφορές στις ιδιότητες διαλυτότητας, την κινητικότητα και τους ρυθμούς μεταφοράς μάζας των μετάλλων και των αντιοξειδωτικών μέσω διαφορετικών φάσεων (Mickaël Laguerre et al., 2017).

1.7.2.1 Μηχανισμός αυτοοξείδωσης λιπιδίων και παράγοντες που την επηρεάζουν

Τα ακόρεστα λιπίδια αποτελούν μία ευρεία ομάδα φυσικών υδρόφοβων ή και αμφιφιλικών μορίων που περιέχουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Τα ακόρεστα λιπίδια περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα και τα παράγωγά τους (συμπεριλαμβανομένων των τρι-, δι- και μονογλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων), καθώς και άλλες ενώσεις όπως τα σφιγγολιπίδια, λιπίδια στερόλης και σακχαρολιπίδια (Bravo-Díaz, 2022a). Τα ακόρεστα λιπίδια είναι ευαίσθητα στην οξείδωση. Παρόλο που ένας περιορισμένος βαθμός οξείδωσης των λιπιδίων σε ορισμένα τρόφιμα (π.χ τυριά), είναι επιθυμητός λόγω του σχηματισμού ειδικών ενώσεων που έχουν ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, η οξείδωση των λιπιδίων είναι γενικώς ανεπιθύμητη στα περισσότερα τρόφιμα, επειδή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δυσάρεστης γεύσης και αρωματικών, ενώ παράλληλα σε προχωρημένο στάδιο θέτει σε κίνδυνο την ασφάλεια των τροφίμων λόγω της δημιουργίας τοξικών ενώσεων (Yi et al., 2014).

Η οξείδωση των λιπιδίων σε ένα ομοιογενές σύστημα (καθαρό έλαιο) έχει διερευνηθεί από επιστήμονες τροφίμων για αρκετές δεκαετίες και οι μηχανισμοί, η κινητική και τα προϊόντα οξείδωσης είναι

πλέον καλά τεκμηριωμένα. Η οξείδωση των λιπιδίων λαμβάνει χώρα μέσω μίας αλυσιδωτής αντίδρασης που είναι γνωστή ως αυτοοξείδωση και διακρίνεται σε τρία βασικά στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό.

- **Κατά την έναρξη**, παράγεται μία ρίζα υπεροξειδίου (ROO^*), αλκοξυλίου (RO^*) ή αλκυλίου (R^*) λόγω της δράσης μίας ελευθέρης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου συνήθως από το μεθυλένιο της 1,4-πενταδιενικής ομάδας του λιπαρού οξέος.
- **Κατά τη διάδοση**, η ρίζα του λιπαρού οξέος (R^*) που δημιουργήθηκε κατά το στάδιο της έναρξης είναι ασταθής, και για αυτόν το λόγο αντιδρά με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο προκειμένου να σχηματιστεί μία υπεροξειδική ρίζα ενός λιπαρού οξέος (ROO^*). Οι υπεροξειδικές ρίζες που σχηματίστηκαν κατά την έναρξη ή τη διάδοση αντιδρούν με νέα μόρια λιπαρών οξέων (RH) προς σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών (R^*) και υπεροξειδίων (ROOH). Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται όσο υπάρχουν διαθέσιμα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Στη συνέχεια καθώς η συγκέντρωση των υπεροξειδίων αυξάνεται, λαμβάνει χώρα διμοριακός μηχανισμός αποσταθεροποίησης τους και δημιουργούνται νέες ελεύθερες ρίζες.
- Κατά τον τερματισμό του μηχανισμού αυτοοξείδωσης οι ελεύθερες ρίζες που είχαν παραχθεί στα προηγούμενα στάδια, αντιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να σχηματιστούν μη ριζικές ενώσεις (Waraho, McClements and Decker, 2011).

Παρακάτω φαίνονται αναλυτικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την οξείδωση των λιπιδίων ανά στάδιο:

Έναρξη



Διάδοση



Τερματισμός



Οι κυριότεροι παράγοντες που δρουν καταλυτικά στην οξείδωση λιπών και ελαίων είναι:

- Τα ένζυμα και κυρίως οι λιποξειδάσες και λιποξυγενάσες οι οποίες όταν ενεργοποιηθούν κάτω από ειδικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας και υγρασίας, δρουν καταλυτικά προς την παραγωγή υπεροξειδίων.
- Μέταλλα που ανήκουν στα στοιχεία μεταπτώσεως. Ακόμη και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις, τα μέταλλα αυτά και κυρίως ο σίδηρος και ο χαλκός ευνοούν το σχηματισμό νέων ριζών, και έτσι δρουν ως προξειδωτικά διότι επιταχύνουν τη διάσπαση των υπεροξειδίων, αντιδρούν απευθείας με το υπόστρωμα και μπορούν να ενεργοποιήσουν το μοριακό οξυγόνο προς οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης που διευκολύνει το σχηματισμό υπεροξειδίων.
- Η θερμοκρασία. Η οξείδωση επιταχύνεται ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι αύξηση της θερμοκρασίας κατά 15° C διπλασιάζει την ταχύτητα οξείδωσης.
- Το φως, και ιδιαίτερα το υπεριώδες φως επιταχύνει την οξείδωση των λιπών και ελαίων.
- Η παρουσία αέρα. Το οξυγόνο έρχεται σε επαφή με τη λιπαρή ύλη και επιταχύνει την οξείδωση.
- Ο ακόρεστος χαρακτήρας της λιπαρής ύλης. Όσο πιο ακόρεστο είναι το υπόστρωμα τόσο πιο επιδεκτικό είναι στην αυτοοξείδωση (Sun *et al.*, 2011).

1.7.3 Επίδραση των αντιοξειδωτικών στην οξείδωση των λιπιδίων

Η παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης αντιοξειδωτικών ουσιών. Τα αντιοξειδωτικά έχουν σημαντική εφαρμογή τόσο στον τομέα της διατροφής, καθώς προστατεύουν τα λιπαρά συστατικά από την οξείδωση, όσο και στον τομέα της υγείας, καθώς προφυλάσσουν τον οργανισμό από τις επιβλαβείς επιδράσεις των ενεργών μορφών του οξυγόνου (Bravo-Díaz, 2022a). Εξ ορισμού, οι αντιοξειδωτικές ουσίες είναι εκείνες που, όταν υπάρχουν σε συγκέντρωση χαμηλότερη από τη συγκέντρωση ενός ευοξειδωτού υποστρώματος, μπορούν να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν τη διαδικασία της οξείδωσης. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες βάσει του τρόπου που λειτουργούν:

Αντιοξειδωτικά που προκαλούν μείωση του ρυθμού έναρξης της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών: Αυτά τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν με διάφορους μηχανισμούς που καθυστερούν την αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη δέσμευση ιόντων των μετάλλων που ανήκουν στα στοιχεία μεταπτώσεως και την απόσβεση του οξυγόνου απλής διεγερμένης κατάστασης, γνωστή ως singlet oxygen. Αυτά τα αντιοξειδωτικά είναι γνωστά ως δευτεροταγή αντιοξειδωτικά ή προληπτικά αντιοξειδωτικά (secondary ή preventive antioxidants).

Μεταξύ αυτών των αντιοξειδωτικών, είναι και οι χηλικές ουσίες μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), του κιτρικού οξέος, των πολυφωσφορικών ή των πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα. Λόγω της αποτελεσματικότητας του EDTA ως χηλικού συμπλεκτικού παράγοντα και του χαμηλού κόστους του, χρησιμοποιείται συχνά σε βιομηχανικές εφαρμογές. Ωστόσο, οι ανησυχίες των καταναλωτών σχετικά με τη συνθετική του φύση οδήγησαν στην αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών φαινολικών ενώσεων που περιέχουν γενικώς μία ομάδα κατεχόλης (ορθοδιφαινολική) ή μία ορθοκετο-υδροξυ ομάδα, καθώς τέτοιες δομές είναι γνωστό ότι δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες και τα βιοπεπτίδια έχουν κάποιες ιδιότητες χηλικής συμπλοκοποίησης μετάλλων και μελετώνται ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις για το EDTA (Laguerre et al., 2017; Bravo-Diaz, 2022).

Αντιοξειδωτικά που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες: Αυτά τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και δημιουργώντας σταθερά προϊόντα, σταματώντας την αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών. Αυτά τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται στην κατηγορία των πρωτοταγών αντιοξειδωτικών ή αντιοξειδωτικών που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση (primary ή chain-breaking antioxidants). Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν οι τοκοφερόλες, οι τοκοτριενόλες και φαινολικές ενώσεις (Villeneuve et al., 2023).

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά έχουν την ιδιότητα να δωρίζουν ένα άτομο υδρογόνου σε ρίζες υπεροξυλίου παγιδεύοντας έτσι τις λιπιδικές ρίζες.



Τα αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να δημιουργήσουν αντιδράσεις τερματισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης στις οποίες σχηματίζονται μη ριζικά είδη.



(Villeneuve et al., 2023).

1.7.3.1 Φυσικοχημικές παράμετροι που επηρεάζουν την οξείδωση των λιπιδίων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η οξείδωση των λιπιδίων είναι μία σύνθετη χημική αντίδραση που περιλαμβάνει πολλαπλές οδούς στις οποίες εμπλέκονται διαφορετικά χημικά μόρια: άκωρεστα λιπί-

δια, αντιοξειδωτικά και προοξειδωτικά όπως ελεύθερες ρίζες και μέταλλα. Εκτός από τις χημικές αντιδράσεις αυτών των μοριακών ειδών και τη φυσική τους θέση (ελεύθερα ή γαλακτωματοποιημένα), άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών των μορίων παίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο στην κινητική της οξείδωσης των λιπιδίων.

Για να ελεγχθεί η οξείδωση των λιπιδίων σε αυτά τα συστήματα, πρέπει να αξιολογηθεί όχι μόνο η συνολική αντιδραστικότητα όλων των εμπλεκόμενων μορίων, αλλά και η θέση τους, η αλληλεπίδρασή τους με άλλα συστατικά τροφίμων και η πιθανή κινητικότητά τους μέσα στο σύστημα (Villeneuve *et al.*, 2023).

1.7.3.1.1 Μέγεθος σταγονιδίων γαλακτώματος

Η γαλακτωματοποίηση σε σταγονίδια δημιουργεί μία μεγάλη επιφάνεια για την αλληλεπίδραση των προοξειδωτικών, των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Οι μελέτες σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο το εμβαδόν της επιφάνειας επηρεάζει την οξειδωτική σταθερότητα ποικίλλουν, με γενικό συμπέρασμα ότι το εμβαδόν της επιφάνειας δεν είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει τον ρυθμό οξείδωσης. Ωστόσο, τα γαλακτώματα συνήθως περιέχουν ένα ευρύ φάσμα μεγεθών σωματιδίων, επομένως μπορεί να είναι πειραματικά δύσκολο να παρατηρηθούν αλλαγές στο ρυθμό οξείδωσης αλλάζοντας το μέσο μέγεθος σταγονιδίων γαλακτώματος ενός γαλακτώματος ελαίου σε νερό που έχει πολυτροπική κατανομή μεγέθους σωματιδίων (Laguerre *et al.*, 2017).

1.7.3.1.2 Ιδιότητες διεπιφάνειας σταγονιδίων γαλακτώματος

Οι ιδιότητες της διεπιφανειακής στοιβάδας των σταγονιδίων γαλακτώματος είναι σημαντικές, επειδή μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα των μετάλλων που ανήκουν στα στοιχεία μεταπτώσεως να αλληλεπιδρούν με το υδροϋπεροξείδιο των λιπαρών οξέων καθώς και να επηρεάζουν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες. Το φορτίο της διεπιφάνειας των σταγονιδίων του γαλακτώματος μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Αρνητικά φορτισμένοι γαλακτωματοποιητές βρέθηκε ότι αυξάνουν την οξείδωση των λιπιδίων καθώς προσελκύουν κατιονικά μέταλλα, ενώ οι θετικά φορτισμένοι γαλακτωματοποιητές μπορούν να απωθούν τα κατιονικά μέταλλα και να επιβραδύνουν την οξείδωση των λιπιδίων (Bravo-Díaz, 2022). Ορισμένες μελέτες έχουν βρει ένα αντιφατικό αποτέλεσμα, όπου οι αρνητικά φορτισμένοι γαλακτωματοποιητές οδηγούν σε χαμηλότερο ρυθμό οξείδωσης λιπιδίων από τους θετικά φορτισμένους γαλακτωματοποιητές. Αυτό μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της περίσσειας αρνητικά φορτισμένων γαλακτωματοποιητών που κατανέμονται στην υδατική φάση όπου μπορούν να δεσμεύσουν και να ωθήσουν τα

ιόντα μετάλλων μακριά από τη διεπιφάνεια σταγονιδίων γαλακτώματος (Faraji, McClements and Decker, 2004).

Το πάχος της διεπιφάνειας σταγονιδίων γαλακτώματος μπορεί επίσης να επηρεάσει το ρυθμό οξείδωσης. Οι Chaiyasit et al. (2000) διαπίστωσαν ότι το μέγεθος της κεφαλής του γαλακτωματοποιητή επηρεάζει το ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων με μεγαλύτερες ομάδες κεφαλής που αναστέλλουν την οξείδωση. Ωστόσο, το μέγεθος της ουράς δεν βρέθηκε να επηρεάζει το ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Η αναστολή της οξείδωσης από τις ομάδες κεφαλής γαλακτωματοποιητή πιστεύεται ότι οφείλεται στην αναστολή των αλληλεπιδράσεων μετάλλου-υδροϋπεροξειδίου (Chaiyasit et al., 2000).

Ο Berton et. al (2012) συνέκρινε το ρυθμό οξείδωσης μεταξύ σταθεροποιημένου γαλακτώματος με Tween 20 και γαλακτώματος σταθεροποιημένου με πρωτεΐνες (β-λακτοσφαιρίνη, αλβουμίνη β-βόειου ορού και β-καζεΐνη) και διαπίστωσε ότι το σταθεροποιημένο με πρωτεΐνη γαλάκτωμα είχε υψηλότερο ρυθμό οξείδωσης από το σταθεροποιημένο γαλάκτωμα με Tween 20 τόσο με, όσο και χωρίς εκκινητές (σίδηρος συν ασκορβικό οξύ, μετμυοσφαιρίνη ή 2,20-αζωδισ(2-αμιδινοπροπάνιο)-διυδροχλωρίδιο). Θεωρήθηκε ότι το Tween 20 θα μπορούσε να σχηματίσει ένα πιο ομοιογενές και συμπαγές διεπιφανειακό στρώμα από την πρωτεΐνη, μειώνοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις σταγονιδίων προοξειδωτικού-γαλακτώματος (Berton-Carabin, M. H. Ropers and Genot, 2014).

1.7.3.1.3 pH

Το pH μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην οξείδωση των λιπιδίων στα γαλακτώματα τροφίμων. Γενικώς, ένα περιβάλλον χαμηλού pH είναι ευνοϊκό για την οξείδωση των λιπιδίων, ενώ ένα περιβάλλον υψηλού pH μπορεί να μειώσει τον ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Το pH του γαλακτώματος επηρεάζει επίσης τη σταθερότητα της μικροδομής, επηρεάζοντας έτσι τη διαλυτότητα του οξυγόνου, η οποία μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί περαιτέρω από τις διεπιφανειακές συμπεριφορές των γαλακτωματοποιητών που επηρεάζονται από το pH. Για παράδειγμα, τα γαλακτώματα N/E που παρασκευάζονται με απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) σε pH 7,0 είναι λιγότερο επιρρεπή στην οξείδωση (Kim et al., 2016) από ότι σε pH 3,0 (Kim et al., 2016). Επιπλέον, η δραστηριότητα της λιποξυγενάσης ή των αντιοξειδωτικών μπορεί επίσης να επηρεαστεί από το pH, επηρεάζοντας έτσι την οξείδωση των λιπιδίων στα γαλακτώματα. Το pH μπορεί να επηρεάσει κυρίως την οξείδωση των λιπιδίων μέσω άλλων παραγόντων, αντί να ενεργεί ως άμεσος καθοριστικός παράγοντα (Bao and Pignitter, 2023). Οι Warahe και συνεργάτες (2011) βρήκαν ότι το αρνητικό φορτίο των σταθεροποιημένων γαλακτωμάτων ε/ν με Tween 20 μειώθηκε με την αύξηση του pH. Αυτό υποδηλώνει ότι η απώλεια αρνητικού φορτίου θα μπορούσε να μειώσει τις αλληλεπιδράσεις σταγονιδίων μετάλλου-γαλακτώματος και να οδηγήσει σε βραδύτερους ρυθμούς οξείδωσης με υψηλότερο pH (Warahe, McClements and Decker, 2011a). Ωστόσο, σε γαλακτώματα

σταθεροποιημένα με πρωτεΐνη, το φορτίο των σταγονιδίων του γαλακτώματος γίνεται θετικό όταν το pH είναι χαμηλότερο από το pI της πρωτεΐνης. Αυτά τα θετικά φορτισμένα σταγονίδια γαλακτώματος που έχουν σταθεροποιηθεί με πρωτεΐνη οξειδώνονται πιο αργά, πιθανώς λόγω της ικανότητάς τους να απωθούν τα μέταλλα που ανήκουν στα στοιχεία μεταπτώσεως και να μειώνουν τις αλληλεπιδράσεις μετάλλου-λιπιδίου (Berton-Carabin, M. H. Ropers and Genot, 2014).

1.7.3.1.4 Συγκέντρωση οξυγόνου

Το οξυγόνο είναι ένα κρίσιμο συστατικό στις αντιδράσεις οξείδωσης λιπιδίων, επομένως η συγκέντρωση και η θέση του μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά το ρυθμό οξείδωσης. Το οξυγόνο είναι διαλυτό τόσο στα λιπίδια όσο και στο νερό (Bayram and Decker, 2023). Ο συμβατικός σχηματισμός γαλακτώματος γίνεται συνήθως σε ανοιχτές ατμοσφαιρικές συνθήκες που εκθέτουν όλα τα συστατικά του γαλακτώματος σε οξυγόνο. Σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, η μηχανική ανάδευση και η ψύξη αύξησαν τον ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων καθώς αύξησαν τις συγκεντρώσεις οξυγόνου στο γαλάκτωμα. Ωστόσο, σε υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, αυτές οι δύο διαδικασίες είχαν μικρή επίδραση στην οξείδωση των λιπιδίων καθώς ο ρυθμός διάχυσης οξυγόνου δεν ήταν περιοριστικός (Johnson and Decker, 2015).

1.7.4 Προσδιορισμός οξείδωσης γαλακτωμάτων

Ο βαθμός της οξείδωσης των λιπιδίων μπορεί να αξιολογηθεί με αρκετές μεθόδους, όπως ο δείκτης Αριθμού Υπεροξειδίων (PV), ο προσδιορισμός Αριθμού Ανισιδίνης (AV), ο Προσδιορισμός με βάση τις ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), καθώς με αναλυτικές μεθόδους όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS), η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας, η φασματογραφία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), η φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier (FTIR), και η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης. Η οργανοληπτική αξιολόγηση του υποβιβασμού της γεύσης λόγω οξείδωσης των λιπιδίων είναι μία ακόμη σημαντική μέθοδος που πρέπει να χρησιμοποιείται για να κατανοηθεί πώς η οξείδωση των λιπιδίων επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης μπορούν να προσδιοριστούν με φασματοφωτομετρική μέτρηση συζευγμένων υδροϋπεροξειδίων διενίου στα 234 nm ή με προσδιορισμό του Αριθμού Υπεροξειδίων (PV). Πριν από τη μέτρηση όμως, τα λιπίδια πρέπει να εξαχθούν από τα γαλακτώματα (Ghelichi, Hajfathalian, Yesiltas, A. D. M. Sørensen, *et al.*, 2023).

Κάποια από τα προϊόντα δευτερογενούς οξείδωσης μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά. Ο προσδιορισμός του Αριθμού Ανισιδίνης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιομηχανία πετρελαίου ως μέτρο προσδιορισμού του επιπέδου των καρβονυλικών ενώσεων. Η αρχή

του προσδιορισμού του Αριθμού Ανισιδίνης είναι ότι τα καρβονύλια αντιδρούν με την π-ανισιδίνη για να σχηματίσουν ένα έγχρωμο σύμπλοκο που απορροφάται στα 350 nm. Μετρά κυρίως τα 2-αλκενάλια, αλλά και άλλες καρβονυλικές ενώσεις μπορούν επίσης να αντιδράσουν με την π-ανισιδίνη (Bravo-Díaz, 2022a).

Ο προσδιορισμός TBARS είναι μία άλλη ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό των προϊόντων δευτερογενούς οξείδωσης. Αυτή η ανάλυση μετρά την έγχρωμη χρωστική ουσία που σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και προϊόντων οξείδωσης από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Ούτε η μέθοδος TBA ούτε η μέθοδος ανισιδίνης έχουν μεγάλη ευαισθησία, αλλά αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση μεθόδων αέριας χρωματογραφίας (GC) για τον προσδιορισμό των δευτερογενών πτητικών προϊόντων οξείδωσης (αλδεΐδες, υδρογονάνθρακες, κετόνες και αλκοόλες). Η αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξηθεί ο βαθμός βεβαιότητας της ταυτοποίησης και της ποσοτικοποίησης των πτητικών προϊόντων οξείδωσης. Προτού τα πτητικά προϊόντα οξείδωσης μπορούν να αναλυθούν από το GC-MS, πρέπει να συλλεχθούν από τη μήτρα του δείγματος. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι συλλογής των πτητικών είναι η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) (Thomsen *et al.*, 2013). Η NMR είναι μία εναλλακτική μέθοδος για τον προσδιορισμό δευτερογενών πτητικών προϊόντων οξείδωσης, αλλά δεν προσφέρει την ίδια ικανότητα μέτρησης μεγάλου εύρους διαφορετικών πτητικών προϊόντων οξείδωσης (Ghelichi, Hajfathalian, Yesiltas, A.-D. M. Sørensen, *et al.*, 2023).

1.7.5 Συμπεράσματα σχετικά με την οξείδωση των γαλακτωμάτων

Μέχρι σήμερα, η επίδραση της ύπαρξης μικυλλίων στα γαλακτώματα δεν είναι ακόμη απολύτως κατανοητή καθώς πολλές διαφορετικές παράμετροι ρυθμίζουν την επίδρασή του. Πράγματι, τόσο τα μικύλλια σε γαλακτώματα όσο και τα φυσικά κολλοειδή σε έλαια μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγές αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών. Μπορούν επίσης να παίξουν το ρόλο των νανοαντιδραστών όπου συμβαίνουν αντιδράσεις οξείδωσης λιπιδίων (αλληλεπιδράσεις μεταξύ υδροϋπεροξειδίων και άλλων ενώσεων οξείδωσης/μετάλλων/αντιοξειδωτικών). Επιπλέον, η φύση και η δομή των ίδιων των μικυλλίων μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην οξείδωση των λιπιδίων ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα και τη φύση των περιεχόμενων επιφανειοδραστικών ενώσεων, τις χημικές αντιδράσεις, καθώς και τη συγκέντρωσή τους.

1.8 Μέθοδοι μέτρησης ιδιοτήτων και σταθερότητας μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Για την εξέταση της μικροδομής ενός μικρο/νανο-γαλακτώματος, η οπτική μικροσκοπία θεωρείται η απλούστερη τεχνική. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος αποτυγχάνει για την ακριβή απεικόνιση σωματιδίων κάτω των 500 nm. Επίσης, δεν μπορεί να ανιχνεύσει την ωρίμανση κατά Ostwald, τη συνένωση και τις μεταβάσεις φάσης σε ορισμένες περιπτώσεις. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υψηλής ανάλυσης για την ακριβή απεικόνιση της δομής του μικρο/νανο-γαλακτώματος και τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων (Islam *et al.*, 2023).

1.8.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η τεχνική ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης χρησιμοποιεί μία εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας για την παραγωγή μίας σειράς σημάτων στην επιφάνεια του δείγματος για την παραγωγή εικόνων υψηλής ανάλυσης (Aswathanarayan and Vittal, 2019b). Η μέθοδος SEM μπορεί να παράξει τρισδιάστατες (3D) εικόνες δομής που βοηθούν στην ανάλυση της μορφολογίας της επιφάνειας της διεσπαρμένης φάσης (Chime, Kenechukwu and Attama, 2014). Η μέθοδος SEM που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων κάθε φορά σε χαμηλότερη μεγέθυνση (Silva, Cerqueira and Vicente, 2012). Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τη SEM μία ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική χαρακτηρισμού εικόνας. Ωστόσο, το υψηλό κόστος, η χρήση υψηλού κενού και η υψηλή αγωγιμότητα του δείγματος είναι μερικά από τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής. Επίσης, τα επιφανειοδραστικά που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάζουν την εικόνα SEM (Islam *et al.*, 2023).

1.8.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM) είναι μία τεχνική μικροσκοπίας στην οποία η δέσμη ηλεκτρονίων μεταδίδεται μέσω ενός λεπτού μέσου, αλληλεπιδρώντας με το υλικό καθώς ταξιδεύει μέσα από αυτό δημιουργώντας μία εικόνα που δείχνει τη μορφολογία, τη σύνθεση και τη δομή του δείγματος. Σε αυτή την τεχνική παράγονται εικόνες υψηλότερης ανάλυσης της τάξης των 0,2 nm και είναι επίσης γνωστή ως η εσωτερική σύνθεση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Πρόκειται για μία επίπονη διαδικασία καθώς τα δείγματα πρέπει να γίνουν όσο το δυνατόν πιο λεπτά για να είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η δομή του δείγματος μπορεί να τροποποιηθεί. Επιπλέον, το μικρό οπτικό πεδίο και η χρήση δεσμών ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο δείγμα (Joshi T. *et al.*, 2023). Η Cryo TEM, μία από τις πιο

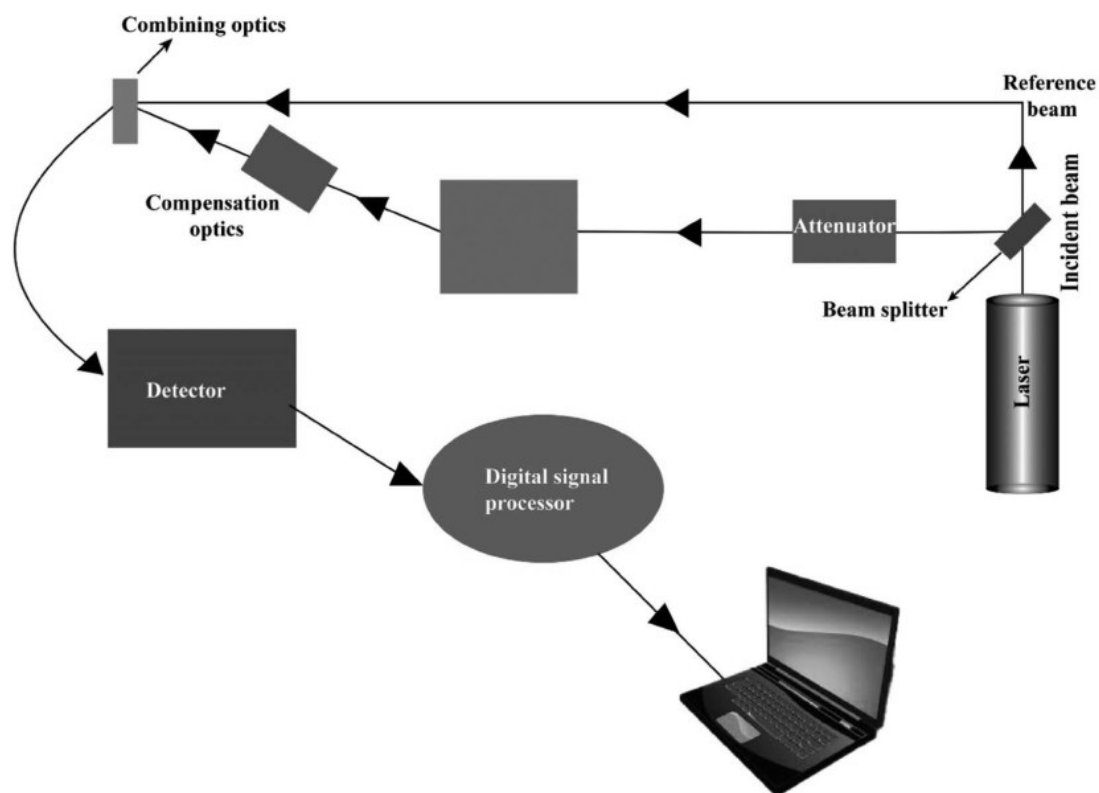
κατάλληλες τεχνικές για την ανάλυση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, παρέχει πληροφορίες για την εσωτερική δομή των κολλοειδών δομών που παρατηρούνται στη φυσική τους κατάσταση. Για αυτήν την τεχνική, το δείγμα αναλύεται απευθείας στην παγωμένη-ενυδατωμένη κατάστασή του και η συσκευή είναι εφοδιασμένη με ένα δοχείο Ντιούαρ για υγρό άζωτο ως ψυκτικό παράγοντα στο άκρο του (Islam *et al.*, 2023).

1.8.3 Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM)

Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) είναι μία νέα τεχνική που αναπτύχθηκε για να ξεπεραστούν ορισμένα βασικά μειονεκτήματα άλλων τεχνικών μικροσκοπίας (Luykx *et al.*, 2008). Είναι σε θέση να παράγει απεικονίσεις υψηλής ανάλυσης της τάξης των 0,1 nm (Silva, Cerqueira and Vicente, 2012). Σε αυτή τη μέθοδο, το αραιωμένο φιλμ δείγματος ακινητοποιείται σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα για εξέταση χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή μεγέθους. Αυτή η διαδικασία παρέχει μία σαφή ιδέα για τη μορφή και το μέγεθος των σταγονιδίων της διασκορπισμένης φάσης (Dasgupta and Ranjan, 2018b; Joshi T. *et al.*, 2023). Ένα μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι η ανάλυση επιφανειών που είναι μαλακές, κολλώδεις ή έχουν χαλαρά σωματίδια μη ακινητοποιημένα, είναι δύσκολη καθώς περιλαμβάνει άμεση επαφή της επιφάνειας με τον ανιχνευτή (Joshi T. *et al.*, 2023).

1.8.4 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τον γρήγορο προσδιορισμό της κατανομής μεγέθους μικρών σωματιδίων σε διαλύματα. Είναι επίσης γνωστή ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων ή και ελαστική διασπορά φωτός. Η μέθοδος DLS μετρά το μέγεθος των σωματιδίων αναλύοντας τις διακυμάνσεις της έντασης που προκαλούνται από την κίνηση Brown και συνδέοντάς τις με την εξίσωση Stokes-Einstein (Silva, Cerqueira and Vicente, 2012). Από την ανάλυση DLS προκύπτουν διαγράμματα συγκέντρωσης και μεγέθους σωματιδίων (McClements, 2016a). Η DLS όχι μόνο καθορίζει το προφίλ μεγέθους σωματιδίων, αλλά αξιολογεί επίσης και τη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Παρόλο που η DLS είναι μία τεχνική με μεγάλη συσχέτιση, συχνά απαιτεί αραιώση του δείγματος για να αποφευχθούν πολλαπλά φαινόμενα σκέδασης (Abd-Elsalam and Murugan, 2022).



Εικόνα 1.18 Αρχή λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός (Zetasizer) (Ahmad and Nollet, 2021).

1.8.5 ζ-δυναμικό

Το ζ-δυναμικό είναι ένας επιστημονικός όρος για το ηλεκτροκινητικό δυναμικό κολλοειδών συστημάτων. Η τιμή του ζ-δυναμικού αντιπροσωπεύει τον βαθμό απώθησης μεταξύ γειτονικών όμοια φορτισμένων σωματιδίων στη διασκορπισμένη φάση. Το ζ-δυναμικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των ιδιοτήτων επιφανειακού φορτίου και της φυσικής σταθερότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Li *et al.*, 2021). Όταν το ζ-δυναμικό είναι υψηλό, τα μικρά μόρια και τα σωματίδια βρίσκονται σε πολύ σταθερή κατάσταση. Ένα χαμηλό δυναμικό ζήτα, δηλαδή 0 έως 30 mV, δείχνει ότι το μικρο/νανο-γαλακτώμα είναι ασταθές επειδή η έλξη υπερβαίνει την απώθηση, η οποία τείνει να κάνει τη διασπορά να διαχωριστεί και να κροκιδωθεί. Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν το ζ-δυναμικό ενός μικρο/νανο-γαλακτώματος είναι οι επιφανειοδραστικές ουσίες, το μέγεθος και η μορφολογία της διεσπαρμένης φάσης, το pH του διαλύματος, η παρουσία ηλεκτρολυτών και η προσρόφησή τους (Sharifi *et al.*, 2021).

1.8.6 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC) είναι μία θερμοανλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση των δομικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Dasgupta and Ranjan, 2018b). Ένα δείγμα χαρακτηρίζεται με βάση τη μορφή της θερμότητας που ακτινοβολείται ή απορροφάται από το δείγμα σε σχέση με κάποιο δείγμα αναφοράς καθώς αλλάζει η θερμοκρασία του (Bourbon *et al.*, 2018). Γενικώς, η θερμοκρασία αυξάνεται ως γραμμική συνάρτηση του χρόνου. Αυτή η τεχνική είναι ικανή να εξετάσει το σημείο τήξης, τη θερμότητα της σύντηξης, τις μεταπτώσεις φάσης, την κινητική κρυστάλλωσης, την οξειδωτική σταθερότητα κ.λπ., του δείγματος. Μπορεί επίσης να ανιχνεύσει τις αλληλεπιδράσεις διαφορετικών συστατικών στο δείγμα και τη μικροσκοπία πόλωσης χρησιμοποιώντας διασταυρούμενους πολωτές (Chime, Kenechukwu and Attama, 2014).

1.8.7 Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier βασίζεται στην απορρόφηση και μετάδοση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από το δείγμα (Silva, Cerqueira and Vicente, 2012). Η διαδικασία σάρωσης καταλήγει σε ένα φάσμα που δημιουργεί ένα μοριακό δακτυλικό αποτύπωμα του δείγματος. Αυτό το δακτυλικό αποτύπωμα παρουσιάζει τις κορυφές απορρόφησης που δημιουργούνται από διαφορετικά συστατικά του δείγματος που δίνει άμεσες πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα του υλικού στο δείγμα. Η φασματοσκοπία FTIR χρησιμοποιείται ως μέθοδος για τον έλεγχο της παρουσίας φυσικών ή χημικών αντιδράσεων μεταξύ φαρμάκων και εκδόχων. Άλλα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι είναι σχετικά απλή στην εφαρμογή, απαιτεί μικρό χρόνο για ανάλυση και δίνει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τα συστατικά και τη συμπεριφορά τους (Dasgupta and Ranjan, 2018a).

1.8.8 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα σύνθετο αναλυτικό εργαλείο που επιτρέπει τη μελέτη του τύπου, της δομής και των ιδιοτήτων διάχυσης των συστατικών σε μικρο/νανο-γαλακτώματα (Jin *et al.*, 2016). Αυτή η τεχνική εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις των ραδιοκυμάτων και των πυρήνων των ατόμων υδρογόνου για την ανάλυση ενός δείγματος. Είναι σε θέση να παράγει πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς αστάθειας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων όπως η κροκίδωση, η συνένωση και η ωρίμανση Ostwald. Ωστόσο, αυτό δεν είναι κατάλληλο να εφαρμοστεί για τα περισσότερα μικρο/νανο-γαλακτώματα, επειδή μπορεί να μετρήσει σωματίδια από 100 nm έως 100 μm. Ωστόσο, η εφαρμογή του NMR για τον χαρακτηρισμό μικρο/νανο-γαλακτωμάτων δεν έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά ίσως λόγω του μεγάλου κόστους της ανάλυσης (Bourbon *et al.*, 2018).

1.8.9 Περίθλαση ακτίνων X (XRD)

Η περίθλαση ακτίνων X είναι μία μη καταστροφική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των δομικών, κρυσταλλικών και φυσικών ιδιοτήτων καθώς και της χημικής σύστασης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Bourbon *et al.*, 2018). Σε αυτή τη μέθοδο, το δείγμα διαπερνάται από ακτίνες X και έπειτα εξετάζεται βάσει του βαθμού σκέδασης της ακτινοβολίας (Silva, Cerqueira and Vicente, 2012). Οι ακτίνες X έχουν μήκος κύματος της τάξης των angstroms που είναι περίπου το ίδιο με τις διατομικές αποστάσεις στα κρυσταλλικά στερεά, γεγονός που οδηγεί σε περίθλαση. Η μέθοδος XRD μπορεί να παρέχει ποσοτικές και ακριβείς πληροφορίες για τις ατομικές διατάξεις στις διεπιφάνειες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Islam *et al.*, 2023)

1.8.10 Σκέδαση ακτίνων X μικρής γωνίας (SAXS)

Η τεχνική σκέδασης ακτίνων X μικρής γωνίας (SAXS) χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει το σχήμα, το μέγεθος και τη δομή των νανοσωματιδίων των κolloειδών σωματιδίων (Islam *et al.*, 2023). Σε αυτή τη μέθοδο, τα δείγματα εξετάζονται κάτω από μία μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X μήκους κύματος 0,1–0,2 nm. Μερικές από τις ακτίνες X διασκορπίζονται και μερικές από αυτές περνούν μέσα από το υλικό του δείγματος χωρίς καμία αλληλεπίδραση. Οι ακτίνες X που διασκορπίζονται λόγω της ανομοιογένειας του υλικού και ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή ακτίνων X, ο οποίος δίνει τις απαιτούμενες πληροφορίες για τις ιδιότητες (Luykx *et al.*, 2008). Μερικά από τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν είναι καταστροφική και απαιτεί πολύ μικρό χρόνο προετοιμασίας δείγματος, σε αντίθεση με τις τεχνικές μικροσκοπίας (Luykx *et al.*, 2008).

1.8.11 Μέτρηση ρεολογικής συμπεριφοράς

Το ιξώδες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων είναι συνάρτηση της επιφανειοδραστικής ουσίας, των συστατικών του νερού και του ελαίου και της συγκέντρωσής τους. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό μειώνει το ιξώδες, ενώ η μείωση της ποσότητας των επιφανειοδραστικών και συνεπιφανειοδραστικών αυξάνει τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ νερού και ελαίου με αποτέλεσμα αυξημένο ιξώδες (Chime *et al.*, 2014). Χρησιμοποιούνται διάφορα όργανα για τη μέτρηση του ιξώδους όπως το ιξωδόμετρο Ostwald, το ιξωδόμετρο πίπτουσας σφαίρας Hoerpler, το ιξωδόμετρο Stormer, το ιξωδόμετρο Brookfield και το ιξωδόμετρο Ferranti-Shirley. Μεταξύ όλων αυτών των μεθόδων προσδιορισμού ιξώδους, το Brookfield θεωρείται το προτιμώμενο για τη μέτρηση του ιξώδους των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Ο προσδιορισμός του ιξώδους επιβεβαιώνει εάν το σύστημα είναι γαλάκτωμα ϵ/ν ή ν/ϵ . Χαμηλές τιμές ιξώδους αποτελούν ένδειξη ότι το γαλάκτωμα είναι τύπου ϵ/ν , ενώ υψηλές τιμές ιξώδους υποδηλώνουν ότι το γαλάκτωμα είναι τύπου ν/ϵ (Ahmad and Nollet, 2021).

1.8.12 Δείκτης διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης περιγράφει πώς διαδίδεται το φως από ένα μέσο. Ο δείκτης διάθλασης (n) του μέσου μπορεί να οριστεί ως ο λόγος της ταχύτητας του κύματος (c) στο μέσο αναφοράς προς την ταχύτητα φάσης του κύματος ($νρ$) στο μέσο: $n=c/νρ$. Ο δείκτης διάθλασης του μικρο/νανο-γαλακτώματος μπορεί να προσδιοριστεί με διαθλασίμετρο τύπου Abbe στους $25\pm 0,5^\circ$ τοποθετώντας μία σταγόνα μικρο/νανο-γαλακτώμα στη πλάκα και συγκρίνοντάς τον με τον δείκτη διάθλασης του νερού (1,333). Εάν ο δείκτης διάθλασης του μικρο/νανο-γαλακτώματος έχει ίσο δείκτη διάθλασης με αυτόν του νερού, τότε το μικρο/νανο-γαλακτώμα θεωρείται ότι έχει διαφανή φύση. Οι Harika et al. Μέτρησαν τον δείκτη διάθλασης του μικρο/νανο-γαλακτώματος αμφοτερικίνης Β με διαθλασίμετρο Abbe και η τιμή του δείκτη διάθλασης του σκευάσματος βρέθηκε να είναι παρόμοια με αυτή του νερού (Gurpreet and Singh, 2018a).

1.9 Εφαρμογές των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Οι τεχνολογικοί περιορισμοί της ανάπτυξης λειτουργικών τροφίμων είναι η χαμηλή διαλυτότητα, σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ενώσεων (Aswathanarayan and Vittal, 2019c). Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα τροφίμων παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς μπορούν να χρησιμεύσουν ως φορείς εγκλεισμού, φυσικά συντηρητικά, μέθοδοι εκχύλισης, συστήματα χορήγησης για λειτουργικά συστατικά, νανο-αντιδραστήρες και ενεργές συσκευασίες τροφίμων (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022). Οι κύριες εφαρμογές των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στη βιομηχανία τροφίμων παρουσιάζονται αναλυτικότερα στις ακόλουθες υποενότητες.

1.9.1 Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως συστήματα μικροεγκλεισμού

Τελευταία έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός μελετών σχετικά με τα οφέλη των εφαρμογών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε τρόφιμα και ποτά ως συστήματα μεταφοράς για επιθυμητά λιπόφιλα ή υδρόφιλα βιοενεργά συστατικά. Οι περισσότερες αρωματικές, χρωστικές και βιοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, είναι ευάλωτες σε οξειδωτικές και φωτοχημικές αντιδράσεις, καθιστώντας την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα τροφίμων και ποτά αρκετά δύσκολη και πολύπλοκη (Banasa et al., 2020a). Έχει αποδειχθεί ότι όταν μία τέτοια ένωση ενσωματωθεί σε κάποιο φορέα εγκλεισμού και διασκορπιστεί σε μία συνεχή φάση γαλακτώματος, μπορεί να αποκτήσει αυξημένη σταθερότητα, ενισχυμένη προστασία κατά την επεξεργασία των τροφίμων λόγω του

περιορισμού αλληλεπιδράσεων με άλλα συστατικά των τροφίμων, ενώ παράλληλα μπορεί να καλυφθεί κάποια πιθανή δυσάρεστη οσμή ή γεύση. Ο μικροεγκλεισμός εξασφαλίζει μακροπρόθεσμη σταθερότητα και προστασία των βιοδραστικών συστατικών στα τελικά προϊόντα έναντι δυσμενών περιβαλλοντικών επιδράσεων όπως οξείδωση, υδρόλυση και θερμική αποικοδόμηση (Banasaz et al., 2020).

Τα γαλακτώματα τύπου ε/ν βρίσκονται σε πλήθος προϊόντων, όπως η μαγιονέζα, σάλτσες σαλάτας, επιδόρπια και ποτά, λόγω του σημαντικού ρόλου τους στην υφή, τη ρεολογία και τις οργανοληπτικές ιδιότητες (McClements and McClements, 2016a; Katsaros et al., 2020). Η ανάπτυξη δε, τα τελευταία χρόνια, των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ε/ν έχει διευρύνει σημαντικά το φάσμα των εφαρμογών τους λόγω της ικανότητάς τους να λειτουργούν ως φορείς εγκλεισμού βιοδραστικών και μη συστατικών όπως λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E και K), χρωστικές, αρωματικές ουσίες, βιοδραστικές ενώσεις, καθώς και αιθέρια έλαια (Banasaz et al., 2020a).

Από την άλλη, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα τύπου ν/ε παρουσιάζουν σημαντική δυνατότητα εφαρμογής, παρόλο που δεν έχουν μελετηθεί τόσο εκτενώς όσο για τα μικρο/νανο-γαλακτώματα τύπου ε/ν, ειδικά στον εμπλουτισμό τροφίμων με βάση τα λιπίδια με υδρόφιλα βιοενεργά ή βιταμίνες, τα οποία πρέπει να προστατεύονται από υποβάθμιση, επειδή είναι ευαίσθητα σε θερμική αποικοδόμηση ή αντίδραση με άλλα συστατικά (Rezaei et al., 2019).

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα τύπου ν/ε έχουν χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή προϊόντων τροφίμων με μειωμένα λιπαρά. Η χρήση τους μειώνει τη συνολική συγκέντρωση στο τρόφιμο, ενώ η σύστασή του μπορεί να διαμορφωθεί έτσι ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά υφής.

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα τύπου ν/ε είναι σημαντικά δομικά συστατικά διαφόρων τροφίμων, όπως το βούτυρο και τα προϊόντα επάλειψης, καθώς και φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων. Το μικρό μέγεθος σταγονιδίων μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση των ιδιοτήτων του προϊόντος, καθώς και στη βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα του ωφέλιμου φορτίου. Εκτός από την αποτελεσματική αποδέσμευση βιοδραστικών ενώσεων, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα ν/ε μπορούν να αξιοποιηθούν στο σχεδιασμό σταθερών διπλών γαλακτωμάτων, όπως τα γαλακτώματα ν/ε/ν. Η διαμερισματοποιημένη δομή των διπλών γαλακτωμάτων είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για την παροχή και ελεγχόμενη απελευθέρωση υδρόφιλων συστατικών, για προϊόντα μειωμένων θερμίδων και μειωμένης αλατότητας και για την κάλυψη δυσάρεστων γεύσεων ή οσμών (Donsì and Velikov, 2019)

Μία σύνοψη των κύριων πρόσφατων μελετών σχετικά με την εφαρμογή των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ως φορείς εγκλεισμού για βιοδραστικές ενώσεις τροφίμων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.7 Παραδείγματα εφαρμογών των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ως φορείς μικροεγκλεισμού για βιοδραστικά συστατικά

Βιοδραστικό συστατικό	Μέθοδος Παρασκευής	Είδος γαλακτώματος	Γαλ/τής και λιπαρή φάση	Αναφορά
Εκχύλισμα παντζαριού	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση + Υπέρηχοι	ε/ν, ν/ε μικρο- και νανο-	Συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPC) και ηλιέλαιο	(Mohammed, Ishwarya and Nisha, 2021)
Τοκοφερόλη και τοκοτριενόλη	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	ε/ν μικρο-	Span 60 και φοινικέλαιο	(Fatehi <i>et al.</i> , 2020)
Συνένζυμο Q10 (CoQ10)	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	ε/ν μικρο-	Πολυσορβικό 80 και τριγλυκερίδια καπρυλικού/καπρικού (TG) /γλυκοσφιγγολιπίδια ρυζιού (RGSLs)	(Uchiyama <i>et al.</i> , 2019)
Εκχύλισμα πιπεριού "Dedo-de-moca"	Ομογενοποιητής πίεσης	ε/ν νανο-	Tween 80/Span 80 και έλαιο σόγιας	(Galvão, Vicente and Sobral, 2018)
Κουρκουμίνη	Ομογενοποιητής πίεσης	ε/ν διπλό νανο-	SDS/αλγινικό/χιτοζάνη (παραγόντες επικάλυψης) και τριγλυκερίδια μέσης αλυσίδας (MCTs)	(Silva <i>et al.</i> , 2018)
Αιθέριο έλαιο μέντας	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	μικρο- και νανο-	Tween 20/Tween 40/Tween 80 και αιθέριο έλαιο μέντας/MCTs	(Barzegar <i>et al.</i> , 2018)
Έλαιο Kenaf	Ομογενοποιητής πίεσης	ε/ν νανο-	Καζεϊνικό νάτριο (SC)/Βήτα-κυκλοδεξτρίνη (β-CD)/Tween 20	(Cheong, Tan and Nyam, 2018)
Ασταξανθίνη	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	ε/ν νανο-	Φωσφολιπίδια/Χιτοζάνη/Καρραγενάνη/Ακετόνη και Αιθάνιο	(Alarcón-De-la-lastra, 2022)
α-Τοκοφερόλη	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	ε/ν μικρο-	Tween 20/οξικός ισοαμυλεστέρας γλυκερόλης/μυριστικός ισοπροπυλεστέρας και έλαιο λεμονιού	(Aboudzadeh <i>et al.</i> , 2018)
Βιταμίνη D	Ομογενοποιητής πίεσης	ε/ν νανο-	Tween 20/λεκιθίνη σόγιας και έλαιο σόγιας/βούτυρο κακάο	(Golfomitsou <i>et al.</i> , 2018)
Έλαιο σπόρων τσαγιού (Camellia oleifera Abel.)	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	ν/ε, ε/ν μικρο-	Tween 20/Αιθανόλη και ελαϊκό οξύ	(Deng <i>et al.</i> , 2015)

Οι παραπάνω μελέτες έχουν αναλύσει τη σύνθεση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και τις παραμέτρους που επηρεάζουν τη φυσικοχημική σταθερότητα των βιοδραστικών ενώσεων στις ανεπτυγμένες διασπορές μεγέθους νανοκλίμακας. Περαιτέρω μελέτες είναι επίσης πιθανό να λάβουν υπόψη άλλα χαρακτηριστικά, όπως οργανοληπτικές ιδιότητες των αναπτυγμένων σκευασμάτων και ταυτόχρονο μικροεγκλεισμό θρεπτικών ουσιών για να αξιοποιηθούν οι πιθανές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους ακολουθούμενες από προσομοίωση πέψης/απορρόφησης (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022).

1.9.2 Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως φυσικά συντηρητικά

Η ασφάλεια των τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί προτεραιότητα για τους καταναλωτές και τους ρυθμιστικούς φορείς, καθώς οι τροφιμογενείς ασθένειες προκαλούν σημαντική επιβάρυνση για την υγεία και οικονομική επιβάρυνση των παραγωγών και των μεταποιητικών τομέων. Η αυξανόμενη ζήτηση για φυσικά οργανικά συστατικά και λιγότερα χημικά πρόσθετα σε προϊόντα διατροφής έχουν δημιουργήσει έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών συντηρητικών και την αντικατάσταση των χημικών ουσιών στη βιομηχανία τροφίμων (Burt, 2004). Ωστόσο, τα κύρια εμπόδια στην εφαρμογή πολλών φυσικών συντηρητικών τροφίμων είναι η χαμηλή διαλυτότητά τους σε σκευάσματα με βάση το νερό και η έντονη γεύση και οσμή τους, που μπορεί να προκαλέσει οργανοληπτικές αλλαγές και απόρριψη από τον καταναλωτή (Negi, 2012). Αυτά τα τεχνικά ζητήματα μπορούν να επιλυθούν με τον μικροεγκλεισμό των φυσικών συντηρητικών τροφίμων χρησιμοποιώντας τεχνικές μικρο/νανο-γαλακτωμάτων για τη βελτίωση της διαλυτότητάς τους και την ελαχιστοποίηση των πιθανών οργανοληπτικών αλλαγών που προκαλούνται από αυτά (Kuorwel *et al.*, 2011). Ένα μικρο- ή νανο-γαλακτωμα που περιέχει αιθέρια έλαια μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανή εναλλακτική λύση σε συμβατικές αντιμικροβιακές ενώσεις για τη αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν ισχυρά βιοφίλμ και να αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά (Fathi *et al.*, 2021).

Οι κύριες πρόσφατες μελέτες για την ανάπτυξη γαλακτωμάτων στη νανοκλίμακα που περιέχουν φυσικά συντηρητικά τροφίμων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. Τα αιθέρια έλαια και τα φυτικά εκχυλίσματα ως πιθανά φυσικά υποκατάστατα για τα συμβατικά συντηρητικά έχουν ενσωματωθεί ως επί το πλείστον σε μια λιπιδική φάση ε/ν (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022).

Πίνακας 1.8 Σημαντικές πρόσφατες εξελίξεις στις εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων (MEs) και των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ως φυσικά συντηρητικά τροφίμων

Βιοδραστικό συστατικό	Μέθοδος Παρασκευής	Είδος γαλακτώματος	Γαλ/τής και λιπαρή φάση	Αναφορά
Κουρκουμίνη	Μέθοδος σημείου αναστροφής γαλακτώματος	ε/ν νανο-	Tween 80 και αιθέριο έλαιο κανέλας/Αιθέριο έλαιο σκόρδου/Ηλιέλαιο	(Abdou, Galhoum and Mohamed, 2018)
Ελαιορητίνη	Ομογενοποιητής πίεσης Ομογενοποίηση με υπέρηχους	ε/ν νανο-	Tween 80 και Γλυκερίνη	(Akbas, Soyler and Oztop, 2018)
Αιθέριο έλαιο ρίγανης	Μέθοδος PIT (αντιστροφής φάσης με θερμοκρασία)	ε/ν νανο-	PEG-40 υδροξυλιωμένο καστορέλαιο (<i>Ricinus communis</i>)/πο-	(Bedoya-Serna <i>et al.</i> , 2018)

			λυοξυαιθυλενο 4-λαυρυλαιθέρας (Brij 30)/μονοελαϊκή σορβιτάνη (Span 80) και ηλιέλαιο	
Zataria multiflora Boiss. αιθέριο έλαιο	Ομογενοποίηση με υπέρηχους	ε/ν νανο-	Tween 80 και ηλιέλαιο	(Shadman <i>et al.</i> , 2017)
Έλαιο φύλλων κανέλας	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση Ομογενοποίηση με υπέρηχους	ε/ν νανο-	Tween 80 και έλαιο καρύδας	(Yildirim, Oztop and Soyer, 2017)
Αιθέρια έλαια δεντρολίβανου, δάφνης, θυμαριού και φασκόμηλου	Ομογενοποίηση με υπέρηχους	ε/ν νανο-	Tween 80/Αιθανόλη και αιθέρια έλαια δεντρολίβανου, δάφνης, θυμαριού και φασκόμηλου	(Ozogul <i>et al.</i> , 2017)
Έλαιο γλυκάνισου	Ομογενοποιητής πίεσης	ε/ν νανο-	Λεκιθίνη σόγιας και τριακυλογλυκερόλη μέσης αλυσίδας	(Toruz <i>et al.</i> , 2016)
Χλωριούχο κετυλοπυριδίνιο (CPC)	Μικρορευστοποιητής	ε/ν νανο-	Triton X-100/Tween 60/Tween 80/Στερόλη σόγιας και σογιέλαιο/ελαϊκός αιθυλεστέρας/Οκτανόλη	(Hwang <i>et al.</i> , 2013)

Η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που μικροεγκλείουν φυσικά συντηρητικά τροφίμων σε πιο ρεαλιστικά περιβάλλοντα, όπως τα προϊόντα τροφίμων, ακολουθούμενη από βελτιστοποίηση των παραμέτρων της διαδικασίας, είναι ένας πολύ σημαντικός τομέας στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά ο αριθμός των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά είναι πολύ περιορισμένος. Η αντιμικροβιακή ισχύς των φυσικών συστατικών μειώνεται κατά την επεξεργασία των τροφίμων, καθώς επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες της διαδικασίας (π.χ. pH, θερμοκρασία και επαφή με αέρα) και την έκταση της μικροβιακής μόλυνσης διαφόρων τροφίμων (Hyltdgaard, Mygind and Meyer, 2012; Hwang *et al.*, 2013).

Επιπλέον, παρά το τεκμηριωμένο δυναμικό των φυσικών συντηρητικών τροφίμων μέσα σε μικρο/νανο-γαλακτώματα, απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις αυτών για την αποτελεσματική καθυστέρηση ή πρόληψη της ανάπτυξης μικροοργανισμών στα τρόφιμα, περιορίζοντας έτσι την εφαρμογή τους ως συντηρητικά στον τομέα των τροφίμων.

Αν και τα αιθέρια έλαια είναι τα φυσικά συμπυκνώματα διαφόρων φυτών, υπάρχουν ρυθμιστικοί περιορισμοί που έχουν τεθεί από διεθνείς οργανισμούς σχετικά με την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψή τους, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνιέται. Πιθανές λύσεις για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα μπορεί να είναι η εισαγωγή φυσικών συντηρητικών σε ενεργές συσκευασίες αντί για σκευάσματα τροφίμων ή η αξιοποίηση πιθανών συνεργιστικών δράσεων μεταξύ διαφορετικών αιθέριων ελαίων και άλλων συστατικών όπως φυτικής προέλευσης ουσίες (π.χ. ισοθειοκυανικά, πολυφαινόλες), χηλικοί παράγοντες (π.χ. κιτρικό οξύ, EDTA), ένζυμα (π.χ. λυσοζύμη) και πεπτιδία (π.χ. βακτηριοσίνες, λακτοφερρίνη) (Hyltdgaard, Mygind and Meyer, 2012; Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022).

1.9.3 Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως ενεργά επικαλυπτικά τροφίμων

Το διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών που αποζητούν υγιεινά και θρεπτικά τρόφιμα με χαρακτηριστικά καθαρής ετικέτας τα οποία όμως εξακολουθούν να είναι ασφαλή για κατανάλωση, έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες τροφίμων και τη βιομηχανία τροφίμων στη χρήση περισσότερων φιλικών προς το περιβάλλον εναλλακτικών λύσεων συσκευασίας για εφαρμογές τροφίμων. Διάφορες δημοσιεύσεις έχουν τεκμηριώσει την ισχυρή αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων που λαμβάνονται από διαφορετικά φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά, συγκεκριμένα από κανέλα, σκόρδο, φασκόμηλο, γαρύφαλλο, μπαχάρι και δεντρολίβανο, ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Ωστόσο, τα αιθέρια έλαια τείνουν να είναι λιπόφιλα, χημικά ασταθή και εξαιρετικά πτητικά, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της αποτελεσματικότητάς τους και περιορισμένες εφαρμογές τους στις συσκευασίες τροφίμων (Burt, 2004; Kuorwel *et al.*, 2011; Negi, 2012).

Μία νέα τάση στις συσκευασίες αντιμικροβιακών τροφίμων, με την εφαρμογή της νανοτεχνολογίας, είναι η χρήση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που ενσωματώνουν αιθέρια έλαια και φυτικά εκχυλίσματα με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση. Αυτό το είδος συσκευασίας επωφελείται από μοναδικά χαρακτηριστικά, όπως ρυθμιζόμενη ρεολογία και η οπτικά διαφανής εμφάνιση.

Οι κύριες πρόσφατες εξελίξεις στις εφαρμογές μικρο/νανο-γαλακτωμάτων για την ανάπτυξη αντιμικροβιακών υλικών συσκευασίας τροφίμων συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Σε αυτό το πλαίσιο, έχουν αναπτυχθεί, γαλακτώματα με μέγεθος σταγονιδίων στη νανοκλίμακα που περιέχουν αιθέρια έλαια ή άλλα βιοενεργά συστατικά και στη συνέχεια ενσωματώνονται σε αιωρήματα πολυμερών που σχηματίζουν φιλμ (Espitia, Fuenmayor and Otoni, 2019).

Πίνακας 1.9 Σημαντικές πρόσφατες εξελίξεις των εφαρμογών μικρογαλακτωμάτων και μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε ενεργές συσκευασίες τροφίμων

Βιοδραστικό συστατικό	Μέθοδος Παρασκευής	Είδος γαλακτώματος	Γαλ/τής και λιπαρή φάση	Αναφορά
Θυμόλη	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση + υπέρηχοι	ε/ν νανο-	Tween 80 και Miglyol 812	(Robledo <i>et al.</i> , 2018)
Ρουτίνη	Μικρορρευστοποιητής	ε/ν νανο-	Span 80/Tween 80 και σογιέλαιο	(Dammak <i>et al.</i> , 2017)
Αιθέριο έλαιο Zataria multiflora	Ομογενοποίηση με υπέρηχους	ε/ν νανο-	Tween 80 και αιθέριο έλαιο	(Hashemi Gahruie <i>et al.</i> , 2017)
Αιθέριο έλαιο τζίντζερ	Μικρορρευστοποιητής	ε/ν νανο-	Tween 20/Span 80 και έλαιο Canola	(Alexandre <i>et al.</i> , 2016)
Αιθέρια έλαια ρίγανης (<i>Origanum vulgare</i>) και γαρύφαλλου (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ομογενοποίηση με υπέρηχους	ε/ν νανο-	Μονοελαϊκή σορβιτάνη (Tween 80) και αιθέρια έλαια	(Otoni <i>et al.</i> , 2014)

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σε συσκευασίες τροφίμων που ενεργοποιούνται από αιθέρια έλαια και φυτικά εκχυλίσματα οι οποίες συνήθως προσανατολίζονται στην ανάλυση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του ανεπτυγμένου φιλμ σε σύγκριση με δείγματα αναφοράς. Ωστόσο, η στάση και η συμπεριφορά των καταναλωτών απέναντι σε τρόφιμα που συσκευάζονται με νέα αντιμικροβιακά φιλμ επηρεάζονται κυρίως από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Τα ενεργά αντιμικροβιακά συστατικά είναι κυρίως αιθέρια έλαια που μπορούν να προκαλέσουν δυσμενή οργανοληπτικά (δηλαδή οσμή, γεύση και υφή) χαρακτηριστικά που υπερβαίνουν το αποδεκτό όριο στους καταναλωτές τροφίμων.

Ως εκ τούτου, η οργανοληπτική αξιολόγηση των προϊόντων διατροφής που συσκευάζονται χρησιμοποιώντας φιλμ που περιέχουν φυσικά αντιμικροβιακά συστατικά φαίνεται να είναι υψίστης σημασίας (Espitia, Fuenmayor and Otoni, 2019).

1.9.4 Μικρο/νανο-γαλακτώματα ως συστήματα χορήγησης βιοδραστικών συστατικών

Η εφαρμογή συστημάτων χορήγησης βιοδραστικών ουσιών έχει επικεντρωθεί κυρίως στα φάρμακα στη φαρμακευτική βιομηχανία, αλλά πρόσφατα επεκτάθηκε στον τομέα των θρεπτικών και λειτουργικών τροφίμων (Banasaz *et al.*, 2020b). Οι τεχνικές παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων αντιπροσωπεύουν αποτελεσματικές προσεγγίσεις για τη μεταφορά συστατικών τροφίμων που προάγουν την υγεία και για την προστασία των χημικά ασταθών βιοδραστικών ενώσεων από την οξείδωση και την αποδόμηση ή την αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά. Η πεπτικότητα, η παροχή και η ελεγχόμενη απελευθέρωση ελάχιστα υδατοδιαλυτών συστατικών μπορούν να βελτιωθούν μέσω της διαλυτοποίησης σε μικτά μικύλλια μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Από αυτή την άποψη, ένα γαλάκτωμα νανοκλίμακας (δηλαδή, μικρο/νανο-γαλάκτωμα) είναι πιο αποτελεσματικό στη συγκράτηση και τη χορήγηση βιοδραστικών ουσιών μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα από ένα συμβατικό γαλάκτωμα (Qian *et al.*, 2012; Banasaz *et al.*, 2020b).

Η σχετικά χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των φυσικών καροτενοειδών που υπάρχουν στα περισσότερα φυτικά τρόφιμα έχει συσχετιστεί με το γεγονός ότι υπάρχουν ως κρύσταλλοι ή δεσμεύονται σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα στις δομές του κυτταρικού τοιχώματος και δεν μπορούν να απελευθερωθούν πλήρως κατά την πέψη στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η μικρο- και η νανο-γαλακτωματοποίηση τέτοιων καροτενοειδών και παρόμοιων θρεπτικών ουσιών έχει εφαρμοστεί ως αποτελεσματική μέθοδος για τη βελτίωση της πεπτικότητας και της απελευθέρωσής τους και κατά συνέπεια της θρεπτικής τους αξίας. Οι πρόσφατες εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων ως συστημάτων χορήγησης για βιοδραστι-

κές ενώσεις παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. Οι μελέτες σχετικά με αυτό το θέμα έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην *in vitro* πέψη και συμπεριφορά σταθερότητας και απελευθέρωσης μικροεγκλεισμένων βιοδραστικών ουσιών υπό συνθήκες προσομοίωσης γαστρεντερικού υγρού. Ωστόσο, η κατανόηση των βιοχημικών διεργασιών (όπως η δομική παραμόρφωση, ο μετασχηματισμός σύνθεσης και η συμπεριφορά απελευθέρωσης) που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της πέψης δεν έχει ληφθεί επαρκώς υπόψη, αλλά φαίνεται ότι είναι κρίσιμης σημασίας για να καταστεί δυνατή η εξέταση της πραγματικής λειτουργικότητας των ανεπτυγμένων συστημάτων χορήγησης (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022).

Πίνακας 1.10 Σημαντικές πρόσφατες εξελίξεις στις εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων και των νανογαλακτωμάτων ως συστήματα χορήγησης βιοδραστικών σε τρόφιμα.

Βιοδραστικό συστατικό	Μέθοδος Παρασκευής	Είδος γαλακτώματος	Γαλ/τής και λιπαρή φάση	Αναφορά
α-Λινολενικό οξύ	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	ν/ο/ν μικρο-	Καστορέλαιο πολυοξυαιθυλενίου EL (CrEL)/Αιθανόλη και οξικός ισοαμυλεστέρας	(Qiu <i>et al.</i> , 2020)
Εκχυλίσματα μαγγοστίνης	Ομογενοποίηση με υπέρηχους	ε/ν νανο-	Tween20/Span20/προπυλενογλυκόλη (PG) και παρθένο έλαιο καρύδας	(Sungpud <i>et al.</i> , 2020)
Λυκοπένιο	Ομογενοποιητής πίεσης	ε/ν νανο-	Λακτοφερρίνη και έλαιο καρύδας/Λινέλαιο/Σησαμέλαιο	(Zhao <i>et al.</i> , 2020)
β-Καροτένιο και πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού	Ομογενοποιητής πίεσης	ε/ν νανο-	Πολυφαινόλες τσαγιού και αραβοσιτέλαιο	(Meng <i>et al.</i> , 2019)
Βιταμίνη Ε φυτικής προέλευσης	Μικρορευστοποιητής	ε/ν νανο-	Quillaja σαπωνίνη και καλαμποκέλαιο	(Lv <i>et al.</i> , 2018)
Βιταμίνη Ε φυτικής προέλευσης, Εικοσιδυαεξαν οϊκό οξύ (DHA)	Μικρορευστοποιητής	ε/ν νανο-	Tween-40/καζεϊνικό νάτριο/λεκιθίνη σόγιας και DHA	(Karthik and Anandharamakrishnan, 2016)
β-Καροτένιο	Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση	ε/ν νανο- και ε/ν μικρο-	Τριγλυκερίδια Tween 80 και μακράς αλυσίδας (LCT)/Τριγλυκερίδια μεσαίας αλυσίδας (MCT)/Πορτοκαλέλαιο	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)

Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση της αντιστοιχίας μεταξύ *in vitro* και *in vivo* αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας ένα καλά ανεπτυγμένο μοντέλο για συστήματα τροφίμων για την ενί-

σχυση της προγνωστικής ακρίβειας των υπαρχόντων συστημάτων δοκιμών in vitro που προσομοιώνουν διαφορετικά μέρη του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπλέον, οι in vivo έρευνες είναι υψίστης σημασίας για την κατανόηση της λειτουργικότητας των βιοδραστικών ουσιών σε ένα ρεαλιστικό γαστρεντερικό περιβάλλον (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022).

1.9.5 Εφαρμογές των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στην αγορά των τροφίμων

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα έχουν συγκεντρώσει μεγάλη προσοχή από τη βιομηχανία τροφίμων λόγω των αποδεδειγμένων πλεονεκτημάτων τους ως φορείς μικροεγκλεισμού βιοδραστικών ουσιών, όπως αποδεικνύεται από διάφορες in vitro και in vivo μελέτες. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ελάχιστα παραδείγματα βιομηχανικής εφαρμογής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα διατροφής ή τη χρήση τους ως υλικά συσκευασίας (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022). Παρακάτω αναφέρονται κάποιες επίσημα δημοσιευμένες εμπορικές εφαρμογές των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στη διεθνή βιομηχανία τροφίμων.

Κάποιες μεγάλες εταιρείες τροφίμων όπως η Nestlé και η Unilever, καθώς και ορισμένες νεοφυείς επιχειρήσεις, έχουν ενσωματώσει τα μικρο/νανο-γαλακτώματα στα προϊόντα τροφίμων τους. Για παράδειγμα, η Nestlé έχει αναπτύξει νανογαλακτώματα τύπου ν/ε και έχει κατοχυρώσει με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ορισμένες ενώσεις για ταχεία απόψυξη κατεψυγμένων τροφίμων σε φούρνους μικροκυμάτων (Deen, Skovgaard and Pedersen, 2011). Η Unilever ενσωμάτωσε νανογαλακτώματα σε παγωτά για να μειώσει σημαντικά την περιεκτικότητα σε λιπαρά από 16% σε 1% (Silva, Cerqueira and Vicente, 2012). Η νεοφυής εταιρεία NutraLease εισήγαγε την τεχνολογία νανοσυναρμολογούμενων δομημένων υγρών (NSSL), σχηματίζοντας μικρά συμπιεσμένα μικύλλια ως φορείς για λιποδιαλυτά βιοενεργά συστατικά. Αυτά τα μικύλλια, ενσωματωμένα σε προϊόντα διατροφής, διασχίζουν αποτελεσματικά το πεπτικό σύστημα χωρίς υποβάθμιση, βοηθώντας στην ανάπτυξη ροφημάτων εμπλουτισμένων με λειτουργικές ουσίες (NutraLease, 2011).

Επιπλέον, εταιρείες όπως η Shemen Industries και η AquaNova έχουν χρησιμοποιήσει μικρο/νανο-γαλακτώματα για τον εμπλουτισμό ελαίων και ροφημάτων με διάφορες λειτουργικές ενώσεις και φυσικές χρωστικές, ενισχύοντας τη σταθερότητα και διατηρώντας σταθερές συγκεντρώσεις προσθέτων. Το προϊόν NovaSOL support της AquaNova διαθέτει ένα σύστημα νανοφορέα ιδανικό για τη διευκόλυνση της εντερικής και δερματικής απορρόφησης ενεργών συστατικών όπως το συνένζυμο Q10 και το άλφα-λιποϊκό οξύ (AquaNova 2024)

Η RBC Life Sciences εισήγαγε την τεχνολογία NanoCluster™, χρησιμοποιώντας σκόνη νανομεγέθους σε συμπληρώματα διατροφής, σε προϊόντα όπως το Nanoceuticals™ Slim Shake Chocolate. Αυτή η καινοτόμος προσέγγιση στοχεύει στην ενίσχυση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών. Επιπρόσθετα, το GranaGard™, ένα γαλάκτωμα ελαίου από σπόρους ροδιού από την GranaLix

BioTechnologies, έχει αποδειχθεί πολλά υποσχόμενο στην πρόληψη νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Schreiber and Rowley, 2016).

Η εταιρεία Therapeutics Solutions International, Inc., έχει αναπτύξει σταθερά νανογαλακτώματα πτεροσιλβενίου, ένα ισχυρό ανάλογο της ρεσβερατρόλης, με ενισχυμένη διαλυτότητα και σταθερότητα σε σύγκριση με τη μητρική της ένωση. Αυτά τα νανογαλακτώματα αποτελούν τη βάση πατενταρισμένων διατροφικών προϊόντων όπως το ProJuvenol (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022).

Οι καινοτομίες επεκτείνονται σε κατοχυρωμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα βελτιωτικών γεύσης ιδανικών για τη δημιουργία σταθερών υγρών ροφημάτων, συμπεριλαμβανομένων των αλκοολούχων ποτών, καθώς και για την εφαρμογή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά με σκοπό την επέκταση της διάρκειας ζωής κάποιων τροφίμων. Παράλληλα, κατοχυρωμένα νανογαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε επικαλύψεις τροφίμων σε φρέσκα και ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα και έχουν οδηγήσει σε εκτεταμένη διάρκεια ζωής και βελτιωμένη ποιότητα κατά την απόψυξη κατεψυγμένων τροφίμων (Aswathanarayan and Vittal, 2019c).

Άλλες εταιρείες τροφίμων που εργάζονται επί του παρόντος σε μικρο/νανο-γαλακτώματα είναι η Kraft Heinz Company, η WILD Flavors and Specialty Ingredients, η Keystone Foods, η Jamba, η Fruitarom Group και η DuPont (Allied Market Research, 2024).

Ένας από τους σημαντικότερους περιορισμούς που παρουσιάζονται κατά την ανάπτυξη μικρο/νανο-γαλακτωμάτων για εφαρμογές τροφίμων είναι η φύση και η δοσολογία της επιφανειοδραστικής ουσίας που απαιτείται για την παρασκευή τους. Μόνο μερικές επιφανειοδραστικές ουσίες πληρούν τα πρότυπα ασφαλείας των τροφίμων και επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ η εφαρμογή τους εξακολουθεί να μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα και ερεθισμό εάν χρησιμοποιούνται σε υψηλά επίπεδα (Abd-El Salam and Murugan, 2022). Ως εκ τούτου, οι επιστήμονες θα πρέπει να εξετάσουν προσεκτικά τις επιφανειοδραστικές ουσίες που είναι ασφαλείς για ανθρώπινη κατανάλωση, έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS (γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή), και είναι οικονομικά βιώσιμες για την ανάπτυξη μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Amiri-Rigi, Abbasi and Emmambux, 2022).

1.10 Ασφάλεια των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και νομοθετικό πλαίσιο

Τα πιθανά οφέλη από τη χρήση τεχνολογικά επεξεργασμένων νανοϋλικών στα τρόφιμα είναι πολλά, με μεγάλο εύρος εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά οι σχετικοί κίνδυνοι εξακολουθούν να

μην έχουν διασαφηνιστεί απολύτως. Τα νανοϋλικά μπορεί να έχουν ένα ευρύ φάσμα πιθανών τοξικών επιδράσεων, ανάλογα με τη χημική τους φύση (οργανική ή ανόργανη), κατανομή μεγέθους σωματιδίων, μορφή σωματιδίων, επιφανειακή δομή, κατάσταση συσσωμάτωσης, κλπ. Υπάρχει ανάγκη να διασαφηνιστεί η πιθανή τοξικολογική και η βιολογική τύχη των νανοσωματιδίων μετά την πέψη, να προσδιοριστεί η συμπεριφορά τους στο γαστρεντερικό σύστημα και να προσδιοριστεί η πιθανή βιοσυσώρευσή τους σε ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς. Οι προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας είναι προσανατολισμένες προς αυτόν τον σκοπό, αλλά οι αναλυτικές τεχνικές χρειάζονται επικύρωση με κλινικές μελέτες σε πειραματόζωα και ανθρώπους οι οποίες είναι δαπανηρές και χρονοβόρες (Onyeaka *et al.*, 2022). Παρά την έλλειψη γνώσης, η παρουσία προϊόντων διατροφής που περιέχουν νανοϋλικά στην αγορά αυξάνεται. Αυτό οδήγησε τις αρχές σε όλο τον κόσμο να εκδώσουν κατευθυντήριες γραμμές και κανονισμούς που αφορούν στη χρήση νανοϋλικών στα τρόφιμα (Salvia-Trujillo *et al.*, 2017).

1.10.1 Ασφάλεια των νανοϋλικών στα τρόφιμα

Έχει διεξαχθεί μεγάλη έρευνα για να διαπιστωθεί η πιθανή τοξικότητα των νανοϋλικών, αλλά πολύ περιορισμένα όσον αφορά στην αξιολόγηση της ασφάλειας και της τοξικότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων τροφίμων. Κατά συνέπεια, μεγάλο μέρος της τρέχουσας γνώσης μας για την πιθανή τοξικότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων προέρχεται από μελέτες σε άλλους τύπους υλικών νανοκλίμακας (Onyeaka *et al.*, 2022). Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την πιθανή τοξικολογική επίδραση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στα βιολογικά συστήματα, οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε τρεις ευρείες κατηγορίες:

- Σύνθεση μικρο/νανο-γαλακτώματος
- Δομή μικρο/νανο-γαλακτώματος
- Τρόπος χορήγησης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

1.10.1.1 Σύνθεση Μικρο/νανο-γαλακτώματος

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μπορούν να παρασκευαστούν από ποικίλα φυσικά ή/και συνθετικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων ελαίων, επιφανειοδραστικών, συνεπιφανειοδραστικών, αναστολέων ωρίμανσης κατά Ostwald, τροποποιητών υφής και παραγόντων πήξης (Wani *et al.*, 2016; Jafari, 2017). Ορισμένα από αυτά τα συστατικά συνήθως δεν χρησιμοποιούνται σε συμβατικά γαλακτώματα ή χρησιμοποιούνται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από αυτά που βρίσκονται στα μικρο/νανο-γαλακτώματα (Faridi Esfanjani, Jafari and Assadpour, 2017; Jafari, 2019). Κατά συνέπεια, είναι πιθανό τα

μικρο/νανο-γαλακτώματα να έχουν διαφορετικό προφίλ τοξικότητας από τα συμβατικά γαλακτώματα λόγω διαφορών στη φύση και τη συγκέντρωση των συστατικών που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεσή τους. Πολλά από τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων δεν αναμένεται να έχουν τοξική δράση, επειδή χρησιμοποιούνται ήδη ευρέως σε υψηλές συγκεντρώσεις σε άλλα προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτωματοποιητών με βάση πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και φωσφολιπίδια. Ωστόσο, ορισμένα συνθετικά επιφανειοδραστικά μπορεί να προκαλούν ερεθισμό ή τοξικότητα όταν χρησιμοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως ανιονικά τασιενεργά (π.χ. εστέρες γαλακτικού οξέος), κατιονικά τασιενεργά (π.χ. λαυρικό αργινικό) και μη ιονικά τασιενεργά (π.χ. Tweens and Spans) (Ziani *et al.*, 2011). Έχουν γίνει σχετικά λίγες μελέτες για την επίδραση της σύνθεσης των νανογαλακτωμάτων στην τοξικότητά τους. Μία μελέτη κυτταροκαλλιέργειας Caco-2 (κυτταρική σειρά προερχόμενη από αδενοκαρκίνωμα του επιθηλίου του παχέος εντέρου) δεν ανέφερε εμφανή διαφορά στην τοξικότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και των γαλακτωμάτων που σταθεροποιήθηκαν από διαφορετικά είδη γαλακτωματοποιητών (τροποποιημένο άμυλο, Tween 20 ή πρωτεΐνη ορού γάλακτος), γεγονός που υποδηλώνει ότι η μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων δεν είχε σημαντική επίδραση στην τοξικότητά τους. Ωστόσο το αντικείμενο μελέτης δεν έχει ερευνηθεί εξαντλητικά ακόμη. Μάλιστα, ορισμένα συστατικά μπορεί να αυξήσουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης ή να παρεμποδίσουν τους μηχανισμούς απορρόφησης ή αποβολής, μεταβάλλοντας έτσι έμμεσα την πρόσληψη βιοδραστικών συστατικών (Singh, Hakkarainen and Singh, 2018; Saura C. Sahu, 2023).

1.10.1.2 Δομή Μικρο/νανο-γαλακτώματος

Τα δομικά χαρακτηριστικά των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, δηλαδή το μέγεθος σωματιδίων ή το φορτίο, μπορεί επίσης να επηρεάσουν την πιθανή τοξικότητά τους (Jafari, 2019). Το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων στα μικρο/νανο-γαλακτώματα οδηγεί συχνά σε υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα των περιεχόμενων βιοδραστικών συστατικών για διάφορους λόγους: (1) Η διαλυτότητα ενός εγκλεισμένου βιοδραστικού συστατικού αυξάνεται καθώς το μέγεθος των σταγονιδίων που το περιέχουν μειώνεται οδηγώντας σε μεγαλύτερη απορρόφηση (2) ο ρυθμός της πέψης των λιπιδίων και της βιοδραστικής απελευθέρωσης αυξάνεται καθώς αυξάνεται το μέγεθος των σταγονιδίων (η επιφάνεια των σταγονιδίων μειώνεται), οδηγώντας σε πιο γρήγορη απορρόφηση. (3) Μικρά σταγονίδια μπορούν να διεισδύσουν μέσω των πόρων στο στρώμα του βλεννογόνου του εντέρου, οδηγώντας επίσης σε ταχύτερη απορρόφηση.

Κατά συνέπεια, μπορεί να υπάρχει μεγαλύτερη απορρόφηση ενός βιοδραστικού συστατικού από ένα μικρο/νανο-γαλακτώμα παρά από ένα συμβατικό γαλακτώμα. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτό μπορεί

να είναι επιθυμητό, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι ανεπιθύμητο. Για παράδειγμα, ορισμένα θρεπτικά συστατικά μπορεί να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία όταν υπάρχουν σε χαμηλά έως ενδιάμεσα επίπεδα συγκέντρωσης στον ορό του αίματος, αλλά έχουν τοξικά αποτελέσματα όταν υπάρχουν σε υψηλότερα επίπεδα (όπως η βιταμίνη E) (Islam *et al.*, 2022). Εναλλακτικά, η αυξημένη απορρόφηση ορισμένων βιοδραστικών παραγόντων (όπως τα φυτοφάρμακα) μπορεί να είναι ανεπιθύμητη.

Το φορτίο των σταγονιδίων (ζ-δυναμικό) μπορεί επίσης να επηρεάσει την ασφάλεια και την τοξικότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Το πρόσημο και το μέγεθος του ζ-δυναμικού στα σταγονίδια μικρο/νανο-γαλακτώματος μπορεί να μεταβάλει τη φυσική τους σταθερότητα, τη διείσδυση μέσω των στρωμάτων του βλενογόνου ή τις αλληλεπιδράσεις με τις κυτταρικές μεμβράνες. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα των σταγονιδίων μικρο/νανο-γαλακτώματος να διεισδύουν στα στρώματα του βλενογόνου εξαρτάται από το μέγεθος του ζ-δυναμικού. Επιπλέον, το μέγεθος και το πρόσημο του ζ-δυναμικού στα ανόργανα νανοσωματίδια έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις τους με τα βιολογικά κύτταρα (Schwegmann, Feitz and Frimmel, 2010).

1.10.1.3 Αλληλεπίδραση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με τα βιολογικά συστήματα

Η ασφάλεια και η τοξικότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων εξαρτάται κατ' ουσία από τις αλληλεπιδράσεις τους με τα βιολογικά συστήματα. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει μεγάλος αριθμός συστηματικών μελετών σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με τα βιολογικά συστήματα. Ωστόσο, έχουν γίνει σχετικά λίγες μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με τα βιολογικά συστήματα. Για παράδειγμα, νανογαλακτώματα εμπλουτισμένα με βιταμίνη E άλλαξαν την έκφραση διαφόρων γονιδίων και οδήγησαν σε μεταβολή του ξενοβιοτικού μεταβολισμού (CYP1A1 και γλουταθειόνη S-τρανσφεράση), σχηματισμό κετόνης (Β-υδροξυβουτυρικό και παλμιτελαϊκό οξύ) και αύξηση της στεαροϋλο-CoA δεσатуράσης (Park *et al.*, 2017). Άλλη μελέτη έδειξε ότι τα νανογαλακτώματα με κourkouμίνη δεν είχαν κυτταροτοξικές επιδράσεις στους φυσιολογικούς ινοβλάστες, είχαν καλές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και ήταν σε θέση να προάγουν την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Vecchione *et al.*, 2016).

Το μεγαλύτερο μέρος της πρόσφατης βιβλιογραφίας για την ασφάλεια και την τοξικότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε βιολογικά συστήματα υποδηλώνει ότι η εφαρμογή τους είναι ασφαλής. Υπάρχουν λίγες μελέτες όπου οι ερευνητές έχουν βρει ότι τα νανογαλακτώματα είναι τοξικά πιθανώς λόγω των πολύ υψηλών δόσεων που χρησιμοποιούνται. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι τα περισσότερα από τα νανογαλακτώματα είναι ασφαλή όταν χρησιμοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Tawfik *et al.*, 2023).

1.10.1.4 Τρόπος χορήγησης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Η οδός πρόσβασης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στα βιολογικά συστήματα είναι κρίσιμη για τον προσδιορισμό της πιθανής ασφάλειας και τοξικότητάς τους. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που προορίζονται για εφαρμογές τροφίμων γενικά χορηγούνται από το στόμα. Ωστόσο, οι πνευμονικές, ενδοφλέβιες, ενδομυϊκές και οφθαλμικές χορηγήσεις μικρο/νανο-γαλακτωμάτων δεν είναι ασυνήθιστες στην κοσμητολογία ή στη φαρμακευτική (Wang *et al.*, 2020). Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που λαμβάνονται από το στόμα και αποτελούνται από εύπεπτα λιπίδια συνήθως αφομοιώνονται γρήγορα στη γαστρεντερική οδό (GIT), οδηγώντας στο σχηματισμό μικτών μικυλλίων που αποτελούνται από μονοακυλογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα που στη συνέχεια απορροφώνται. Κατά συνέπεια, τα τελικά προϊόντα της πέψης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων μπορεί να είναι παρόμοια με αυτά των συμβατικών γαλακτωμάτων, αν και παράγονται με ταχύτερο ρυθμό, γεγονός που θα μπορούσε να αλλάξει τα επίπεδα στον ορό του αίματος. Τυπικά, μόνο ένα πολύ μικρό μέρος των σταγονιδίων μικρο/νανο-γαλακτώματος που λαμβάνονται θα παραμείνει άθικτο και θα μπορεί να διασχίσει το βλεννογόνο στρώμα και να απορροφηθεί από τα επιθηλιακά κύτταρα (McClements and McClements, 2016b).

Η πιθανή τοξικότητα του μικρού κλάσματος των νανοσωματιδίων που απορροφώνται απευθείας στο έντερο χωρίς πέψη δεν έχει γίνει ακόμη κατανοητή. Όταν χρησιμοποιούνται δύσπεπτα λιπίδια για τη σύνθεση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, μπορεί να υπάρχει πολύ μεγαλύτερο κλάσμα νανοσωματιδίων που απορροφάται άμεσα. Οι ιδιότητες των σταγονιδίων μικρο/νανο-γαλακτώματος (όπως το μέγεθος των σωματιδίων, το φορτίο και η σύνθεση) μπορεί στη συνέχεια να επηρεάσουν την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκρισή τους (Bouwmeester *et al.*, 2009). Η κατανοήσή μας για αυτόν τον σημαντικό τομέα είναι επί του παρόντος περιορισμένη, και σαφώς υπάρχουν πολλά περιθώρια για περαιτέρω έρευνα στο μέλλον (López Rubio *et al.*, 2018).

Σε ιατρικές εφαρμογές, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μπορούν επίσης να χορηγηθούν με ενδοφλέβια χορήγηση, επειδή μπορεί να οδηγήσει σε ενισχυμένη διαπερατότητα και διατήρηση βιοδραστικών συστατικών (Wang *et al.*, 2020). Συνιστάται η μέση διάμετρος σωματιδίων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που προορίζονται για αυτές τις εφαρμογές να κυμαίνεται μεταξύ 100-300 nm (Sun and Yeo, 2012). Εάν τα σταγονίδια είναι πολύ μεγάλα, μπορεί να φράξουν τα αιμοφόρα αγγεία, ενώ αν είναι πολύ μικρά, μπορεί να απορροφηθούν γρήγορα και αδιάκριτα. Η δοσολογία είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που καθορίζουν την ασφάλεια και την τοξικότητα του εγχυόμενου συστατικού (Singh, Hakkarainen and Singh, 2018).

Η ενδοκυτταρική χορήγηση είναι μία άλλη οδός για παρατεταμένη απελευθέρωση βιοδραστικών συστατικών σε βιολογικά συστήματα. Ο έλεγχος του μεγέθους των σταγονιδίων σε μικρο/νανο-γαλακτώματα που προορίζονται για αυτόν τον τύπο εφαρμογής είναι και πάλι σημαντικός για τον έλεγχο της φαρμακοκινητικής του φαρμάκου. Η ενδοκυτταρική χορήγηση νανοεναιωρημάτων κουρκουμίνης και διδεκανοϊκής κουρκουμίνης αποδείχθηκε ότι δεν προκαλεί τοξικότητα στον σπλήνα, την καρδιά, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τα νεφρά (Wei et al., 2013). Επομένως, υπάρχει περιθώριο για διερεύνηση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που προορίζονται για ενδοφλέβια και ενδοκυτταρική χορήγηση (Saura C. Sahu, 2023).

Για τα μικρο/νανο-γαλακτώματα στην κοσμετολογία, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο κίνδυνος σχετικά με τον τρόπο διείσδυσης των δραστικών συστατικών στο δέρμα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μπορούν να ενισχύσουν το προφίλ διείσδυσής τους. Γενικώς, τα συστατικά των καλλυντικών μπορούν να διεισδύσουν στο ανώτερο στρώμα του ανθρώπινου δέρματος, αλλά δεν πρέπει να διαπερνούν σε βάθος το δέρμα. Ως εκ τούτου, ο κίνδυνος να βελτιωθεί το προφίλ διείσδυσής τους με τη χρήση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων θα πρέπει να θεωρείται ως κρίσιμο χαρακτηριστικό για τη διασφάλιση της ασφάλειας των καταναλωτών (Joseph and Morrison, 2006; Musazzi et al., 2017).

1.10.2 Νομοθετικό πλαίσιο της χρήσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στα τρόφιμα

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει επί του παρόντος κανένας διεθνώς αναγνωρισμένος οργανισμός που να ρυθμίζει τους ορισμούς, την ασφάλεια, την τοξικότητα, την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Υπάρχουν ωστόσο διάφοροι ορισμοί και οδηγίες γενικότερα για τα νανοϋλικά τροφίμων από παγκόσμιες ρυθμιστικές υπηρεσίες και ερευνητές. Ένας από τους γενικώς χρησιμοποιούμενους ορισμούς των νανοϋλικών τροφίμων προτάθηκε από τους Joseph και Morrison (2006) ως «τρόφιμα που έχουν καλλιεργηθεί, παραχθεί, επεξεργαστεί ή συσκευαστεί χρησιμοποιώντας τεχνικές ή εργαλεία νανοτεχνολογίας ή στα οποία έχουν προστεθεί κατασκευασμένα νανοϋλικά» (Joseph and Morrison, 2006). Έως και 24 ορισμοί του «νανοϋλικού» έχουν δοθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Αυτοί βασίζονται στις εκτιμήσεις ότι ένα υλικό περιέχει σωματίδια εντός του εύρους νανοκλίμακας (1–100 nm) ή ότι οι ιδιότητες του υλικού αποδίδονται στη διάστασή του ακόμη και αν οι διαστάσεις δεν ξεπερνούν το εύρος νανοκλίμακας (έως 1000 nm) (FDA 2014). Οι σχετικές ρυθμίσεις από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) όσον αφορά στη χρήση και την ασφάλεια αυτών των υλικών είναι ακόμη σε αρχικό στάδιο και βασίζονται κυρίως στην καθοδήγηση από τη βιομηχανία (FDA 2015).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση και η Ελβετία είναι οι μόνες δύο περιοχές του κόσμου όπου έχουν ενσωματωθεί ειδικοί κανονισμοί στη νομοθεσία για τη γεωργία, τις ζωοτροφές και τα τρόφιμα όσον αφορά τα νανοϋλικά. Το ευρωπαϊκό ρυθμιστικό πλαίσιο για τα καλλυντικά προϊόντα έχει σχεδόν ολοκληρωθεί. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας στον τομέα της ιατρικής, η αξιολόγηση των νανοϋλικών βασίζεται σε αξιολόγηση κατά περίπτωση (Musazzi *et al.*, 2018).

Όσον αφορά τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έχουν καταβληθεί προσπάθειες για τον έλεγχο της χρήσης νανοϋλικών στα τρόφιμα, και σήμερα υπάρχει ένα επαρκώς ορισμένο πλαίσιο. Γενικώς, η ενσωμάτωση τεχνολογικά επεξεργασμένων νανοϋλικών στα τρόφιμα πρέπει να πληροί τον κανονισμό για τα πρόσθετα τροφίμων (ΕΕ 1333/2008) όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει, καθώς θεωρούνται νέα συστατικά τροφίμων. Τον Φεβρουάριο του 2009, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) εξέδωσε επιστημονική γνώμη σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους που προκύπτουν από τη νανοεπιστήμη και τη νανοτεχνολογία στην ασφάλεια των τροφίμων και των ζωοτροφών. Πιο πρόσφατα, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο δημοσίευσε την αναθεώρηση των κανονισμών για τα νανοϋλικά, κατά την οποία συντάχθηκε κατάλογος τύπων και χρήσεων νανοϋλικών, συμπεριλαμβανομένων μέτρων ασφάλειας (Cheng *et al.*, 2022).

Επιπλέον, λόγω της ανάγκης για ειδικές κατευθυντήριες γραμμές για τα νανοϋλικά, η EFSA δημοσίευσε τον Μάιο του 2011 έναν οδηγό για την εκτίμηση κινδύνου των παρασκευασμένων νανοϋλικών στα τρόφιμα καθώς και για την έκθεση των καταναλωτών σε αυτά, λαμβάνοντας υπόψη τον χαρακτηρισμό τους, την πιθανή τους τοξικότητα και τη βιολογική τους τύχη. Στον οδηγό αυτόν παρέχονται οδηγίες για τον χαρακτηρισμό των κινδύνων καθώς και τη μεθοδολογία ελέγχου για τον εντοπισμό των κινδύνων που προκύπτουν από τα νανοϋλικά στα τρόφιμα.

Αναφέρεται ότι εάν μπορεί να αποδειχθεί η πλήρης πέψη ενός νανοϋλικού στο γαστρεντερικό σύστημα και επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος να εμφανιστεί βιοσυσσώρευση στο ανθρώπινο έντερο, τότε τα νανοϋλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εμπορικούς σκοπούς βάσει της υπάρχουσας νομοθεσίας.

Επομένως, στην περίπτωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε αυτά που παρασκευάζονται από μη αφομοιώσιμα έλαια, τα οποία ενδέχεται να είναι επιρρεπή να βιοσυσσωρευτούν σε εντερικά ή ηπατικά κύτταρα.

Τον Οκτώβριο του 2011 δημοσιεύθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ο Κανονισμός 1169/2011 της ΕΕ σχετικά με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές, όπου αναφέρεται ότι η παρουσία των τεχνολογικά επεξεργασμένων νανοϋλικών στα τρόφιμα πρέπει να φέρει κατάλληλη επισήμανση (ΕΕ 1169/2011). Τον Σεπτέμβριο του 2013, υποβλήθηκε η ισχύουσα τροπολογία στην ΕΕ 1169/2011 προκειμένου να γίνει διάκριση μεταξύ φυσικών και των τεχνολογικά επεξεργασμένων νανοϋλικών.

Το Νοέμβριο του 2015 δημοσιεύτηκε ο κανονισμός ΕΕ 2015/2283 ο οποίος θεσπίζει κανόνες για τη διάθεση καινοτόμων τροφίμων (novel foods) στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) τα οποία έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν υψηλό επίπεδο προστασίας για την ανθρώπινη υγεία και τα συμφέροντα των καταναλωτών. Ο ορισμός των νανοϋλικών στον κανονισμό για τα νέα τρόφιμα αφορά τα σκοπίμως παραγόμενα («τεχνολογικά επεξεργασμένα») νανοϋλικά τα οποία έχουν μία ή περισσότερες διαστάσεις έως 100 nm ή αποτελούνται από διακριτά μέρη που ενδέχεται να έχουν διαστάσεις έως 100 nm. Ο ορισμός περιλαμβάνει επίσης τα τεχνολογικά επεξεργασμένα νανοϋλικά που περιλαμβάνουν δομές, συσσωματώματα ή σύνολα με διαστάσεις ακόμη και άνω των 100 nm, τα οποία όμως διατηρούν χαρακτηριστικά της νανοκλίμακας, όπως η μεγάλη ειδική επιφάνεια και συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες.

Οι ιδιότητες που είναι χαρακτηριστικές της νανοκλίμακας περιλαμβάνουν:

- (i) εκείνες που σχετίζονται με τη μεγάλη ειδική επιφάνεια των υπό εξέταση υλικών και/ή
- (ii) ειδικές φυσικοχημικές ιδιότητες που είναι διαφορετικές από αυτές της μη νανομορφής του ίδιου υλικού.

Προκειμένου να οριστεί ένα προϊόν τροφίμων ως καινοτόμο τρόφιμο, θα πρέπει οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων να επαληθεύουν οι ίδιοι εάν τα τρόφιμα που σκοπεύουν να διαθέσουν στην αγορά εντός της Ένωσης εμπίπτουν ή όχι στο πεδίο εφαρμογής του παρόντος κανονισμού. Εναλλακτικά όταν δεν είναι βέβαιοι να συμβουλευούνται το κράτος μέλος στο οποίο σκοπεύουν να διαθέσουν για πρώτη φορά το νέο τρόφιμο.

Η διαδικασία έγκρισης της διάθεσης στην αγορά στην Ένωση ενός νέου τρόφιμου και η ενημέρωση του ενωσιακού καταλόγου που προβλέπεται στο άρθρο 9 του κανονισμού ΕΕ 2015/2283 ξεκινά είτε με πρωτοβουλία της Επιτροπής είτε κατόπιν αίτησης αιτούντος στην Επιτροπή.

Η αίτηση για άδεια περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την περιγραφή της διαδικασίας παραγωγής, τη λεπτομερή σύνθεση του νέου τρόφιμου, επιστημονικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το νέο τρόφιμο δεν ενέχει κίνδυνο ασφάλειας για την ανθρώπινη υγεία, όπου ενδείκνυται, η(οι) μέθοδος(οι) ανάλυσης και πρόταση για τις συνθήκες προβλεπόμενης χρήσης, και ειδικές απαιτήσεις επισήμανσης που δεν παραπλανούν τον καταναλωτή.

Επομένως η ο σχεδιασμός, η παραγωγή και η διάθεση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων τροφίμων, αλλά και η αποδοχή τους από τους καταναλωτές εξαρτάται από την παροχή αξιόπιστων πληροφοριών από την επιστημονική κοινότητα σχετικά με πραγματικούς κινδύνους που συνδέονται με την κατανάλωσή τους (Jain *et al.*, 2018).

Συμπερασματικά, υπάρχουν περιορισμένα επιστημονικά στοιχεία για το αν τα νανοϋλικά ενέχουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Οι διαθέσιμες τοξικολογικές γνώσεις σχετικά με τα νανοϋλικά υποδηλώνουν ότι, λόγω του μέγεθους των σωματιδίων, η τοξικότητά τους βασίζεται στη φύση τους

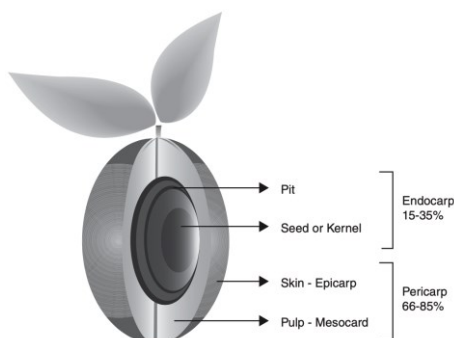
και στη δυνατότητά τους να αντιδράσουν στο περιβάλλον των βιολογικών ιστών. Κατά συνέπεια, ορισμένα νανοϋλικά μπορεί να είναι επικίνδυνα και άλλα όχι. Προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής προστασία για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, διαφορετικές χώρες στον κόσμο θα πρέπει να συνεργάζονται μεταξύ τους και να ανταλλάσσουν πληροφορίες χωρίς να διακυβεύεται η ανάπτυξη νέων ευεργετικών προϊόντων και η παγκόσμια εμπορική αξιοποίησή τους.

Ελαιόλαδο και φαινολικές ενώσεις ως συστατικά των μικρο/νανο-γα- λακτωμάτων

2.1.1 Ελαιόλαδο

Η ελιά, με τον επιστημονικό όρο *Olea europaea*, χαρακτηρίζεται ως ένα δέντρο το οποίο παράγει καρπούς με ωειδές σχήμα που περιλαμβάνουν δύο βασικά συστατικά: το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο. Το περικάρπιο αντιπροσωπεύει το 66-85% του βάρους του καρπού και αποτελείται από το επικάρπιο (επιδερμίδα/φλοιός) και το μεσοκάρπιο (πολτός). Το ενδοκάρπιο, που ονομάζεται επίσης κουκούτσι ή πυρήνας, περιέχει τον σπόρο, ο οποίος αντιπροσωπεύει <3% του βάρους του καρπού. Το περικάρπιο περιέχει 96–98% της συνολικής ποσότητας ελαίου, ενώ το υπόλοιπο 2-4% του ελαίου βρίσκεται στο ενδοκάρπιο (Kiritsakis and Shahidi, 2017).

Το μέσο βάρος των καρπών κυμαίνεται από 2 έως 12 g, ενώ σε ορισμένες ποικιλίες οι καρποί είναι δυνατό να φτάσουν και τα 20 g. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης, το επικάρπιο υφίσταται μεταβολή στο χρώμα του, μεταβαίνοντας από μία ανοιχτή πράσινη απόχρωση σε μία σκούρα μαύρη απόχρωση. Η περιεκτικότητα του σπόρου σε νερό, συχνά αναφερόμενο ως φυτικό νερό, αγγίζει πολλές φορές το 70% του καρπού.



Εικόνα 2.1: Η ανατομία του καρπού της ελιάς αποκαλύπτει συνήθως έναν σπόρο ωοειδούς σχήματος στον πυρήνα του καρπού (Kiritsakis & Shahidi, 2017).

Η σύνθεση του καρπού ελιάς περιλαμβάνει συνήθως νερό, πρωτεΐνες, έλαιο, υδατάνθρακες, κυτταρίνη και ανόργανα συστατικά (δηλαδή τέφρα) σε ποσοστά της τάξης του 50, 1.6, 22, 19, 5.8 και 1.5% αντιστοίχως. Οι ελιές συνιστούν σημαντική πηγή οργανικών οξέων, αζωτούχων ενώσεων, φλαβονοειδών και ανθοκυανών, ενώ ενώσεις όπως η ελαιοευρωπαϊνή, η διμεθυλοευρωπαϊνή και η βερμπασκοσίδη, που κυριαρχούν στο φαινολικό κλάσμα είναι ζωτικής σημασίας για τη σύνθεση της ελιάς. Οι συγκεντρώσεις αυτών των χημικών ουσιών κυμαίνονται από 0,5% έως 2,5% του νωπού βάρους της ελιάς.

Η αύξηση του βάρους των καρπών εξελίσσεται μέσω σταδίων που εκτείνονται μέχρι τον Οκτώβριο ή τα μέσα Νοεμβρίου με τη μέγιστη συγκέντρωση ελαίου να εμφανίζεται κατά κανόνα από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο.

Ο καρπός εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της περιόδου από τα μέσα Ιουλίου έως τις αρχές Αυγούστου, ενώ μεταβαίνοντας από το φθινόπωρο στο χειμώνα, ο καρπός σκουραίνει σημαντικά, αποκτά βαθιά μαύρη απόχρωση με την περιεκτικότητα σε έλαιο να αυξάνεται συνεχώς. Τότε, το περικάρπιο φαίνεται να περιέχει περίπου το 96% έως 98% της περιεκτικότητας σε έλαιο. Το μοναδικό άρωμα και η γεύση του ελαίου αποδίδεται στη σύνθεση και ταυτόχρονα στη συσσώρευσή του στον καρπό, ο οποίος χρησιμεύει ως αποθήκη για διάφορες λιπιδικές ενώσεις, ενώ η διάρκεια που απαιτείται για την ωρίμανση των ελιών φαίνεται ότι εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές, όπως ο τύπος της ελιάς, η παροχή νερού, η θερμοκρασία, οι καλλιεργητικές μέθοδοι και το γεωγραφικό πλάτος της περιοχής καλλιέργειας. Η παραλαβή ελαιόλαδου πλούσιου σε ξεχωριστό άρωμα και λεπτή γεύση βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην προσεκτική διαδικασία εκχύλισης/εξαγωγής από πλήρως ώριμες, ακέραιες ελιές, με συνέπεια ο βαθμός ωριμότητας να παίζει καθοριστικό ρόλο για την ποιότητα του ελαίου (Preedy and Watson, 2020). Η επιστημονική κοινότητα έχει αντιμετωπίσει προκλήσεις όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση της σχετικής σημασίας διαφόρων παραγόντων για τον καθορισμό της τελικής ποιότητας του ελαιόλαδου. Το επίπεδο ωριμότητας του καρπού εξηγεί το 30% του συνολικού ποιοτικού αποτελέσματος του καρπού (παραγωγή ελαιόλαδου), με την ποικιλία να αντιπροσωπεύει το 20%, τη

συγκομιδή το 5%, τη μεταφορά και την αποθήκευση πριν από την άλεση το 15%, και το σύστημα εξαγωγής το 30%. Το στάδιο κατά το οποίο οι καρποί έχουν φθάσει στο μέγιστο μέγεθός τους, όπου βρίσκονται ακόμη σε άγουρη κατάσταση όντας στη διαδικασία ωρίμανσης, περιγράφεται με τον όρο «πράσινο» και είναι το στάδιο κατά το οποίο οι ανθοκυανίνες αντικαθιστούν τελικά τις χλωροφύλλες στη φλούδα, το οποίο ακολουθείται από τη "στικτή", τη "μοβ" και τη "μαύρη" φάση. Κατά το στάδιο της "veraison" (το στάδιο κατά το οποίο ο καρπός αλλάζει χρώμα), η μετάβαση του χρώματος της φλούδας των ελιών από το πράσινο στο μωβ υποδηλώνει την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών χημικών ουσιών (Εικόνα 2.2) (Lanza, 2011; Zabetakis *et al.*, 2022).



Εικόνα 2.2: Η *Veraison* είναι μία κρίσιμη περίοδος στη διαδικασία ωρίμανσης, κατά την οποία το χρώμα των ελιών αλλάζει από πράσινο σε μαύρο, περνώντας από διάφορες αποχρώσεις του μωβ και του ροζ (*bravoleum*, 2023).

2.1.2 Είδη και χαρακτηρισμός του ελαιόλαδου

Σύμφωνα με τον ισχύοντα Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, «ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαίας της Ευρωπαϊκής (*olea europaea*) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου» (Κ.Τ.Π., 2009). Πέρα όμως από τους διάφορους τύπους ελαιόλαδου που θα αναλυθούν στη συνέχεια, άλλος τύπος ελαίων που προκύπτουν από την επεξεργασία της ελιάς και αξίζει να αναφερθεί είναι τα πυρηνέλαια.

Βάσει του σχετικού κανονισμού της Ευρωπαϊκής Ένωσης, συνολικά, υπάρχουν οκτώ διαφορετικές κατηγορίες ελαιόλαδων και πυρηνέλαιων:

1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο
2. Παρθένο ελαιόλαδο
3. Παρθένο μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε)
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο
5. Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα
6. Πυρηνέλαιο
7. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο

8. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο.

Σημειώνεται ότι δεν είναι όλες οι κατηγορίες διαθέσιμες για λιανική πώληση στους καταναλωτές. Μόνο το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, το παρθένο ελαιόλαδο, το ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένο και παρθένο ελαιόλαδο, καθώς και το πυρηνέλαιο επιτρέπεται να πωλούνται απευθείας (ΕΕ 2022/2104, 2022).

Αναφορικά με τα ελαιόλαδα και πυρηνέλαια που πωλούνται απευθείας, ο κανονισμός ΕΕ 1169/2011 αναφέρει τους παρακάτω ορισμούς:

“α) για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο: «ελαιόλαδο ανωτέρας κατηγορίας που παράγεται απευθείας από ελιές και μόνο με μηχανικές μεθόδους»·

β) για το παρθένο ελαιόλαδο: «ελαιόλαδο που παράγεται απευθείας από ελιές και μόνο με μηχανικές μεθόδους»·

γ) για το ελαιόλαδο - αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδο και παρθένο ελαιόλαδο: «έ-
λαιο που περιέχει αποκλειστικά ελαιόλαδο που έχει υποστεί επεξεργασία εξευγενισμού και έ-
λαιο που έχει παραχθεί απευθείας από ελιές»·

δ) για το πυρηνέλαιο:

i) «έλαιο που περιέχει αποκλειστικά έλαιο που προέρχεται από επεξεργασία του προϊόντος που ελήφθη μετά την εξαγωγή του ελαιόλαδου, και έλαιο που ελήφθη απευθείας από τις ελιές»· ή

ii) «έλαιο που περιέχει αποκλειστικά έλαιο που προέρχεται από επεξεργασία πυρήνων ελιάς και ελαίου που παράγεται απευθείας από ελιές».”

Το πλαίσιο αξιολόγησης της ποιότητας του ελαιόλαδου ορίζεται θεσμικά από τον κανονισμό ΕΕ 2104/2022, ενώ η μέθοδοι αξιολόγησης συμπεριλαμβανομένης και της οργανοληπτικής αξιολόγησης ορίζονται σαφώς από τον κανονισμό ΕΕ 2568/91.

Συγκεκριμένα ο κανονισμός ΕΕ 2568/91 ορίζει: α) τις παραμέτρους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ποιότητας και της καθαρότητας του ελαιόλαδου, υποδεικνύοντας επίσης ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες παράμετροι για το σκοπό αυτό όταν διενεργείται επίσημος έλεγχος, β) τα όρια για κάθε παράμετρο και εμπορική κατηγορία ελαιόλαδου, γ) τις περιγραφές αναλυτικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης και της οργανοληπτικής αξιολόγησης, που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να αξιολογηθεί εάν ένα δείγμα ελαιόλαδου ταιριάζει στα όρια (προδιαγραφές) της εμπορικής κατηγορίας για όλες τις παραμέτρους του κανονισμού (Conte *et al.*, 2020).

Τα ελαιόλαδα διαμορφώνουν την ποιότητά τους μέσω πολλών παραγόντων που επηρεάζουν τον καρπό, ακόμη και κατά την ανάπτυξή του. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν την επαφή με παράσιτα, μικροοργανισμούς, υγρασία, οξυγόνο, έντονο φως και θερμοκρασία. Η ποιότητα καθορίζεται

μέσω μέτρησης συγκεκριμένων φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως η οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίων και η απορρόφηση στο υπεριώδες φως (K270/K232/ΔΚ). Επιπλέον, για το παρθένο ελαιόλαδο, η οργανοληπτική αξιολόγηση συμπεριλαμβάνεται στα κριτήρια ποιότητας (ΕΕ 2568/91, 1991). Παρακάτω αναλύονται οι κυριότερες μετρήσεις που καθορίζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου.

2.1.2.1 Αφιλτράριστο παρθένο ελαιόλαδο πρόσφατης παραγωγής (Veiled virgin olive oil – VVOO)

Μία ιδιαίτερη υποκατηγορία του παρθένου ελαιόλαδου είναι το αφιλτράριστο παρθένο ελαιόλαδο πρόσφατης παραγωγής (Veiled virgin olive oil - VVOO). Η κατηγορία αυτή εμφανίζεται στο ανθρώπινο μάτι ως ένα θολό σύστημα (κολλοειδές σύστημα), λόγω των κυτταρικών θραυσμάτων και των μικρών σταγονιδίων νερού που παραμένουν αιωρούμενα στη συνεχή λιπαρή φάση. Η εκχύλιση/εξαγωγή του VVOO παράγει ένα σύστημα αιωρήματος/διασποράς γαλακτώματος, το οποίο μπορεί να παραμείνει για εβδομάδες ή αρκετούς μήνες πριν η διασκορπισμένη φάση κατακρημνιστεί σχηματίζοντας ένα λασπώδες ίζημα (Cinelli, Cofelice and Venditti, 2020).

Αυτό το είδος ελαιόλαδου εκτιμάται ιδιαιτέρως από την ιατρική κοινότητα και τους καταναλωτές για τα οφέλη στην υγεία και τις αξιόλογες οργανοληπτικές του ιδιότητες. Το VVOO είναι μοναδικό μεταξύ των φυτικών ελαίων που καταναλώνεται χωρίς καμία διαδικασία εξευγενισμού (Cayuela-Sánchez and Caballero-Guerrero, 2019).

Ενώ στο παρελθόν η αγορά ακατέργαστου ελαιόλαδου ήταν περιορισμένη, σήμερα επεκτείνεται καθώς πολλοί καταναλωτές θεωρούν το VVOO ως φυσικό προϊόν με υψηλότερη διατροφική αξία (Valli *et al.*, 2014). Το φρέσκο VVOO περιέχει ένα παράγωγο τυροσόλης (ελαιοκανθάλη), το οποίο έχει παρόμοια χημική δομή και φαρμακολογικές ιδιότητες με την ιβουπροφαίνη, μία μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ένωση (Beauchamp *et al.*, 2005).

Τα VVOO δεν διηθούνται παραδοσιακά ούτε αφήνονται μέχρι να διαυγαστούν σε ανοξείδωτες δεξαμενές, αλλά συσκευάζονται και διατίθενται στο εμπόριο χωρίς διαδικασίες εξαντλητικής διήθησης παρά μόνο μετά από ήπιο διαχωρισμό για την απομάκρυνση των σωματιδίων μεγάλου μεγέθους. Μερικές φορές, σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι δυνατή η ρύθμιση του μεγέθους των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης (Cinelli, Cofelice and Venditti, 2020).

Η κύρια αιτία της θολότητας του VVOO είναι η περιεκτικότητα σε σταγονίδια νερού (Koidis and Boskou, 2006), με τα εν λόγω μικροσταγονίδια να έχουν μέγεθος μεταξύ 1 και 5 μm (Koidis, Triantafyllou and Boskou, 2008). Η περιεκτικότητα σε νερό στο φρέσκο ελαιόλαδο είναι μεταβλητή, με μέση τιμή περίπου 0,5 % κατά βάρος (Di Giovanacchino, 2013).

Αρκετοί ερευνητές, προσπαθώντας να εξηγήσουν τις συνθήκες παρασκευής του VVOO, αναφέρουν ότι διάφορες ενώσεις μπορούν να δράσουν στα VVOO ως φυσικά επιφανειοδραστικά, όπως μονο- και δι-ακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες, στερόλες, πολυφαινόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα (Cinelli, Cofelice and Venditti, 2020). Τα αμφίφιλα αυτά συστατικά μπορούν να προκαλέσουν αυθόρμητο σχηματισμό θερμοδυναμικά σταθερών κολλοειδών δομών, όπως μικύλλια, ανεστραμμένα μικύλλια και λιποσώματα, σταθεροποιώντας μία μικρή περιεκτικότητα κολλοειδών σχηματισμών υδατικής φύσης, με περιεκτικότητα υδατικής φάσης κυμαινόμενη από 0,10 έως 0,25% w/w ή και μεγαλύτερη (Ambrosone, Mosca and Ceglie, 2006; Xenakis, Papadimitriou and Sotiroudis, 2010). Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, σε ορισμένα φρεσκοεκχυλισμένα παρθένα ελαιόλαδα το νερό μπορεί να ξεπεράσει το 1%, φθάνοντας έως και περίπου το 1,5% (Di Giovacchino, 2013).

Συγκεκριμένα, κάποιες πολυφαινόλες έχουν βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικές στη σταθεροποίηση των φυσικών γαλακτωμάτων που σχηματίζονται στο VVOO (Di Mattia et al., 2010; Liu et al., 2016). Έρευνες έχουν δείξει ότι η επίδραση των πολυφαινολών στα γαλακτώματα εξαρτάται από τη συγκεκριμένη πολυφαινόλη, και τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της (Giacintucci et al., 2016), ενώ παρατηρείται ότι προσθήκη πολυφαινολών σε γαλακτώματα ενισχύει τη σταθερότητα καθώς και τις ρεολογικές παραμέτρους αυτών (Zhao et al., 2022).

Τα χαρακτηριστικά αυτών των δομών διαφέρουν ανάλογα με την εφαρμοζόμενη τεχνική, την ποιότητα και ποικιλία του ελαιόκαρπου και τις συνθήκες της έκθλιψης. Σύμφωνα με τους (Sotiroudis et al., 2005), αυτοί οι σχηματισμοί χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη σταθερότητα, ενώ η ύπαρξη των μικρο-συστατικών που τους σταθεροποιούν σε ένα έλαιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε γαλακτώμα, μπορεί να επηρεάσει είτε θετικά είτε αρνητικά, τα τελικά χαρακτηριστικά του γαλακτώματος. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων και τα κινητικά σταθερά γαλακτώματα μπορεί να επιτρέψουν την αύξηση της μεταφοράς μεταξύ των διεπιφανειών υδρόφιλων μορίων, όπως οι φαινόλες, οι οποίες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά (Zamora, Alaiz and Hidalgo, 2001).

Η υδατική φάση που περιέχεται στο VVOO μπορεί να περιέχει ένζυμα και, ιδίως, λιπάση, η οποία μπορεί να υδρολύσει τα τριγλυκερίδια και να απελευθερώσει ελεύθερα λιπαρά οξέα, που αυξάνουν την οξύτητα του VVOO (Di Giovacchino, 2013). Σε επιβαρυμένες ελιές, πριν από την επεξεργασία και κατά τη διάρκεια της εξαγωγής, οι λιπάσες μπορεί να είναι υπεύθυνες για την υψηλή οξύτητα του ελαιόλαδου λόγω υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων. Η υψηλή οξύτητα ασκεί μεγάλη επίδραση στη σταθερότητα του ελαιόλαδου, ενώ επισημαίνεται η προοξειδωτική επίδραση της περιεκτικότητας των ελαιόλαδων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Από την άλλη πλευρά, η υδατική φάση που περιέχεται στο VVOO είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές φαινόλες οι οποίες παρέχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Ambrosone et al., 2002). Έτσι, η παρουσία νερού θα μπορούσε να μειώσει έμμεσα τον ρυθμό οξείδωσης, βελτιώνοντας τη σταθερότητα του

VVOO. Είναι ενδιαφέρον να τονιστεί ότι υπάρχει μεγάλη βιβλιογραφία, συμπεριλαμβανομένων πολλαπλών ανασκοπήσεων, σχετικά με τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά των φαινολικών ουσιών του ελαιόλαδο, τόσο για τη συμβολή τους στη σταθερότητα του προϊόντος, όσο και για τις ιδιότητες που τις καθιστούν ωφέλιμες για την υγεία (Tsimidou *et al.*, 2005). Ως εκ τούτου, τα ελαιόλαδα που κρατούνται αφιltrάριστα έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (Di Gioacchino, 2013). Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του παρθένου ελαιόλαδου είναι οι αγλυκόνες της ελευρωπαϊνης και τα παράγωγά της, μεταξύ των οποίων οι απλές φαινόλες τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη. Οι ενώσεις αυτές είναι έντονα πολικές και υδατοδιαλυτές (Galanakis *et al.*, 2013), οπότε η παρουσία τους στο ελαιόλαδο εξαρτάται από την περιεκτικότητά του σε νερό, η οποία μειώνεται δραστικά με τις επεξεργασίες της διήθησης. Παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι οι πολικές φαινολικές ενώσεις δεν δρουν μόνο ως αντιοξειδωτικά, αλλά και ως αναστολείς των οξειδωτικών ενζύμων μειώνοντας τις δράσεις υποβάθμισης που προκαλούνται από την παρουσία λιπάσης και άλλων οξειδωτικών ενζύμων στην υδατική φάση (Cayuela-Sánchez and Caballero-Guerrero, 2019).

Συμπερασματικά, η συνολική επίδραση της παρουσίας υδατικής φάσης στην ανθεκτικότητα του VVOO στην οξείδωση είναι αμφιλεγόμενη, με διαφορετικές μελέτες να καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα, και πιθανώς εξαρτάται από τα συγκεκριμένα συστήματα που χρησιμοποιούνται για τη διήθηση του ελαιόλαδου (Xenakis, Papadimitriou and Sotiroudis, 2010; Cinelli, Cofelice and Venditti, 2020).

2.1.3 Μέθοδοι προσδιορισμού της οξειδωτικής σταθερότητας του ελαιόλαδου

Παρακάτω αναλύονται οι βασικότερες αναλύσεις που πραγματοποιούνται για τον εργαστηριακό προσδιορισμό την οξειδωτικής κατάστασης του ελαιόλαδου σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό ΕΕ 1348/2013.

2.1.3.1 Οξύτητα

Ως Ελεύθερη Οξύτητα στο ελαιόλαδο ορίζεται ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του ελαιόλαδου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και εκφράζεται σε γραμμάρια ελαϊκού οξέος ανά 100 γραμμάρια ελαιόλαδου. Ένα ειδικό ένζυμο η λιπάση, που βρίσκεται στον καρπό της ελιάς δρα λιπολυτικά ειδικά στις θέσεις 1 και 3 των τριγλυκεριδίων και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (που είναι υπεύθυνα για την οξύτητα στο ελαιόλαδο) και μονο- και δι- γλυκεριδίων.

Η Ελεύθερη Οξύτητα στο ελαιόλαδο προκύπτει από τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του ελαιόλαδου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και εκφράζεται σε γραμμάρια ελαϊκού οξέος ανά 100 γραμμάρια ελαιόλαδου.

Τα υπεροξειδία είναι χημικές ενώσεις που προκύπτουν από την αντίδραση του οξυγόνου με το ελαιόλαδο. Ο αριθμός των υπεροξειδίων πηγάζει από τα υδροϋπεροξειδία, τα οποία είναι αποτελέσματα της πρώτης φάσης οξειδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων. Η οξειδωση μπορεί να είναι είτε ενζυμική είτε χημική. Η ενζυμική οξειδωση προκαλείται από τη δράση των λιποξειδασών, ενζύμων που υπάρχουν στον καρπό της ελιάς. Κατά τη διαδικασία διαχωρισμού του ελαιόλαδου από τα απόνερα στο ελαιοτριβείο, τα υδατοδιαλυτά ένζυμα αφαιρούνται μαζί με τα απόνερα, εξασφαλίζοντας έτσι ότι το ελαιόλαδο δεν επηρεάζεται πλέον από αυτά. Η χημική οξειδωση, από την άλλη, συμβαίνει κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιόλαδου μέσω μηχανισμών που προκαλούν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών.

2.1.3.2 Φασματοφωτομετρική εξέταση στο υπεριώδες

Η φασματοφωτομετρική ανάλυση στο υπεριώδες αναφέρεται στις απορροφήσεις στα μήκη κύματος 232nm και 270nm, συνήθως αναπαριστώμενες με τον όρο K. Ο δείκτης ΔK ορίζεται ως μαθηματική σχέση για τον υπολογισμό των συντελεστών απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η απορρόφηση στα 232nm οφείλεται στα εξής:

- Υδροϋπεροξειδία, τα οποία παράγονται σε πρώιμα στάδια οξειδωσης.
- Συζυγή διένια, τα οποία παράγονται σε ενδιάμεση φάση οξειδωσης. (Η τιμή του συντελεστή απορρόφησης K232 αυξάνει όταν ο ελαιόκαρπος παραμένει αποθηκευμένος για πολλές ημέρες πριν τη συντήρησή του και το ελαιόλαδο εκτίθεται σε ακατάλληλες συνθήκες).

Η απορρόφηση στα 270nm οφείλεται στα εξής:

- Καρβοξυλικές ομάδες (κετόνες και αλδεΐδες), που είναι δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης.
- Συζυγή τριένια, που παράγονται όταν το ελαιόλαδο υφίσταται βιομηχανική επεξεργασία.

Η τιμή του συντελεστή απορρόφησης K270 εξαρτάται από το πόσο φρέσκο είναι το ελαιόλαδο. Παλιά ελαιόλαδα ή μείγματα με παλιά ελαιόλαδα έχουν αυξημένες τιμές του K270. Επιπλέον, η τιμή του K270 είναι πολύ χαμηλή αμέσως μετά την εμφιάλωση και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Η έκθεση του ελαιόλαδου στην ηλιακή ακτινοβολία ή σε υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν τη διαδικασία γήρανσης. Η απορρόφηση στα 270nm και ο δείκτης ΔK, εκτός από κριτήρια ποιότητας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως κριτήρια αυθεντικότητας.

2.1.3.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση παρθένων ελαιόλαδων

Η οργανοληπτική αξιολόγηση είναι ένας σημαντικός τρόπος για την εκτίμηση της ποιότητας των παρθένων ελαιόλαδων. Αποτελεί τη διαδικασία ανίχνευσης και περιγραφής των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών τους μέσω της ανθρώπινης αισθητικής και ταξινομεί τα ελαιόλαδα βάσει των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών.

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιεί μία ομάδα δοκιμαστών (συνήθως 8-12 άτομα) οι οποίοι έχουν εκπαιδευτεί και ελέγχονται, και εφαρμόζεται μόνο για την ταξινόμηση των παρθένων ελαιόλαδων. Κατά τη διαδικασία αυτή, λαμβάνεται υπόψη η ένταση των ελαττωμάτων και η παρουσία ή η απουσία του φρουτώδους στο ελαιόλαδο.

Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη λιπαρή αίσθηση στην αφή και στο στόμα. Η διάσπαση των τριγλυκεριδίων παράγει ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την οξύτητα του ελαιόλαδου.

Ωστόσο, το πιο σημαντικό κλάσμα που επηρεάζει τη γευστική και οσφρητική ποιότητα του ελαιόλαδου είναι το ασαπωνοποίητο κλάσμα. Από τις ουσίες που το απαρτίζουν, οι υδρογονάνθρακες, οι φαινόλες και οι τοκοφερόλες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά του ελαιόλαδου και επηρεάζουν τη γεύση του. Το χρώμα του ελαιόλαδου καθορίζεται από τις περιεχόμενες χρωστικές ουσίες, όπως τα καροτένια και οι χλωροφύλλες.

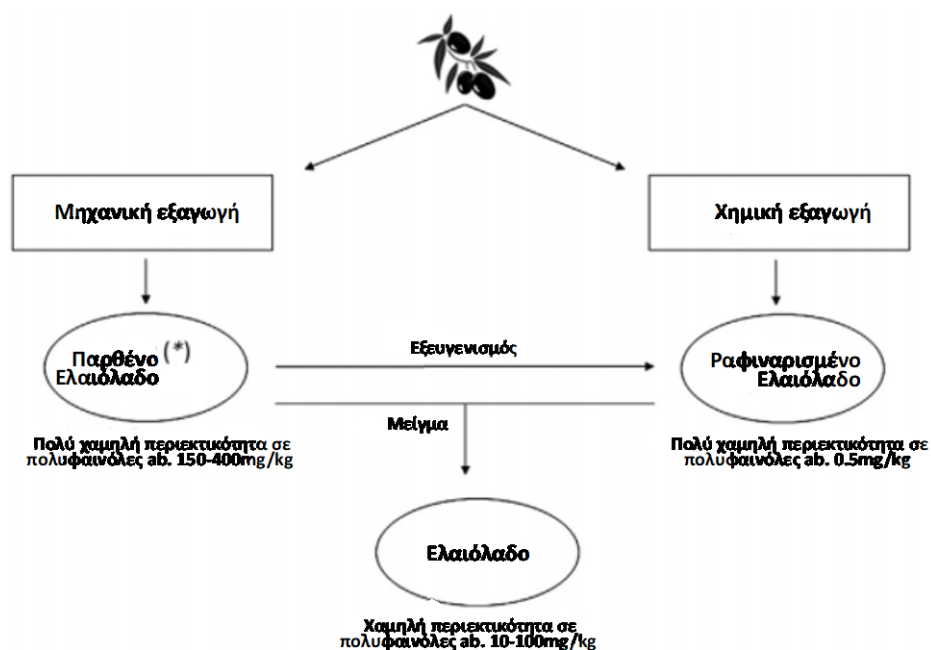
Συνολικά, η οργανοληπτική αξιολόγηση αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά των παρθένων ελαιόλαδων, βασιζόμενη στην αντίληψη των ανθρώπινων αισθήσεων (ΟΟС, 2015).

Πίνακας 2.1: Ποιοτικές παράμετροι του ελαιόλαδου ανάλογα με την κατηγορία του (τροποποιημένο από ΕΕ 1348/2013)

Κατηγορία	Οξύτητα	Αριθμός Υπεροξειδίων (meqO ₂ kg ⁻¹)	K232	K270	ΔΚ	Οργανοληπτική αξιολόγηση μειωνεκτημάτων ν	Οργανοληπτική ή αξιολόγηση φρουτώδους
ΕVOO	≤0,8	≤20	≤2,50	≤0,22	≤0,01	Md = 0	Mf>0
VO	≤2,0	≤20	≤2,60	≤0,25	≤0,01	Md≤3,5	Mf>0
Λαμπάντε	>2,0	-	-	-	-	Md>3,5	-
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤0,2	≤5	-	≤1,10	≤0,16	-	-
Ελαιόλαδο	≤1,0	≤15	-	≤0,90	≤0,15	-	-
Ακατέργαστο Πυρηνέλαιο	-	-	-	-	-	-	-
Επεξεργασμένο πυρηνέλαιο	≤0,3	≤5	-	≤2,00	≤0,20	-	-

Το καλύτερης ποιότητας ελαιόλαδο, γνωστό ως εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, παράγεται συνήθως από την ψυχρή έκθλιψη των ελιών, χωρίς τη χρήση θερμότητας ή πρόσθετων ουσιών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα έλαιο με το χαμηλότερο επίπεδο οξύτητας (κάτω από 0,8% το οποίο αποτελεί και ανώτερη τιμή οξύτητας για την κατηγορία αυτή) και το υψηλότερο επίπεδο αντιοξειδωτικών και άλλων ευεργετικών ενώσεων. Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο διακρίνεται από το φρουτώδες άρωμά του και την ελαφρώς πικρή γεύση του, μερικές φορές έντονη ώστε να περιγράφεται ως "πιπεράτη". Το χρώμα του μπορεί να κυμαίνεται από ανοιχτό πράσινο έως βαθύ χρυσό.

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών σχετικά με τα πιθανά οφέλη του για την υγεία. Σε μία συστηματική ανάλυση του 2014, οι Schwingshackl και Hoffmann διαπίστωσαν ότι οι άνθρωποι που καταναλώνουν περισσότερο ελαιόλαδο είχαν χαμηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων, όπως καρδιακές προσβολές (Schwingshackl & Hoffmann, 2014). Η υψηλή συγκέντρωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFAs) στο ελαιόλαδο έχει συσχετιστεί με μειωμένη αρτηριακή πίεση και βελτιωμένο προφίλ λιπιδίων στο αίμα, ενώ πολλά από τα οφέλη για την υγεία σχετίζονται άμεσα με τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), όπως το λινελαϊκό οξύ, υπάρχουν επίσης στο ελαιόλαδο, αλλά σε μικρότερες ποσότητες, ενώ τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFAs), όπως το παλμιτικό οξύ, ως λιγότερο άφθονα στο ελαιόλαδο, το καθιστούν μία πιο υγιεινή εναλλακτική λύση σε σχέση με άλλα έλαια που περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες αυτών (Preedy, 2020).



Εικόνα 2.3: Η διαδικασία εξαγωγής επηρεάζει την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και, κατά συνέπεια, την αντιοξειδωτική του δράση. Το ελαιόλαδο είναι ένα μείγμα εξευγενισμένου και παρθένου ελαιόλαδου (Preedy, 2020).

Το παρθένο ελαιόλαδο είναι παρόμοιο με το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο και παράγεται με παρόμοιο τρόπο, αλλά με ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα οξύτητας (συνήθως κάτω από 2%). Το παρθένο ελαιόλαδο έχει ελαφρύτερη γεύση και άρωμα σε σύγκριση με το εξαιρετικό παρθένο, με χρώματα που κυμαίνονται από χρυσοκίτρινο έως ανοιχτό πράσινο (Preedy, 2020).

Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο παράγεται με εξευγενισμό του παρθένου ελαιόλαδου με τη χρήση θερμότητας και χημικών ουσιών. Η διαδικασία αφαιρεί πολλές από τις ευεργετικές ενώσεις που βρίσκονται στο μη εξευγενισμένο ελαιόλαδο, με αποτέλεσμα να έχει λιγότερο έντονη γεύση και χρώμα. Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο συνήθως αναμειγνύεται με παρθένο ή εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο για την παραγωγή ελαίων χαμηλότερης ποιότητας.

Η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε φαινολικές ενώσεις είναι μία άλλη σημαντική παράμετρος του χαρακτηρισμού της ποιότητας του ελαιόλαδου, αφού οι φαινολικές ενώσεις ως φυτικές ενώσεις διαθέτουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Πρόκειται για ενώσεις που μειώνουν τις φλεγμονές, βελτιώνουν την καρδιακή λειτουργία και συντελούν στη μείωση του κινδύνου από χρόνιες παθήσεις. Η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε φαινολικές ουσίες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι ο τύπος και η ποιότητα του ελαιόλαδου, η γεωγραφική θέση και οι πρακτικές καλλιέργειας των ελιών, αλλά και οι συνθήκες αποθήκευσης μετά την παραγωγή του.

Η περιεκτικότητα σε φαινόλες του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου κυμαίνεται συνήθως από 40 έως 800 mg/kg. Έχουν καταγραφεί πολύ υψηλότερες περιεκτικότητες σε ορισμένες περιπτώσεις. Οι

ερευνητές σημείωσαν ότι άλλοι παράγοντες, όπως οι πρακτικές συγκομιδής και οι μέθοδοι εκχύλισης, επηρεάζουν την συγκέντρωση του ελαιόλαδου σε φαινόλες (Cicerale *et al.*, 2008).

Συμπερασματικά, το ελαιόλαδο είναι ένα υγιεινό και λειτουργικό προϊόν διατροφής με πολλαπλές ταξινομήσεις με βάση τον τύπο, το προφίλ λιπαρών οξέων και την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Η κατανόηση των διαφορών μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή και τη χρήση του ελαιόλαδου για βέλτιστα οφέλη για την υγεία. Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο είναι το πιο ποιοτικό και γνωστό για τα οφέλη του στην υγεία. Έχει το χαμηλότερο επίπεδο οξύτητας, υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και είναι πλούσιο σε MUFAs. Το παρθένο ελαιόλαδο έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με το εξαιρετικά παρθένο, αλλά έχει ελαφρύτερη γεύση και άρωμα. Το ραφινρισμένο ελαιόλαδο είναι το ελαιόλαδο χαμηλότερης ποιότητας και συχνά αναμειγνύεται με άλλα έλαια για την παραγωγή ελαίων χαμηλότερης ποιότητας. Τέλος, το προφίλ των λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανομένων των MUFAs, PUFAς και SFAς, και η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις παίζει σημαντικό ρόλο στα οφέλη του ελαιόλαδου για την υγεία (Cicerale *et al.*, 2008).

2.1.4 Παρθένο ελαιόλαδο ως λειτουργικό τρόφιμο

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα σημαντικότερα λειτουργικά τρόφιμα λόγω της βιολειτουργικής χημικής του σύνθεσης και της θρεπτικής του αξίας. Περιέχει υψηλά επίπεδα ελαϊκού οξέος και πολλές βιοδραστικές χημικές ουσίες και μέταλλα. Η ευνοϊκή αντίδραση στις φλεγμονώδεις διεργασίες και ο μειωμένος κίνδυνος καρδιαγγειακών παθήσεων έχουν συνδεθεί με τη χρήση ελαιόλαδου. Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, η υψηλότερη κατηγορία σχετικά με την ποιότητα, διατηρεί τα φυσικά βιοδραστικά συστατικά του και αποτελεί σημαντικό συστατικό σε μία ισορροπημένη διατροφή με πολλά οφέλη για την υγεία. Έχει αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινικά και καρδιαγγειακά προστατευτικά αποτελέσματα. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο ελαιόλαδο συμβάλλουν στη σταθερότητά του, στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στην εξάλειψη των ελεύθερων ριζών. Το παρθένο ελαιόλαδο μπορεί να εμπλουτιστεί με βιοδραστικές πολυφαινόλες για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη πρόσληψη αυτών των ενώσεων και να παρέχει πρόσθετα οφέλη για την υγεία (Alves, Domingues and Domingues, 2023).

Άτομα με την υψηλότερη κατανάλωση ελαιόλαδου παρουσίασαν 26% μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων σε σύγκριση με εκείνα με τη χαμηλότερη κατανάλωση. Αυτά τα τεκμηριωμένα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το παρθένο ελαιόλαδο έχει τη δυνατότητα να συμβάλει στη διατήρηση ενός καλά λειτουργικού καρδιαγγειακού συστήματος (Watson and Preedy, 2012; Preedy and Watson, 2020).

Μία βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε από τους Grosso *et al.* (2018) το 2018 εξέτασε τη χρήση του ελαιόλαδου στην πρόληψη του καρκίνου, με τους ερευνητές να καταλήγουν στο

συμπέρασμα ότι η κατανάλωση ελαιόλαδου βοηθά στη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης και ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, αλλά και του παχέος εντέρου ή και άλλων μορφών καρκίνου. Οι ερευνητές παρουσίασαν ως ιδιαίτέρως κρίσιμη την περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε πολυφαινόλες, αφού αυτές οι ενώσεις εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Grosso et al., 2018).

Πέρα από την πιθανότητα μείωσης του κινδύνου που εμφανίζουν οι χρόνιες ασθένειες πολλές μελέτες αναφέρονται και στην ενίσχυση της ανθρώπινης γνωστικής λειτουργίας. Σε μία συστηματική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε από τους Lombardo et al. (2018) το 2018, διαπιστώθηκε ότι η κατανάλωση ελαιόλαδου συσχετίστηκε με βελτιωμένη γνωστική λειτουργία, ενίσχυση της μνήμης, αλλά και βελτίωση των εκτελεστικών εντολών. Οι συγγραφείς ισχυρίστηκαν ότι αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη συγκέντρωση ελαϊκού οξέος στο ελαιόλαδο, η οποία έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα νευροτροφικού παράγοντα που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF) σε ζώα όντα (Lombardo et al., 2018).

2.1.5 Σύσταση ελαιόλαδου

Η σύσταση σε ενώσεις του ελαιόλαδου είναι εξαιρετικά περίπλοκη και υπόκειται σε διακυμάνσεις που βασίζονται σε πολλούς παράγοντες, όπως η συγκεκριμένη ποικιλία από την οποία προέρχεται, οι επικρατούσες κλιματολογικές και γεωγραφικές συνθήκες, αλλά και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά τη συγκομιδή και την επεξεργασία. Ωστόσο, παρά την προαναφερθείσα μεταβλητότητα, η σύσταση του ελαιόλαδου μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ευρέως σε τρία κύρια συστατικά που είναι τα λιπαρά οξέα, οι δευτερεύουσες ενώσεις και οι πτητικές ουσίες (Silva and Schmiele, 2021).

Τα λιπαρά οξέα χρησιμεύουν ως τα κύρια δομικά στοιχεία του ελαιόλαδου, αντιπροσωπεύοντας ένα σημαντικό μέρος της συνολικής μάζας του που φτάνει και το 98%. Μεταξύ αυτών των λιπαρών οξέων, το ελαϊκό οξύ (C 18:1, ω9) είναι το πιο άφθονο, αποτελώντας περίπου το 55-83% του συνολικού βάρους, ενώ η σημαντική του παρουσία στο ελαιόλαδο συμβάλλει στις ξεχωριστές ιδιότητές του, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλής οξύτητας και της ευνοϊκής οξειδωτικής σταθερότητας. Επιπλέον, το ελαιόλαδο περιλαμβάνει λινελαϊκό οξύ (C 18:2 ω6), ένα απαραίτητο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, το οποίο αντιπροσωπεύει το 3-21% της σύνθεσής του, ενώ το δεύτερο σε σημαντικότητα λιπαρό οξύ φαίνεται να είναι το παλμιτικό οξύ με συγκέντρωση περίπου στο 7-20%. Επιπλέον, περιέχει σημαντικά επίπεδα άλλων απαραίτητων λιπαρών οξέων όπως είναι το γ-λινολενικό οξύ (C 18:3 ω6) και το α-λινολενικό οξύ (C 18:3 ω3) (Reboredo-Rodríguez et al., 2014; Kalogianni, Georgiou and Hasanov, 2019; Li et al., 2020).

Τα δευτερεύοντα συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο περιλαμβάνουν το σκουαλένιο, που αποτελεί περίπου το 0,1-0,7% του συνόλου του ελαίου, καθώς και τις τοκοφερόλες, γνωστές και ως

βιταμίνη E, οι οποίες συμβάλλουν στις πλεονεκτικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ελαίου. Το σκουαλένιο που χαρακτηρίζεται ως μία λιποδιαλυτή ένωση με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, υπάρχει τόσο στο ζωικό όσο και στο ανθρώπινο δέρμα και στο ήπαρ και χρησιμοποιείται εκτενώς στους τομείς των τροφίμων και της ιατρικής. Επιπλέον, τα ελαιόλαδα περιέχουν στερόλες, συμπεριλαμβανομένης της καμπεστερόλης, της στιγμαστερόλης και της σιτοστερόλης (Silva and Schmiele, 2021).

Οι πτητικές ουσίες, ιδίως όσες είναι υπεύθυνες για το αρωματικό αποτέλεσμα του ελαίου, διαφέρουν ανάλογα με τον βαθμό ωριμότητας του καρπού της ελιάς, τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές επεξεργασίας και τις συνθήκες αποθήκευσης του ελαίου. Στη γενική ομάδα των πτητικών ουσιών, συναντώνται οι υδρογονάνθρακες, οι αλδεΐδες και οι πυραζίνες, ενώσεις στις οποίες αποδίδεται το ξηρό και φρουτώδες άρωμα του ελαίου (Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2014).

Τα συστατικά του ελαιόλαδου ποικίλλουν ανάλογα με ορισμένους παράγοντες όπως το είδος της ελιάς που καλλιεργείται, το επικρατούμενο κλίμα και τη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή στην οποία καλλιεργούνται οι ελιές. Μεταξύ των πιο ευρέως καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαίου είναι οι ποικιλίες Arbequina, Arbosana και Korwnéϊκη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το κλίμα και η γεωγραφική θέση της καλλιέργειας ασκούν επίσης επιρροή στη σύνθεση του ελαίου, αφού ελιές που καλλιεργούνται σε θερμότερα κλίματα παρουσιάζουν γενικά υψηλότερα επίπεδα ελαϊκού οξέος σε σύγκριση με εκείνες που καλλιεργούνται σε ψυχρότερες περιοχές (Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2014; Kalogianni, Georgiou and Hasanov, 2019).

Το ελαιόλαδο, ως διατροφικό συστατικό, διαθέτει μία σύνθεση που κυμαίνεται ανάλογα με πολλά στοιχεία, που περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα, δευτερεύοντα συστατικά και πτητικές ενώσεις. Λόγω των ποικίλων πλεονεκτημάτων του όσον αφορά την υγεία, όπως οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, συνιστάται ιδιαίτερα η ενσωμάτωση του ελαιόλαδου σε μία διατροφικά ισορροπημένη αγωγή. Η σύσταση του ελαίου αποκλίνει ανάλογα με την παραλλαγή της ποικιλίας, τη γεωγραφική τοποθεσία, το κλίμα, καθώς και τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια και την επεξεργασία (Galanakis, 2019). Παρακάτω αναφέρονται κάποια από τα κύρια λειτουργικά συστατικά του ελαιόλαδου.

2.1.5.1 Τοκοφερόλες

Τα επίπεδα τοκοφερόλης ή αλλιώς βιταμίνης E, στο παρθένο ελαιόλαδο ποικίλλουν ανάλογα με την ποικιλία και τους τεχνολογικούς παράγοντες, όπως οι μέθοδοι εξαγωγής και εκχύλισης. Τα επίπεδα κυμαίνονται από περίπου 55 έως 370 mg α-τοκοφερόλης ανά kg ελαίου, ανάλογα με την πηγή προέλευσης του ελαίου και τις ερευνητικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί. Τα ελληνικά έλαια φέρονται να

έχουν μερικά από τα υψηλότερα επίπεδα α-τοκοφερόλης. Αυτή η διακύμανση των επιπέδων θα μπορούσε να οφείλεται σε πολλά πράγματα, όπως οι διαφορές στο έδαφος, το κλίμα και τις μεθόδους εκχύλισης που χρησιμοποιούν οι παραγωγοί ελαιόλαδου. Το παρθένο ελαιόλαδο από διάφορες πηγές περιέχει πλέον περισσότερες τοκοφερόλες από ότι στο παρελθόν, χάρη στις βελτιωμένες μεθόδους παραγωγής και στις υποστηριζόμενες από την ΕΕ διαδικασίες παρακολούθησης της ποιότητας όλων των βρώσιμων ελαιόλαδων, ενώ με την πάροδο των ετών, το όριό τους στο ελαιόλαδο μειώθηκε, για να είναι σήμερα κατά μέσο όρο στα 100 mg/kg (Belitz et al., 2009).

Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση του συστήματος εκχύλισης στη συγκέντρωση της τοκοφερόλης ποικίλλουν. Ενώ ορισμένες ερευνητικές μελέτες δείχνουν ότι παράγοντες όπως η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης και οι μέθοδοι αποθήκευσης επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα των τοκοφερολών, άλλες έδειξαν μικρή έως καθόλου επίδραση. Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να δοθεί μία συνολική δήλωση σχετικά με την επίδραση των συστημάτων εκχύλισης χωρίς περαιτέρω έρευνα (Galanakis, 2019).

Ο εξευγενισμός ή η υδρογόνωση προκαλεί την απώλεια των τοκοφερολών και πολλών άλλων ουσιών στο ελαιόλαδο. Αυτό είναι ένα σημαντικό ζήτημα για τους παραγωγούς ελαιόλαδου, διότι οι διαδικασίες εξευγενισμού επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη θρεπτική αξία του ελαιόλαδου. Για παράδειγμα, η διαδικασία εξευγενισμού μειώνει σημαντικά τα επίπεδα άλλων ευεργετικών ουσιών που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, όπως οι φαινολικές ενώσεις. Από την άλλη πλευρά, η υδρογόνωση συμβάλλει στο σχηματισμό trans-λιπαρών οξέων, τα οποία έχουν συνδεθεί με πολλές χρόνιες ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου 2, η παχυσαρκία και οι καρδιακές παθήσεις (Boskou and Society., 2006).

Συμπερασματικά, οι τοκοφερόλες είναι ένα βασικό συστατικό του παρθένου ελαιόλαδου με αντιοξειδωτικές ιδιότητες in vivo που μπορούν να προστατεύσουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες. Η έρευνα δείχνει ότι η α-τοκοφερόλη περιλαμβάνει το σημαντικότερο ποσοστό των τοκοφερολών στο παρθένο ελαιόλαδο και ποικίλλει ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως το δυναμικό της ποικιλίας, την τεχνολογία εκχύλισης και την προέλευση. Η καθιέρωση ορθών παρασκευαστικών πρακτικών και συνολικών προγραμμάτων ποιοτικού ελέγχου είχε θετικό αντίκτυπο στα επίπεδα τοκοφερόλης σε παρθένα ελαιόλαδα διαφορετικής προέλευσης. Ο εξευγενισμός ή η υδρογόνωση προκαλούν απώλεια των τοκοφερολών- ως εκ τούτου, οι παραγωγοί ελαιόλαδου πρέπει να εξετάζουν προσεκτικά τις εν λόγω διεργασίες, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά τη διατροφική αξία του ελαιόλαδου. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να προσδιοριστεί πόσοι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του συστήματος εκχύλισης, θα μπορούσαν να συμβάλουν στα διαφορετικά επίπεδα τοκοφερολών στο παρθένο ελαιόλαδο και σε άλλες ευεργετικές ουσίες (Koidis and Boskou, 2015a).

2.1.5.2 Χρωστικές

Το χρώμα του παρθένου ελαιόλαδου εξαρτάται από την παρουσία χλωροφυλλών και καροτενοειδών, που δίνουν πράσινες και κίτρινες αποχρώσεις. Το χρώμα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με παράγοντες όπως η ποικιλία ελιάς, η ζώνη παραγωγής, ο δείκτης ωρίμανσης, το σύστημα εκχύλισης και οι συνθήκες αποθήκευσης. Αυτή η διακύμανση καθιστά το χρώμα του ελαιόλαδου χρήσιμο δείκτη ποιότητας, παρόλο που δεν υπάρχουν τυποποιημένες μέθοδοι για τη μέτρησή του (Gandul-Rojas, Roca and Gallardo-Guerrero, 2016).

Η χλωροφύλλη-α είναι η κυρίαρχη μορφή χλωροφυλλών που απαντάται στο ελαιόλαδο. Η χλωροφύλλη-α και η μετατροπή της σε φαιοφυτίνη α (Pheo α) σχετίζεται με τις συνθήκες επεξεργασίας και την ενζυμική αποικοδόμηση, καθιστώντας την πιθανή μεταβολή της κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και του χειρισμού. Έχει αναφερθεί η παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης της φαιοφυτίνης α στο ελαιόλαδο, όπως επιμερή, πυρομορφές και αλλομερή. Αυτά τα προϊόντα αποικοδόμησης βρέθηκαν σε δείγματα ισπανικού παρθένου ελαιόλαδου μετά από ήπιες συνθήκες αποθήκευσης για ένα έτος, γεγονός που καθιστά πιθανό ότι δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Τα προϊόντα αποικοδόμησης που εντοπίστηκαν περιελάμβαναν την πυροφαιτίνη α, την 151-OH-λακτόνη φαιοφυτίνη α και την 132-OH-φαιοφυτίνη α. Τα επίπεδα της φαιοφυτίνης α εξαρτώνται από τη μεθοδολογία ανάλυσης που χρησιμοποιείται, με τις φασματομετρικές μεθόδους να οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα από εκείνα που προσδιορίζονται με NP- ή RP-HPLC. Η χλωροφύλλη α είναι παρούσα μόνο σε πρόσφατα ληφθέντα έλαια, ενώ η χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη β είναι παρούσες σε ίχνη (Borello & Domenici, 2019).

Η λουτεΐνη και το β-καροτένιο είναι τα κύρια καροτενοειδή που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, με τα επίπεδα να ποικίλλουν ανάλογα με τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται, όπως η φαιοφυτίνη α. Η παρουσία των καροτενοειδών συνδέεται στενά με εκείνη των πράσινων χρωστικών ουσιών και οι ίδιοι παράγοντες που επηρεάζουν τις πράσινες χρωστικές ουσίες (όπως η ποικιλία ελιάς, η ζώνη παραγωγής, ο δείκτης ωρίμανσης, οι συνθήκες εκχύλισης και αποθήκευσης) επηρεάζουν τα επίπεδα των καροτενοειδών. Τα κλάσματα των καροτενοειδών περιλαμβάνουν επίσης διάφορες ξανθοφύλλες, όπως η βιολαξανθίνη, η νεοξανθίνη, η λουτεοξανθίνη, η ανθεραξανθίνη, η μετατοξανθίνη και η β-κρυπτοξανθίνη. Η αναλογία μεταξύ των δύο κύριων καροτενοειδών, της λουτεΐνης και του β-καροτενίου, φαίνεται να εξαρτάται από την ποικιλία. Έρευνες έχουν διαπιστώσει ότι τα επίπεδα των καροτενοειδών στο ελαιόλαδο μπορούν να επηρεαστούν από παράγοντες όπως η ποικιλία ελιάς, η ζώνη παραγωγής, ο δείκτης ωρίμανσης, το σύστημα εκχύλισης και οι συνθήκες αποθήκευσης (Martakos et al., 2019).

Υπό την έκθεση στο φως, οι πράσινες χρωστικές ουσίες στο ελαιόλαδο μπορούν να αποικοδομηθούν, οδηγώντας σε αποχρωματισμό του ελαιόλαδου. Η υποβάθμιση αυτών των χρωστικών ουσιών οφείλεται πιθανώς στην αυξημένη οξειδωση που συμβαίνει όταν το υπεριώδες φως εισέρχεται στο έλαιο, οδηγώντας στη διάσπαση των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών. Αυτή η διάσπαση μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση της φαιοφυτίνης α σε προϊόντα αποικοδόμησής της, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν περαιτέρω το χρώμα και τη γεύση του ελαίου (Preedy and Watson, 2020).

Συνολικά, το χρώμα του παρθένου ελαιόλαδου καθορίζεται από την παρουσία χλωροφυλλών και καροτενοειδών, τα οποία εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία ελιάς, η ζώνη παραγωγής, ο δείκτης ωρίμανσης, το σύστημα εκχύλισης και οι συνθήκες αποθήκευσης. Ως εκ τούτου, το χρώμα αποτελεί πολύτιμο δείκτη ποιότητας, παρόλο που η μέτρησή του στερείται τυποποίησης. Τα επίπεδα της φαιοφυτίνης α και των καροτενοειδών επηρεάζονται από τους ίδιους παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα των πράσινων χρωστικών και οι αναλογίες των διαφόρων καροτενοειδών που βρίσκονται στο ελαιόλαδο εξαρτώνται από την ποικιλία. Τα προϊόντα αποικοδόμησης της φαιοφυτίνης α μπορούν να παραχθούν κατά την αποθήκευση και το χειρισμό, ιδίως υπό την έκθεση στο φως. Από κοινού, οι παράγοντες αυτοί υπογραμμίζουν τη σημασία της εξέτασης των επιπτώσεων της παραγωγής και της αποθήκευσης στην ποιότητα του παρθένου ελαιόλαδου (Martakos et al., 2019).

2.1.5.3 Στερόλες

Οι στερόλες είναι λιπίδια που αποτελούν σημαντικούς δείκτες της ποιότητας του ελαιόλαδου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαλήθευση της γνησιότητας του ελαιόλαδου. Το ελαιόλαδο έχει τέσσερις κατηγορίες στερολών, οι οποίες περιλαμβάνουν τις κοινές στερόλες, τις 4α-μεθυλεστερόλες, τις τριτερπενικές αλκοόλες και τις τριτερπενικές διαλκοόλες. Τα κύρια συστατικά της κατηγορίας κοινών στερολών στο ελαιόλαδο είναι η β-σιτοστερόλη, η Δ5-αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη. Άλλες στερόλες που υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες είναι η στιγμαστερόλη, η χοληστερόλη, η βρασικαστερόλη, η χολεροστερόλη, η εργοστερόλη, η σιτοστανόλη, η καμπεστανόλη, η Δ7-αβεναστερόλη, η Δ7-χοληστενόλη, Δ7-καμπεστενόλη, Δ7-στιγμαστενόλη, Δ5,23-στιγμασταδιενόλη, Δ5,24-στιγμασταδιενόλη, Δ7,22-εργοσταδιενόλη, Δ7,24-εργοσταδιενόλη, 24-μεθυλενοχοληστερόλη και 22,23-διυδροβρασικοστενόλη (Lukić, Lukić and Moslavac, 2021).

Η περιεκτικότητα του παρθένου ελαιόλαδου σε ολικές στερόλες κυμαίνεται κυρίως μεταξύ 1000 mg/kg (το κατώτερο όριο που έχει καθοριστεί από την Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης) και 2000 mg/kg. Τα ελαιόλαδα λαμπάντε περιέχουν υψηλότερες ποσότητες ολικών στερολών από τα παρθένα

ελαιόλαδα, ενώ τα εξευγενισμένα ελαιόλαδα περιέχουν ολικές στερόλες σε χαμηλότερα επίπεδα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διαδικασία εξευγενισμού έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές απώλειες στερολών, οι οποίες μπορεί να φτάσουν και το 25%. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε ολικές στερόλες των εκχυλισμένων με διαλύτη ελαιόλαδων είναι έως και τρεις φορές υψηλότερη από εκείνη των παρθένων ελαιόλαδων.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η β-σιτοστερόλη αποτελεί το 75 έως 90% του συνολικού κλάσματος στερολών του ελαιόλαδου, ενώ η Δ5-αβεναστερόλη κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 5% και 20%. Τα ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα έχουν ποσοστά Δ5-αβεναστερόλης που έχουν αναφερθεί ότι φτάνουν μέχρι και 36%. Η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε στερόλες μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία των ελιών, τον δείκτη ωρίμανσης, την ζώνη παραγωγής και το σύστημα εκχύλισης (Lukic et al., 2015; Lukic, Lukic and Moslavac, 2021).

2.2 Φαινολικές ενώσεις ελαιόλαδου και ενσωμάτωση σε γαλακτώματα

2.2.1 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μία κατηγορία φυσικών ουσιών που χαρακτηρίζονται από τις φαινολικές δομικές τους ομάδες, οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο για τους ερευνητές όσο και για τη βιομηχανία τροφίμων, ενώ εντοπίζονται σε πλήθος περιπτώσεων όπως το τσάι, τα φρούτα, τα λαχανικά και το κόκκινο κρασί, μεταξύ άλλων, και διερευνώνται για τα πιθανά φυσιολογικά τους πλεονεκτήματα. Ο ορισμός των πολυφαινολών έχει αποτελέσει αντικείμενο συνεχούς επιστημονικής συζήτησης, με αποτέλεσμα τη σταδιακή βελτίωσή του με την πάροδο των ετών (Tsao, 2010).

Η προέλευση της χρήσης των πολυφαινολών μπορεί να εντοπιστεί στα πρώτα στάδια της βιομηχανίας δέρματος, κατά τα οποία φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνταν για τη μετατροπή των δερμάτων των ζώων, ενώ οι φυτικές προέλευσης ενώσεις, γνωστές ως "φυτικές τανίνες" αποτέλεσαν το αντικείμενο της έρευνας για τις πολυφαινόλες, η οποία προήλθε από τις προσπάθειες διερεύνησης της χημικής σύνθεσης αυτών των φυτικών εκχυλισμάτων. Η προσπάθεια για τον εντοπισμό και την περιγραφή των φαινολικών συστατικών στα φυτικά εκχυλίσματα φαίνεται ότι ξεκίνησαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, εξετάζοντας φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία δέρματος (Quideau et al., 2011).

Το 1957 ο Theodore White με τους Cheynier et al. (2015) διατύπωσαν επακριβώς τον όρο "τανίνη", αναφέροντας ότι αφορά αποκλειστικά τις πολυφαινολικές ουσίες που προέρχονται από φυτά. Οι ουσίες αυτές, σύμφωνα με τη μελέτη, έχουν μοριακές μάζες που κυμαίνονται από 500 έως 3000Da, και έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με μόρια κολλαγόνου διαθέτοντας ταυτόχρονα επαρκή ποσότητα φαινολικών ομάδων (Cheynier et al., 2015).

Ο καθοριστικός παράγοντας στον οποίο βασίστηκαν οι αρχικοί χαρακτηρισμοί των πολυφαινολών ήταν η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλα βιομόρια, όμως χωρίς μεγάλη ακρίβεια αφού απλά κατηγοριοποιούσαν τις πολυφαινολικές ενώσεις σε τρεις κατηγορίες με βάση τη σύνθεσή τους σε πολυυδροξυφαινυλικά τμήματα. Σύμφωνα με τους Quideau et al. (2011) ο χαρακτηρισμός "πολυφαινόλες" πρέπει να υποδηλώνει τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που προερχόμενους αποκλειστικά από τη φαινυλοπροπανοειδή και/ή πολυκετιδική οδό (οδοί) που παράγεται (παράγονται) από τη σικιμάτη και διαθέτουν πολλούς φαινολικούς δακτυλίους. Επιπλέον, είναι απαραίτητο οι πολυφαινόλες να παρουσιάζουν πλήρη απουσία λειτουργικών ομάδων που περιέχουν άζωτο στη βασική δομική τους διαμόρφωση (Quideau et al., 2011).

Από χημική άποψη, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο όρος "φαινόλες" περιλαμβάνει τον δακτύλιο αρενίου μαζί με τον ή τους υδροξυ υποκαταστάτες του, δημιουργώντας έτσι δυνητικά διαφορούμενες χημικές δομές που σχετίζονται με τον όρο "πολυφαινόλες". Σύμφωνα με τους Quideau et al. (2011), ο όρος "πολυφαινόλη" πρέπει να περιορίζεται σε ενώσεις που διαθέτουν τουλάχιστον δύο φαινολικά τμήματα, ανεξάρτητα από τον αριθμό των υδροξυομάδων που υπάρχουν σε κάθε τμήμα.

Η συμβατική προσέγγιση για τον ορισμό των φυτικών πολυφαινολών βασίστηκε στα δομικά χαρακτηριστικά τους και στην ικανότητά τους να προκαλούν κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική αναθεώρηση του θέματος, με ιδιαίτερη έμφαση στην ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών και στην κατανόηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών. Οι Haslam και Cai (1994) πρότειναν ότι οι φυτικές φαινόλες που είναι διαλυτές στο νερό και έχουν μοριακό βάρος μεταξύ 500 και 3000-4000Da, θα πρέπει να ταξινομούνται ως "πολυφαινόλες" εάν διαθέτουν 12 έως 16 φαινολικές υδροξυομάδες σε 5 έως 7 αρωματικούς δακτυλίους ανά 1000Da σχετικής μοριακής μάζας (Haslam & Cai, 1994).

Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι υπάρχουν διακριτές υποομάδες πολυφαινολών, όπως τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια και οι λιγνάνες, με την ονομασία "φλαβονοειδή" να χρησιμοποιείται για να περιγράψει ομάδα πολυφαινολών με δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα. Οι ενώσεις αυτές διακρίνονται από την παρουσία μίας υδροξυομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C, καθώς και στις θέσεις 5 ή/και 7 του δακτυλίου A. Αντίθετα, η ονομασία "φαινολικά οξέα" φαίνεται να αφορά ένα συγκεκριμένο υποσύνολο πολυφαινολών που

διακρίνονται από την παρουσία μίας καρβοξυλομάδας και ενός αρωματικού δακτυλίου. Η ταξινόμηση αυτών των ενώσεων βασίζεται στο μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας, με αποτέλεσμα υποδιαιρέσεις όπως τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και διάφορα άλλα.

Τα σιλιβένια, με παράδειγμα τη ρεσβερατρόλη, αντιπροσωπεύουν ένα ξεχωριστό υποσύνολο πολυφαινολικών ενώσεων που διακρίνονται από την παρουσία δύο φαινυλικών δακτυλίων που συνδέονται με γέφυρα αιθενίου. Η ρεσβερατρόλη έχει συνδεθεί με την υγεία, αφού φαίνεται να έχει σημαντική θετική επίδραση στη διασφάλιση της καρδιαγγειακής υγείας, στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη πρόληψη του καρκίνου, μεταξύ άλλων. Οι λιγνάνες, συμπεριλαμβανομένων της σεκοΐσολαρικρεσινόλης και της ματαΐρεσινόλης, αποτελούν μία ξεχωριστή κατηγορία πολυφαινολών που απαντάται αποκλειστικά στο χώρο των φυτών, ενώ κάποιες από τις λιγνάνες φαίνεται να διαθέτουν ορισμένα πλεονεκτήματα για την υγεία, όπως αντιοιστρογονικές ιδιότητες.

Τα πιθανά οφέλη των πολυφαινολών για την υγεία, όπως οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινογόνες ιδιότητες, αποτελούν αντικείμενο επιστημονικής έρευνας σύμφωνα με τον Tsao (2010) με την αντιοξειδωτική ιδιότητά τους να προκύπτει από την ικανότητά τους να μεταφέρουν άτομα υδρογόνου ή ζεύγη ηλεκτρονίων σε αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), εξουδετερώνοντας έτσι τις επιδράσεις τους και αναστέλλοντας τις οξειδωτικές βλάβες. Ερευνητικές μελέτες έχουν παράσχει στοιχεία σχετικά με την ικανότητα των πολυφαινολών να εξαλείφουν αποτελεσματικά διάφορα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), όπως ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου, και ρίζες υπεροξυλίου, μεταξύ άλλων τύπων (Tsao, 2010).

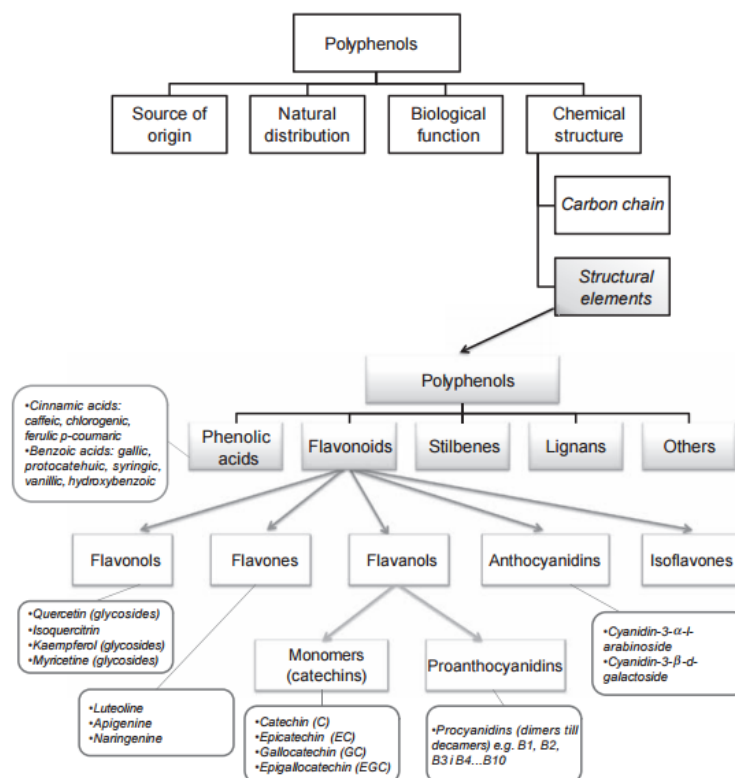
Συνοψίζοντας αναφέρεται ότι οι ερευνητές έχουν αναπτύξει μία πιο ακριβή οριοθέτηση των εννοιολογικών ορίων μίας "πολυφαινόλης" και των ποικίλων υποκατηγοριών της. Οι πολυφαινόλες έχουν συγκεντρώσει σημαντική προσοχή τόσο από την επιστημονική κοινότητα όσο και από τη βιομηχανία τροφίμων λόγω των πιθανών πλεονεκτημάτων τους για την υγεία.

2.2.1.1 Ταξινόμηση των πολυφαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μία εξέχουσα και ευρέως κατανεμημένη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, όπως σημειώνεται από τους Scalbert και Williamson (2000). Οι πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούνται από μία πολυφαινολική δομή που χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες ομάδες υδροξυλίου που συνδέονται με αρωματικούς δακτυλίους, περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει επίσης μόρια με έναν μόνο δακτύλιο φαινόλης, όπως φαινολικά οξέα και φαινολικές αλκοόλες. Παρά το γεγονός ότι ταξινομούνται χημικά ως ενώσεις με φαινολικά δομικά χαρακτηριστικά, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν σημαντική ποικιλομορφία ως συλλογή

φυσικών προϊόντων και περιλαμβάνουν πολλαπλές υποομάδες φαινολικών ενώσεων. Από βιογενετική προοπτική, οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται από δύο ξεχωριστές μεταβολικές διεργασίες. Η πρώτη οδός, γνωστή ως οδός κυκλικού οξέος, οδηγεί κυρίως στο σχηματισμό φαινυλοπροπανοειδών. Η δεύτερη οδός, που αναφέρεται ως οδός οξικού οξέος, αποδίδει κυρίως απλές φαινόλες ως τα κύρια προϊόντα (Sánchez-Moreno, 2002). Οι Pereira et al. (2009) προβλέπουν ότι ο αριθμός των δευτερογενών μεταβολιτών κυμαίνεται από 100.000 έως 200.000, με περίπου το 20% του άνθρακα που σταθεροποιείται από τη φωτοσύνθεση να κατευθύνεται προς την οδό φαινυλοπροπανοειδών.

Οι φαινολικές ενώσεις των περισσότερων φυτών παράγονται μέσω της οδού φαινυλοπροπανοειδών (Hollman, 2001). Η σύνθεση των φλαβονοειδών, τα οποία αντιπροσωπεύουν την κυρίαρχη κατηγορία φαινολικών ενώσεων στο φυσικό περιβάλλον, διευκολύνεται από τη σύγκλιση αυτών των δύο οδών (Sánchez-Moreno, 2002). Κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, ο σχηματισμός συμπυκνωμένων τανινών ή μη υδρολυμένων τανινών συμβαίνει σε ορισμένα στάδια συμπύκνωσης και πολυμερισμού που δεν είναι πλήρως κατανοητά. Οι υδρολυόμενες τανίνες μπορούν να προέρχονται είτε από γαλλικό οξύ είτε από εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ, όπως σημειώνεται από τον Stafford (1983). Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν χημική ποικιλομορφία και μπορούν να βρεθούν σε συνδυασμό με διάφορους υδατάνθρακες, όπως γλυκοσίδες που περιέχουν διαφορετικές μονάδες σακχάρου και ακυλιωμένα σάκχαρα που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις εντός των δομών πολυφαινόλης. Επιπλέον, οι πολυφαινόλες μπορούν να συνδεθούν με οργανικά οξέα ή άλλες πολυφαινόλες (Manach et al., 2004). Ένας σημαντικός αριθμός πολυφαινολικών ενώσεων έχει εντοπιστεί, συμπεριλαμβανομένων περισσότερων από 8150 φλαβονοειδών με ένα ευρύ φάσμα δομών (Lattanzio et al., 2008). Η εκτεταμένη ποικιλομορφία και η ευρεία εμφάνιση πολυφαινολών στα φυτά οδήγησε σε διάφορες μεθόδους ταξινόμησης αυτών των φυσικών χημικών ουσιών, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2.5.



Εικόνα 2.5: Διαφορετικές ταξινομήσεις φυτικών πολυφαινολών και πολυφαινολικών κατηγοριών με βάση τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων και τα δομικά τους στοιχεία (Galanakis 2018).

Οι πολυφαινόλες έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τις πηγές τους, τα φυσικά χαρακτηριστικά, τις φυσιολογικές λειτουργίες και τις χημικές συνθέσεις τους. Όσον αφορά την εμφάνισή τους στο φυσικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ξεχωριστές κατηγορίες: αυτές που υπάρχουν σε περιορισμένες ποσότητες (όπως απλές φαινόλες, πυροκατεχόλη, υδροκινόνη, ρεσορκινόλη και αλδεΐδες που προέρχονται από βενζοϊκά οξέα που βρίσκονται σε αιθέρια έλαια, όπως η βολική ανιλίνη), εκείνες που είναι ευρέως διαδεδομένες (συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών και των παραγώγων τους, κουμαρινών και φαινολικών οξέων, όπως βενζοϊκό και κινναμικό οξύ και τα παράγωγά τους), και πολυμερή (συγκεκριμένα τανίνες και λιγνάνες) (Bravo, 1998).

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τον εντοπισμό τους μέσα στο φυτό, συγκεκριμένα την παρουσία τους στο διαλυτό κλάσμα του κυττάρου ή τη συσχέτισή τους με ενώσεις εντός του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον, η χημική τους σύνθεση χρησιμεύει ως πρόσθετο κριτήριο για την ταξινόμηση αυτών των ουσιών. Η ομάδα των απλών φαινολών περιλαμβάνει φλαβονοειδή και τανίνες περιορισμένου και μέτριου μοριακού βάρους, τα οποία δεν συνδέονται χημικά με ενώσεις μεμβράνης. Αντίθετα, η ομάδα των ουσιαστικά συνθετικών φαινολών περιλαμβάνει συμπυκνωμένες τανίνες, φαινολικά οξέα και άλλες φαινολικές ενώσεις χαμηλότερου μοριακού βάρους που συνδέονται με πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες στο κυτταρικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό

αδιάλυτων σταθερών συμπλεγμάτων. Αυτή η προαναφερθείσα κατηγοριοποίηση έχει σημαντική σημασία όσον αφορά τη διατροφική ανάλυση, καθώς το κινητικότητα αυτών των ομάδων εντός του γαστρεντερικού σωλήνα και οι φυσιολογικές τους επιπτώσεις επηρεάζονται κυρίως από τα χαρακτηριστικά διαλυτότητάς τους. Οι αδιάλυτες φαινολικές ενώσεις επιδεικνύουν ανοχή στην πέψη και μπορούν να ανακτηθούν εν μέρει ή εξ ολοκλήρου στα κόπρανα. Αντίθετα, ένα μέρος των διαλυτών φαινολικών ενώσεων μπορεί να διασχίσει το εντερικό φράγμα και να αναγνωριστεί στην κυκλοφορία του αίματος, είτε στην αρχική τους μορφή είτε ως μεταβολίτες. Η επικρατούσα κατηγοριοποίηση των πολυφαινολών βασίζεται συνήθως στις χημικές δομές των α-γλυκονών. Ωστόσο, τηρώντας αυτήν την αρχή, οι πολυφαινολικές ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν χρησιμοποιώντας εναλλακτικά συστήματα κατηγοριοποίησης.

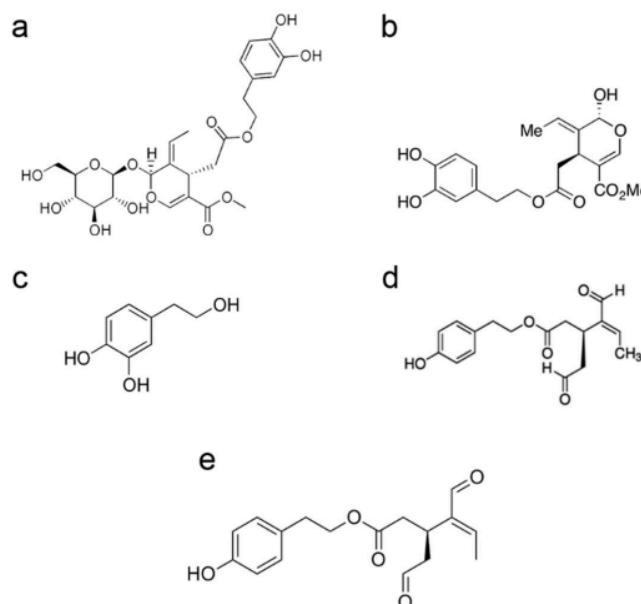
Οι φαινολικές ενώσεις έχουν ταξινομηθεί σε 16 κύριες ομάδες με βάση τη δομή της ανθρακικής τους αλυσίδας σε ένα σύστημα που επινοήθηκε από τον Harborne (1989) (Harborne & Harborne, 1998). Αρκετές κατηγορίες αποτελούν μέρος αυτής της ομαδοποίησης, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και άλλες. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν παρόμοια ταξινόμηση με βάση τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων, αλλά με μικρές διαφοροποιήσεις στην ερμηνεία των κατηγοριών στις διάφορες δημοσιεύσεις. Οι D'Archivio et al. (2007) κατέταξαν τις πολυφαινόλες σε πέντε κατηγορίες, οι Manach et al. (2004) κατέταξαν τις πολυφαινόλες σε τέσσερις ομάδες, ενώ οι Chiuzhen et al. (2007) επέκτειναν το σύστημα ταξινόμησης για να ενσωματώσουν το διχλωρομεθάνιο και τις τανίνες ως πρόσφατες κατηγορίες (D'Archivio et al., 2007; Manach et al., 2004; Chiuzhen et al., 2007).

Οι πολυφαινόλες έχουν ταξινομηθεί σε πέντε μεγάλες κατηγορίες. Εκτός από τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και τις λιγνάνες, υπάρχει μία άλλη κατηγορία που ονομάζεται "άλλα". Τα φλαβονοειδή απαντώνται ευρέως στα φυτικά τρόφιμα και μπορούν να χωριστούν σε 13 κατηγορίες με βάση τις δομικές τους παραλλαγές. Οι πιο σημαντικές κατηγορίες περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες, τις φλαβανόλες, τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες, τις ανθοκυανιδίνες, τις ανθοκυανίνες και τις φλαβανόνες. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν περίπου το ένα τρίτο όλων των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στην ανθρώπινη διατροφή και διαθέτουν αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα βενζοϊκά και τα σιναμικά οξέα είναι δύο διαφορετικές κατηγορίες φαινολικών οξέων. Οι λιγνάνες βρίσκονται στον λιναρόσπορο στη μεγαλύτερη ποσότητα, αν και άλλα τρόφιμα όπως τα δημητριακά, οι σπόροι, τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν μικρότερες ποσότητες αυτών των ενώσεων. Τα στυλβένια έχουν περιορισμένη κατανομή στην ανθρώπινη διατροφή με τη ρεσβερατρόλη, μία ένωση με αντικαρκινογόνες ιδιότητες, να αποτελεί ένα από τα βασικά παραδείγματα στυλβενίων. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο κρασί.

2.2.2 Φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο

Τα οφέλη για την υγεία που συνδέονται με την τακτική κατανάλωση ελαιόλαδου έχουν ερευνηθεί εκτενώς και αποδίδονται στην υψηλή περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε φαινολικές ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις είναι βιοδραστικά μόρια που είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας ή περισσότερων φαινολικών ομάδων. Το ελαιόλαδο περιέχει ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ενώσεων που έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν πλήθος ευεργετικών βιολογικών δραστηριοτήτων σε μελέτες σε ζώα και ανθρώπους.

Μία από τις πιο γνωστές και μελετημένες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο είναι τα σεκοϊριδοειδή. Τα σεκοϊριδοειδή είναι γλυκοζίτες που αποτελούνται από ένα τμήμα υδροξυτυροσόλης ή τυροσόλης και ένα μόριο σακχάρου, ενώ σε αφθονία παρουσιάζεται στο ελαιόλαδο η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη. Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο της ελευρωπαΐνης όσο και της υδροξυτυροσόλης *in vitro* και *in vivo*, αφού η υδροξυτυροσόλη έχει αποδειχθεί η παρουσία της στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα βοηθά στη μείωση του οξειδωτικού στρες και ενισχύει την αντίσταση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στην οξείδωση (Visioli, Poli and Gall, 2002). Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής (Talhaoui *et al.*, 2016).



Εικόνα 2.4: Χημική δομή της ελευρωπαΐνης (a), της αγκυκόνης (b), της υδροξυτυροσόλης (c), της ελεασίνης (d), της ελαιοκανθάλης (e) (Bucciantini *et al.*, 2021).

Μία άλλη φαινολική ένωση που υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες στο ελαιόλαδο είναι η τυροσόλη που εμφανίζει ισχυρή δράση απορρόφησης ελεύθερων ριζών και έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει από οξειδωτικές βλάβες σε διάφορες *in vivo* και *in vitro* δοκιμές (Sánchez-González *et al.*, 2017). Εκτός από τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, η τυροσόλη φαίνεται επίσης να εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση όπως διεπίστωσαν σε μελέτη τους οι Cárdeno *et al.* (2014), δείχνοντας ότι η τυροσόλη μειώσε τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες σε ένα μοντέλο κολίτιδας σε ποντίκια με τη μείωση της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτοκινών (Cárdeno *et al.*, 2014).

Μία τρίτη ομάδα φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν σε σπόρους και σιτηρά, αλλά έχουν ανιχνευθεί, σε μικρότερες συγκεντρώσεις και στο ελαιόλαδο, είναι οι λιγνάνες που χαρακτηρίζονται ως πολυφαινολικές. Η λιγνάνη με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ελαιόλαδο είναι η πινορεσινόλη η οποία εμφανίζει ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η πινορεσινόλη μειώνει το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μακροφάγα (Park and Pezzuto, 2015).

Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων που αντιπροσωπεύουν περίπου το 1-2% του συνολικού βάρους του ελαιόλαδου ποικίλλουν εξαιτίας διαφόρων παραγόντων όπως είναι το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς, οι μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται και οι συνθήκες αποθήκευσης του ελαιόλαδου. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο είναι το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς, με μελέτες να έχουν δείξει ότι οι άγουρες και οι πρώιμα συγκομισμένες ελιές εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με τις ώριμα συγκομισμένες ελιές. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι οι φαινολικές ενώσεις συντίθενται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ελαιόκαρπου και ότι η συγκέντρωσή τους μειώνεται καθώς ο καρπός ωριμάζει (Alarcón-De-la-lastra, 2022; Mousavi *et al.*, 2022)

Οι μέθοδοι επεξεργασίας έχουν επίσης σημαντικό αντίκτυπο στη φαινολική σύνθεση του ελαιόλαδου. Η θερμοκρασία και η διάρκεια εκχύλισης του ελαιόλαδου από τον καρπό περιλαμβάνει διάφορα στάδια, όπως την σύνθλιψη, πολτοποίηση και φυγοκέντρηση που μπορεί να έχουν σημαντική συνεισφορά στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο τελικό προϊόν (Alarcón-De-la-lastra, 2022; Mousavi *et al.*, 2022). Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση μεθόδων εκχύλισης σε χαμηλές θερμοκρασίες και μικρότερο χρόνο επεξεργασίας διατηρούν την περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε φαινολικές ενώσεις και ανάλογα η έκθεση σε θερμότητα και οξυγόνο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας οδηγεί σε σημαντική απώλεια φαινολικών ενώσεων (Cicerale *et al.*, 2008).

Συμπερασματικά, οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν μία ποικιλία βιοδραστικών μορίων που υπάρχουν σε μεγάλη αφθονία στο ελαιόλαδο, επιδεικνύοντας την ίδια στιγμή αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που πιστεύεται ότι συμβάλλουν σημαντικά στα οφέλη για την υγεία του

ανθρώπου και σχετίζονται με την τακτική κατανάλωση ελαιόλαδου. Τα κύρια συστατικά των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο είναι τα σεκοϊριδοειδή, η τυροσόλη και οι λιγνάνες. Η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων στο ελαιόλαδο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία εκχύλισης. Περαιτέρω διερεύνηση είναι επιτακτική για τον πλήρη χαρακτηρισμό της δομής και της βιοδραστηριότητας των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο, καθώς και για να εξακριβωθούν οι πιο αποτελεσματικές μέθοδοι επεξεργασίας για τη διατήρηση των ιδιοτήτων τους που ενισχύουν την υγεία (Preedy and Watson, 2020).

2.2.3 Πολυφαινόλες και οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιόλαδου

Η οξειδωτική σταθερότητα είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει τόσο τις οργανοληπτικές όσο και τις διατροφικές ιδιότητες του παρθένου ελαιόλαδου καθορίζοντας και τη διάρκεια ζωής αλλά και την ποιότητα του παρθένου ελαιόλαδου (Jukić Šrika *et al.*, 2022). Η οξείδωση των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που περιέχονται στο παρθένο ελαιόλαδο, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και τη μείωση της ποιότητάς του, με παράλληλη αλλοίωση γεύσεων και οσμών (Miho *et al.*, 2020).

Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο, συμπεριλαμβανομένων της υδροξυτυροσόλης, της τυροσόλης, της ελευρωπαϊνης και των παραγώγων τους επηρεάζουν την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιόλαδου (Miho *et al.*, 2020). Σύμφωνα με μελέτη Delgado-Ad *et al.* (2014), το φαινολικό προφίλ του παρθένου ελαιόλαδου έχει σημαντικές επιπτώσεις στη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής του (Delgado-Ad *et al.*, 2014), καθώς οι πολυφαινόλες, δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, αποτρέποντας έτσι την οξείδωση του ελαίου και συμβάλλοντας ταυτόχρονα στην υψηλή οξειδωτική σταθερότητα και τη μακρά διάρκεια ζωής του παρθένου ελαιόλαδου (Delgado-Ad, Franco Baltasar and Ayuso Yuste, 2014).

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης, ενζυμικές και χημικές αντιδράσεις είναι πιθανό να οδηγήσουν σε αποικοδόμηση των πολυφαινολών, αφού τόσο η θερμοκρασία όσο και η χρονική διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης παίζουν κρίσιμο ρόλο στη σταθερότητα του ελαιόλαδου. Επιπλέον, η εκχύλιση σε υψηλή θερμοκρασία θα μπορούσε να οδηγήσει σε απώλεια της περιεκτικότητας σε φαινόλες και να συμβάλει στην υποβάθμιση του ελαίου. Συνεπώς, είναι σημαντικό να υπάρχει σωστή διαχείριση της διαδικασίας εκχύλισης του παρθένου ελαιόλαδου για να διατηρηθούν οι πολυφαινολικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ελαίου.

Οι συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας μπορούν επίσης να επηρεάσουν την οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιόλαδου, αφού έκθεση στο φως και στον αέρα οδηγεί σε διάσπαση των πολυφαινολών και σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στην οξείδωση του

ελαιόλαδου, οδηγώντας σε αλλοιώσεις της γεύσης και της οσμής. Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση των πολυφαινολών στην οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιόλαδου. Στη μελέτη των Bucciantini et al. (2021) διαπιστώθηκε ότι το παρθένο ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες είχε αυξημένη αντίσταση στην οξείδωση και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με ελαιόλαδα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Bucciantini et al., 2021). Μία άλλη μελέτη των Di Mattia et al. (2014) διαπίστωσε ότι η προσθήκη εκχυλισμάτων πολυφαινολών σε παρθένο ελαιόλαδο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης θα μπορούσε να βελτιώσει την οξειδωτική του σταθερότητα (Di Mattia et al., 2014a).

Συμπερασματικά, το παρθένο ελαιόλαδο αποτελεί εξαιρετική πηγή πολυφαινολών, οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιόλαδου. Οι πολυφαινόλες δρουν ως εκκαθαριστές ελεύθερων ριζών, αποτρέποντας έτσι την οξείδωση του ελαίου, ενώ η φαινολική σύνθεση του παρθένου ελαιόλαδου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία της ελιάς, η ωριμότητα, η επεξεργασία, οι μέθοδοι αποθήκευσης και καλλιέργειας, οι αγρονομικές πρακτικές και οι τεχνικές επεξεργασίας. Η διατήρηση της σταθερότητας του ελαίου σε αυτές τις διάφορες διαδικασίες παραγωγής επηρεάζει τις πολυφαινολικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του παρθένου ελαιόλαδου, ενώ σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες οι πολυφαινόλες του παρθένου ελαιόλαδου εξαιτίας των αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, εμφανίζουν θετικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.

2.2.4 Αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες από ελαιόλαδο έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Candida albicans* και *Cronobacter sakazakii* (Fei et al., 2018; Borjan et al., 2020; Melguizo-Rodríguez, de Luna-Bertos, et al., 2021). Αυτές οι ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων και μυκήτων, καθιστώντας τους πιθανούς παράγοντες για χρήση στην επούλωση πληγών, τη συντήρηση τροφίμων και τις φαρμακευτικές βιομηχανίες. Η αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο αποδίδεται στην ικανότητα που έχουν να διαταράσσουν τις βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες, να οδηγούν σε μείωση τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις, να αποπολώνουν τις κυτταρικές μεμβράνες και τέλος να προκαλούν διαρροή κυτταροπλάσματος. Τα φαινολικά εκχυλίσματα ελαιόλαδου που λαμβάνονται με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, είτε αυτές είναι βιομηχανικές είτε παραδοσιακές μέθοδοι εμφανίζουν ποικίλους βαθμούς αντιμικροβιακής δράσης, με το βιομηχανικό εκχύλισμα να παρουσιάζει καλύτερη δραστικότητα. Συνολικά, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των πολυφαινολών από το ελαιόλαδο τις καθιστούν ελπιδοφόρες φυσικές εναλλακτικές λύσεις για την καταπολέμηση μικροβιακών λοιμώξεων διασφαλίζοντας σε γενικές γραμμές

την ασφάλεια των τροφίμων και κατά συνέπεια την προστασία της υγείας των καταναλωτών (Fei *et al.*, 2018; Borjan *et al.*, 2020; Melguizo-Rodríguez, de Luna-Bertos, *et al.*, 2021).

Η καταπολέμηση του *Escherichia coli* είναι αντικείμενο μελέτης πολλών συγγραφέων, που φαίνεται να παρουσιάζουν τις πολυφαινόλες, όπως είναι η ρουτίνη αλλά και η υδροξυτυροσόλη, να σχετίζονται με την αντίστοιχη εμφάνιση τόσο του αντιμικροβιακού φορτίου όσο και του δυναμικού του (Pereira *et al.*, 2007; Sudjana *et al.*, 2009; Liu, McKeever and Malik, 2017). Μία μελέτη των Liu *et al.* (2017) έχει εντοπίσει ότι η ελευρωπαΐνη και η βερβασκοσίδη έχουν σημαντικό αντίκτυπο κατά της *Salmonella enteritidis* (Liu *et al.* 2017). Ομοίως, οι Erdohan *et al.* (2011) ανέλυσαν τις επιπτώσεις της απιγενίνης-7-γλυκοζίδης, του καφεϊκού οξέος, της κατεχίνης, της διοσετίνης-7-γλυκοζίδης, της υδροξυτυροσόλης, της λουτεολίνης, της λουτεολίνης-7-γλυκοζίδης, της ελευρωπαΐνης, του βανιλικού οξέος, της βερβασκοσίδης, της ρουτίνης και της τυροσόλης στη *Salmonella enteritidis* (Erdohan *et al.* 2011). Πολλαπλές αναφορές έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα του καφεϊκού οξέος, της ελευρωπαΐνης, της ρουτίνης και της βερβασκοσίδης έναντι του *Staphylococcus aureus* (Khalil *et al.*, 2014; Pérez-Masiá, Lagaron and López-Rubio, 2014).

Πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε τις συνεργιστικές επιδράσεις της ελευρωπαΐνης, της απιγενίνης-7-Ο-γλυκοζίδης, του καφεϊκού οξέος, της λουτεολίνης 40-Ο-γλυκοζίδης, της λουτεολίνης 7-Ο-γλυκοζίδης, της ρουτίνης και της βερβασκοσίδης έναντι του *Bacillus cereus* (Ahmed *et al.*, 2014). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν επισημάνει την αποτελεσματικότητα της χημικής σύνθεσης των φύλλων ελιάς έναντι του *Bacillus subtilis*, ενός καλά χαρακτηρισμένου κατά Gram θετικού βακτηρίου (Markin, Duek and Berdicevsky, 2003).

Σε μία έρευνα των Pereira *et al.* (2007) αναφέρθηκε ότι συστατικά του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, όπως η απιγενίνη 7-Ο-γλυκοζίτη, το καφεϊκό οξύ, η ελευρωπαΐνη, η λουτεολίνη 7-Ο-γλυκοζίδη, η λουτεολίνη 40-Ο-γλυκοζίδη, η ρουτίνη και η βερβασκοσίδη, παρουσιάζουν προστατευτικά αποτελέσματα έναντι του μύκητα *Cryptococcus neoformans* (Pereira *et al.*, 2007).

Έχει αποδειχθεί ότι η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη είναι οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς (Bayçin *et al.*, 2007; Markin *et al.*, 2003), ενώ παρά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς έναντι της *Candida albicans*, έχει αναφερθεί ότι η ελευρωπαΐνη καταστέλλει σημαντικά την *Candida glabrata* και την *Candida parapsilosis* (Markin, Duek and Berdicevsky, 2003; Bayçin *et al.*, 2007).

2.2.5 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών και επίδραση στην ανθρώπινη υγεία

Οι πολυφαινόλες λόγω της φύσης των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινογονικών χαρακτηριστικών τους είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες, ενώ η βιοδιαθεσιμότητά τους, ο βαθμός στον οποίο τα δραστικά συστατικά ενός τροφίμου ή συμπληρώματος απορροφώνται και καθίστανται

διαθέσιμα για χρήση από τον οργανισμό, καθορίζει την ποσότητα στην οποία οι ουσίες αυτές είναι ευεργετικές για την υγεία. Ο Preedy (2020) παρουσιάζει έρευνες σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών και τις επιπτώσεις τους στην υγεία. Οι διάφορες πολυφαινόλες, όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα, κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη χημική τους δομή και ενώσεις όπως η κερσετίνη, οι κατεχίνες και οι ανθοκυανίνες είναι παραδείγματα φλαβονοειδών, μίας κατηγορίας πολυφαινολών που έχουν αναλυθεί και μελετηθεί εκτενώς, με το υδροξυβενζοϊκό οξύ και το υδροξυκιναμωμικό οξύ είναι δύο παραδείγματα τέτοιων φαινολικών οξέων (Preedy, 2020).

Η ικανότητα των πολυφαινολών να μεταβάλλουν τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, να μειώνουν το οξειδωτικό στρες και να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες είναι η βάση για τις αντιοξειδωτικές τους δράσεις με τη βοήθεια των οποίων χρόνιες ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά και ο διαβήτης μπορεί να προληφθούν σε σημαντικό βαθμό.

Πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με τις ιδιότητες των πολυφαινολών στην προστασία της καρδιάς. Φλαβονοειδή στο τσάι και τη σοκολάτα κατεβάζουν το επίπεδο της LDL (κακής χοληστερόλης) βελτιώνοντας την ενδοθηλιακή λειτουργία, παράγοντες που μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου.

Προκειμένου να επιβραδύνουν ή να σταματήσουν την εξέλιξη του καρκίνου, οι πολυφαινόλες μπορούν να μειώσουν τη δημιουργία ROS και να προστατεύσουν το DNA από βλάβες. Ενώσεις όπως είναι η ρεσβερατρόλη, η κουρκουμίνη και η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) είναι πολυφαινόλες που έχουν αποδειχθεί σε πολλαπλές προκλινικές έρευνες ότι καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την κακοήγη εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων (Preedy, 2020).

2.2.6 Παρασκευή γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο ως φορείς εγκλεισμού πολυφαινολών

Έχει αναπτυχθεί ένα ευρύ φάσμα τεχνολογιών για τον εγκλεισμό των πολυφαινολών, συμπεριλαμβανομένης της ξήρανσης με ψεκασμό, των γαλακτωμάτων, των λιποσωμάτων, των μικυλλίων, των νανοσωματιδίων, της ξήρανσης με κατάψυξη, της συγκρυστάλλωσης και της ενθυλάκωσης με ζύμη. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και αδυναμίες όσον αφορά τον εγκλεισμό, την προστασία, τη βιοδιαθεσιμότητα, το κόστος, το ρυθμιστικό καθεστώς, την ευκολία χρήσης και τη βιοσυμβατότητα. Μεταξύ αυτών, τα γαλακτώματα θεωρούνται ευρέως ως ένα από τα πιο δημοφιλή συστήματα εγκλεισμού και χορήγησης για ένα ευρύ φάσμα λιπόφιλων, υδρόφιλων και αμφίφιλων βιοδραστικών μορίων (Lee and McClements, 2010), λόγω της υψηλής απόδοσης εγκλεισμού, της διατήρησης της χημικής σταθερότητας των ενθυλακωμένων μορίων και της ελεγχόμενης απελευθέρωσης (Pricharan and Klinkesorn, 2014).

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με γαλακτώματα ως φορείς εγκλεισμού πολυφαινολών περιλαμβάνουν κυρίως φυτικά έλαια όπως το ηλιέλαιο και το έλαιο αραβόσιτου. Πολύ περιορισμένη στα γαλακτωματοποιημένα τρόφιμα είναι η χρήση της ελαιόλαδου, το οποίο όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι γνωστό ότι είναι πιο ανθεκτικό στην οξείδωση χάρη στον χαμηλότερο βαθμό ακόρεστων λιπαρών οξέων και την υψηλή περιεκτικότητά του σε δευτερεύοντα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των τοκοφερόλων και των φαινολικών ενώσεων (Bendini *et al.*, 2007; Koidis and Boskou, 2015b).

Το ελαιόλαδο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον ως βάση γαλακτωμάτων λόγω των ιδιοτήτων του που προάγουν την υγεία και αποδίδονται στην παρουσία πολλών δευτερευουσών ενώσεων και ειδικότερα στις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι επίσης υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της πικράδας και της οξύτητας (Di Mattia *et al.*, 2014b).

Παρακάτω παρουσιάζονται μια συλλογή μελετών όπου ερευνήθηκε η δυνατότητα παρασκευής γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο ως φορέα εγκλεισμού πολυφαινολών.

Πίνακας 2.2 Παραδείγματα γαλακτωμάτων ν/ε με βάση το ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με πολυφαινόλες.

Υδατική φάση	Λιπαρή φάση	Γαλ/τής	Εγκλεισμένο συστατικό	Παρατηρήσεις	Αναφορά
Νερό (0.7%) + Tween 80 (0.7%)	Ελαιόλαδο	Span 80 (0.7%)	Εκχύλισμα φύλλων πράσινου τσαγιού, εκχύλισμα πολυφαινολών από παρθένο ελαιόλαδο, εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείου	Η ενσωμάτωση όλων των αντιοξειδωτικών έκανε τα γαλακτώματα πιο σταθερά. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση επιτεύχθηκε με ενσωμάτωση εμπλουτισμένων ενώσεων.	(Mosca <i>et al.</i> , 2013)
Νερό (2-3% w/w)	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (96 and 95% w/w)	Tween 20 (2% w/w)	Βανιλικό, καφεϊκό και συριγγικό οξύ (0.1% w/w)	Η προσθήκη καφεϊκού οξέος στην υδατική φάση (σε ποσοστό 2%) παρουσίασε τη χαμηλότερη διάμετρο σταγονιδίων (251 nm) με μεγάλη σταθερότητα στην οξείδωση (33,6 h).	(Katsouli, Polychniatou and Tzia, 2018)
Νερό (2% w/w)	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	Tween 20 (0%, 2%, 4% και 6% g γαλ/τής /g τελικού γαλ/τος)	Γαλλικό, συριγγικό και βανιλικό οξύ (1% w/w)	Η ενσωμάτωση ενδογενών ενώσεων του ελαιόλαδου στην υδατική φάση μείωσε την επιφανειακή τάση διευκολύνοντας το σχηματισμό νανογαλακτωμάτων. Επιπλέον, η προσθήκη	(Polychniatou and Tzia, 2018)

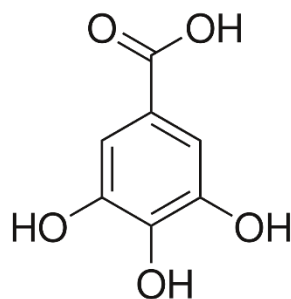
				των οξέων ενίσχυσε την κινητική και οξειδωτική σταθερότητα.	
Νερό (2% w/w)	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (92, 94 and 96% w/w)	Tween 202%-4%-6%	Ασκορβικό και γαλλικό οξύ (0.5% and 1% w/w)	Και οι δύο βιοδραστικές ενώσεις επηρέασαν την επιφανειακή τάση της υδατικής φάσης. Το βέλτιστο σκεύασμα παρασκευάστηκε με 1 % του ασκορβικού και του γαλλικού οξέος και 4 % Tween.	(Katsouli, Polychniatou and Tzia, 2018)
Νερό (10 and 20% wt)	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	Tween 20 Span 80 (8%, 10% and 12% wt)	Εκχύλισμα φαινολικών ενώσεων από Hibiscus sabdariffa	Τα συστήματα που ενσωματώνουν βιοδραστικές ενώσεις που εξαγονται από το H. sabdariffa έδειξαν καλή οξειδωτική σταθερότητα κατά τη διάρκεια ενός μήνα αποθήκευσης.	(Pimentel-Moral <i>et al.</i> , 2018)
Νερό (1% w/w)	Ελαιόλαδο	Span 80 (1% w/w)	Ξηρό εκχύλισμα κρασιού (0,4, 1 και 1,5 mg εκχυλίσματος/g γαλακτώματος)	Αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε εκχύλισμα κρασιού, η διαδικασία οξείδωσης επιβραδύνθηκε, ενώ παράμετροι όπως το μέγεθος της διασκορπισμένης φάσης δεν επηρεάστηκαν.	(Cinelli <i>et al.</i> , 2019)

2.2.7 Επιλεγμένα βιοδραστικά συστατικά

Όπως προαναφέρθηκε, η αγορά εκδηλώνει αυξημένο ενδιαφέρον για λειτουργικά τρόφιμα που περιέχουν συστατικά που συμβάλλουν στην υγεία. Ωστόσο, πολλά από αυτά τα συστατικά, παρά την αυξανόμενη δημοτικότητά τους, αντιμετωπίζουν προκλήσεις κατά την προσθήκη τους στα τρόφιμα. Αυτές οφείλονται στη φυσική ή χημική τους αστάθεια, καθώς και στην αδιαλυτότητά τους στο νερό. Τα παρακάτω φαινολικά οξέα του ελαιόλαδου που επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα διατριβή παρουσιάζουν διάφορα οφέλη για την υγεία, αλλά χαρακτηρίζονται από μία ήπια αμφιφιλικότητα και χημική αστάθεια. Έτσι, είναι αναγκαίος ο εγκλεισμός και η προστασία τους πριν από την ενσωμάτωσή τους στα τρόφιμα.

2.2.7.1 Γαλλικό οξύ (gallic acid)

Το γαλλικό οξύ είναι μία φυσική φαινολική ένωση που βρίσκεται σε διάφορα μέρη φυτών, όπως τα φύλλα, οι ρίζες και ο φλοιός. Έχει κερδίσει την προσοχή για τις ποικίλες βιοδραστητικότητές του και τις πιθανές εφαρμογές του στα τρόφιμα και την ιατρική. Έχει αποδειχθεί ότι το γαλλικό οξύ αλληλεπιδρά με τα τετραπλέγματα G του DNA, επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων και οδηγώντας σε αντικαρκινικά αποτελέσματα στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Sánchez-González *et al.*, 2017; Sanchez-Martin *et al.*, 2022). Μπορεί επίσης να δράσει ως φυσικός βιοενισχυτής, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα διαφόρων φαρμάκων, αναστέλλοντας τον ηπατικό μεταβολισμό και μεταβάλλοντας τη γαστρεντερική διαπερατότητα (Dhiman and Mukherjee, 2021).



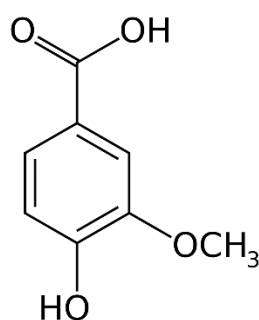
Εικόνα 2.5: Συντακτικός τύπος του γαλλικού οξέος

Επιπλέον, το γαλλικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί ως δραστικό συστατικό σε συνθέσεις για την επιτάχυνση της μυϊκής διαφοροποίησης, την προώθηση της μυϊκής ανάπτυξης και την πρόληψη της σαρκopenίας που προκαλείται από την ηλικία (Wadhwa *et al.*, 2023). Η εκχύλιση και ο καθαρισμός του γαλλικού οξέος από πολύπλοκες βιολογικές μήτρες έχουν επιτευχθεί με τη χρήση μαγνητικών μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών, τα οποία προσφέρουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και αποτελεσματικότητα (J. Li *et al.*, 2022). Συνολικά, το γαλλικό οξύ είναι πολλά υποσχόμενο ως βιοενεργό συστατικό σε προϊόντα διατροφής λόγω των διαφόρων βιολογικών δραστηριοτήτων του και των πιθανών οφελών για την υγεία.

2.2.7.2 Βανιλικό οξύ (vanilic acid)

Το βανιλικό οξύ είναι μία βιοδραστητική ένωση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ασφαλές μόριο ενεργοποίησης για ελεγχόμενη από τη διατροφή έκφραση διαγονιδίων σε θεραπείες γονιδίων και κυττάρων. Βρίσκεται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης και μπορεί να μεταβολιστεί από το *Caulobacter crescentus* (Gitzinger *et al.*, 2012). Το βανιλικό οξύ καταναλώνεται συνήθως από τον άνθρωπο μέσω

αρωματισμένων έτοιμων τροφίμων, φρέσκων λαχανικών και φρούτων, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο συστατικό για προϊόντα διατροφής (Remaud et al., 2023). Έχει χρησιμοποιηθεί ως άρωμα σε βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών λόγω των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του (Verardo, Gómez-Caravaca and Tabanelli, 2020). Το βανιλικό οξύ και άλλες βιοδραστικές ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι έχουν διατροφική αξία και διαδραματίζουν ρόλο στην ανθρώπινη ανάπτυξη, την ανάπτυξη και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης (Jiang et al., 2023). Η βιολογική παραγωγή βανιλίνης από ανανεώσιμες πηγές μέσω μικροβιακής ζύμωσης έχει κερδίσει την προσοχή λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας και των φιλικών προς το περιβάλλον ιδιοτήτων της.



Εικόνα 2.6: Συντακτικός τύπος του βανιλικού οξέος

Το βανιλικό οξύ είναι ένα μονοϋδροξυβενζοϊκό οξύ, επίσης γνωστό ως 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζοϊκό οξύ, που παίζει ρόλο ως φυτικός μεταβολίτης, προερχόμενο από τα φυτά γνωστό για τις ιδιότητες προστασίας των μιτοχονδρίων, αλλά για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες (Jeong et al., 2010), μέλος της ομάδας των φαινολικών ενώσεων και από τα φαινολικά οξέα που έχουν εντοπιστεί στο ελαιόλαδο, μαζί με το καφεϊκό, το συριγγικό, το p-κουμαρικό και το o-κουμαρικό οξύ (Polychniatou & Tzia, 2018). Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ελαιόλαδου επηρεάζεται θετικά από την παρουσία του βανιλικού οξέος στο ελαιόλαδο, ενώ οι θετικές του ιδιότητες του περιλαμβάνουν και μεταξύ άλλων και γαλακτωματοποιητικές και σταθεροποιητικές ιδιότητες (Polychniatou & Tzia, 2018). Το βανιλικό οξύ φαίνεται, σύμφωνα με μελέτη των Phan et al. (2001) να παρουσιάζει επίσης εξαιρετικές δυνατότητες επούλωσης τραυμάτων, αφού σε μελέτες καλλιέργειας ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών και επιδερμικών κερατινοκυττάρων έχει δείξει μαζί με άλλες φαινολικές ενώσεις ότι μπορεί να ενισχύσει τη διαδικασία επούλωσης χρόνιων τραυμάτων (όπως φλεβικά έλκη ή εγκαύματα) προστατεύοντάς τα από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από αυτούς τους τύπους βλαβών (Phan et al., 2001). Σε μελέτη τους οι Delaquis et al. (2005) έδειξαν επίσης ότι το βανιλικό οξύ είναι πιο αποτελεσματικό στον έλεγχο των βακτηρίων *Listeria* σε προϊόντα όπου το pH είναι περίπου 4,5, ενώ η βανιλίνη λειτουργεί καλύτερα όταν το pH είναι πιο κοντά στο ουδέτερο. Η βανιλίνη με έντονο άρωμα με ισχυρό όριο γεύσης είναι δυνατό με την παρουσία της να επηρεάζει τη γεύση του τελικού προϊόντος, ενώ από την άλλη το βανιλικό οξύ φαίνεται σύμφωνα με την ίδια μελέτη να έχει μικρότερη

επίδραση. Η χρήση μείγματος των δύο ενώσεων σύμφωνα με τους Delaquis et al. (2005) μπορεί να είναι χρήσιμη σε ορισμένες εφαρμογές όπου δεν είναι επιθυμητή η έντονη γεύση βανίλιας. Παρά τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, το βανιλικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως και αναγνωρίζεται ως διατροφικό ωφέλιμο στα φυτικά τρόφιμα και έχουν πιθανό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου και των μεταλλαξιγόνων, όπως είναι το ελαιόλαδο (Delaquis, Stanich and Toivonen, 2005).

Το βανιλικό οξύ είναι μία φαινολική ένωση που βρίσκεται στο ελαιόλαδο έχοντας αναγνωριστεί για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του με διάφορες μελέτες να έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις του εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδου (EVOO), συμπεριλαμβανομένου και του βανιλικού οξέος, παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές δραστηριότητες (Pedan et al., 2019). Η ανασταλτική επίδραση που έχει το βανιλικό οξύ στα αντιδραστικά είδη οξυγόνου και στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες συμβάλλει στις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του, ενώ οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του βανιλικού οξέος αποδίδονται στη δράση του για την απομάκρυνση ριζών (Melguizo-Rodríguez, de Luna-Bertos, et al., 2021; Melguizo-Rodríguez, Illescas-Montes, et al., 2021). Αυτές οι ιδιότητες του βανιλικού οξέος στο ελαιόλαδο αναδεικνύουν τα δυνητικά οφέλη για την υγεία και τις θεραπευτικές εφαρμογές του.

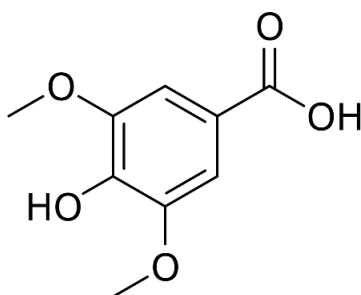
Είναι γνωστό ότι η κατανάλωση ελαιόλαδου (κυρίως εξαιρετικό παρθένο EVOO), ενισχύει τη διασφάλιση της ανθρώπινης υγείας έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενισχύοντας τους καρδιομεταβολικούς δείκτες όπως είναι η αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα αλλά και τα μη φυσιολογικά όρια χοληστερόλης (Fanali et al., 2018). Το βανιλικό οξύ ως ένα κρίσιμο συστατικό των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφύλαξη της καρδιαγγειακής υγείας, εκτός βέβαια από τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που έχει (Fanali et al., 2018).

Η συγκέντρωση του βανιλικού οξέος διαφέρει σημαντικά στις διάφορες ποικιλίες ελαιόλαδου, ανάλογα με παράγοντες όπως ο τύπος της ελιάς που χρησιμοποιήθηκε, το έδαφος και το κλίμα στο οποίο καλλιεργήθηκαν οι ελιές και η μέθοδος εξαγωγής του ελαίου.

2.2.7.3 Συριγγικό οξύ (syringic acid)

Το συριγγικό οξύ, επίσης γνωστό ως 4-υδροξυ-2,3-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ, είναι μία φυσική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των βενζοϊκών οξέων, η οποία περιλαμβάνει το διμεθοξυβενζόλιο και τις φαινόλες (PubChem, 2023) και συγγενεύει λειτουργικά με το γαλλικό οξύ και δρα ως συζυγές οξύ του συριγγικού (PubChem, 2023). Η χημική δομή του συριγγικού οξέος αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο με μεθοξυομάδες στις θέσεις 3 και 5, συμβάλλοντας στην ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση (Srinivasulu et al., 2018).

Μία από τις βασικές ιδιότητες του συριγγικού οξέος είναι το αντιοξειδωτικό του δυναμικό, το οποίο αποδίδεται στην παρουσία των μεθοξυομάδων στον αρωματικό δακτύλιο, παίζοντας με τον τρόπο αυτό κρίσιμο ρόλο στην προστασία του οργανισμού από τις βλαβερές συνέπειες των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες ασθένειες όπως ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος και οι νευρολογικές διαταραχές (Srinivasulu *et al.*, 2018). Μελέτες έχουν δείξει ότι το συριγγικό οξύ, μαζί με άλλα φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό, το βανιλικό και το πρωτοκατεχικό οξύ, παρουσιάζουν γαλακτωματοποιητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθιστώντας τα πολύτιμα συστατικά για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας (Katsouli, Polychniatou and Tzia, 2018).



Εικόνα 2.7: Συντακτικός τύπος του συριγγικού οξέος

Το συριγγικό οξύ μπορεί να βρεθεί σε διάφορες φυσικές πηγές, συμπεριλαμβανομένου του ελαιόλαδου (Rodrigues *et al.*, 2021), μαζί με το ευρύτερο φάσμα των φαινολικών ενώσεων, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, υδροξυ-ισοχρωμάνες, τα φλαβονοειδή και οι λιγνάνες (Servili *et al.*, 2013). Άλλες πηγές συριγγικού οξέος περιλαμβάνουν την παρουσία του στο δενδρολίβανο, τον βασιλικό, το θυμάρι και κάρδαμο κήπου, το τσάι, τους ξηρούς καρπούς και τα μούρα, τα οποία περιέχουν ποικίλα επίπεδα φαινολικών οξέων, συμπεριλαμβανομένου του συριγγικού οξέος (Bendini *et al.*, 2007; Ghelichi, Hajfathalian, Yesiltas, A.-D. M. Sørensen, *et al.*, 2023).

Τα επίπεδα συριγγικού οξέος σε διάφορες ποικιλίες ελαιόλαδου μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος της ελιάς, η διαδικασία εκχύλισης και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (Srinivasulu *et al.*, 2018), με μελέτες να έχουν αναφέρει την παρουσία συριγγικού οξέος στα ελαιόλαδα, μαζί με άλλα φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό, το βανιλικό, το p-κουμαρικό, το o-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ (Pedan *et al.*, 2019). Η σύνθεση των λιπαρών οξέων του ελαιόλαδου, η οποία διαφέρει από άλλα φυτικά έλαια λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, μπορεί επίσης να επηρεάσει τα επίπεδα του συριγγικού οξέος (Faci *et al.*, 2021), ενώ η σύνθεση των λιπαρών οξέων, των τοκοφερολών, των πολικών φαινολών και των πτητικών ουσιών στα παρθένα ελαιόλαδα μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τις συγκεκριμένες ποικιλίες ελιάς που χρησιμοποιούνται (Chtourou *et al.*, 2021).

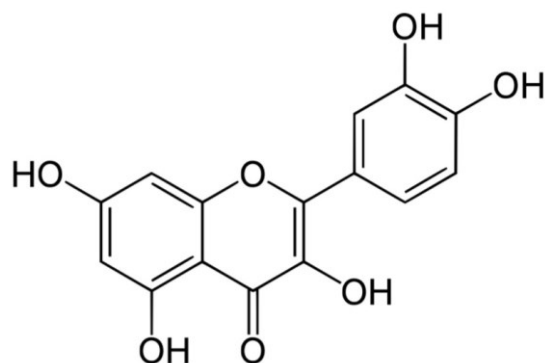
Η περιεκτικότητα του συριγγικού οξέος στο ελαιόλαδο, μπορεί να επηρεαστεί τόσο από αγρονομικούς παράγοντες, όπως είναι η ποικιλία της ελιάς, το κλίμα και τις πρακτικές καλλιέργειας στο χωράφι, αλλά και από παράγοντες της επεξεργασίας του, όπως είναι οι μέθοδοι εκχύλισης, οι συνθήκες αποθήκευσης αλλά και τα λαμβανόμενα μέτρα ποιοτικού ελέγχου (Jukic Šrika *et al.*, 2022) (Jukic Šrika *et al.*, 2022). Η βιοδιαμεσιμότητα του συριγγικού οξέος εξαρτάται τόσο από φυσικούς, όσο και χημικούς παράγοντες και ως μία από τις φαινολικές αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν φυσικά στις ελιές και τα ελαιόλαδα, συμβάλλει στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στα οφέλη για την υγεία που συνδέονται με την κατανάλωση ελαιόλαδου. Επιδρά επίσης και στην κινητική της γαλακτωματοποίησης, έχοντας γαλακτωματοποιητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες ανάλογες με αυτές της συγγενικής του φαινολικής ένωσης, του βανιλικού οξέος (Polychniatou and Tzia, 2018).

Ένα άλλο πιθανό όφελος από την παρουσία του συριγγικού οξέος στο ελαιόλαδο είναι ο ρόλος του στην πρόληψη του καρκίνου, αφού έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου, συμπεριλαμβανομένου του συριγγικού οξέος, μπορούν να έχουν δυνητικά ευεργετικά αποτελέσματα στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου (Briguglio *et al.*, 2020). Οι ενώσεις αυτές λειτουργούν μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες στο σώμα, αποτρέποντας τη βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών, των μιτοχονδρίων και του DNA, μειώνοντας τελικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Kabaran, 2019).

Οι επιδράσεις του συριγγικού οξέος στη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας είναι επίσης σημαντική και φαίνονται από την επίδραση που φαίνεται να έχει στα επίπεδα χοληστερόλης και στη συνολική υγεία της καρδιάς, ενώ υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι το συριγγικό οξύ αυξάνει τα επίπεδα χοληστερόλης λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), τα οποία θεωρούνται ευεργετικά για την καρδιαγγειακή υγεία (Romani *et al.*, 2019; Mehmood *et al.*, 2020).

2.2.7.4 Κερσετίνη (quercetin)

Ένα από τα πιο συνηθισμένα флаβονοειδή που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι η κερσετίνη, ένα πολυυδροξυλικό ανάλογο με αντιοξειδωτικές, μεταλλοεπικαλυπτικές και γονιδιακές και ενζυμικές ρυθμιστικές ιδιότητες (Hollman *et al.*, 1997).



Εικόνα 2.8: Συντακτικός τύπος κερσετίνης

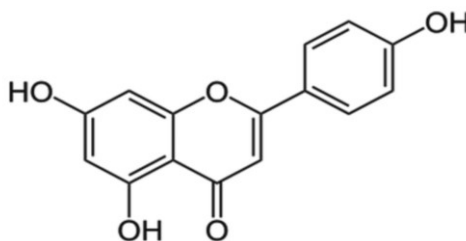
Ως εκ τούτου, η κερσετίνη είναι σε θέση να χρησιμοποιηθεί στις βιομηχανίες λειτουργικών τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων λόγω των αντιφλεγμονωδών, αντιπηκτικών, αγγειοδιασταλτικών, αντικαρκινογόνων και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της (Erlund, 2004; Murakami, Ashida and Terao, 2008). Παρά τις δυνατότητές της ως θρεπτικό συστατικό, η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της κερσετίνης και η ακραία αστάθειά της σε μεταβολές των φυσικών και χημικών συνθηκών έχουν περιορίσει σημαντικά την εφαρμογή της, με συνέπεια να χρειάζεται να δοθεί μεγάλη έμφαση στην εξεύρεση τρόπων για να καταστεί πιο σταθερή και ευκολότερα διαλυτή. Για τη βελτίωση της διαλυτότητας, της σταθερότητας και της απορρόφησης της κερσετίνης, έχει τεκμηριωθεί ένας αυξανόμενος αριθμός μεθόδων που περιλαμβάνει ενίσχυση υπό όξινες, ουδέτερες, αλκαλικές, ακόμη και θερμές συνθήκες μέσω της κατασκευής πολυμερών νανοσωματιδίων, όπως αλβουμίνη ορού βοοειδών (Fang *et al.*, 2011), απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας (Wang and Wang, 2015), νανοσωματίδια ζεΐνης (Farrell *et al.*, 2012) και συνθετικό πολυγαλακτικό οξύ (PLA) (Pandey *et al.*, 2015).

2.2.7.5 Απιγενίνη (apigenin)

Η απιγενίνη είναι ένα φυσικό флаβονοειδές που απαντάται σε διάφορα φυτά και τυπικά ανήκει στην υποκατηγορία των флаβονών (Salehi *et al.*, 2019). Χημικά, η απιγενίνη είναι γνωστή ως 4', 5, 7,-τριδροξυφλαβόνη και αποτελεί την αγλυκόνη διαφόρων γλυκοζιτών, όπως η απικετρίνη (Allahverdiyev *et al.*, 2013). Η ένωση αυτή διαθέτει τρεις υδροξυλικούς υποκαταστάτες που συμβάλλουν στη χημική δομή και τις ιδιότητές της (Ali *et al.*, 2017).

Πολλά οφέλη για την υγεία έχουν αποδοθεί στην απιγενίνη λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιικών επιδράσεών της (Salehi *et al.*, 2019), ενώ σύμφωνα με μελέτη των Ali *et al.* (2017) έχει φανεί ως δυνητικός θεραπευτικός παράγοντας για ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Ali *et al.*, 2017). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι είναι σε θέση να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ασκήσει αντιφλεγμονώδη δράση στα μικρογλοιακά κύτταρα (Ginwala *et al.*, 2019). Η

προερχόμενη από εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο απιγενίνη είναι σε θέση να καταστείλει την έκφραση λιπογενετικών ενζύμων, προάγοντας την υγεία της καρδιάς (Shukla and Gupta, 2010).



Εικόνα 2.9: Συντακτικός τύπος της απιγενίνης

Μελέτες έχουν δείξει ότι η απιγενίνη, μαζί με άλλα φλαβονοειδή όπως η λουτεολίνη και η κερσετίνη, λειτουργεί συνεργικά με άλλες πολυφαινόλες, όπως η υδροξυτυροσόλη και οι αγλυκόνες της ελαιουρωπαϊίνης και ενισχύει τα συνολικά οφέλη του ελαιόλαδου για την υγεία (Visioli et al., 2008), υποδηλώνοντας με τον τρόπο αυτό ότι η παρουσία της απιγενίνης στο ελαιόλαδο είναι ένας σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στα πολυάριθμα οφέλη του για την υγεία και υποστηρίζει τη σημασία της κατανάλωσης ελαιόλαδου ως μέρος μιας υγιεινής διατροφής (García-Martínez et al., 2016).

Η απιγενίνη ως ένα φλαβονοειδές που βρίσκεται στο ελαιόλαδο, συμβάλλει σημαντικά στα οφέλη για την υγεία που συνδέονται με την κατανάλωσή του σύμφωνα με μελέτη των García-Martínez et al. (2016), αφού η υψηλή τους πρόσληψη συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Salehi et al., 2019). Επιπροσθέτως σύμφωνα με μελέτη των Khwaldia et al. (2022), η απιγενίνη έχει προταθεί ως ένας ισχυρός θεραπευτικός παράγοντας για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, βάσει μελετών in vivo, in vitro και κλινικών δοκιμών (Salehi et al., 2019).

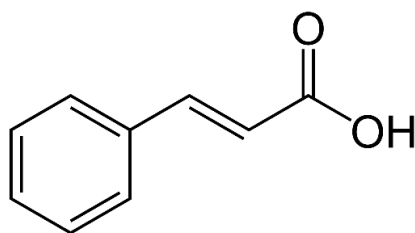
Οι συνεργιστικές επιδράσεις της απιγενίνης και άλλων ενώσεων στο ελαιόλαδο σύμφωνα με μελέτη των García-Martínez et al. (2016) συμβάλλουν στις ιδιότητες που προάγουν την υγεία με μελέτες να δείχνουν ότι αφενός αυξάνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων και αφετέρου φαίνεται να συσχετίζονται με αντιϊκές επιδράσεις, μαζί με άλλα φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη και η ρουτίνη (Salehi et al., 2019; Melguizo-Rodríguez, de Luna-Bertos, et al., 2021).

Μία μελέτη κατέδειξε 262% αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της απιγενίνης σε ένα σκεύασμα 42-DHA-απιγενίνης με βάση το ελαιόλαδο, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα μίας νέας και πιο αποτελεσματικής μεθόδου χορήγησης (Tsiailanis et al., 2023), έτσι από διατροφική άποψη, η επιλογή ενός ελαιόλαδου πλούσιου σε φαινόλες συμβάλλει στη διαιτητική πρόσληψη βιολογικά ενεργών ενώσεων (Visioli et al., 2008). Ως ισχυρός θεραπευτικός παράγοντας κατά ασθενειών όπως η ρευματοειδής

αρθρίτιδα, είναι δικαιολογημένη η περαιτέρω έρευνα σχετικά με τις *in vivo*, *in vitro* και κλινικές μελέτες της απιγενίνης σύμφωνα με τους Ali et al. (2017) με τις ισχυρές θεραπευτικές δραστηριότητες των βιοδραστικών φλαβονοειδών φυτικής προέλευσης, όπως η απιγενίνη, κατά του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων και άλλων θεμάτων υγείας να παρέχουν μία σταθερή βάση για μελλοντικές μελέτες (Ali et al., 2017; Kashyar et al., 2018).

2.2.7.6 Trans-σινναμικό οξύ (trans-cinamic acid)

Το *trans*-σινναμικό οξύ ως μονοκαρβοξυλικό οξύ είναι συστατικό του ακρυλικού οξέος που φέρει φαινυλικό υποκαταστάτη στην 3^η θέση, ενώ κατά κύριο λόγο, βρίσκεται στο *Cinnamomum cassia* (PubChem, 2023), υπάρχει ως *cis* όσο και ως *trans* ισομερές, ενώ μόνο η μορφή *trans* μορφή του απαντά συχνότερα στη φύση και αποτελεί αντικείμενο του εμπορίου (ACS, 2023). Απαντάται στη φύση σε διάφορα φυτά με τη μορφή του καρβοξυλικού οξέος (Arn and Acree, 1998; Kashyar et al., 2018), ενώ δομικά πρόκειται για μία λευκή κρυσταλλική ένωση ελαφρώς διαλυτή στο νερό και πλήρως διαλυτή σε πολλούς οργανικούς διαλύτες (ACS, 2023).



Εικόνα 2.10: Συντακτικός τύπος του *trans*-σινναμικού οξέος

Το *trans*-σινναμικό οξύ έχει μία σειρά από οφέλη για την υγεία, τα οποία αποδίδονται κυρίως στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες που βρίσκονται στις ενώσεις βιοφαινόλης (Ghanbari et al., 2012) και οι οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στις διάφορες χημικές, οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες του παρθένου ελαιόλαδου (Arn and Acree, 1998).

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ποσότητα του *trans*-σινναμικού οξέος που υπάρχει στο ελαιόλαδο, συμπεριλαμβανομένης της ποικιλίας ελιάς, των συνθηκών καλλιέργειας και των μεθόδων επεξεργασίας (Oğraş, 2022). Είναι γεγονός ότι διαφορετικές ποικιλίες ελιάς δίνουν έλαια με διαφορετικές ποσότητες φαινολικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένου του *trans*-σινναμικού οξέος (Oğraş, 2022). Σε μία μελέτη ο Oğraş (2022) παρουσίασε ότι η ποικιλία Memecik εμφάνισε υψηλότερη περιεκτικότητα σε τυροσόλη, βανιλικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ και *trans*-σινναμικό οξύ συγκριτικά με άλλες ποικιλίες (Oğraş, 2022). Εκτός από την ποικιλία του ελαιόδεντρου, οι

τεχνικές εκχύλισης και επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαιόλαδου είναι δυνατό να επηρεάσουν την τελική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Bendini et al., 2007), όπως για παράδειγμα, το ελαιόλαδο ψυχρής έκθλιψης που εξαιτίας της ελάχιστης έκθεσης σε θερμότητα και οξυγόνο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας είναι σε θέση να διατηρήσει υψηλότερα υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένου βέβαια και του trans-σινναμικού οξέος (Bendini et al., 2007; Oğraş, 2022). Η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την παρουσία του trans-σινναμικού οξέος στο ελαιόλαδο μπορεί να βοηθήσει τους παραγωγούς να βελτιστοποιήσουν τις μεθόδους τους, ώστε να αποδίδουν έλαια με υψηλότερες συγκεντρώσεις από trans-σινναμικό οξύ.

Το trans-σινναμικό οξύ ή γνωστό ως και τρανσινναμικό οξύ παίζει ρόλο στην πρόληψη διαφόρων ασθeneιών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιακών παθήσεων, του καρκίνου και των νευροεκφυλιστικών ασθeneιών και βελτιώνει την ποιότητα του ελαιόλαδου, συμβάλλοντας στην καλύτερη γεύση, αλλά και στην αναβάθμιση του αρώματός του. Προσθέτει στη συνολική ποιότητα του ελαίου, βελτιώνει την εμπειρία του χρήστη, όμως εμφανίζεται έντονη μεταβλητότητα της συγκέντρωσής του ανάλογα με την ποικιλία του ελαιόλαδου. Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του, το trans-σινναμικό οξύ εμφανίζει το υδροξυλιωμένο παράγωγο του σινναμικού οξέος, το p-κουμαρικό οξύ που σύμφωνα με τη μελέτη El-Seedi et al., (2018), φαίνεται να έχει βρεθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου, με βάση τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που διαθέτει (El-Seedi et al., 2018). Η παρουσία του τρανσινναμικού οξέος και άλλων φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο μπορεί, επομένως, να συμβάλει στη συνολική αντιοξειδωτική του ικανότητα και στα δυνητικά οφέλη για την υγεία. Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, έχει αποδειχθεί ότι το cis-σινναμικό οξύ ασκεί μεγαλύτερη αντιφυματική δράση από το trans ισομερές του, υποδεικνύοντας πιθανές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Bermúdez-Oria et al., 2024). Επιπλέον, το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο περιέχοντας trans-σινναμικό οξύ συσχετίζεται με τη διέγερση του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος, προσφέροντας πρόσθετες ιδιότητες που προάγουν την υγεία (Romani et al., 2019).

Πειραματική Επεξεργασία

3.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της δυνατότητας και των συνθηκών επίτευξης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο (ν/ε), καθώς και της δυνατότητας ενσωμάτωσης φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου σε αυτά, επιδιώκοντας ταυτόχρονα τη διερεύνηση και την αναπαραγωγή των κολλοειδών σχηματισμών που από τη φύση του περιέχει το παρθένο ελαιόλαδο πρόσφατης παραγωγής.

Με βάση τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθορίστηκαν οι βασικοί άξονες της έρευνας. Ειδικότερα, επιλέχθηκαν οι τεχνολογικές μέθοδοι παρασκευής/ομογενοποίησης (βέλτιστες συνθήκες πειραματικής διαδικασίας), οι κατάλληλες επιφανειοδραστικές ουσίες και η αναλογία τους, καθώς και τα προς ενσωμάτωση φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου.

Αρχικά διερευνήθηκαν οι τεχνικές και οι συνθήκες ομογενοποίησης/παρασκευής που μπορούν να οδηγήσουν στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτώματος με επιθυμητά χαρακτηριστικά (1^η σειρά πειραμάτων). Επιλέχθηκαν δύο τεχνικές, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ως αποτελεσματικότερες για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων: η μία αφορά σε ομογενοποίηση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε διάφορες ταχύτητες περιστροφής, και η δεύτερη σε ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων υψηλής ισχύος, σε διάφορα επίπεδα έντασης ισχύος και σε διάφορους χρόνους έκθεσης. Στόχος ήταν να βρεθεί η βέλτιστη τεχνική ομογενοποίησης και οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας που μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλής σταθερότητας γαλακτώματα με μέση διάμετρο σταγονιδίων μεταξύ 5 και 500 nm (μικρο/νανο-γαλακτώματα).

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη επίτευξης συστημάτων ν/ε μικρο -και νανο-γαλακτωμάτων, με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, χωρίς προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας, αλλά με χρήση μη ιονικών γαλακτωματοποιητών, εγκεκριμένων για τη χρήση τους στην παραγωγή τροφίμων. Ειδικότερα μελετήθηκε η επιφανειοδραστική ικανότητα των Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 20 και Span 80 στις συνθήκες των δοκιμών (2^η σειρά πειραμάτων). Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο επιλέχθηκε ως βάση των πειραματικών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων καθώς είναι ως επί το

πλείστον απαλλαγμένο από αμφιφιλικά μικρο-συστατικά λόγω της εφαρμοζόμενης διαδικασίας εξευγενισμού, και επομένως αποτελεί κατάλληλη βάση για τους σκοπούς της μελέτης.

Για την κατασκευή τριαδικών διαγραμμάτων φάσης με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ελεγχόμενη προσθήκη νερού σε μίγμα ελαίου-γαλακτωματοποιητή (τιτλοδότηση), με σκοπό να προσδιοριστεί το φάσμα των αναλογιών των τριών συστατικών που με ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν μικρο/νανο-γαλάκτωμα. Έπειτα, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με συγκεκριμένες αναλογίες και μελετήθηκε η κινητική και οξειδωτική σταθερότητά τους, καθώς και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μέσο μέγεθος σταγονιδίων, μορφή διασποράς, ζ-δυναμικό, θολότητα, χρώμα).

Στη συνέχεια, με βάση τους αποτελεσματικότερους γαλακτωματοποιητές (Tween 20 και Span 20), σκοπός ήταν να μελετηθεί η ενσωμάτωση των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κερσετίνη, απιγενίνη, trans-σινναμικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, και βανιλικό οξύ στην υδατική φάση, καθώς και η επίδρασή τους στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (3^η σειρά πειραμάτων). Όπως και στη 2^η σειρά πειραμάτων, για τη μελέτη πλαισιώθηκε με κατασκευή ψευδο-τριαδικών διαγραμμάτων φάσης, και με προσδιορισμό της κινητικής και οξειδωτικής σταθερότητας καθώς και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε προκαθορισμένες αναλογίες των τριών συστατικών.

Εν συνεχεία, από τη μελέτη παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με χρήση του γαλακτωματοποιητή Tween 20 σε βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της φύσης του ελαίου στη σταθερότητα και στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της αντίστοιχης μελέτης με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο (4^η σειρά πειραμάτων).

Ακολούθως, σκοπός ήταν η εκτεταμένη μελέτη της κινητικής και οξειδωτικής σταθερότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο και το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με γαλακτωματοποιητή Tween 20, και προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου (γαλλικό, βανιλικό και συριγγικό οξύ) στην υδατική φάση (5^η σειρά πειραμάτων), που πλαισιώθηκε με προσδιορισμό ακόμη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των παρασκευαζόμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων καθώς και της επιφανειακής τάσης των επιμέρους φάσεων.

Τέλος, τέθηκε ως σκοπός η αριστοποίηση της σταθερότητας και των άλλων ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με γαλακτωματοποιητή Tween 20 ως προς τις παραμέτρους 1) αναλογία γαλακτωματοποιητή και 2) αναλογία φαινολικού συστατικού του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ) (6^η σειρά πειραμάτων).

Η εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

3.2 Υλικά, συσκευές και μέσα για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων

3.2.1 Υλικά

3.2.1.1 Έλαια

Τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ως βάσεις των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ήταν εξευγενισμένο ελαιόλαδο και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Προσφέρθηκαν από την εταιρεία Μινέρβα Α.Ε.

3.2.1.2 Γαλακτωματοποιητές

- Μονολαυρική πολυοξαιθυλενο-σορβιτάνη (Tween 20) (HLB=16,7) (PubChem CID: 443314),
- μονοπαλμιτική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Tween 40) (HLB=15,6),
- μονοστεατική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Tween 60) (HLB=14,9),
- μονοελαϊκή πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Tween 80) (HLB=4,3) (PubChem CID: 86289060),
- μονολαυρική σορβιτάνη (Span 20) (HLB=8,6) και
- μονοελαϊκή σορβιτάνη (Span 80) (HLB=4,3) και προμηθεύτηκαν από την Across Organics (New Jersey, USA).

3.2.1.3 Φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου προς ενσωμάτωση στην υδατική φάση

- Γαλλικό οξύ (gallic acid) (PubChem CID: 370), 98%, Across Organics (New Jersey, USA).
- Βανιλικό οξύ (vanilic acid) (PubChem CID: 8468), 98%, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Συριγγικό οξύ (syringic acid) (PubChem CID: 10742), 92%, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Κερσετίνη (quercetin) (PubChem CID: 5280343), 95%, Fluka BioChemika (Switzerland).
- Απιγενίνη (apigenin) (PubChem CID: 5280443), 98%, Fluka BioChemika (Switzerland).
- Trans-Σινναμικό οξύ (trans-cinamic acid) (PubChem CID: 444539), 98%, Fluka BioChemika (Switzerland).

Αναλυτικής καθαρότητας

3.2.1.4 Άλλα αντιδραστήρια και διαλύτες

- Οξικό οξύ
- Χλωροφόρμιο
- Ιωδιούχο κάλιο
- Μεθανόλη
- Ανθρακικό νάτριο
- Θειοθειικό νάτριο 0,01N
- Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu
- Νερό απιονισμένο αγωγιμότητας <5S/cm

3.2.2 **Συσκευές και μέσα**

- Ομογενοποιητής CAT Unidrive 1000 homogenizer (CAT Scientific, Ca., USA)
- Συσκευή υπερήχων VC750 Vibracell[®] (Sonics & Materials, Inc, USA) με κυλινδρικό στέλεχος από κράμα τιτανίου Ti-6Al-4V (L: 136mm, D: 13mm)
- Συσκευή Δυναμικής Σκέδασης Φωτός - Dynamic Light Scattering DLS (Zetasizer nano-zs 2000, Malvern Instruments Ltd, UK)
- Υδατόλουτρο Lauda RE312, (GmbH, Germany)
- Αντιδραστήρας οξείδωσης “Oxitest[®]” (oxidation reactor, Velp Scientifica, Usmate, Milan, Italy)
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V)
- Τενσιόμετρο (Sigma 700, Biolin Scientific AB, Espoo, Finland)
- Χρωματόμετρο (Minolta CR/200, Minolta Company, Chuo-ku, Osaka, Japan)
- Ρεόμετρο RC1 Rheotek (Messtechnik GmbH, Germany).
- Διαθλασίμετρο (B&C 32400 ABBE)
- Θερμοθάλαμος επώασης Bekso EB 1N, Bekso, Brussels, Belgium ικανός να διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία στην περιοχή 20- 90^o C με ανοχή $\pm 1^{\circ}$ C
- Ηλεκτρονικός ζυγός (620C, Precisa Instruments, Switzerland)
- Αναδευτήρας Vortex

3.3 Πειραματική διαδικασία

3.3.1 Λήψη δεδομένων για σχεδίαση διαγραμμάτων φάσης

Η ακόλουθη διεργασία εφαρμόστηκε στις σειρές των δοκιμών 2 και 3. Δεν εφαρμόστηκε στις επόμενες σειρές, επειδή τα δεδομένα που παρήχθησαν ήταν επαρκή για τον σκοπό για τον οποίο έγιναν.

Σε ορισμένη ποσότητα ελαιόλαδου, το οποίο διατηρείτο στους 40 °C σε υδατόλουτρο, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα γαλακτωματοποιητή, ώστε η τελική ποσότητα του μίγματος να είναι 80 g. Το μίγμα τέθηκε σε ανάμιξη με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (§ 3.2.2) σε 12.000 rpm για 10 min. Μετά το πέρας των 10 min, οπότε είχε επέλθει θερμοκρασιακή ισορροπία, προστέθηκε ελεγχόμενα και με προχοΐδα στάγδην η υδατική φάση, με διαδικασία τιτλοδότησης, μέχρις εμφάνισης με οπτική παρατήρηση, κάτω από λευκό φως λάμπας πυράκτωσης, ενός στοιχειώδους σταθερού θολώματος. Ο ρυθμός προσθήκης της υδατικής φάσης διατηρήθηκε σταθερός στα 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ υπό συνεχή ανάδευση. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων κατά την ομογενοποίηση. Ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα είναι ανεπιθύμητος, επειδή οδηγεί σε ψευδή αποτελέσματα, ως προς το μέγεθος και τη διασπορά των σωματιδίων, σε αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος και σε διάλυση οξυγόνου στο μίγμα, με συνέπεια την προώθηση της οξειδωσής του.

Ως υδατική φάση χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό ή/και παρασκεύασμα αποτελούμενο από απιονισμένο νερό στο οποίο είχαν αναμιχθεί φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (§ 3.2.1) σε αναλογία 1% w/w για 12 h πριν την ενσωμάτωσή της στα μικρο/νανο-γαλακτώματα.

Έτσι μελετήθηκε εξαντλητικά η συμπεριφορά των γαλακτωματοποιητών και των φαινολικών του ελαιόλαδου συστατικών που επιλέχθηκαν, με δοκιμές που επαναλήφθηκαν με διάφορες περιεκτικότητες γαλακτωματοποιητή για κάθε γαλακτωματοποιητή και για κάθε υδατική φάση. Με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν από την πειραματική διαδικασία σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα φάσης.

3.3.2 Παρασκευή γαλακτωμάτων με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα παρασκευάστηκαν με προκαθορισμένες αναλογίες ελαίου - γαλακτωματοποιητή - νερού, που προέκυψαν από τη μελέτη των διαγραμμάτων φάσης, τα οποία σχεδιάστηκαν με τις δοκιμές της § 3.3.1. Το ελαιόλαδο αναμίχθηκε με την επιθυμητή ποσότητα γαλακτωματοποιητή (αναλογίες: 0, 2, 4, 6, 8, 10% w/w γαλακτωματοποιητή/τελικό μίγμα), στους 40°C για 10 min και ακολούθως προστέθηκε η υδατική φάση (2% w/w τελικού μίγματος) στο μίγμα στάγδην (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) υπό συνεχή ανάδευση (8.000, 10.000 και 12.000 rpm). Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης της υδατικής φάσης το μίγμα ομογενοποιήθηκε για 10 ή 20 min επιπλέον στις ίδιες συνθήκες. Τα

δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία στους 25 °C σε σκοτεινό χώρο για 24 h πριν τη διεξαγωγή των αναλύσεων.

3.3.3 Παρασκευή γαλακτωμάτων με ομογενοποιητή υπερήχων

Η ομογενοποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με υπέρηχους πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή υπερήχων VC750 Vibracell[®] (3.2.2.2) με κυλινδρικό στέλεχος από κράμα τιτανίου Ti-6Al-4V (L: 136mm, D: 13mm) που βυθιζόταν στο μίγμα κατά 2,5cm. Αρχικά ομογενοποιήθηκε το έλαιο με τον γαλακτωματοποιητή για 10 min, και στη συνέχεια προστέθηκε η υδατική φάση στάγδην υπό συνεχή λειτουργία με ρυθμό 100 μL/min. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης της υδατικής φάσης το μίγμα ομογενοποιήθηκε για 10 ή 20 min επιπλέον. Η συχνότητα των υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20 kHz και η ένταση της ισχύος τους 150, 225 και 300 W.

3.3.4 Πειράματα επιταχυμένης οξείδωσης

Για τη μελέτη της οξειδωσιμότητας των παρασκευασμάτων επιλέχτηκαν δύο μέθοδοι επιταχυμένης οξείδωσης. Η πρώτη περιελάμβανε την τοποθέτηση των δειγμάτων στο θερμοθάλαμο επώασης (§ 3.2.2), στους 40 °C, για 40 ημέρες με εξέταση του δείκτη υπεροξειδίων ανά 5 ημέρες. Η δεύτερη μεθοδολογία περιλάμβανε την τοποθέτηση των δειγμάτων στο θερμοθάλαμο στους 60 °C για 20 ημέρες με λήψη δείγματος κάθε 4 ημέρες για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων και των συνολικών φαινολικών συστατικών.

3.4 Αναλύσεις - Μέθοδοι

3.4.1 Μέτρηση σταθερότητας

Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο προσδιορίστηκε με βάση το ρυθμό διαχωρισμού τους σε φάσεις. Βαθμονομημένοι γυάλινοι σωλήνες των 20 mL, κλεισμένοι με εσφυρισμένο πώμα και με περιεχόμενο 20 mL παρασκευασμένου γαλακτώματος τοποθετήθηκαν στο θερμοθάλαμο (§ 3.2.2), όπου αφέθηκαν σε ηρεμία για 8 εβδομάδες στους 25°C. Μετά την παρέλευση του επιλεγμένου χρόνου, οπότε είχε εκδηλωθεί διαχωρισμός φάσεων, μετρήθηκαν τα ύψη των διαχωριζόμενων στοιβάδων στο πάνω μέρος της στήλης του γαλακτώματος και στο κάτω μέρος της στήλης. Ο δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%) υπολογίστηκε με βάση τα μεγέθη HC, HS και το ολικό ύψος της στήλης του γαλακτώματος HE και συγκεκριμένα ως ποσοστό του ολικού ύψους γαλακτώματος:

$$ESI(\%) = 100 \times \left[\frac{HE - (HS + HC)}{HE} \right] \quad (3-1)$$

Όπου:

HE: Ολικό ύψος της στήλης του μίγματος,

HS: Ύψος της ανώτερης διαχωριζόμενης στοιβάδας (λιπαρή),

HC: Ύψος της κατώτερης διαχωριζόμενης στοιβάδας

3.4.2 Προσδιορισμός μεγέθους σταγονιδίων, διασποράς και ζ-δυναμικού γαλακτώματος

Το μέγεθος των σταγονιδίων, η κατανομή του μεγέθους τους καθώς και το ζ-δυναμικό των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο προσδιορίστηκε με Δυναμική Σκέδασης Φωτός - Dynamic Light Scattering DLS (Zetasizer nano-zs 2000, Malvern Instruments Ltd, UK). Οι μετρήσεις έγιναν στα 488nm, στους 25°C. Οι τιμές του ζ-δυναμικού υπολογίστηκαν από την εξίσωση Helmholtz-Smoluckowski:

$$v_{av} = -E_z \cdot \epsilon_r \cdot \epsilon_o \cdot \zeta \cdot \mu^{-1} \quad (3-2)$$

Όπου:

v_{av} είναι η μέση ηλεκτροστατική ταχύτητα ροής (m/s),

E_z είναι το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο (V/m),

ϵ_r είναι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου,

ϵ_o είναι η διαπερατότητα του κενού ($8.85 \cdot 10^{-12}$ F/m),

ζ είναι το ζ-δυναμικό του επίπεδου διάτμησης (V) και

μ είναι το δυναμικό ιξώδες (kg/(m·s)).

3.4.3 Προσδιορισμός θολότητας

Η θολότητα των γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο προσδιορίστηκε με θολοσίμετρο (HACH 2100N) στους 25 °C ως μέτρο της διασποράς και του μεγέθους των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης.

3.4.4 Προσδιορισμός ρεολογικής συμπεριφοράς

Η ρεολογική συμπεριφορά των δειγμάτων ελέγχθηκε με το ρεόμετρο RC1 Rheotek (Messtechnik GmbH, Germany). Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Cc48. Οι μετρήσεις των δειγμάτων έγιναν στους 25 °C με τη βοήθεια υδατόλουτρου (Lauda RE312, GmbH, Germany).

3.4.5 Προσδιορισμός δείκτη διάθλασης γαλακτώματος με βάση το ελαιόλαδο

Ο δείκτης διάθλασης των γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε με χρήση διαθλασίμετρου (B&C 32400 ABBE) σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε αναγωγή των τιμών στους 25 °C.

3.4.6 Προσδιορισμός χρώματος

Το χρώμα των γαλακτωμάτων μετρήθηκε με χρήση χρωματόμετρου (Minolta CR/200, Minolta Company, Chuo-ku, Osaka, Japan), το οποίο αποδίδει τις τιμές των χρωματικών παραμέτρων L^* , a^* , b^* βάσει του συστήματος CIELAB. Η τιμή του χρώματος προκύπτει με βάση την εξίσωση (3-1). Το L^* εκφράζει τη φωτεινότητα του χρώματος. Οι τιμές των a^* , b^* ερμηνεύονται ως εξής: η θετική τιμή για το a^* υποδεικνύει κόκκινο χρώμα, ενώ η αρνητική τιμή πράσινο χρώμα, θετική τιμή για το b^* υποδεικνύει κίτρινο χρώμα, ενώ η αρνητική τιμή μπλε χρώμα.

$$E = \sqrt{a^2 + b^2 + L^2}$$

(Εξίσωση 3-1)

3.4.7 Μέτρηση Επιφανειακής τάσης

Ο προσδιορισμός της τιμής της επιφανειακής τάσης της υδατικής φάσης, όπως αυτή ορίστηκε στην § 3.3.1 και της συνεχούς φάσης, δηλαδή του μίγματος ελαίου και γαλακτωματοποιητών, διεξήχθη στους 25 °C, με τη μέθοδο δακτυλίου du Nouy και χρήση τενσιόμετρου (Sigma 700, Biolin Scientific AB, Espoo, Finland). Ο χρόνος εξισορρόπησης ήταν 15 min όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή του οργάνου.

3.4.8 Προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίων (Α.Υ.)

Ο Αριθμός Υπεροξειδίων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο AOCS CD8-53, όπως τροποποιήθηκε από τους (O'Keefe and Pike, 1994). Ποσότητα 5 g από κάθε γαλάκτωμα διαλύθηκε σε 30 mL μίγματος χλωροφορμίου/οξικού οξέος (2:3 v/v). Στη συνέχεια, προστέθηκε στο μίγμα 1 mL κορεσμένου υδατικού διαλύματος ιωδιούχου καλίου, παρασκευασμένου αμέσως πριν από τη δοκιμή. Ακολούθησε συνεχής ανάδευση του μίγματος επί 1min. Κατόπιν προστέθηκαν 30 mL απιονισμένου νερού, ακολούθησε σύντομη και έντονη ανάδευση και άμεση ογκομέτρηση του απελευθερούμενου ιωδίου με πρότυπο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου 0,01N χρησιμοποιώντας διάλυμα αμύλου ως δείκτη.

Πριν από κάθε μέτρηση εκτελέστηκε τυφλός προσδιορισμός για την αξιολόγηση της κατάστασης των αντιδραστηρίων. Ο Α.Υ. των δειγμάτων είναι εκφρασμένος σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg γαλακτώματος ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$):

$$A.Y. = \frac{V \times T \times 1000}{m} \quad \text{Εξίσωση 3-2}$$

Όπου:

V, ο όγκος του καταναλωθέντος θειοθειικού νατρίου, αφαιρουμένου του όγκου του τυφλού σε mL,
T, ο ακριβής τίτλος του διαλύματος του θειοθειικού νατρίου και
m, η ακριβής μάζα του γαλακτώματος σε g.

3.4.9 Προσδιορισμός ολικών Φαινολικών Συστατικών (ΟΦΣ)

Τα Ολικά Φαινολικά Συστατικά (ΟΦΣ) των παρασκευασμένων γαλακτωμάτων προσδιορίστηκαν βάσει της φωτομετρικής μεθόδου Folin–Ciocalteu σύμφωνα με τους (Fuentes *et al.*, 2012). Ποσότητα 2,500 g από το κάθε δείγμα αναμίχθηκαν με 5 mL εξάνιο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3mL μίγματος μεθανόλης/νερού (60:40 v/v) και το μίγμα αναμίχθηκε με χρήση vortex για 2 min. Η λιπαρή και η υδρομεθανολική φάση διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση (3500 rpm για 10 min). Η διαδικασία επαναλήφθηκε στη λιπαρή φάση με 2 mL μίγματος μεθανόλης/νερού (60:40 v/v). Τα δύο εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν σε εσμυρισμένο γυάλινο σωλήνα των 10 mL, στον οποίο προστέθηκε ποσότητα διαλύτη, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος να είναι 6,00 mL. Σε ογκομετρικό φιαλίδιο των 5 mL προστέθηκαν 0,20 mL από το συνολικό εκχύλισμα καθώς και 2,3 mL απιονισμένου νερού και 0,25 mL αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu. Μετά από 3 min ανάδευσης προστέθηκε στο μίγμα 0,5 mL κορεσμένου και διηθημένου ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Κατόπιν προστέθηκε απιονισμένο νερό έως συνολικού όγκου 5 mL, και το μίγμα αναδεύθηκε με χρήση vortex. Στη συνέχεια το δείγμα αφήθηκε για 2 h σε ηρεμία, σε σκοτεινό χώρο. Παράλληλα παρασκευάστηκε τυφλό δείγμα με χρήση 0,2 mL απιονισμένου νερού αντί για μεθανολικό εκχύλισμα. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος με φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V) στα 765 nm σε κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm με χρήση του τυφλού ως διάλυμα αναφοράς (blank).

Σχεδίαση καμπύλης αναφοράς: Ζυγίστηκαν 100,0 mg γαλλικού οξέος (3.2.1.3), αναλυτικής καθαρότητας και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ακολούθησε διάλυση με απιονισμένο νερό, συμπλήρωση μέχρι χαραγής και ομογενοποίηση με ανακίνηση (διάλυμα 1 mg/mL). Από το διάλυμα αυτό προστέθηκαν με προχοϊδα σε φιάλες των 100 mL όγκοι ίσοι με 1,0 – 2,0 – 5,0 – 7,5 – 10,0

mL και οι φιάλες συμπληρώθηκαν με απιονισμένο νερό. Τα διαλύματα που προέκυψαν είχαν συγκεντρώσεις σε γαλλικό οξύ αντίστοιχα ίσες με 10 – 20 – 50 – 75 – 100 mg GAE /L. Ελήφθησαν 0,2 mL από κάθε φιάλη και υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία όπως τα 0,20 g του εκχυλίσματος. Ως διάλυμα αναφοράς (blank) χρησιμοποιήθηκε το ίδιο με το οποίο ελήφθη η απορρόφηση του εκχυλίσματος. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν εις τριπλούν. Με βάση τις ληφθείσες τιμές απορρόφησης σχεδιάστηκε η καμπύλη αναφοράς $abs/[mg\ GAE/L]$, της οποίας η εξίσωση ήταν:

$$ABS = 0,0028 * C - 0,0006 \quad (\text{Εξίσωση 3-3})$$

με $R^2 = 0,9989$, όπου C η συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος σε mg GAE /L, από το οποίο ελήφθησαν τα 0,2 mL και ABS η αντίστοιχη απορρόφηση του παρασκευάσματος.

Έκφραση αποτελεσμάτων: Τα ολικά φαινολικά συστατικά του γαλακτώματος εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος mg GAE/kg γαλακτώματος και προκύπτουν από τη συσχέτιση της μετρηθείσας απορρόφησης (Abs), όπως αναφέρθηκε ως άνω, με την ευρεθείσα εξίσωση της καμπύλης:

$$O. \Phi. \Sigma. = \frac{6}{2,5} \times \frac{Abs+0,0006}{0,0028} \text{ mg GAE/kg γαλακτώματος} \quad (\text{Εξίσωση 3-4})$$

3.4.10 Προσδιορισμός οξειδωτικής σταθερότητας

Η μέτρηση οξειδωτικής σταθερότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους (Verardo *et al.*, 2013), χρησιμοποιώντας ταχεία μέθοδο αξιολόγησης με τη συσκευή “Oxitest®” oxidation reactor, Velp Scientifica, Usmate, Milan, Italy. Σύμφωνα με αυτήν, το υπό εξέταση δείγμα κλείνεται ερμητικά σε θάλαμο της συσκευής, ο οποίος πληρούται εφάπαξ με οξυγόνο σε υψηλή πίεση και σε υψηλή σταθερή θερμοκρασία. Η οξείδωση των συστατικών του δείγματος προκαλεί δέσμευση και ελάττωση του αερίου οξυγόνου, με συνέπεια την πτώση της πίεσης στο θάλαμο. Η μεταβολή της πίεσης συναρτάται ευθέως με την οξειδωσιμότητα του δείγματος. Για τις δοκιμές της έρευνας ζυγίζονταν 5,4 g από κάθε δείγμα σε υποδοχείς της συσκευής και τοποθετούνταν στο θάλαμο του οργάνου. Ακολουθούσε σφράγιση του θαλάμου, ρύθμιση της θερμοκρασίας σε 90 °C και πλήρωση με οξυγόνο καθαρότητας 99.9999% υπό πίεση 6 Atm. Η πίεση του θαλάμου παρακολουθείτο και καταγράφονταν αυτόματα καθ’ όλη τη διάρκεια της δοκιμής μέσω του λογισμικού του οργάνου OXIsoft™. Η οξείδωση των συστατικών του δείγματος οδήγησε σε πτώση της αρχικής πίεσης, ελάχιστη κατ’ αρχή, απότομη στη συνέχεια, και ομαλή στο τέλος, αποτυπώθηκε δε σε αντίστοιχη καμπύλη μεταβολής της πίεσης συναρτήσει του χρόνου. Ο χρόνος που αντιστοιχεί στο πρώτο τμήμα της καμπύλης είναι ο χρόνος που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί το αρχικό στάδιο της οξείδωσης, δηλαδή μέχρι το σημείο επαγωγής (Induction Point – IP(h)).

Ενδεικτικά, για πληρέστερη κατανόηση, παρατίθεται το αποτέλεσμα μιας τυπικής δοκιμής:

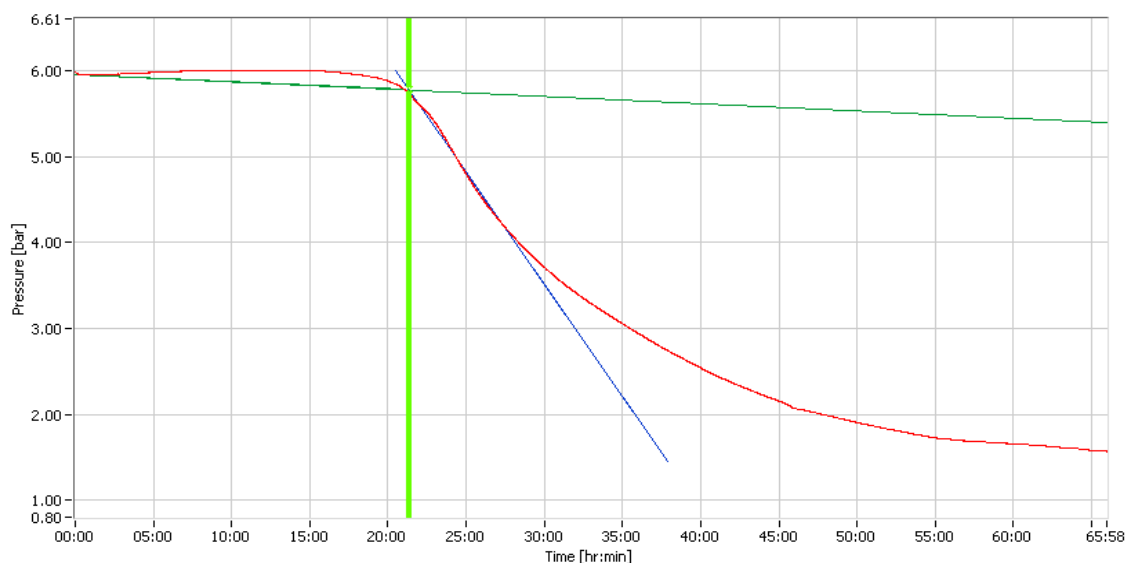
Velp Scientifica - Oxitest 2.0



Test Report

Test conditions	
Oxitest identification:	0123769 (Reactor A)
Operator:	Vaso
Start Time:	11/03/11 - 16:40:03
Sample Name:	0%tween40
Quantity:	6.000 g
Notes:	
Sampling time:	1min 0sec
Temperature set point:	90.0 °C
Pressure set point:	6.00 bar

Results	
Induction Period (IP):	21hr 20min (Graphical method)
Test duration:	93hr 15min
Curve 1:	$Y = -0.009X + 5.96$
Curve 2:	$Y = -0.262X + 11.36$
Comments:	



3.4.11 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα των μετρήσεων προέκυψαν ως μέση τιμή τριών επαναλήψεων. Πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με χρήση του λογισμικού STATISTICA v. 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), και χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test, προκειμένου να καθοριστεί η επίδραση των ανεξάρτητων πειραματικών μεταβλητών

στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Επίσης, εφαρμόστηκε η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principle Component Analysis – PCA), η Ανάλυση Ομαδοποίησης (Cluster Analysis) καθώς και η συσχέτιση (correlation) μεταξύ μεταβλητών, εκτιμώντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (r) κατά Pearson (Pearson correlation coefficient, r). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης με χρήση της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης (RSM).

3.5 Σχεδιασμός πειραμάτων

Στον Πίνακα 3.1 περιγράφεται ο σχεδιασμός των πειραμάτων παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Δίνονται πληροφορίες για τις αναλογίες υπό τις οποίες αναμίχθηκαν το έλαιο ο γαλακτωματοποιητής και το νερό με τα βιοδραστικά συστατικά καθώς και οι αναλύσεις ή μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 3.1 Σειρές πειραμάτων

A/A	Σειρά πειραμάτων
1	Μελέτη της επίδρασης των μεθόδων ομογενοποίησης στις ιδιότητες μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο
	<p>Μελετήθηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με χρήση του γαλακτωματοποιητή Tween 20 (4% w/w τελικού γαλακτώματος) και 2% w/w υδατική φάση - Μελέτη επίδρασης τεχνικής ομογενοποίησης (Υπέρηχοι ή ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας σε διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας (150, 225, 300 W και 8000, 10000, 120000 rpm αντίστοιχα) και χρόνου ομογενοποίησης (10 ή 20 min)
2	Προσδιορίστηκαν:
	<ul style="list-style-type: none"> - Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος - Μέση διάμετρος σταγονιδίων - Δείκτης πολυδιασποράς - ζ-Δυναμικό - Θολότητα - Χρώμα
2	Μελέτη της επίδρασης του είδους και της αναλογίας γαλακτωματοποιητή στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο
	Μελετήθηκαν:

	<ul style="list-style-type: none"> - Επίδραση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή μικρο/νανο-γαλακτώματος - Επίδραση του είδους του γαλακτωματοποιητή (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 20 και Span80) - Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με γνωστές αναλογίες νερού (2% w/w τελικού γαλακτώματος) και γαλακτωματοποιητή (0, 2, 4, 6, 8 και 10% w/w τελικού γαλακτώματος) - Οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε συνθήκες επιταχυμένης οξείδωσης
	<p>Προσδιορίστηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Τριαδικά διαγράμματα φάσης ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων - Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος - Μέση διάμετρος σταγονιδίων - Δείκτης πολυδιασποράς - ζ-Δυναμικό - Θολότητα - Χρώμα - Ρεολογικά χαρακτηριστικά - Δείκτης διάθλασης - Οξειδωτική σταθερότητα (Αριθμός Υπεροξειδίων)
3	<p>Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο και ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου</p> <p>Μελετήθηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Επίδραση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή μικρο/νανο-γαλακτώματος - Επίδραση του είδους γαλακτωματοποιητή (Tween 20, και Span 20) - Επίδραση της ενσωμάτωσης φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, κερσετίνη, απιγενίνη, trans-σινναμικό οξύ) σε αναλογία 1% w/w της υδατικής φάσης - Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με γνωστές αναλογίες νερού (2% w/w τελικού γαλακτώματος) και γαλακτωματοποιητή (0, 2, 4, 6, 8 και 10% w/w τελικού γαλακτώματος) για κάθε φαινολικό συστατικό - Οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε συνθήκες επιταχυμένης οξείδωσης <p>Προσδιορίστηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Τριαδικά διαγράμματα φάσης ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

	<ul style="list-style-type: none"> - Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος - Μέση διάμετρος σταγονιδίων - Δείκτης πολυδιασποράς - ζ-Δυναμικό - Θολότητα - Χρώμα - Ρεολογικά χαρακτηριστικά - Δείκτης διάθλασης - Οξειδωτική σταθερότητα (Αριθμός Υπεροξειδίων)
	<p>Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο και εξευγενισμένο ελαιόλαδο</p>
	<p>Μελετήθηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Επίδραση της συνεχούς φάσης στις ιδιότητες των γαλακτωμάτων - Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με γνωστές αναλογίες νερού (2% w/w τελικού γαλακτώματος) και γαλακτωματοποιητή Tween 20 (0, 2, 4, και 6% w/w τελικού γαλακτώματος) διατηρησιμότητας γαλακτωμάτων με αναλογία νερού 2%, αναλογίες γαλ/τή 4,6% - Μελέτη οξειδωτικής σταθερότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε συνθήκες επιταχυσμένης οξείδωσης
4	<p>Προσδιορίστηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος - Μέση διάμετρος σταγονιδίων - Δείκτης πολυδιασποράς - ζ-Δυναμικό - Θολότητα - Χρώμα - Ρεολογικά χαρακτηριστικά - Δείκτης διάθλασης - Οξειδωτική σταθερότητα (Αριθμός Υπεροξειδίων)
	<p>Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο και εξευγενισμένο ελαιόλαδο με ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου</p>
5	<p>Μελετήθηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Επίδραση της ενσωμάτωσης φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, βανιλικό οξύ) σε αναλογία 1% w/w της υδατικής φάσης

	<ul style="list-style-type: none"> - Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με γνωστές αναλογίες νερού (2% w/w τελικού γαλακτώματος) και γαλακτωματοποιητή, Tween 20 (0, 2, 4, και 6% w/w τελικού γαλακτώματος) για κάθε φαινολικό συστατικό - Οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε συνθήκες επιταχυμένης οξείδωσης - Επίδραση των φαινολικών συστατικών και του γαλακτωματοποιητή στην επιφανειακή τάση των επιμέρους φάσεων
	<p>Προσδιορίστηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος - Μέση διάμετρος σταγονιδίων - Δείκτης πολυδιασποράς - Θολότητα - Οξειδωτική σταθερότητα (Αριθμός Υπεροξειδίων, Oxitest, Ολικά Φαινολικά Συστατικά) - Επιφανειακή τάση επιμέρους φάσεων
6	<p>Αριστοποίηση σταθερότητας και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με χρήση της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης</p> <p>Μελετήθηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween 20 σε αναλογίες 2, 4 και 6% w/w και νερό σε αναλογία 2% w/w. Στην υδατική φάση ενσωματώθηκε γαλλικό οξύ σε αναλογίες 0, 0,5 ,1% w/w - Επίδραση της αναλογίας φαινολικού συστατικού στην επιφανειακή τάση της υδατικής φάσης. <p>Προσδιορίστηκαν:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος - Μέση διάμετρος σταγονιδίων - Δείκτης πολυδιασποράς - Θολότητα

Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.1 1^η σειρά πειραμάτων: Μελέτη της επίδρασης των μεθόδων ομογενοποίησης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο

Όπως έχει αναφερθεί, τα γαλακτώματα είναι μίγματα δύο ή περισσότερων μη αναμίξιμων υγρών εκ των οποίων το ένα είναι διεσπαρμένο στο άλλο υπό τη μορφή μικρών σταγονιδίων, που επιφανειακά φέρουν διαχωριστική στοιβάδα, στο σχηματισμό της οποίας συμμετέχει απαραίτητα ένα επιφανειοδραστικό συστατικό. Τα κοινά γαλακτώματα έχουν μέσο μέγεθος σταγονιδίων μεγαλύτερο από 500 nm και είναι θερμοδυναμικά ασταθή. Ωστόσο τα μικρο/νανο-γαλακτώματα, λόγω του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων τους (5-500 nm), χαρακτηρίζονται από εξαιρετική κινητική σταθερότητα. Το μικρό μέγεθος σταγονιδίων αυξάνει τη σταθερότητα του γαλακτώματος, επειδή με την ελάττωση του μεγέθους τους οι μεγαλύτερες ταχύτητες που αποκτούν τα σωματίδια, κινούμενα προς κάθε κατεύθυνση στο χώρο λόγω κίνησης Brown, υπερσχύουν της κίνησής τους λόγω του βάρους τους, το οποίο εν τω μεταξύ με την ελάττωση του μεγέθους τους έχει μειωθεί. Το αποτέλεσμα είναι να παρεμποδίζεται ο βαρυτικός διαχωρισμός τους, είτε αυτός γίνεται προς τα άνω (μικρότερη πυκνότητα της διασπαρμένης ουσίας από αυτή του μέσου διασποράς), είτε προς τα κάτω (μεγαλύτερη πυκνότητα), ακόμη και σε παρατεταμένη αποθήκευση (McClements, 2016a). Επιπλέον τα μικρο-και μικρο/νανο-γαλακτώματα χαρακτηρίζονται από υψηλή οπτική καθαρότητα. Με τις ιδιότητες αυτές καθίστανται κατάλληλα ως μέσα για τη διαλυτοποίηση μη υδατοδιαλυτών συστατικών, όπως στα συστήματα χορήγησης ελεγχόμενης απελευθέρωσης μη διαλυτών θρεπτικών συστατικών, αρωμάτων και χρωστικών στα τρόφιμα (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Για την παρασκευή των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων απαιτείται είτε μεγάλη παροχή ενέργειας, είτε προσθήκη μεγάλης συγκέντρωσης επιφανειοδραστικών συστατικών, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό μέγεθος σταγονιδίων (McClements, 2015b). Ωστόσο, πολλές επιφανειοδραστικές ουσίες δεν επιτρέπονται σε τρόφιμα, ενώ άλλες μπορούν να προστεθούν μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Ως αποτέλεσμα, η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ομογενοποίησης είναι σημαντική στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η απαραίτητη συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή. Διάφορες τεχνικές γαλακτωματοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτό το πλαίσιο, στο οποίο εντάσσονται ομογενοποιητές υψηλής πίεσης, ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας κολλοειδείς μύλοι, και ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων (McClements, 2012). Από τις τεχνικές αυτές κρίθηκε ότι η χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και η χρήση υπερήχων παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ερευνητικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Οι ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας αξιοποιούν τη διατμητική τάση που αναπτύσσεται μεταξύ των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης και του αναμίκτη για την επίτευξη της ομογενοποίησης (McClements, 2016). Οι υπέρηχοι υψηλής έντασης ισχύος είναι ικανοί να τροποποιήσουν τις ιδιότητες του υλικού μέσω του οποίου διαδίδονται, δημιουργώντας μεγάλη αύξηση πίεσης, θερμοκρασίας και διατμητικής τάσης, προκαλώντας φαινόμενα σπηλαιώσης (Zhou *et al.*, 2021). Η εφαρμογή των υπερήχων σε γαλακτώματα μειώνει κατά πολύ το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης, και κατά συνέπεια προκαλεί ομογενοποίηση (Abismaïl *et al.*, 1999).

Η 1^η σειρά πειραμάτων αφορά στη διερεύνηση των τεχνικών και συνθηκών ομογενοποίησης που μπορούν να οδηγήσουν στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτώματος με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Εξετάστηκε η ομογενοποίηση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε διαφορετικές ταχύτητες περιστροφής (8.000, 10.000, και 12.000 rpm) και η ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων υψηλής έντασης σε διαφορετικές εντάσεις (150, 225, και 300 W) για δύο διαφορετικούς χρόνους (10, 20 min). Στόχος ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της τεχνικής και των συνθηκών ομογενοποίησης στη διαμόρφωση, τη σταθερότητα και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Ως γαλακτωματοποιητής, επιλέχθηκε ο Tween 20 (μονολαυρική πολυοξυαιθυλενο σορβιτάνη), σε συγκέντρωση 4% w/w ολικού γαλακτώματος, λόγω της σταθερότητάς του και της καταλληλότητάς του ως συστατικό τροφίμων (Gorjian, Mihankhah and Khaligh, 2022). Η υδατική φάση αποτελείτο από απιονισμένο νερό και προστέθηκε σε αναλογία 2% w/w ολικού γαλακτώματος. Η προσθήκη συν-επιφανειοδραστικού συστατικού αποφεύχθηκε κατά την παρασκευή των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Αλκοόλες μεσαίου μήκους αλυσίδας και σε μικρότερο βαθμό, αμίνες και οξέα έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ως συν-επιφανειοδραστικές ουσίες, λόγω της ικανότητάς τους να μειώνουν την επιφανειακή τάση της διπλοστοιβάδας και το ιζώδες του γαλακτώματος. Ωστόσο, δεν είναι όλες οι συν-επιφανειοδραστικές ουσίες εγκεκριμένες για ανθρώπινη κατανάλωση, καθώς ορισμένες εξ αυτών ενδέχεται να εκδηλώσουν τοξικότητα και να προκαλέσουν ερεθισμό (Cho *et al.*, 2008). Επιπλέον, είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε αποσταθεροποίηση του μικρο/νανο-γαλακτώματος κατά την αραίωση, λόγω μετάπτωσης της συν-επιφανειοδραστικής ουσίας από τη διεπιφάνεια στη συνεχή φάση (Aswathanarayan and Vittal, 2019c).

Οι ιδιότητες που μελετήθηκαν αφορούσαν τόσο στη διερεύνηση της ικανότητας των τεχνικών να οδηγήσουν σε επιτυχή παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτώματος, όσο και στον προσδιορισμό της σταθερότητας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των παρασκευασμένων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε ο δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος, η μέση διάμετρος σταγονιδίων, ο δείκτης πολυδιασποράς, το ζ-δυναμικό, η θολότητα και το χρώμα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

4.1.1 Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)

Τα εμπορικά γαλακτώματα είναι σημαντικό να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και σταθερά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Για το λόγο αυτόν, εξετάστηκε η σταθερότητα των συστημάτων και ειδικότερα η επίδραση του χρόνου στο Δείκτη Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), όπως αυτός ορίστηκε στην § 3.4.1. Παρατηρήθηκε και μελετήθηκε η κατά περίπτωση μείωση του δείκτη σταθερότητας των γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης για 2 μήνες στους 25 °C, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις υπήρξε σημαντική ($P < 0,05$). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της εξέτασης τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την τεχνική ομογενοποίησης που εφαρμόστηκε, την ένταση που ασκήθηκε σε κάθε δείγμα και το χρόνο έκθεσης εκάστου ($P < 0,05$). Στα συμπεράσματα που προέκυψαν περιλαμβάνονται τα εξής:

Ο δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος επηρεάζεται σημαντικά από την τεχνική και την ένταση της ομογενοποίησης ($P < 0,05$). Τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν βάσει της έντασης της ισχύος που διατέθηκε κατά την ομογενοποίηση. Η ομογενοποίηση υψηλής ταχύτητας αποδείχτηκε αποτελεσματικότερη, σταθεροποιώντας τα γαλακτώματα καθ' όλη τη διάρκεια την αποθήκευσής τους, ακόμη και με εφαρμογή σχετικά ήπιων συνθηκών. Η ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων με εφαρμογή σχετικά χαμηλών εντάσεων ισχύος στην κλίμακα των δοκιμών υστερεί ως προς τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων που επιτυγχάνει. Τα αποτελέσματα βελτιώνονται με την αύξηση της έντασης ισχύος, και καθίστανται ικανοποιητικά όταν εφαρμόζονται υπέρηχοι υψηλής ισχύος. Είναι προφανές ότι η συμπεριφορά αυτή πρέπει να συσχετιστεί με το δείκτη πολυδιασποράς των σταγονιδίων (§ 4.1.3). Τα μεγέθη και οι μεταβολές του δείκτη υποδηλώνουν ότι σε χαμηλές εντάσεις υπερήχων παραμένει σημαντικό ποσοστό μεγάλου μεγέθους σταγονιδίων στο γαλάκτωμα, γεγονός που οδηγεί σε φαινόμενα αποσταθεροποίησης.

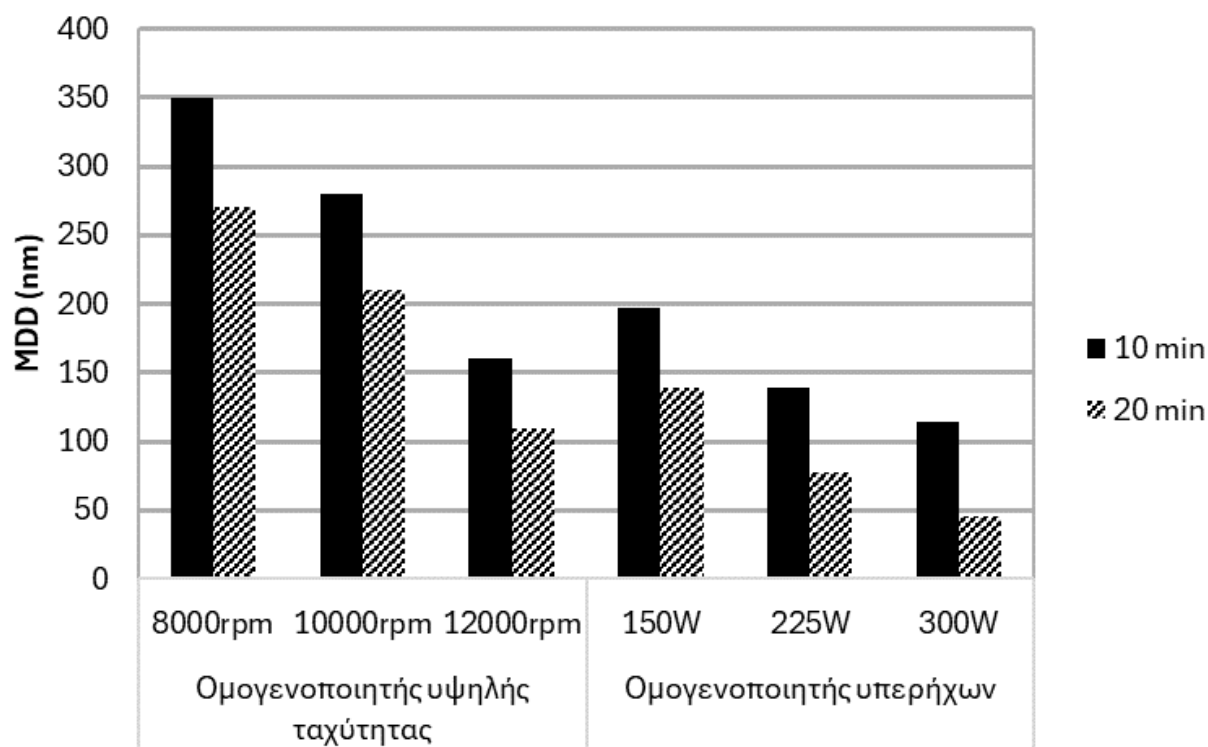
Η παράταση του χρόνου έκθεσης στις συνθήκες ομογενοποίησης επηρεάζει θετικά τα αποτελέσματα του ESI%.

Πίνακας 4.1 Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%), που υποδεικνύει τον βαθμό βαρυντικού διαχωρισμού των παρασκευασμένων γαλακτωμάτων κατά την τελευταία ημέρα της αποθήκευσης για 2 μήνες στους 25 °C. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$)

Μέθοδος	Ένταση ομογενοποίησης (rpm/W)	Χρόνος ομογενοποίησης (min)	ESI%
Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας	8000 rpm	10	99 ± 0,3 ^b
		20	99 ± 0,2 ^b
	10000 rpm	10	100 ± 0,3 ^a
		20	100 ± 0,0 ^a
12000 rpm	10	100 ± 0,1 ^a	
	20	100 ± 0,0 ^a	
Ομογενοποιητής υπερήχων	150 W	10	96 ± 0,9 ^c
		20	97 ± 0,5 ^c
	225 W	10	98 ± 0,7 ^{bc}
		20	99 ± 0,2 ^b
	300 W	10	100 ± 0,3 ^a
		20	100 ± 0,2 ^a

4.1.2 Προσδιορισμός Δυναμικής Σκέδασης Φωτός των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος, ο δείκτης διασποράς και το ζ-δυναμικό των διεσπαρμένων σταγονιδίων, διεξήχθησαν μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός (DLS) στα γαλακτώματα. Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων θεωρείται ως το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό για την αξιολόγηση της σταθερότητας, της μορφής και του είδους των γαλακτωμάτων (μακρο-, νανο-, μικρο-γαλάκτωμα) (Kralova et al., 2009). Το Διάγραμμα 4.1 παριστά την επίδραση της έντασης και του χρόνου εφαρμογής των δύο τεχνικών ομογενοποίησης στη μέση διάμετρο σταγονιδίων των γαλακτωμάτων (MDD). Αρχικά θα πρέπει να σημειωθεί ότι και οι δύο τεχνικές οδήγησαν σε διασπορές μέσου μεγέθους σταγονιδίων μικρότερου των 500nm, επομένως είναι κατάλληλες για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Ωστόσο προέκυψε ότι το MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάζεται σημαντικά από το είδος της εφαρμοζόμενης μεθόδου ομογενοποίησης, την ισχύ που επιλέγεται και τον χρόνο έκθεσης ($P < 0,05$).



Διάγραμμα 4.1 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στη Μέση Διάμετρο Σταγονιδίων (MDD), (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

Από τα διαγράμματα προκύπτει ότι:

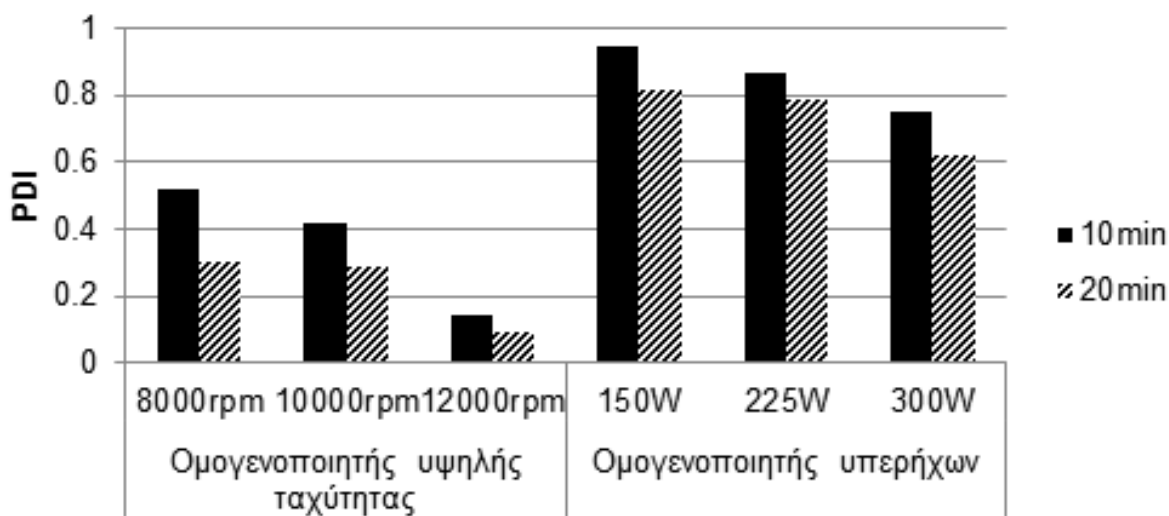
Η μέση διάμετρος των σταγονιδίων μειώνεται με αύξηση της έντασης και του χρόνου ομογενοποίησης. Η ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων γενικά οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές MDD. Η χαμηλότερη τιμή που επιτεύχθηκε στην κλίμακα της δοκιμής ήταν 45,6 nm με χρήση υπερήχων στα 300 W για 20 min. Αντίστοιχα, με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας η χαμηλότερη τιμή MDD που επιτεύχθηκε ήταν 114,4 nm σε 12.000 rpm για 20 min.

Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν βάσει της έντασης και της τεχνικής ομογενοποίησης που εφαρμόστηκε. Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με υψηλή ένταση υπερήχων ομαδοποιήθηκαν με αυτά που παρασκευάστηκαν με τον ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε λειτουργία υψηλής ισχύος.

4.1.3 Προσδιορισμός δείκτη πολυδιασποράς (PDI)

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) είναι καθαρός αριθμός που υποδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο τα σταγονίδια διασπείρονται στη συνεχή φάση και σχετίζεται άμεσα με τη διακύμανση του μεγέθους των σταγονιδίων. Χαμηλό PDI σημαίνει μονοδιεσπαρμένα γαλακτώματα. Γαλακτώματα που συνδυάζουν χαμηλό PDI και χαμηλό MDD χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα. Αντίθετα, υψηλό PDI

σημαίνει πολυδισπαρμένα γαλακτώματα με χαμηλή σταθερότητα αντιστοίχως. Επομένως υπό προϋποθέσεις ο δείκτης PDI μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συγκριτικός δείκτης σταθερότητας.



Διάγραμμα 4.2 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

Παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές του δείκτη πολυδιασποράς ανάλογα με την τεχνική ομογενοποίησης που εφαρμόστηκε ($P < 0,05$). Σε αντίθεση με την ομογενοποίηση με υψηλή ταχύτητα, η ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων οδηγεί σε υψηλές τιμές PDI, γεγονός που αποτελεί ένδειξη χαμηλής σταθερότητας. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε και από τον προσδιορισμό του ES1% των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Ως συμπέρασμα, η ομογενοποίηση με υπέρηχους, παρότι είναι πολύ αποτελεσματική στη μείωση του μέσου μεγέθους των σταγονιδίων, δεν επιτυγχάνει ομογενή αποτελέσματα σε όλο τον όγκο του γαλακτώματος, οδηγώντας σε πολυδισπαρμένες κατανομές σταγονιδίων.

4.1.4 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού της διεπιφάνειας

Για την περαιτέρω μελέτη των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό της διεπιφάνειας μεταξύ της συνεχούς και της δισπαρμένης φάσης. Το ζ-δυναμικό προσδιορίζεται από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των δισπαρμένων σταγονιδίων και αποτελεί μέτρο της σταθερότητας του γαλακτώματος. Υψηλές απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού αντιστοιχούν σε σταθερές διασπορές, ενώ χαμηλές τιμές ζ-δυναμικού είναι ενδεικτικές της αστάθειας της διασποράς και μπορεί να οδηγήσουν σε συσσωμάτωση (Sharifi *et al.*, 2021b). Στην παρούσα μελέτη το ζ-δυναμικό της διπλοστοιβάδας επηρεάστηκε σημαντικά μόνο από την ένταση της ομογενοποίησης που επιβλήθηκε στο σύστημα ($P < 0,05$).

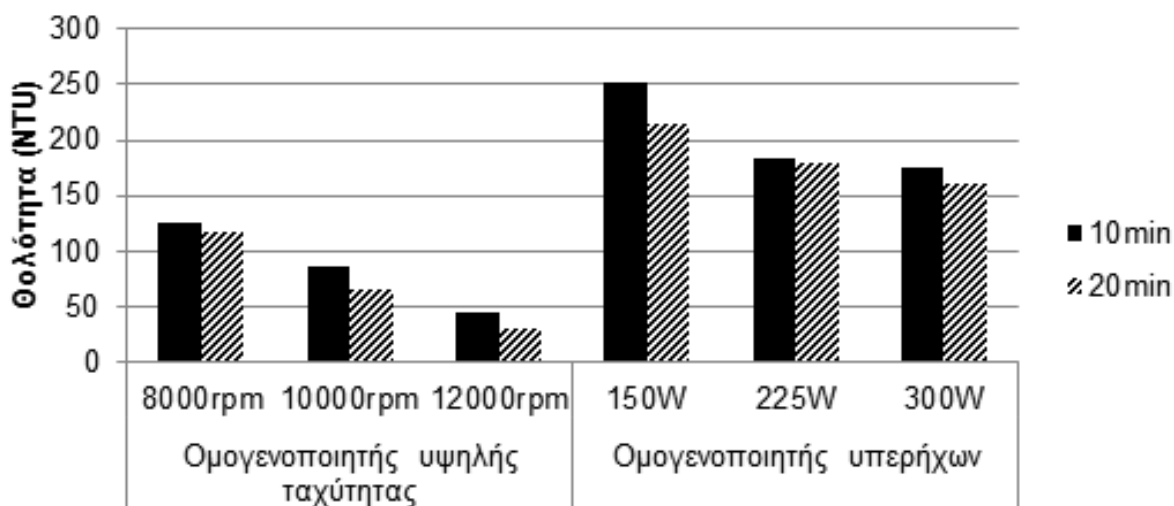
Πίνακας 4.2 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στο ζ-δυναμικό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$)

Μέθοδος	Ένταση (rpm/W)	Χρόνος (min)	ζ-δυναμικό (mV)
Ομογενοποιητής υ- ψηλής ταχύτητας	8000 rpm	10	-0,853 ± 0,009 ^{ab}
		20	-0,856 ± 0,011 ^{bc}
	10000 rpm	10	-0,841 ± 0,014 ^a
		20	-0,853 ± 0,008 ^{ab}
	12000 rpm	10	-0,845 ± 0,014 ^a
		20	-0,865 ± 0,008 ^c
Ομογενοποιητής υ- περήχων	150 W	10	-0,875 ± 0,017 ^c
		20	-0,842 ± 0,020 ^a
	225 W	10	-0,835 ± 0,009 ^a
		20	-0,842 ± 0,014 ^a
	300 W	10	-0,866 ± 0,008 ^c
		20	-0,874 ± 0,016 ^c

Στις δοκιμές που έγιναν το ζ-δυναμικό παρουσίασε χαμηλές αποκλίσεις, κάτι που είναι αναμενόμενο καθώς η σύσταση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων παρέμεινε σταθερή (McClements, 2012; Rao and McClements, 2012). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν πιθανόν να οφείλονται σε μεταβολές της μορφολογίας της διεπιφάνειας μεταξύ της συνεχούς και της διεσπαρμένης φάσης, ως αποτέλεσμα της υψηλής έντασης ομογενοποίησης.

4.1.5 Προσδιορισμός Θολότητας

Συμπληρωματικά με τη μέτρηση της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων και του δείκτη πολυδιασποράς, διερευνήθηκε η θολότητα των παρασκευασμένων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Η θολότητα αποτελεί ένδειξη του μεγέθους και του βαθμού διασποράς των σταγονιδίων. Αντιστρόφως, μετακίνηση σε μικρότερες τιμές έντασης θολότητας υποδηλώνει αύξηση της σταθερότητας του μικρο/νανο-γαλακτώματος. Επιπλέον η θολότητα αποτελεί σημαντικό παράγοντα και κριτήριο οργανοληπτικού ελέγχου του τελικού προϊόντος από τους καταναλωτές. Στην παρούσα μελέτη οι τιμές της θολότητας κυμάνθηκαν μεταξύ 31 και 251 NTU.



Διάγραμμα 4.3 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Όπως προκύπτει από τα διαγράμματα, η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων συμπεριφέρεται ανάλογα με τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI). Έτσι, επηρεάζεται από την τεχνική ομογενοποίησης, την ένταση της εφαρμοζόμενης ισχύος και τον χρόνο έκθεσης ($P < 0,05$). Συγκεκριμένα, όπως ο δείκτης πολυδιασποράς, έτσι και η μικρότερη θολότητα παρατηρήθηκε σε μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, μειώνεται δε με αύξηση της έντασης της ομογενοποίησης και του χρόνου διάρκειάς της. Αυτό συμβαίνει επειδή, έστω και αν το μέσο μέγεθος των σταγονιδίων είναι μικρό, η αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς παραπέμπει σε ευρεία διασπορά του μεγέθους τους και ύπαρξη μεγάλου μεγέθους σωματιδίων που αυξάνουν τη θολότητα. Για αυτό η ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων δεν κρίθηκε αποτελεσματική. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με υπέρηχους, χαρακτηρίστηκαν από υψηλές τιμές θολότητας.

4.1.6 Προσδιορισμός χρώματος μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Η μελέτη του χρώματος των γαλακτωμάτων βοηθά στην κατανόηση της μικροδομής τους. Οι σχετικές αναλογίες του φωτός που μεταδίδονται και ανακλώνται σε διαφορετικά μήκη κύματος εξαρτώνται από τη σκέδαση και την απορρόφησή του από το γαλάκτωμα. Η σκέδαση και η απορρόφηση του φωτός εξαρτάται από το μέγεθος, τη συγκέντρωση και την κατανομή των σταγονιδίων, καθώς και από τους δείκτες διάθλασης του μέσου διασποράς και της διασπαρμένης ουσίας και φυσικά από τα μήκη κύματος που περιέχει το προσπίπτον φως. Το χρώμα των γαλακτωμάτων προκύπτει από τον τρόπο ανάκλασης και μετάδοσης του φωτός (Mushtaq *et al.*, 2023)

Πίνακας 4.3 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στο χρώμα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$)

Μέθοδος	Ένταση	Χρόνος (min)	E
Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας	8000 rpm	10	46,26 ± 0,03 ^a
		20	42,36 ± 0,06 ^{ab}
	10000 rpm	10	45,69 ± 0,07 ^b
		20	41,98 ± 0,01 ^c
	12000 rpm	10	40,65 ± 0,02 ^b
		20	39,25 ± 0,05 ^a
Ομογενοποιητής υπερήχων	150 W	10	46,28 ± 0,02 ^a
		20	45,98 ± 0,08 ^c
	225 W	10	46,75 ± 0,02 ^{bc}
		20	45,84 ± 0,03 ^c
	300 W	10	45,98 ± 0,04 ^c
		20	45,23 ± 0,09 ^a

Το χρώμα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (E) επηρεάστηκε σημαντικά από τη μέθοδο ομογενοποίησης ($P < 0,05$). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.3 Επίδραση της έντασης και του χρόνου των δύο μεθόδων ομογενοποίησης στο χρώμα των , η μέθοδος ομογενοποίησης με υψηλή ταχύτητα οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές χρώματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά τα μικρο/νανο-γαλακτώματα ήταν περισσότερο διαυγή, άρα και λιγότερο φωτεινά, οπότε η ένταση του λευκού χρώματος ήταν χαμηλότερη.

4.2 2^η σειρά πειραμάτων: Μελέτη της επίδρασης του είδους και της αναλογίας γαλακτωματοποιητή στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο

Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Ωστόσο, δεν υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία σχετικά με μικρο/νανο-γαλακτώματα τροφίμων και ειδικότερα με μικρο/νανο-γαλακτώματα τύπου νερό-σε-έλαιο (ν/ε). Τα ρευστά ν/ε μικρο/νανο-γαλακτώματα παρουσιάζουν αυξημένη δυσκολία στην παρασκευή και εμφανίζουν χαμηλή διατηρησιμότητα εξαιτίας της υψηλής κινητικότητας των διεσπαρμένων σταγονιδίων του νερού που οδηγεί σε φαινόμενα συνάθροισης, συνένωσης και βαρυτικού διαχωρισμού (Ushikubo and Cunha, 2014). Τα ν/ε γαλακτώματα σταθεροποιούνται ως επί το πλείστο με στερεοχημικές δυνάμεις λόγω της χαμηλής πολικότητας της συνεχούς φάσης, που δεν ευνοεί ανάπτυξη υψηλού κατ' απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού (Mushtaq *et al.*, 2023), σε αντίθεση με τα πιο κοινά γαλακτώματα τύπου έλαιο σε νερό (ε/ν) που σταθεροποιούνται τόσο από στερεοχημικές όσο και από ηλεκτροστατικές δυνάμεις (Ushikubo and Cunha, 2014). Επιπλέον, η εφαρμογή των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε προϊόντα τροφίμων περιορίζεται εξαιτίας του μικρού αριθμού των γαλακτωματοποιητών που είναι κατάλληλοι για ανθρώπινη κατανάλωση, και γενικώς των χαμηλών επιπέδων αποδεκτής συγκέντρωσής τους στο τελικό τρόφιμο (Bera *et al.*, 2012). Οι γαλακτωματοποιητές μειώνουν την επιφανειακή τάση μεταξύ του ελαίου και του νερού ή του αέρα και του νερού, υποβοηθώντας έτσι την ομογενοποίηση και αυξάνοντας τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Η κατανομή του γαλακτωματοποιητή στη διεπιφάνεια μεταξύ της συνεχούς και της διεσπαρμένης φάσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: την τιμή υδροφιλής - λιπόφιλης ισορροπίας (HLB), τη φύση της συνεχούς και της διεσπαρμένης φάσης, τις συνθήκες παρασκευής και αποθήκευσης του γαλακτώματος (θερμοκρασία, μηχανική καταπόνηση, ακτινοβολίες, κ.α.), και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών τους (Jafari, 2020). Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, προκειμένου να μειωθεί η επιφανειακή τάση των επιμέρους φάσεων, συχνά προστίθεται στο σύστημα κάποια συν-επιφανειοδραστική ουσία. Οι ουσίες όμως αυτές περιορίζουν ακόμη περισσότερο την εφαρμογή των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε προϊόντα τροφίμων, καθώς οι ίδιες εμφανίζουν τοξικότητα και γι' αυτό αποφεύγονται (Chaudhari, Patel and Kumar, 2023).

Ένας άλλος σημαντικός ποιοτικός παράγοντας κατά τον σχεδιασμό της σύνθεσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων είναι η οξειδωτική τους σταθερότητα και ο βαθμός με τον οποίο τα συστατικά του γαλακτώματος επιδρούν σε αυτήν. Η οξείδωση του περιεχόμενου ελαίου, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η αρχική οξειδωτική του κατάσταση, η μέθοδος παραλαβής του ελαίου, η θερμο-

κρασία, η υγρασία, η παρουσία ορισμένων μετάλλων (ιδιαίτερα του χαλκού, του σιδήρου, του κοβαλτίου και του μαγγανίου), η έκθεσή του σε φως και οξυγόνο, η σύνθεσή του σε λιπαρά οξέα, και φυσικά η φύση των διεσπαρμένων στο έλαιο ουσιών. Τα ν/ε μικρο/νανο-γαλακτώματα, ειδικά όταν το διασπαρμένο νερό περιέχει ίχνη ιόντων μετάλλων, που έχουν καταλυτική επίδραση στην οξείδωση του ελαίου, είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην οξείδωση καθώς η παρουσία σταγονιδίων νερού πολύ μικρής διαμέτρου συνεπάγεται μεγάλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ του ελαίου και των μετάλλων που περιέχονται στην υδατική φάση (Yi et al., 2014). Επομένως η φύση της διεπιφάνειας και κατ' επέκταση η συγκέντρωση και το είδος του γαλακτωματοποιητή που εμπεριέχεται σε αυτή, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Kioikias and Oreopoulou, 2022).

Το ελαιόλαδο επιλέχθηκε ως η συνεχής φάση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας του και της μεγάλης οξειδωτικής του σταθερότητας. Θεωρείται ότι πλεονεκτεί από άλλα φυτικά έλαια. Ένας λόγος για τούτο είναι ότι μπορεί να καταναλωθεί άμεσα μετά τη μηχανική διεργασία της παραλαβής του, χωρίς να απαιτεί κατ' ανάγκη προηγούμενη φυσικοχημική επεξεργασία, γεγονός που του προσδίδει μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Άλλος λόγος είναι ότι τα φυσικά αντιοξειδωτικά, σε συνδυασμό με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων του ελαιόλαδου, έχει αποδειχτεί ότι έχουν θετική επίδραση στην υγεία (De Leonardis, 2014; Preedy and Watson, 2020). Ωστόσο το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο αποτελεί ένα πολύπλοκο σύστημα λόγω του πλήθους των μικρο-συστατικών και κολλοειδών μορφωμάτων που περιέχει. Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο διατηρεί την ίδια αρχική γλυκεριδική σύνθεση όπως το παρθένο ελαιόλαδο. Η διαδικασία του εξευγενισμού αφαιρεί μεγάλο μέρος από μη επιθυμητά συστατικά όπως μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα κ.α. Παράλληλα όμως μειώνεται και η συγκέντρωση φυσικών κολλοειδών διασπορών, πολυφαινολικών συστατικών και άλλων μικρο-συστατικών που παρουσιάζουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες (Pegi, 2014; Breschi et al., 2023). Για τους λόγους αυτούς και για τους σκοπούς της συγκεκριμένης μελέτης, επιλέχθηκε το εξευγενισμένο ελαιόλαδο ως κατάλληλη βάση για τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους των γαλακτωματοποιητών συστατικών στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

Στόχος της δεύτερης σειράς πειραμάτων ήταν η μελέτη της επιφανειοδραστικής ικανότητας μη ιοντικών γαλακτωματοποιητών (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 20 και Span 80). Οι μη ιοντικοί γαλακτωματοποιητές αυτοί επιλέχθηκαν γιατί είναι επιτρεπόμενοι για προσθήκη σε τρόφιμα, έχουν ευρεία κατανομή τιμών HLB, ενώ έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι είναι κατάλληλοι για την παρασκευή ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Kruglyakov, 2000). Κατασκευάστηκαν τριαδικά διαγράμματα φάσης με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή και πραγματοποιή-

θηκε τιτλοδότηση με υδατική φάση του μίγματος ελαίου – γαλακτωματοποιητή μέχρι επίτευξης σταθερού αντιληπτού θολώματος, ώστε να προσδιοριστεί το πεδίο των αναλογιών των τριών συστατικών που με ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν μικρο/νανο-γαλάκτωμα. Κατόπιν, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με συγκεκριμένες αναλογίες και προσδιορίστηκε η κινητική και οξειδωτική σταθερότητά τους, καθώς και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μέσο μέγεθος σταγονιδίων, μορφή διασποράς, ζ-δυναμικό, θολότητα, χρώμα).

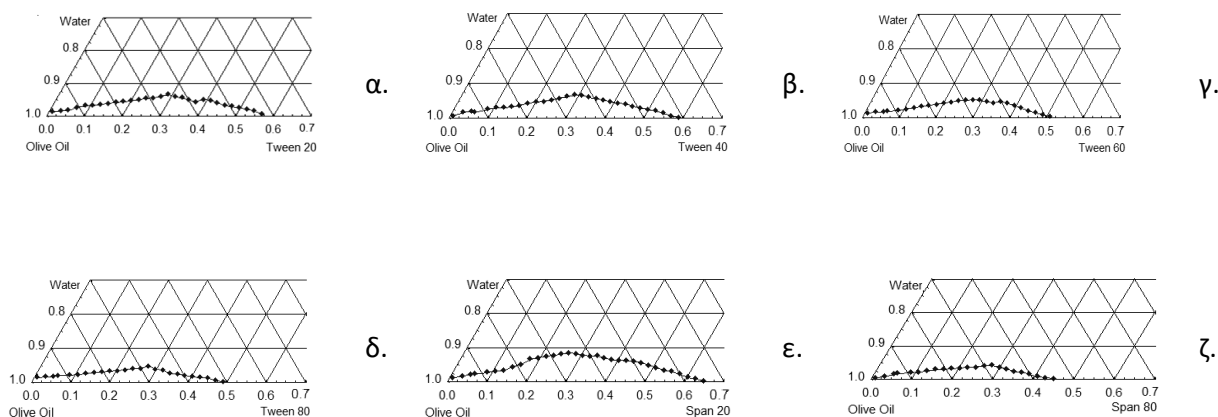
Σε όλες τις σειρές δοκιμών που ακολουθούν εφαρμόστηκε η τεχνική της ομογενοποίησης υψηλής ταχύτητας, γιατί από την πρώτη σειρά πειραμάτων προέκυψε ότι με την τεχνική αυτήν επιτυγχάνεται παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με περισσότερο επιθυμητές ιδιότητες.

4.2.1 Διαγράμματα φάσης

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του είδους και της αναλογίας γαλακτωματοποιητή στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων χωρίς την προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας κατασκευάστηκαν χωριστά διαγράμματα φάσης για τους έξι γαλακτωματοποιητές (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 20, Span 80) που μελετήθηκαν. Στο Διάγραμμα 4.4 παρουσιάζονται τα μερικά (partial) τριαδικά διαγράμματα φάσης των ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο στους 40 °C ανά γαλακτωματοποιητή. Ο σχηματισμός των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, για τον οποίο εφαρμόστηκε, όπως αναφέρθηκε, η τεχνική της ομογενοποίησης υψηλής ταχύτητας, προσδιορίστηκε με οπτική παρατήρηση μέχρι εμφάνισης σταθερού αντιληπτού θολώματος. Η περιοχή κάτω από τη γραμμή τάσης στο διάγραμμα φάσης περιγράφει το πεδίο των αναλογιών των τριών συστατικών που με ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν ν/ε μικρο/νανο-γαλάκτωμα.

Από τα διαγράμματα φάσης προέκυψε αρχικά ότι όλοι οι γαλακτωματοποιητές που δοκιμάστηκαν οδήγησαν στην παρασκευή ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο χωρίς την προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας. Το περιορισμένο εύρος που ορίζεται από τη γραμμή τάσης οφείλεται στο ότι το ελαιόλαδο έχει μικρή διηλεκτρική σταθερά ($\epsilon \leq 5$) και όπως έχει αναφερθεί η παρασκευή σταθερών ηλεκτροστατικών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με μη πολική συνεχή βάση παρουσιάζει πολλές προκλήσεις (Van Der Hoeven and Lyklema, 1992). Πέρα από την περιοχή που οριοθετήθηκε από τη γραμμή τάσης, τα προκύπτοντα γαλακτώματα χαρακτηρίστηκαν από αστάθεια και θολότητα. Σε όλες τις περιπτώσεις, η αύξηση της συγκέντρωσης των γαλακτωματοποιητών είχε ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση μεγαλύτερης ποσότητας νερού στο σύστημα με μορφή μικρο/νανο-γαλακτώματος έως μίας συγκεκριμένης συγκέντρωσης γαλακτωματοποιητή (~30%), οπότε περαιτέρω διαλυτοποίηση γαλακτωματοποιητή ήταν αδύνατη. Πρέπει να σημειωθεί ότι για την παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων απαιτείται γενικά μεγάλη συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή, ώστε να παρέχεται ο απαραίτητος αριθμός των επιφανειοδραστικών μορίων που απαιτούνται

για τη σταθεροποίηση των μικρο-σταγονιδίων που παράγονται κατά την ομογενοποίηση του μικρο/νανο-γαλακτώματος. Αυτό οφείλεται στο ότι η ελάττωση του μεγέθους των σταγονιδίων της διασκορπιζόμενης ουσίας στο γαλάκτωμα και η μετάβαση σε κλίμακα μικρο/νανο-γαλακτώματος οδηγεί μεν σε αύξηση του αριθμού των σταγονιδίων, αλλά και σε αύξηση της επιφάνειάς τους, έτσι ώστε να απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή για την επικάλυψή της, από εκείνη που θα απαιτούσε ένα αντίστοιχο κοινό μακρογαλάκτωμα. Πράγματι στις περισσότερες περιπτώσεις, για την ομογενοποίηση 4% w/w νερού απαιτήθηκε ~20% w/w προσθήκη γαλακτωματοποιητή.



Διάγραμμα 4.4. Μερικά τριαδικά διαγράμματα φάσης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ελαιόλαδο - νερό και χημικούς γαλακτωματοποιητές στους 40 °C. Η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά και η συγκέντρωση του νερού από κάτω προς τα πάνω (α. Tween 20, β. Tween 40, γ. Tween 60, δ. Tween 80, ε. Span 20, ζ. Span 80 αντίστοιχως)

Οι περισσότεροι γαλακτωματοποιητές πολυοξυαιθυλενικής σορβιτάνης (Tweens) παρουσίασαν μέτρια γαλακτωματοποιητική ικανότητα στο μελετώμενο σύστημα. Ο γαλακτωματοποιητής Span 20 αποδείχθηκε ότι έχει την πιο αποτελεσματική γαλακτωματοποιητική ικανότητα - προσθήκη 27,3% w/w αυτού οδήγησε σε ομογενοποίηση 8,39% w/w νερού. Αυτό ήταν θεωρητικά αναμενόμενο, δεδομένου ότι ο Span 20 έχει τιμή HLB, 8,6 και για συστήματα ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο απαιτούνται χαμηλές τιμές HLB (Kruglyakov, 2000; Hong, Kim and Lee, 2018). Ακολουθούμενος από το Span 20, ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 είχε τις καλύτερες γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες - μέγιστη ομογενοποίηση νερού: 7,3% w/w με προσθήκη 28,7% w/w Tween 40 στο τελικό μίγμα. Λιγότερο αποτελεσματικοί γαλακτωματοποιητές κρίθηκαν οι Tween 80 και Span 80.

Με βάση τα αποτελέσματα των διαγραμμάτων φάσης παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα, με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, όπως ήδη αναφέρθηκε, σε σταθερές επιτρεπόμενες αναλογίες βάρους και μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους.

4.2.2 Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)

Τα εμπορικά γαλακτώματα είναι σημαντικό να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και σταθερά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Για το λόγο αυτόν εξετάστηκε η σταθερότητα των συστημάτων σε αποθήκευση 8 εβδομάδων στους 25 °C και αξιολογήθηκε η επίδραση του χρόνου στο Δείκτη Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%).

Η σταθερότητα όλων των ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων μειώθηκε σημαντικά ($P < 0,05$) κατά τη διάρκεια της 2-μηνιαίας περιόδου αποθήκευσης. Εντούτοις, αν και εκδηλώθηκε διαχωρισμός φάσεων στο διάστημα αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι η φάση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων διατηρούσε τη διαύγεια της. Ο γαλακτωματοποιητής Span 20 αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικός από τους άλλους γαλακτωματοποιητές στην κινητική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων λόγω της χαμηλής τιμής HLB του, ακολουθούμενος από τους γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40. Η σταθεροποιητική δράση του Span 20 μπορεί επίσης να εξηγηθεί από την υψηλή απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού του σε σχέση με τους άλλους γαλακτωματοποιητές (Kruglyakov, 2000). Οι γαλακτωματοποιητές Tween 20, Tween 40 και Span 20 είχαν σημαντική επίδραση στη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$), ενώ οι γαλακτωματοποιητές Tween 60 και Span 80 αποδείχτηκαν μη αποτελεσματικοί. Είναι ενδιαφέρον και σημειώνεται ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με χαμηλή αναλογία γαλακτωματοποιητή είχαν τάση να κορυφώνονται, ενώ τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με υψηλή αναλογία γαλακτωματοποιητή έτειναν να δημιουργούν καταβυθιζόμενη φάση. Οι δύο αυτές μορφές βαρυστικού διαχωρισμού οφείλονται στο ότι είτε, η αναλογία γαλακτωματοποιητή δεν ήταν ικανοποιητική ώστε να σταθεροποιήσει τα μικρο-σταγονίδια νερού, είτε ο γαλακτωματοποιητής βρισκόταν σε περίσσεια κατά τόπο που η συγκέντρωσή του να υπερβαίνει τη διαλυτότητά του στο ελαιόλαδο, οπότε αποβαλλόταν στη συνεχή φάση (Rao and McClements, 2012). Ιδανικές αναλογίες γαλακτωματοποιητή για τους Tween 20, Tween 40 και Span 20 ήταν 2-6% w/w στο τελικό μίγμα.

Πίνακας 4.4 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), υποδεικνύοντας την έκταση του βαρυστικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 25 °C για 2 μήνες (8 εβδομάδες). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων.

Γαλ/τής	Αναλογία (Ελαιο-γαλ/τής -υδατ. φάση)	Κωδικοποίηση δειγμάτων	ESI% ανά εβδομάδα							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Τυφλό	98:0:2	0	99	98,5	97,5	97	97	96,5	95	94
Tween 20	88:10:2	T2a	100	100	99,5	99	97,5	96,5	95,5	94

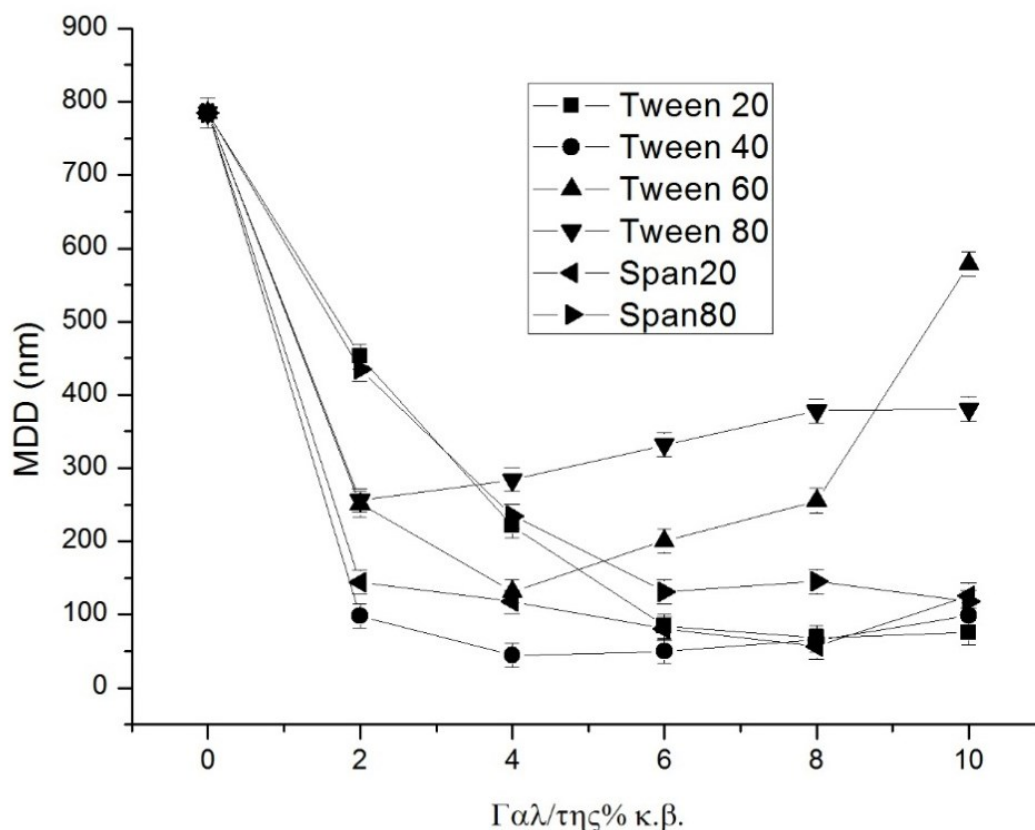
	90:8:2	T2b	100	100	100	99,5	98	97,5	97	96
	92:6:2	T2c	100	100	100	100	100	100	100	99
	94:4:2	T2d	100	100	100	100	100	100	100	100
	96:2:2	T2e	100	100	100	100	99	99	98,5	98,5
Tween 40	88:10:2	T4a	100	100	99,5	97	97,5	97	96	95
	90:8:2	T4b	100	100	100	97,5	97,5	97,5	98	96,5
	92:6:2	T4c	100	100	100	97,5	97,5	97,5	98	97
	94:4:2	T4d	100	100	100	99	98	98	98,5	98
	96:2:2	T4e	99,5	99,5	100	99	99	99	98,5	98
Tween 60	88:10:2	T6a	100	99	98,5	97,5	97	95	93	93
	90:8:2	T6b	100	100	100	98	97	96	94,5	94,5
	92:6:2	T6c	100	100	100	99	97,5	96,5	95	94,5
	94:4:2	T6d	99	100	100	99	98	97	96	95
	96:2:2	T6e	99	100	99,5	99	98,5	98	96	97
Tween 80	88:10:2	T8a	100	99	99,5	98	98	96,5	95,5	95,5
	90:8:2	T8b	100	100	100	98,5	98,5	97,5	95,5	95,5
	92:6:2	T8c	100	100	100	99	99,5	98	97,5	96,5
	94:4:2	T8d	100	99,5	100	99	99,5	98,5	97	96,5
	96:2:2	T8e	100	99	100	99	98,5	98,5	97,5	97,5
Span 20	88:10:2	S2a	100	99,5	99	98,5	98,5	97,5	96	96
	90:8:2	S2b	100	100	100	99,5	99	98	97	97
	92:6:2	S2c	100	100	100	100	100	100	98	98
	94:4:2	S2d	100	100	100	100	100	100	100	100
	96:2:2	S2e	100	99,5	100	100	100	100	100	100
Span 80	88:10:2	S8a	100	99,5	99	98	97,5	96	95	95
	90:8:2	S8b	100	100	100	98,5	98	97,5	96	95
	92:6:2	S8c	100	100	100	100	98,5	98,5	97,5	96
	94:4:2	S8d	100	100	100	99,5	99	98,5	97,5	96
	96:2:2	S8e	100	99	100	99	98,5	98,5	98	96

4.2.3 Προσδιορισμός Δυναμικής σκέδασης φωτός

Προκειμένου να αξιολογηθεί η μέση διάμετρος, ο δείκτης διασποράς και το ζ-δυναμικό των διεσπαρμένων σταγονιδίων διεξήχθησαν μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός (DLS) στα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα.

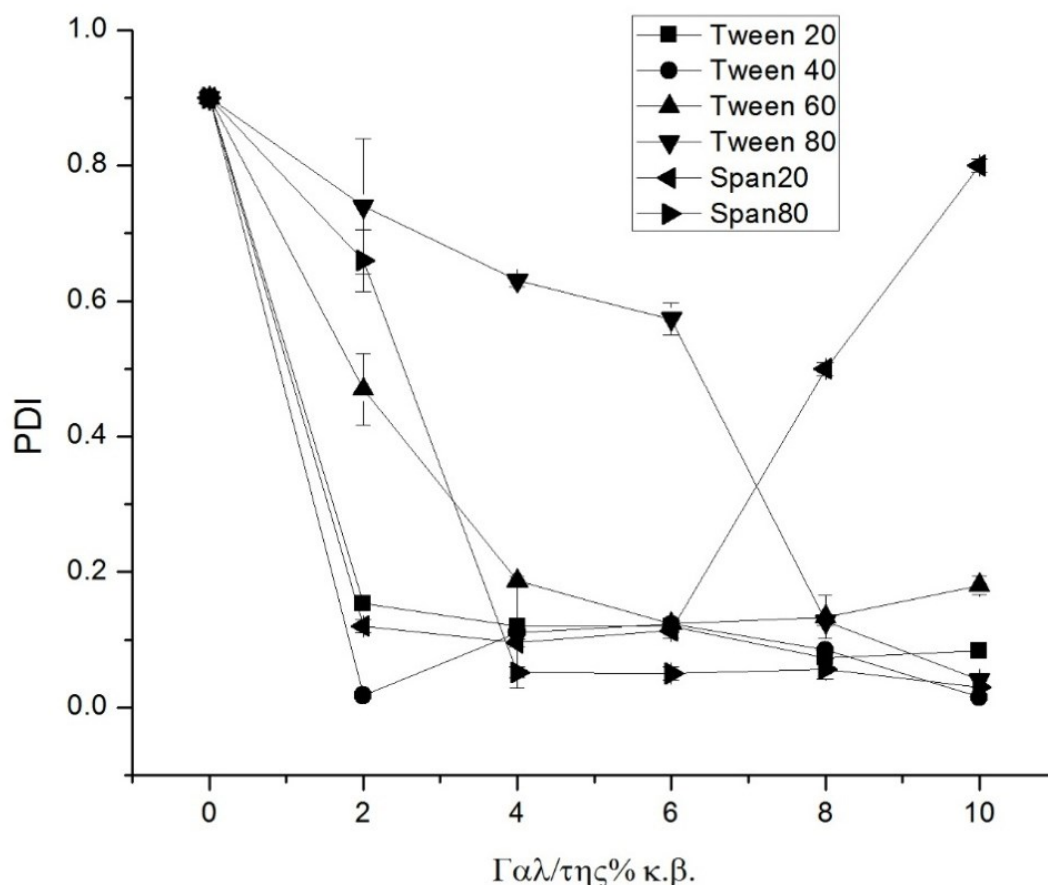
Το Διάγραμμα παρουσιάζει τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (MDD) των γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν σε σχέση με την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή (% w/w) στο τελικό μίγμα. Όλοι οι γαλακτωματοποιητές στις αναλογίες που δοκιμάστηκαν (εκτός του Tween 60, 10% w/w) οδήγησαν σε παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (MDD<500 nm). Τόσο το είδος του γαλακτωματοποιητή όσο και η αναλογία είχαν σημαντική επίδραση στη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (P<0,05). Το μέγεθος των σταγονιδίων έτεινε να μειώνεται αυξανόμενης της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή. Κατώτερες μέσες τιμές διαμέτρου είχαν τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με Tween 40,

Tween 20 και Span 20. Το μικρότερο μέγεθος των σταγονιδίων επιτεύχθηκε με Tween 40, 6% w/w και ήταν 45 nm.



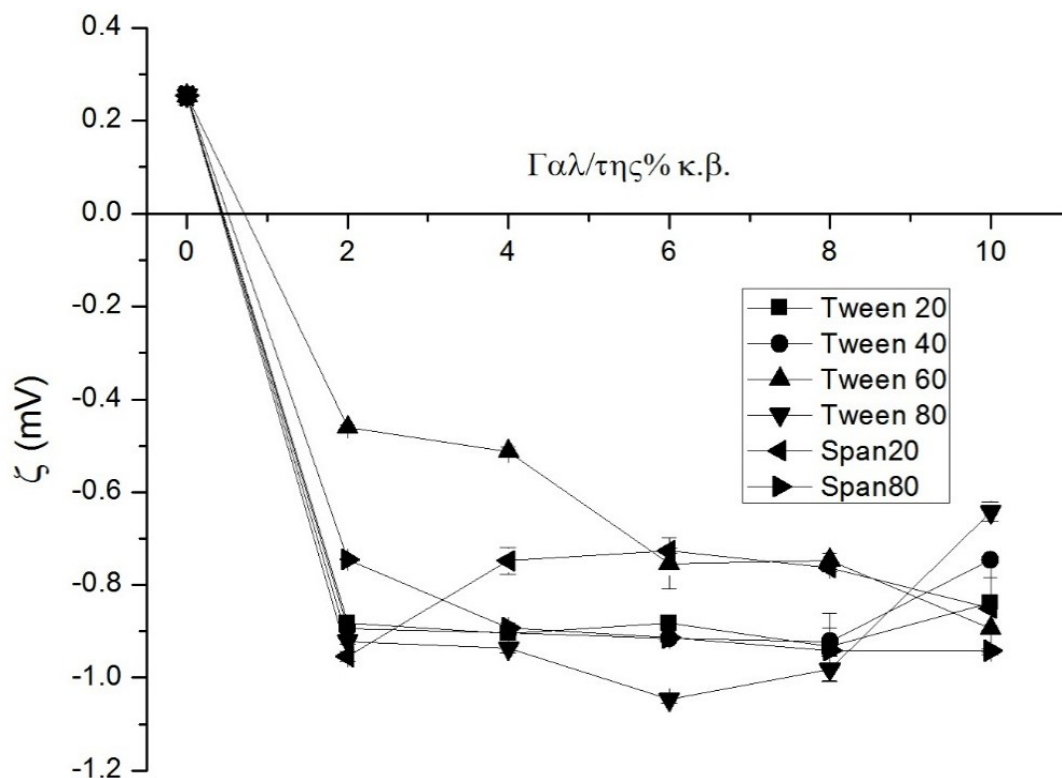
Διάγραμμα 4.5 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Το Διάγραμμα 4.6 παρουσιάζει τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που μελετήθηκαν. Τόσο το είδος του γαλακτωματοποιητή όσο και η αναλογία επηρέασαν σημαντικά το PDI ($P < 0.05$). Οι περισσότεροι γαλακτωματοποιητές από τους εξετασθέντες έδειξαν χαμηλή πολυδιασπορά (Tween 20, Tween 40, Tween 80, Span 20). Τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν οι γαλακτωματοποιητές Tween 40 και Tween 80. Ο γαλακτωματοποιητής Tween 60 έδειξε υψηλό δείκτη πολυδιασποράς, πιθανώς επειδή δεν διαλυτοποιήθηκε επαρκώς στη θερμοκρασία ομογενοποίησης (40°C).



Διάγραμμα 4.6 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στον Δείκτη Πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

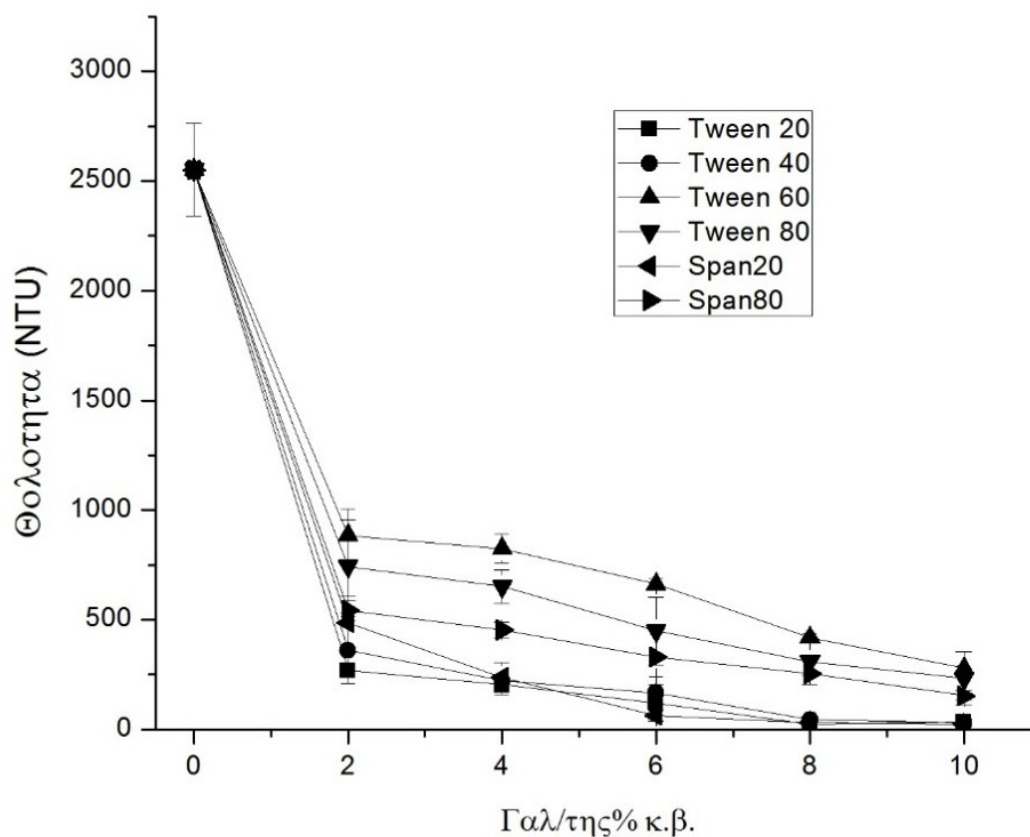
Για την περαιτέρω μελέτη των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό τους. Για μικρο/νανο-γαλακτώματα με μη-ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, το ζ-δυναμικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει το φορτίο του συστήματος. Το ζ-δυναμικό προσδιορίζεται από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των διεσπαρμένων σταγονιδίων και αποτελεί μέτρο της σταθερότητας του γαλακτώματος. Υψηλές απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού αντιστοιχούν σε σταθερές διασπορές, ενώ χαμηλές τιμές ζ-δυναμικού είναι ενδεικτικές της αστάθειας της διασποράς και εν δυνάμει συσσωμάτωσης. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η επίδραση των διαφόρων γαλακτωματοποιητών καθώς και η αναλογία στην οποία προστέθηκαν στο σύστημα στο ζ-δυναμικό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Τόσο το είδος όσο και η αναλογία του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν σημαντικά το ζ-δυναμικό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Όλοι οι γαλακτωματοποιητές που εξετάστηκαν ενήργησαν κατά παρόμοιο τρόπο και μπορούν να ομαδοποιηθούν στατιστικά με εξαίρεση τον Tween 60 (Διάγραμμα 4.7). Μεγαλύτερες αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού έδειξαν οι γαλακτωματοποιητές Span 20 και Tween 20. Ο γαλακτωματοποιητής Tween 60 είχε τις μικρότερες τιμές ζ-δυναμικού, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή σταθερότητα. Πράγματι, η μελέτη του ESI% επιβεβαίωσε ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με Tween 60 χαρακτηρίστηκαν από χαμηλή σταθερότητα.



Διάγραμμα 4.7 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στο ζ-δυναμικό (mV) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.2.4 Προσδιορισμός Θολότητας

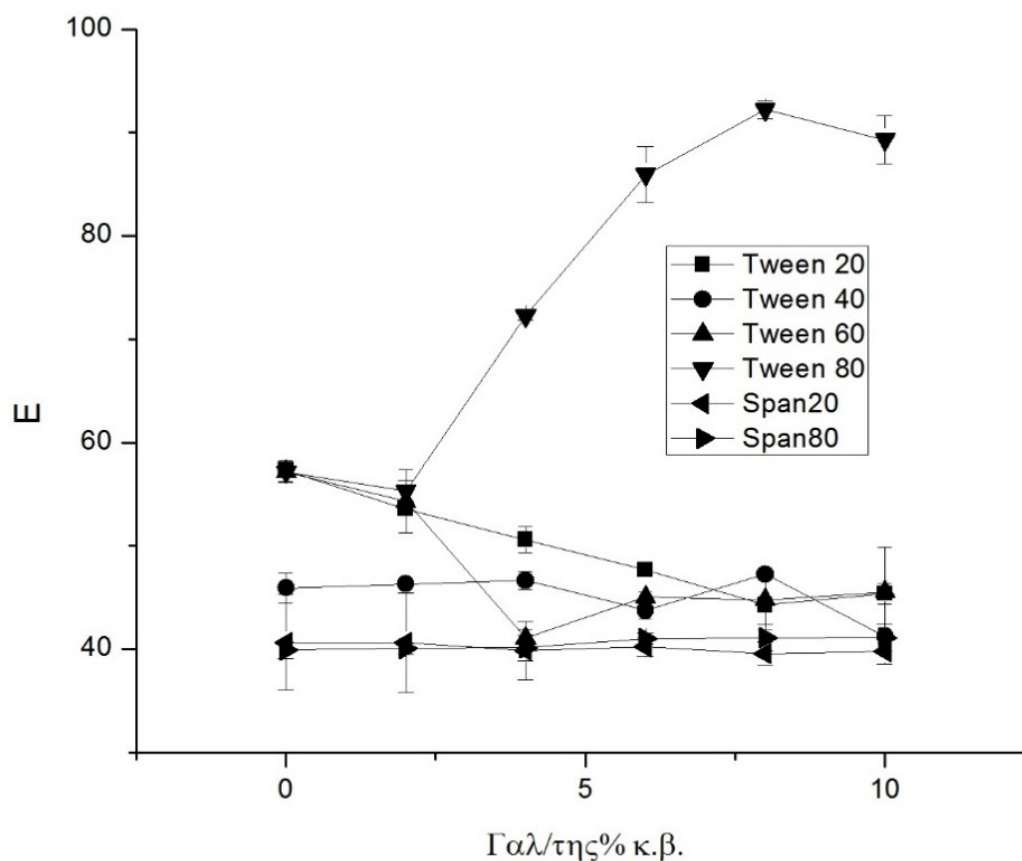
Η σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων διερευνήθηκε επίσης με τη βοήθεια των μετρήσεων θολότητας. Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές θολότητας κυμάνθηκαν από 26 έως 751 NTU. Τόσο το είδος, καθώς και η αναλογία του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν σημαντικά τη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0.05$). Η θολότητα του μικρο/νανο-γαλακτώματος έτεινε να μειώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή. Οι χαμηλότερες τιμές θολότητας προέκυψαν από τους γαλακτωματοποιητές Tween 20, Tween 40 και Span 20. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αρχική θολότητα του τυφλού γαλακτώματος χωρίς την προσθήκη γαλακτωματοποιητή ήταν 2547 NTU, γεγονός που οφείλεται στο μεγάλο βαθμό πολυδιασποράς των σταγονιδίων του νερού στη συνεχή φάση του ελαιόλαδου.



Διάγραμμα 4.8 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στη θολότητα (NTU) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.2.5 Προσδιορισμός Χρώματος

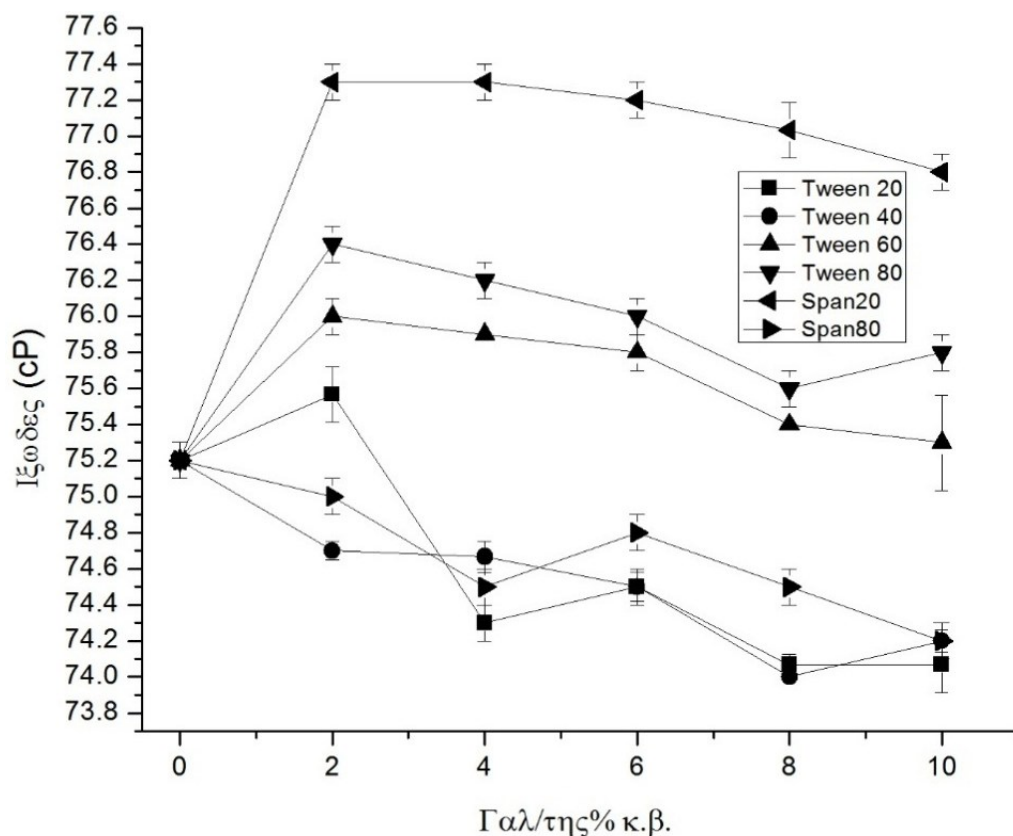
Το χρώμα E των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Διάγραμμα 4.9) επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος του γαλακτωματοποιητή ($P < 0,05$) και όχι με την αναλογία. Πράγματι, οι γαλακτωματοποιητές παρουσίασαν χρωματικές διαφορές. Όλοι οι γαλακτωματοποιητές ομαδοποιήθηκαν στατιστικά με εξαίρεση τον Tween 60 που λόγω του έντονου χρώματος του και της χαμηλής γαλακτωματοποιητικής του ικανότητας στη θερμοκρασία ομογενοποίησης έδωσε μεγαλύτερες τιμές χρώματος.



Διάγραμμα 4.9 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στο χρώμα (E) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.2.6 Προσδιορισμός ρεολογικής συμπεριφοράς

Το ιξώδες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή του μικρο/νανο-γαλακτώματος, τον τύπο και το σχήμα των συσσωματωμάτων, τη συγκέντρωση και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διεσπαρμένων σωματιδίων τους (Gurpreet and Singh, 2018b). Γενικά όλα τα γαλακτώματα που εξετάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως νευτωνικά ρευστά. Το ιξώδες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάστηκε από την αναλογία και τον τύπο του γαλακτωματοποιητή στο τελικό μίγμα ($P < 0.05$). Παρατηρήθηκε τάση αύξησης του ιξώδους τους (cP) αυξανόμενης της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με Span 20 και Tween 80 εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές ιξώδους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ιξώδες όσο και ο δείκτης διάθλασης ήταν απαραίτητες μετρήσεις για την πραγματοποίηση της ανάλυσης σκέδασης φωτός με υψηλή ακρίβεια.



Διάγραμμα 4.10 Επίδραση είδους και αναλογίας γαλακτωματοποιητή στο ιξώδες (zP) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.2.7 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η συσχέτιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που εξετάστηκαν στα μελετώμενα μικρο/νανο-γαλακτώματα, τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν στατιστικά με Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA). Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC-1) συνεισέφερε στο 29,57% της διακύμανσης, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC-2) στο 25,50% αντιστοίχως, συνεπώς και οι δύο μαζί συνιστώσες συνεισέφεραν στο 55,07% της συνολικής διακύμανσης του πειράματος (Διάγραμμα 4.11). Αναφορικά με τις μεταβλητές που μελετήθηκαν με ανάλυση PCA, προέκυψε ότι ο δείκτης σταθερότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (ESI%) συνεισέφερε αρνητικά στην πρώτη συνιστώσα. Η θολότητα, το ιξώδες και ο δείκτης πολυδιασποράς συσχετίστηκαν μεταξύ τους και συνεισέφεραν θετικά στη δεύτερη συνιστώσα. Το χρώμα, το ζ-δυναμικό και η μέση διάμετρος σταγονιδίων συσχετίστηκαν και συνεισέφεραν θετικά στη δεύτερη συνιστώσα.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των δειγμάτων με PCA (Διάγραμμα 4.12). Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα προέκυψαν οι εξής 4 ομάδες:

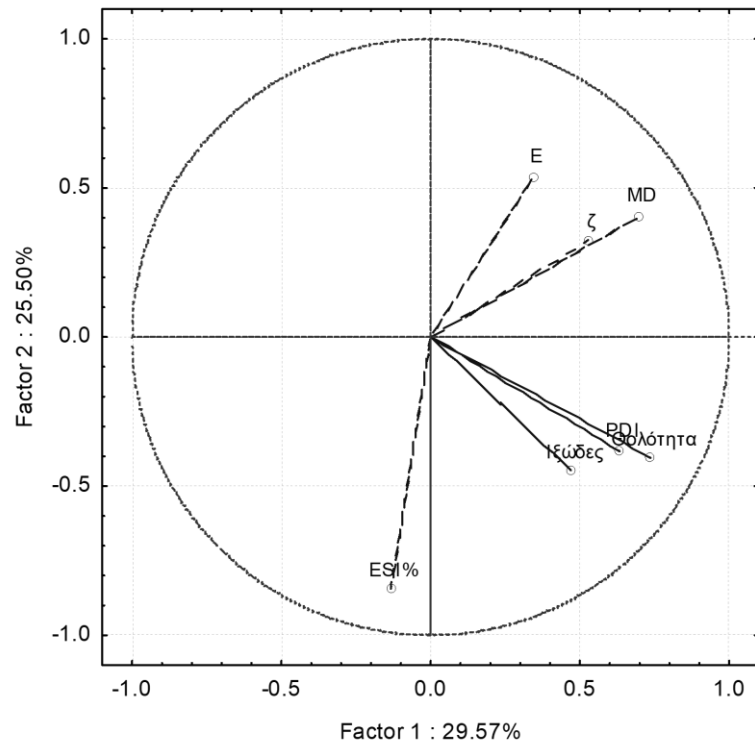
α) T6a, T6b, T6c, T8a, T8b

β) T8c, T8e, T8d, S2e, S8a S8e

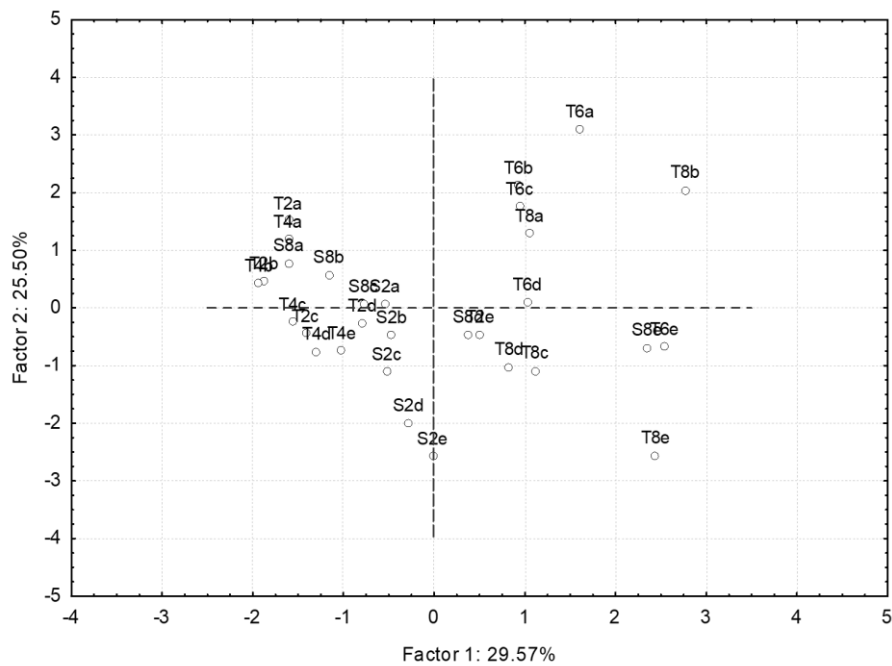
γ) T2c, T2d, T4e, T4d, S2b, S2c, S2d,

δ) T2a, T4a, S2a, S8b, S8c.

Μελετώντας παράλληλα τις Εικόνες 4.11 και 4.12 προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα. Τα δείγματα της πρώτης ομάδας αφορούσαν στα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με υψηλές αναλογίες των γαλακτωματοποιητών Tween 60 και Tween 80 και χαρακτηρίστηκαν από υψηλές τιμές χρώματος και μέσης διαμέτρου σταγονιδίων και από χαμηλή σταθερότητα. Τα δείγματα της δεύτερης ομάδας αφορούσαν κατά κύριο λόγο στα μικρο/νανο-γαλακτώματα με προσθήκη των γαλακτωματοποιητών Tween 80 και Span 80 σε αναλογίες 4-6% w/w. Χαρακτηρίστηκαν από υψηλές τιμές ιξώδους, θολότητας και δείκτη πολυδιασποράς. Η τρίτη ομάδα δειγμάτων περιελάμβανε τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με τους γαλακτωματοποιητές Tween 40 και Span 20 σε αναλογίες 2-6% w/w. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα αυτά χαρακτηρίστηκαν από υψηλό δείκτη σταθερότητας, χαμηλή μέση διάμετρο σταγονιδίων και χρώματος. Τέλος η τέταρτη ομάδα περιελάμβανε τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με υψηλή αναλογία γαλακτωματοποιητή (10 % w/w) και χαρακτηρίστηκαν από χαμηλή σταθερότητα και υψηλές τιμές μέσης διαμέτρου σταγονιδίων και χρώματος. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα για ένα σύστημα ν/ε μικρο/νανο-γαλακτώματος με βάση το ελαιόλαδο καλύτεροι γαλακτωματοποιητές βρέθηκαν οι Tween 20, Tween 40 και Span 20.



Διάγραμμα 4.11 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.



Διάγραμμα 4.12 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (score plot) των δειγμάτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.2.8 Προσδιορισμός Οξειδωτικής Σταθερότητας

Μελετήθηκε η οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωμάτων και ειδικότερα η επίδραση των γαλακτωματοποιητών στην οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Σύμφωνα με τους (Waraho, McClements and Decker, 2011b), η συγκέντρωση και το είδος του γαλακτωματοποιητή, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Στην παρούσα έρευνα, αποδείχθηκε πειραματικά ότι τόσο το είδος όσο και η αναλογία του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν σημαντικά την οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.5, η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε μεγαλύτερη σταθερότητα των μελετώμενων συστημάτων. Ειδικότερα, ο γαλακτωματοποιητής Span 80 είχε την καλύτερη προστατευτική δράση, ακολουθούμενος από τον Tween 80. Αντίστοιχα συμπεράσματα είχαν εξαγάγει οι Ambrosone et al. (2007), οι οποίοι απέδειξαν ότι οι μη-ιοντικοί γαλακτωματοποιητές με χαμηλό HLB ή αλλιώς με έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπαρών σε συστήματα γαλακτωμάτων τύπου νερό-σε-έλαιο. Επιπλέον, οι γαλακτωματοποιητές Tween 80 και Span 80 οδήγησαν σε μεγαλύτερες τιμές μέσης διαμέτρου σταγονιδίων και σύμφωνα με τους (Lee and Choe, 2011) και (Berton-Carabin, Sagis and Schroën, 2018), η αύξηση του μεγέθους των σταγονιδίων αυξάνει την οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωμάτων καθώς μειώνεται το συνολικό εμβαδόν της διεπιφάνειας ελαίου και νερού.

Πίνακας 4.5 Μεταβολή τιμής Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) (οξειδωτική σταθερότητα) του περιεχόμενου ελαίου των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση στους 40 °C για 40 ημέρες. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων ($\text{max SD}=0,18$).

Γαλακτωματοποιητής	Αναλογία	Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) - Ημέρες αποθήκευσης						
		0	5	10	15	30	35	40
Τυφλό	(98-0-2)	4,45	8,99	12,5	19,47	23,32	28,65	32,84
Tween 20	(88-10-2)	4,55	7,95	9,70	12,75	18,81	23,35	24,46
	(90-8-2)	4,53	8,36	10,52	14,47	19,37	23,40	27,79
	(92-6-2)	4,43	8,87	12,05	15,33	21,45	25,38	27,25
	(94-4-2)	4,44	8,85	13,33	16,40	23,79	26,45	29,85
	(96-2-2)	4,45	8,59	11,35	17,45	23,35	28,67	30,81
	(88-10-2)	4,46	9,56	11,44	11,14	19,01	23,85	25,43
Tween 40	(90-8-2)	4,33	9,94	11,85	12,31	20,98	25,88	27,31
	(92-6-2)	4,51	10,22	12,61	16,69	21,35	26,16	27,84
	(94-4-2)	4,50	10,87	13,91	17,05	23,86	24,77	27,30
	(96-2-2)	4,62	11,86	15,05	18,68	23,14	27,26	31,35
	(88-10-2)	4,44	7,08	8,70	11,55	17,13	20,61	21,33
Tween 60	(90-8-2)	4,38	7,35	9,05	12,37	17,09	23,39	23,86
	(92-6-2)	4,39	7,69	9,85	13,46	17,96	23,34	26,14
	(94-4-2)	4,51	8,45	11,11	13,93	20,35	24,05	27,52
	(96-2-2)	4,51	8,45	11,11	13,93	20,35	24,05	27,52

Αποτελέσματα - Συζήτηση

	(96-2-2)	4,62	8,84	12,06	15,35	21,65	24,53	30,85
Tween 80	(88-10-2)	4,13	7,01	8,45	11,61	16,84	19,23	20,52
	(90-8-2)	4,41	7,06	8,72	11,55	17,17	20,35	21,35
	(92-6-2)	4,37	7,31	9,05	11,96	17,83	22,15	23,39
	(94-4-2)	4,55	7,60	9,89	13,44	17,95	23,34	26,18
	(96-2-2)	4,68	8,16	11,4	13,97	20,32	23,73	27,50
Span 20	(88-10-2)	4,43	7,10	8,88	11,85	17,39	21,35	21,83
	(90-8-2)	4,48	7,59	9,10	12,13	17,84	22,86	22,37
	(92-6-2)	4,39	7,75	9,85	13,85	18,35	23,45	25,46
	(94-4-2)	4,71	8,03	11,27	14,37	20,21	24,81	27,55
	(96-2-2)	4,46	8,45	12,07	15,68	21,70	25,75	31,38
Span 80	(88-10-2)	4,39	6,84	8,44	11,12	16,45	19,54	20,25
	(90-8-2)	4,55	7,05	8,76	2,51	17,12	21,39	22,31
	(92-6-2)	4,41	7,30	9,45	12,93	17,28	22,45	25,13
	(94-4-2)	4,47	7,82	10,62	13,45	19,57	22,86	25,35
	(96-2-2)	4,78	7,94	11,51	14,70	21,15	23,15	29,03

4.3 3^η σειρά πειραμάτων: Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο και ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου

Η κινητική και οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωμάτων εξαρτάται άμεσα από τη σύστασή τους καθώς και από αντιδράσεις διάσπασης των συστατικών τους (McClements, 2015a). Συμβατικά, για να αυξηθεί η σταθερότητα των γαλακτωμάτων προστίθενται χημικά επιφανειοδραστικά και αντιοξειδωτικά συστατικά (Szterk, Roszko and Górnicka, 2013; McClements, 2015b). Οι ουσίες αυτές, παρότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές και χαμηλού κόστους, τείνουν να αντικαθίστανται τελευταία με φυσικά εναλλακτικά συστατικά, εξαιτίας της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σε θέματα υγείας και ασφάλειας (Berton-Carabin, M.-H. Ropers and Genot, 2014; Berton-Carabin, Sagis and Schroën, 2018; Kumar *et al.*, 2019). Σχετικές μελέτες επικεντρώνονται σε ορισμένα ενδογενή βιοδραστικά συστατικά που περιέχονται σε φυσικά ακατέργαστα έλαια (Chaiyasit *et al.*, 2008), και έχουν αντιοξειδωτικές και αμφιφιλικές ιδιότητες (Xenakis, Papadimitriou and Sotiroudis, 2010; Koidis and Boskou, 2015a).

Αυξημένη προσοχή έχει δοθεί στα μικρο-συστατικά που περιέχονται στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και ειδικότερα στα φαινολικά συστατικά του. Τα φαινολικά συστατικά είναι γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες και λειτουργούν ως παράγοντες δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Είναι σε θέση να αναστέλλουν τόσο την έναρξη όσο και τη διάδοση της οξείδωσης (Koidis and Boskou, 2015a) και μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών (Bucciantini *et al.*, 2021).

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της μηχανικής παραλαβής του ελαιόλαδου μεταφέρονται στο έλαιο μικρο-συστατικά από τον πυρήνα και τη σάρκα της ελιάς. Τα συστατικά αυτά είναι κατά κανόνα λιπόφιλα. Ωστόσο, κάποια από αυτά είναι αμφίφιλα ή ακόμη και υδρόφιλα. Τα αμφίφιλα συστατικά αυτά όπως μονο- και δι-ακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, στερόλες, πολυφαινόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα προκαλούν αυθόρμητο σχηματισμό θερμοδυναμικά σταθερών κολλοειδών δομών όπως μικκύλια, ανεστραμμένα μικκύλια και λιποσώματα, σταθεροποιώντας μία μικρή περιεκτικότητα κολλοειδών σχηματισμών υδατικής φύσης με περιεκτικότητα υδατικής φάσης, κυμαινόμενη από 0,10 έως 0,25% w/w ή και περισσότερο (Ambrosone, Mosca and Ceglie, 2006; Xenakis, Papadimitriou and Sotiroudis, 2010). Τα χαρακτηριστικά αυτών των δομών διαφέρουν ανάλογα με την τεχνική εξαγωγής του ελαίου που εφαρμόζεται, την ποιότητα και ποικιλία του ελαιόκαρπου και τις συνθήκες της έκθλιψης, Σύμφωνα με τους (Sotiroudis *et al.*, 2005), αυτοί οι σχηματισμοί χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη σταθερότητα, ενώ η ύπαρξη των μικρο-συστατικών που τους σταθεροποιούν σε έλαιο που πρόκειται

να χρησιμοποιηθεί σε γαλάκτωμα, μπορεί να επηρεάσει είτε θετικά είτε αρνητικά, τα τελικά χαρακτηριστικά του γαλακτώματος. Σε αυτό το πλαίσιο, μελέτες που επιχείρησαν να προσδιορίσουν τη φύση αυτών των κολλοειδών σχηματισμών επιβεβαίωσαν ότι κάποια ενδογενή πολυφαινολικά συστατικά παρουσιάζουν γαλακτωματοποιητική ιδιότητα σε συνδυασμό με αντιοξειδωτική δράση (Garti, 1999). Τέτοια συστατικά που έχουν αναφερθεί είναι: η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ, το συριγγικό οξύ και η κερσετίνη (Sotiroudis *et al.*, 2005; Chaiyasit *et al.*, 2008; Di Mattia *et al.*, 2009). Παρότι αυτά τα συστατικά θα μπορούσαν να αποτελέσουν εξαιρετικά λειτουργικά συστατικά τροφίμων λόγω της γαλακτωματοποιητικής, αντιοξειδωτικής και βιοδραστικής τους φύσης, περιορισμένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την εφαρμογή τους σε συστήματα ν/ε γαλακτωμάτων (βλέπε §2.2.1)..

Ο σκοπός της 3^{ης} σειράς πειραμάτων ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης συγκεκριμένων φαινολικών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στην οξειδωτική και κινητική σταθερότητα ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο χωρίς την προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας. Τα φαινολικά συστατικά που εξετάστηκαν ήταν η κερσετίνη, το γαλλικό οξύ, η απιγενίνη, και το trans-σινναμικό οξύ. Τα συστατικά αυτά επιλέχθηκαν τόσο για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες όσο και για τον αμφιφιλικό τους χαρακτήρα που τα κατευθύνει προς τη διεπιφάνεια νερού-ελαίου προσδίδοντας σταθερότητα στο τελικό γαλάκτωμα. Οι βιοδραστικές ιδιότητες των συστατικών αυτών έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, και αντιϊκές ιδιότητες (Arabi, Ghaedi and Ostovan, 2017; Cvetanović *et al.*, 2017; Lévai *et al.*, 2017; Rajan and Muraleedharan, 2017; Trendafilova *et al.*, 2017; Briguglio *et al.*, 2020; Mehmood *et al.*, 2020).

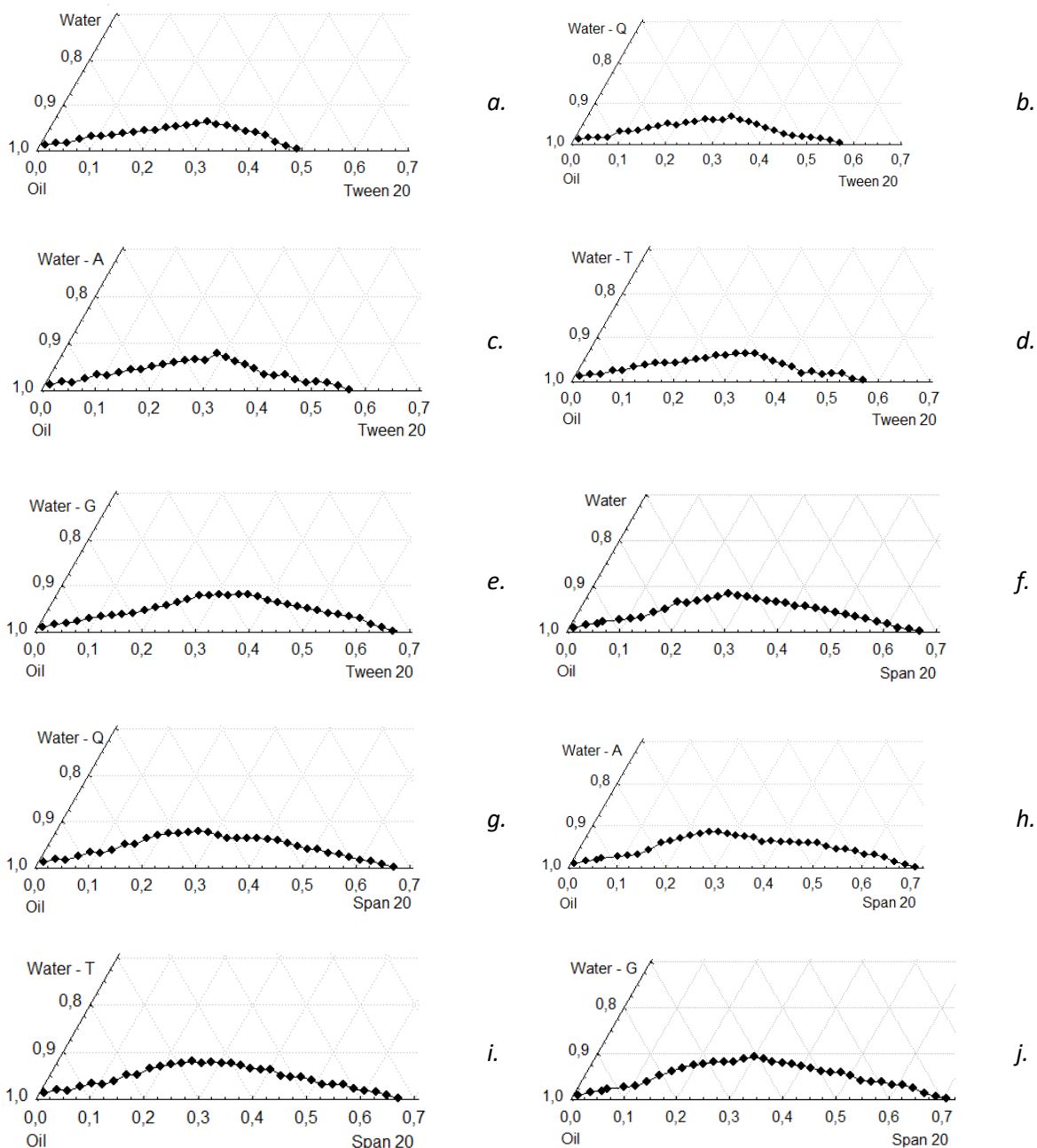
Όπως και στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, κατασκευάστηκαν τριαδικά διαγράμματα φάσης με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή και πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση της υδατικής φάσης στο μίγμα ελαίου-γαλακτωματοποιητή, ώστε να προσδιοριστεί το πεδίο των αναλογιών των τριών συστατικών που με ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν μικρο/νανο-γαλάκτωμα.

Χρησιμοποιήθηκαν οι γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Span 20 που βάσει των αποτελεσμάτων της 2^{ης} σειράς κρίθηκαν οι πιο αποτελεσματικοί. Έπειτα, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με συγκεκριμένες αναλογίες και προσδιορίστηκε η κινητική και οξειδωτική σταθερότητά τους, καθώς και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μέσο μέγεθος σταγονιδίων, μορφή διασποράς, ζ-δυναμικό, θολότητα, χρώμα).

4.3.1 Διαγράμματα φάσης

Στο Διάγραμμα 4.13 παρουσιάζονται τα μερικά ψευδο-τριαδικά διαγράμματα φάσης (η υδατική φάση εμπεριέχει διαλυμένο το υπό εξέταση φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου σε συγκέντρωση

1% w/w) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με δύο διαφορετικούς γαλακτωματοποιητές και 4 διαφορετικά φαινολικά συστατικά στους 40 °C. Ο σχηματισμός των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε με οπτική παρατήρηση. Η περιοχή κάτω από τη γραμμή τάσης στο διάγραμμα φάσης περιγράφει το πεδίο των αναλογιών των τριών συστατικών που με την ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν μικρο/νανο-γαλάκτωμα.



Διάγραμμα 4.13 Ψευδο-τριαδικά διαγράμματα φάσης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξευγενισμένο ελαιόλαδο – νερό –γαλ/τή με 2 διαφορετικούς γαλακτωματοποιητές και 4 φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου στους 40° C. Η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά και η συγκέντρωση του νερού από κάτω προς τα πάνω. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου είναι

διαλυμένα στην υδατική φάση σε συγκέντρωση 1% w/w. (a. Tween 20 – νερό, b. Tween 20-κερσετίνη, c. Tween 20-απιγενίνη, d. Tween 20-trans-σινναμικό οξύ, e. Tween 20-γαλλικό οξύ, f. Span 20 – νερό, g. Span 20-κερσετίνη, h. Span 20-απιγενίνη, i. Span 20-trans-σινναμικό οξύ, j. Span 20-γαλλικό οξύ)

Όπως και στη 2^η σειρά πειραμάτων, ο γαλακτωματοποιητής Span 20 οδήγησε σε ευρύτερο φάσμα δυνατών συγκεντρώσεων που μπορούν να οδηγήσουν σε μικρο/νανο-γαλάκτωμα. Επιπλέον η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στην υδατική φάση, οδήγησε σε αύξηση του εύρους των δυνατών συγκεντρώσεων. Ειδικότερα η ενσωμάτωση γαλλικού οξέος στην υδατική φάση οδήγησε σε αύξηση τόσο του εύρους των δυνατών συγκεντρώσεων όσο και σε αύξηση της μέγιστης συγκέντρωσης υδατικής φάσης. Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωση υδατικής φάσης (1% w/w γαλλικό οξύ) που επιτεύχθηκε στα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα ήταν 8,99 % w/w με την προσθήκη 30,1% w/w Span 20, και 8,82% w/w με προσθήκη 34,8% w/w Tween 20. Η προσθήκη των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου σε συνδυασμό με τους γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Span 20 δεν είχε σημαντική επίδραση στα διαγράμματα φάσης των μελετώμενων συστημάτων.

Μετά το σχεδιασμό των διαγραμμάτων φάσης και τον προσδιορισμό του εύρους παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτώματος, κατασκευάστηκαν ν/ε μικρο/νανο-γαλακτώματα σε καθορισμένες αναλογίες των συστατικών τους, ώστε να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου.

4.3.2 Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, προσδιορίστηκε ο Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος κατά τη διάρκεια αποθήκευσης (8 εβδομάδες). Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.6, η σταθερότητα όλων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.05$) κατά την αποθήκευση, ένδειξη απουσίας θερμοδυναμικής σταθερότητας. Ωστόσο, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μέχρι και τη λήξη της μελέτης παρέμειναν διαυγή, ακόμη και αν παρατηρήθηκαν φαινόμενα αποκορύφωσης ή/και καταβύθισης. Αρχικά, το είδος του γαλακτωματοποιητή δεν εμφάνισε διαφορά στη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων αλλά μετά την τρίτη εβδομάδα αποθήκευσης, αποδείχθηκε ότι ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 οδήγησε σε μεγαλύτερη σταθερότητα. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου είχε σημαντική επίδραση στο ESI% των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Το γαλλικό οξύ, το trans-σινναμικό οξύ και η απιγενίνη έδρασαν

συμπληρωματικά με τους δύο γαλακτωματοποιητές, σταθεροποιώντας τα μικρο/νανο-γαλακτώματα. Αντιθέτως η κερσετίνη οδήγησε σε μείωση της σταθερότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

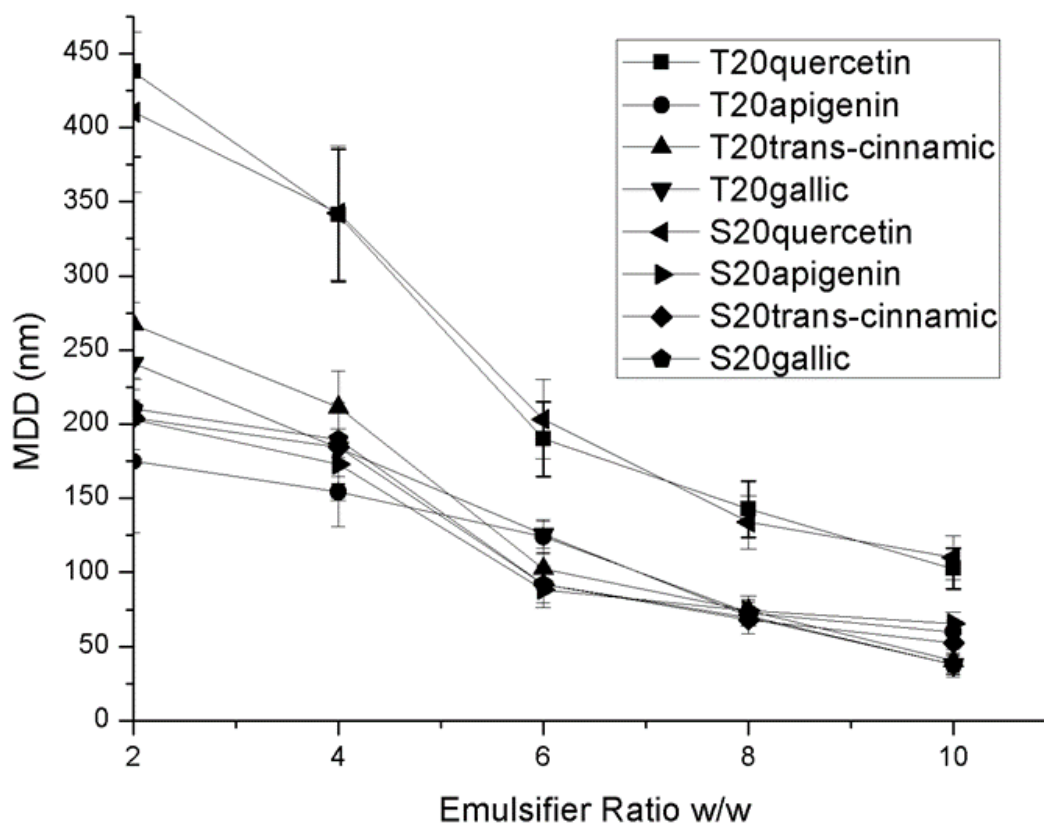
Πίνακας 4.6 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), υποδεικνύοντας την έκταση του βαρυτικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μήνες (8 εβδομάδες). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων ($max SD = 0,2$).

		ESI% ανά εβδομάδα									
Γαλ/τής	Φαινολικό συστατικό	Αναλογία (Ελαιο-γαλ/τής-υδατ. φάση)	Κωδικοποίηση δειγμάτων	1	2	3	4	5	6	7	8
Tween 20	Κερσετίνη	(88-10-2)	qT20a	100 ^a	99,5 ^c	99 ^c	99 ^c	98 ^c	98 ^e	98 ^f	97 ^e
		(90-8-2)	qT20b	100 ^a	99 ^b	99 ^c	99 ^c	98 ^c	97 ^c	96,5 ^c	96 ^c
		(92-6-2)	qT20c	100 ^a	99 ^b	99 ^c	99 ^c	98 ^c	97 ^c	95,5 ^a	96 ^c
		(94-4-2)	qT20d	100 ^a	99 ^b	98,5 ^b	98 ^a	97 ^b	97,5 ^d	96 ^b	95 ^a
		(96-2-2)	qT20e	100 ^a	99 ^b	98 ^a	98 ^a	96 ^a	96 ^a	96 ^b	95 ^a
	Απιγενίνη	(88-10-2)	aT20a	100 ^a	99,5 ^c	99 ^c	98,5 ^b	98,5 ^d	98,5 ^f	98,5 ^g	98,5 ^h
		(90-8-2)	aT20b	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99 ^e	98,5 ^f	98,5 ^g	98 ^g
		(92-6-2)	aT20c	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^g	99,5 ^h	98 ^f	98 ^g
		(94-4-2)	aT20d	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^g	100 ⁱ	99 ^h	98 ^g
		(96-2-2)	aT20e	100 ^a	99 ^b	99 ^c	100 ^e	100 ^g	100 ⁱ	100 ^j	98 ^g
	trans-Σινναμικό οξύ	(88-10-2)	tT20a	100 ^a	100 ^d	99 ^c	99,5 ^d	99 ^e	99 ^g	98,5 ^g	98,5 ^h
		(90-8-2)	tT20b	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99 ^e	99 ^g	98,5 ^g	98,5 ^h
		(92-6-2)	tT20c	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99 ^e	98,5 ^f	98,5 ^g	98 ^g
		(94-4-2)	tT20d	100 ^a	100 ^d	99,5 ^d	99,5 ^d	99 ^e	98,5 ^f	98,5 ^g	98 ^g
		(96-2-2)	tT20e	100 ^a	99 ^b	99 ^c	99 ^c	99 ^e	98,5 ^f	98 ^f	98 ^g
	Γαλλικό οξύ	(88-10-2)	gT20a	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^g	99,5 ^h	99,5 ⁱ	99,5 ^j
		(90-8-2)	gT20b	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^g	100 ⁱ	100 ^h	99,5 ^j
		(92-6-2)	gT20c	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^g	100 ^h	100 ^h	100 ⁱ
		(94-4-2)	gT20d	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^g	100 ^g	100 ^h	100 ⁱ
		(96-2-2)	gT20e	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^g	100 ⁱ	99 ^h	99 ⁱ
Span 20	Κερσετίνη	(88-10-2)	qS20a	100 ^a	100 ^d	99,5 ^d	99 ^c	98 ^c	97 ^c	97,5 ^e	97 ^e
		(90-8-2)	qS20b	100 ^a	100 ^d	99 ^c	98 ^a	98 ^c	97,5 ^d	97 ^d	96,5 ^d
		(92-6-2)	qS20c	100 ^a	99 ^b	99 ^c	98 ^a	97 ^b	97 ^c	96,5 ^c	96 ^c
		(94-4-2)	qS20d	100 ^a	99 ^b	98 ^a	98 ^a	98 ^c	98 ^e	97 ^d	96 ^c
		(96-2-2)	qS20e	100 ^a	98 ^a	98 ^a	98,5 ^b	97 ^b	96,5 ^b	96 ^b	95,5 ^b
	Απιγενίνη	(88-10-2)	aS20a	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99 ^e	98,5 ^f	98,5 ^g	98,5 ^h
		(90-8-2)	aS20b	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99 ^e	98,5 ^f	98,5 ^g	98 ^g
		(92-6-2)	aS20c	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^e	98 ^e	98 ^f	98 ^g
		(94-4-2)	aS20d	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99,5 ^f	98 ^e	98 ^f	98 ^g
		(96-2-2)	aS20e	100 ^a	99,5 ^c	99,5 ^d	99 ^c	98 ^c	97,5 ^d	97 ^d	96 ^c
	trans-Σινναμικό οξύ	(88-10-2)	tS20a	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99 ^e	98,5 ^f	98 ^f	98 ^g
		(90-8-2)	tS20b	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^d	100 ^f	99 ^g	98,5 ^g	98 ^g
		(92-6-2)	tS20c	100 ^a	100 ^d	99 ^c	99 ^c	98 ^c	98 ^e	98 ^f	97,5 ^f
		(94-4-2)	tS20d	100 ^a	100 ^d	99 ^c	99 ^c	98,5 ^d	98 ^e	98 ^f	97 ^e
		(96-2-2)	tS20e	100 ^a	99,5 ^c	99,5 ^d	99,5 ^d	98,5 ^d	98 ^e	97,5 ^e	97 ^e

Γαλλικό οξύ	(88-10-2)	gS20a	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	99,5 ^h	99,5 ⁱ	99,5 ^j	99,5 ^h
	(90-8-2)	gS20b	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	99,5 ^h	99,5 ⁱ	99,5 ^j	99,5 ^h
	(92-6-2)	gS20c	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^f	100 ^h	100 ⁱ	100 ^j
	(94-4-2)	gS20d	100 ^a	100 ^d	100 ^e	100 ^e	100 ^f	100 ^h	100 ⁱ	100 ^j
	(96-2-2)	gS20e	100 ^a	100 ^d	100 ^e	99,5 ^d	99 ^e	99 ^g	99 ^h	99 ⁱ

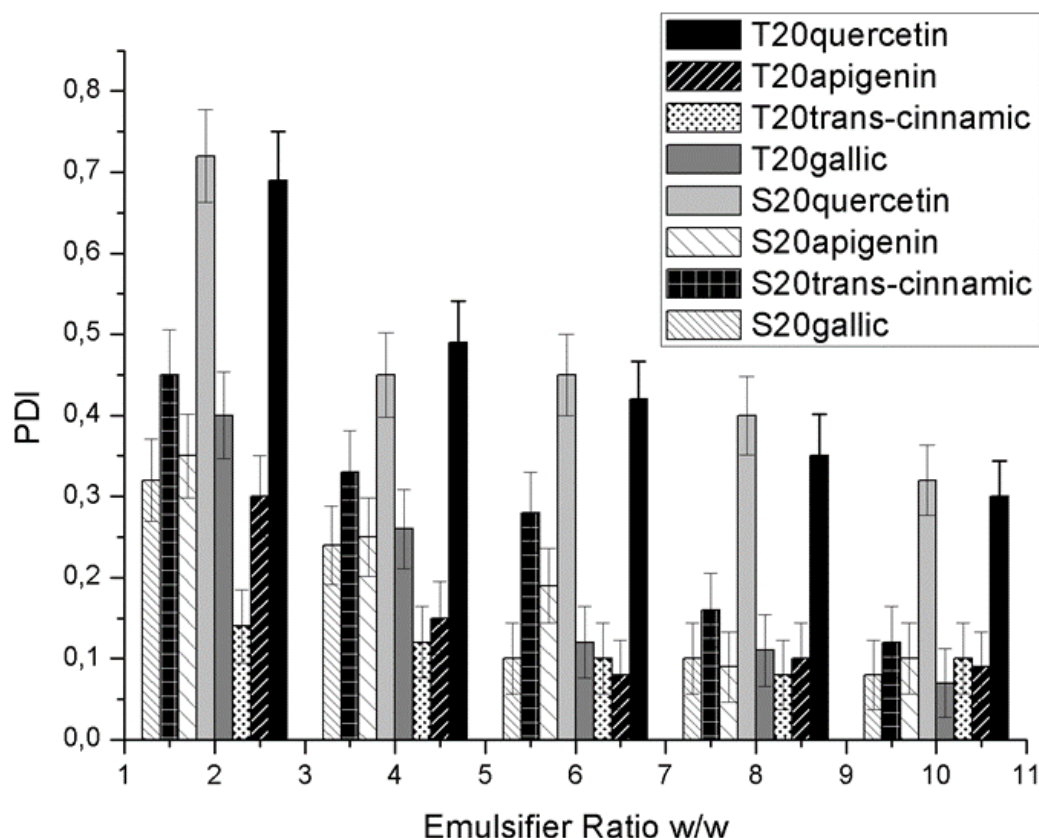
4.3.3 Προσδιορισμός δυναμικής σκέδασης φωτός

Στο Διάγραμμα 4.14 φαίνεται η επίδραση του γαλακτωματοποιητή και του φαινολικού συστατικού του ελαιόλαδου στη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των παρασκευασμένων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Με σύγκριση των αποτελεσμάτων της 2ης σειράς πειραμάτων προέκυψε ότι τόσο η συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή όσο και η προσθήκη φαινολικού συστατικού του ελαιόλαδου επηρέασαν σημαντικά το μέγεθος των σταγονιδίων ($P < 0,05$). Η αύξηση της συγκέντρωσης γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές MDD. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών επηρέασε κατά το πλείστον θετικά τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Το γαλλικό οξύ είχε θετική επίδραση, οδηγώντας σε χαμηλότερες τιμές MDD, ενώ η κερσετίνη οδήγησε σε υψηλότερες τιμές. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κερσετίνη χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, και κατά την ενσωμάτωσή της στην υδατική φάση βρισκόταν υπό μορφή εναιωρήματος. Επομένως, ήταν αναμενόμενο να μην ενσωματωθεί ομοιογενώς στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων, και να οδηγήσει σε μεγαλύτερες τιμές MDD. Η ενσωμάτωση του trans-σινναμικού οξέος και της απιγενίνης οδήγησε σε μη σημαντική μείωση του MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Η μικρότερη τιμή MDD που επιτεύχθηκε ήταν 39,7 nm με προσθήκη 10% w/w Span 20 και γαλλικού οξέος στην υδατική φάση. Όλα τα υπό εξέταση γαλακτώματα παρουσίασαν $MDD < 500\text{nm}$ επομένως χαρακτηρίστηκαν ως μικρο/νανο-γαλακτώματα.



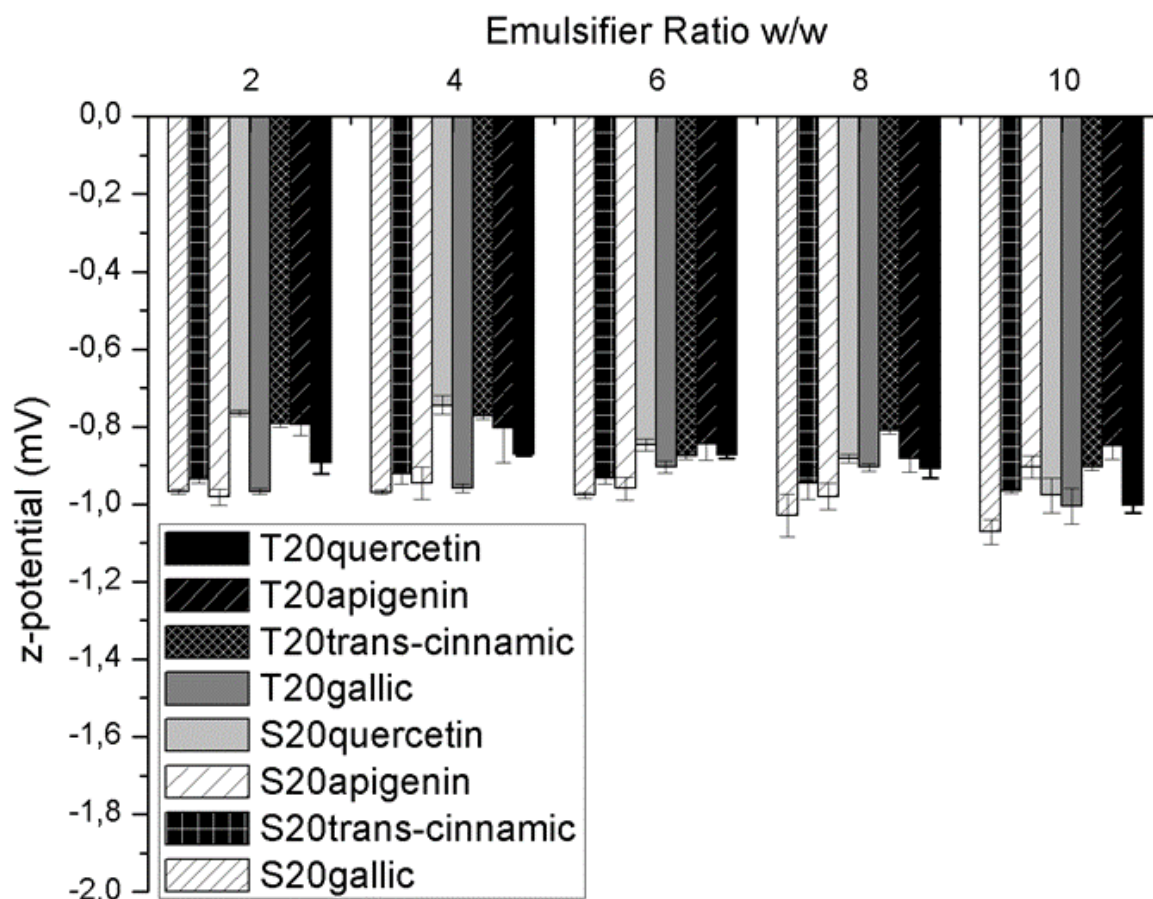
Διάγραμμα 4.14 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου

Το Διάγραμμα 4.15 παρουσιάζει τον δείκτη πολυδιασποράς των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που μελετήθηκαν. Το είδος του γαλακτωματοποιητή, η αναλογία, αλλά και το είδος του φαινολικού συστατικού του ελαιόλαδου επηρέασαν σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς PDI ($P < 0,05$). Ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές PDI, ενώ αύξηση της συγκέντρωσης και των δύο γαλακτωματοποιητών είχε ως αποτέλεσμα της μείωση του PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Σχετικά με τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου, το trans-σινναμικό οξύ, το γαλλικό οξύ, και η απιγενίνη βελτίωσαν την πολυδιασπορά, οδηγώντας σε χαμηλότερες τιμές PDI. Η ενσωμάτωση κερσετίνης στην υδατική φάση αύξησε το PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων όπως ήταν αναμενόμενο καθώς δεν μπορούσε να διαλυτοποιηθεί πλήρως στο σύστημα.



Διάγραμμα 4.15 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στον Δείκτη Πολυδιασποράς PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών ελαιόλαδου

Η επίδραση των δύο γαλακτωματοποιητών, η αναλογία στην οποία προστέθηκαν στο σύστημα, αλλά και η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στο ζ-δυναμικό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων φαίνεται στο Διάγραμμα 4.16. Το είδος, η αναλογία του γαλακτωματοποιητή και η παρουσία φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου επηρέασαν σημαντικά το ζ-δυναμικό των γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Όπως και στη 2^η σειρά πειραμάτων, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με Span 20, είχαν μεγαλύτερες (απόλυτες) τιμές ζ-δυναμικού, ενώ αύξηση της συγκέντρωσης γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της απόλυτης τιμής του ζ-δυναμικού. Τα φαινορικά συστατικά του ελαιόλαδου αύξησαν την απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, με το γαλλικό οξύ και την απιγενίνη να είναι τα πιο αποτελεσματικά. Όπως είχε αναφερθεί και παραπάνω, υψηλότερες απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού βοηθούν στη σταθεροποίηση του γαλακτώματος. Πράγματι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που περιείχαν γαλλικό οξύ και απιγενίνη στην υδατική τους φάση χαρακτηρίστηκαν από μεγάλη σταθερότητα.

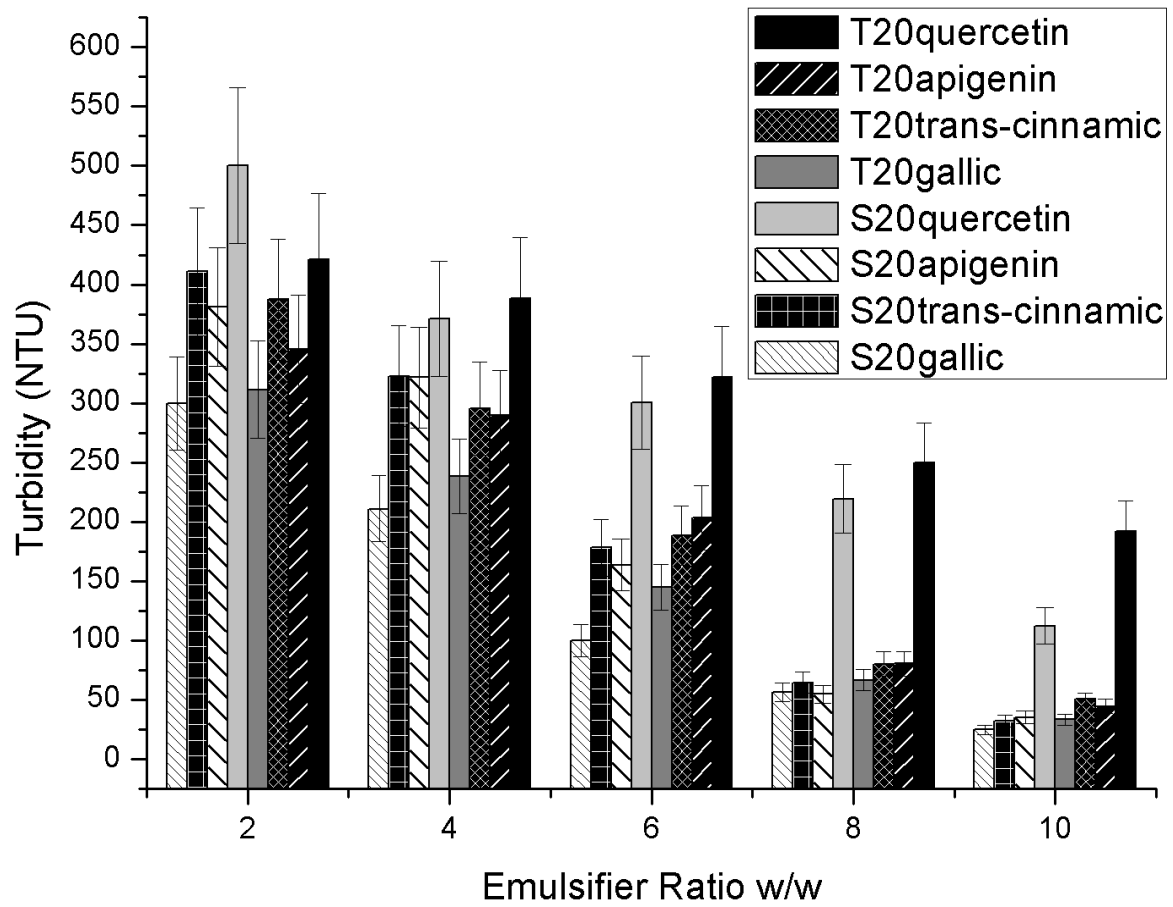


Διάγραμμα 4.16 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο ζ-δυναμικό (mV) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου

4.3.4 Προσδιορισμός Θολότητας

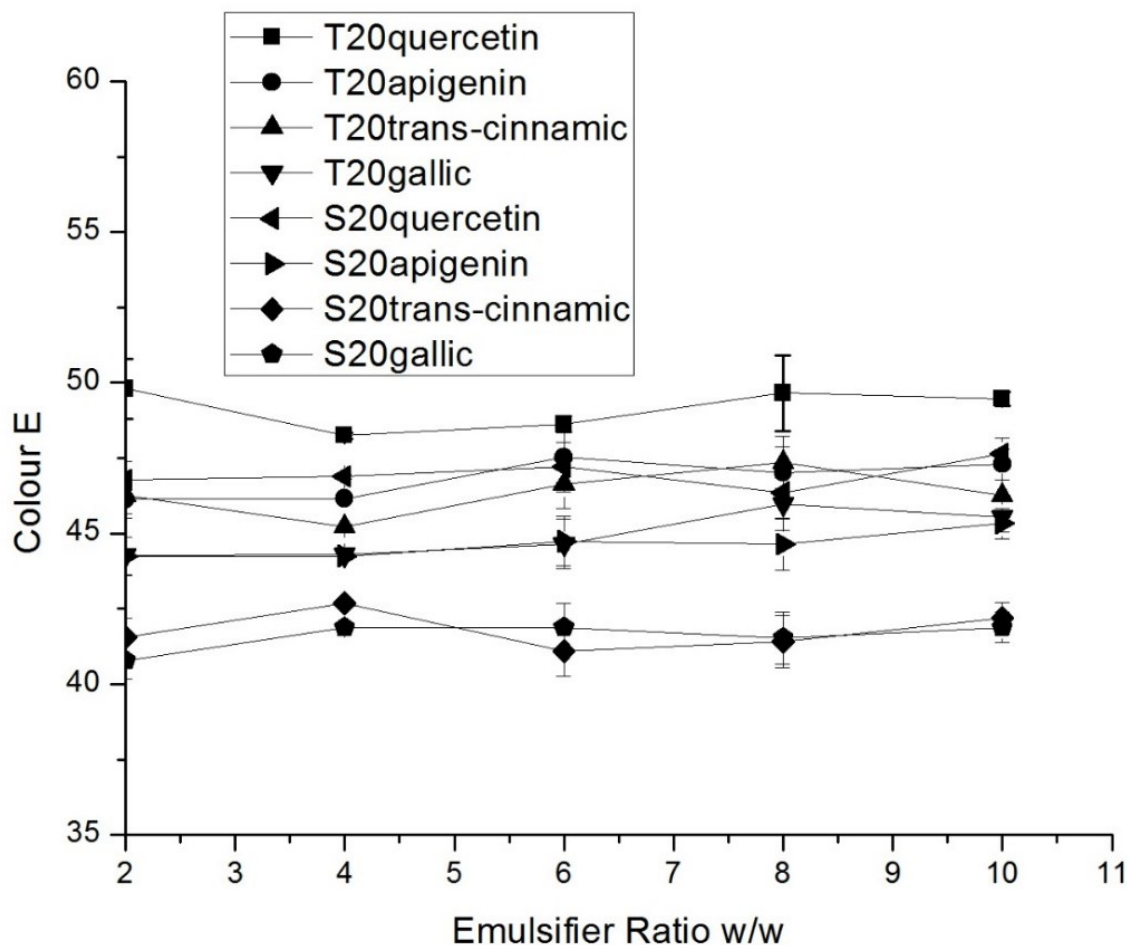
Η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κυμάνθηκε από 26 έως 751 NTU και επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή καθώς και από το είδος του φαινολικού συστατικού του ελαιόλαδου που ενσωματώθηκε στην υδατική φάση ($P < 0,05$). Η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων είναι άμεσα συσχετιζόμενη με τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων και το δείκτη πολυδιασποράς των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Επομένως, ήταν αναμενόμενο να οδηγήσει σε παρόμοια συμπεράσματα. Πράγματι η αύξηση της συγκέντρωσης γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές θολότητας. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου μείωσε τη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, με εξαίρεση την κερσετίνη, που λόγω χαμηλής διαλυτότητας οδήγησε σε μικρο/νανο-γαλακτώματα με υψηλή θολότητα. Το γαλλικό οξύ αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από την απιγενίνη. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 4.17, σε

ορισμένες περιπτώσεις η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων πλησίασε κατά πολύ τη θολότητα του καθαρού εξευγενισμένου ελαιόλαδου που είναι 22 NTU.



Διάγραμμα 4.17 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη θολότητα (NTU) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου

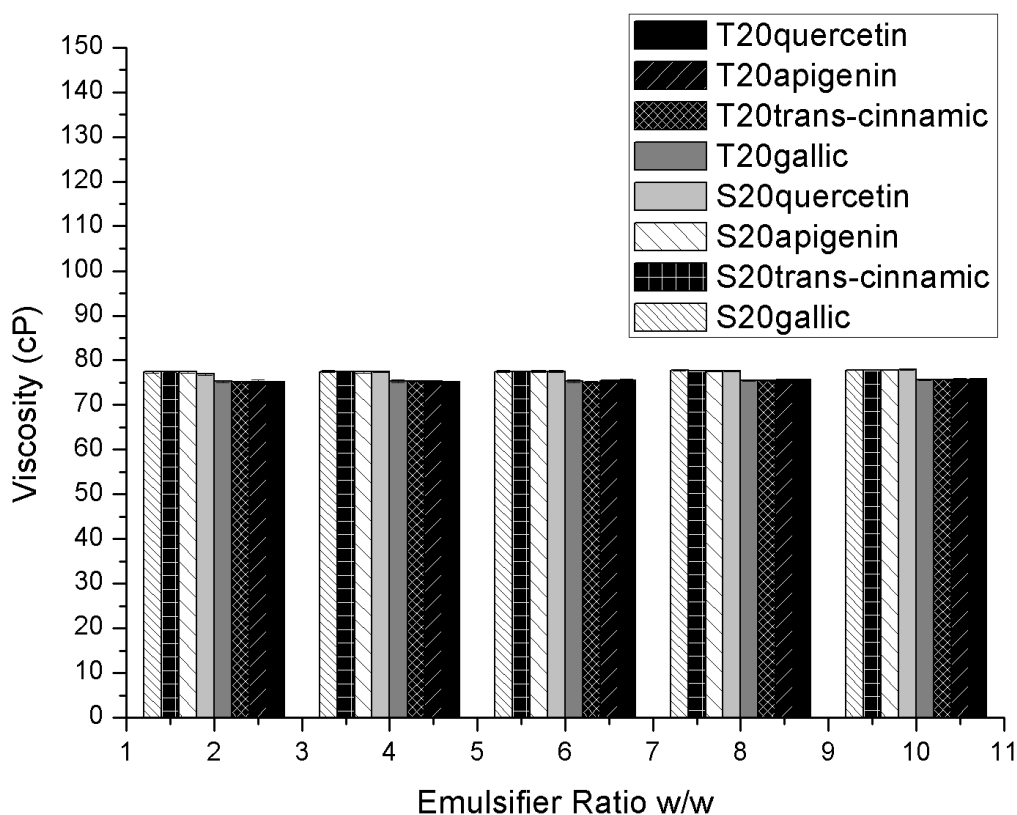
4.3.5 Προσδιορισμός Χρώματος



Διάγραμμα 4.18 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο χρώμα (E) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου

Το χρώμα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4.18. Το είδος του γαλακτωματοποιητή και του φαινολικού συστατικού του ελαιόλαδου επηρέασαν σημαντικά το χρώμα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που περιείχαν Tween 20 χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερες τιμές χρώματος, όπως αποδείχθηκε και στη 2^η σειρά πειραμάτων. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών μείωσε την τιμή του χρώματος των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, με εξαίρεση της κερσετίνης. Η κερσετίνη έχει φυσικό έντονο κίτρινο χρώμα, ενώ παράλληλα οδήγησε και σε μικρο/νανο-γαλακτώματα με υψηλότερη θολότητα, επομένως ήταν επόμενο να οδηγήσει σε μικρο/νανο-γαλακτώματα με υψηλή τιμή χρώματος.

4.3.6 Προσδιορισμός ρεολογικής συμπεριφοράς



Διάγραμμα 4.19 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο ιξώδες (cP) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της προσθήκης των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στο ιξώδες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, μελετήθηκε η ρεολογική συμπεριφορά τους. Το ιξώδες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Διάγραμμα 4.19), επηρεάστηκε από το είδος του γαλακτωματοποιητή στο τελικό μίγμα ($P < 0,05$). Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με το γαλακτωματοποιητή Span 20, όπως και στο πρώτο μέρος της έρευνας εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές ιξώδους. Η προσθήκη των διαφόρων φαινολικών συστατικών δεν είχε σημαντική επίδραση στη μεταβολή του ιξώδους των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

4.3.7 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Προκειμένου να διευκρινιστεί η συσχέτιση των ιδιοτήτων των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA). Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC-1) περιγράφει το 71,40% της διακύμανσης, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC-2), περιγράφει το 16,41%, συνεπώς και οι δύο μαζί συνεισέφεραν στο 97,81% της συνολικής διακύμανσης του πειράματος. Αναφορικά με τις μεταβλητές που μελετήθηκαν με PCA (Διάγραμμα 4.20), η θολότητα, ο δείκτης πολυδιασποράς και η μέση διάμετρος σταγονιδίων, συσχετίστηκαν μεταξύ τους, και όπως προέκυψε συνεισέφεραν αρνητικά στην πρώτη συνιστώσα. Ο δείκτης σταθερότητας συνεισέφερε θετικά στην πρώτη συνιστώσα παρουσιάζοντας αντίθετη συσχέτιση από την προηγούμενη ομάδα παραμέτρων, ενώ το ζ-δυναμικό συνεισέφερε αρνητικά στη δεύτερη συνιστώσα.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των δειγμάτων με PCA (Διάγραμμα 4.21). Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα προέκυψαν οι εξής 4 ομάδες:

- (a) gS20a, gS20b, gS20c, aS20b, tS20a, tS20b
- (b) qT20b, qT20c, qT20d, qT20e, qS20c, qS20b,
- (c) aT20e, aT20d, tT20e, tT20d,
- (d) aT20a, aT20c, aS20a, tT20a, tT20b, tT20c, gT20b

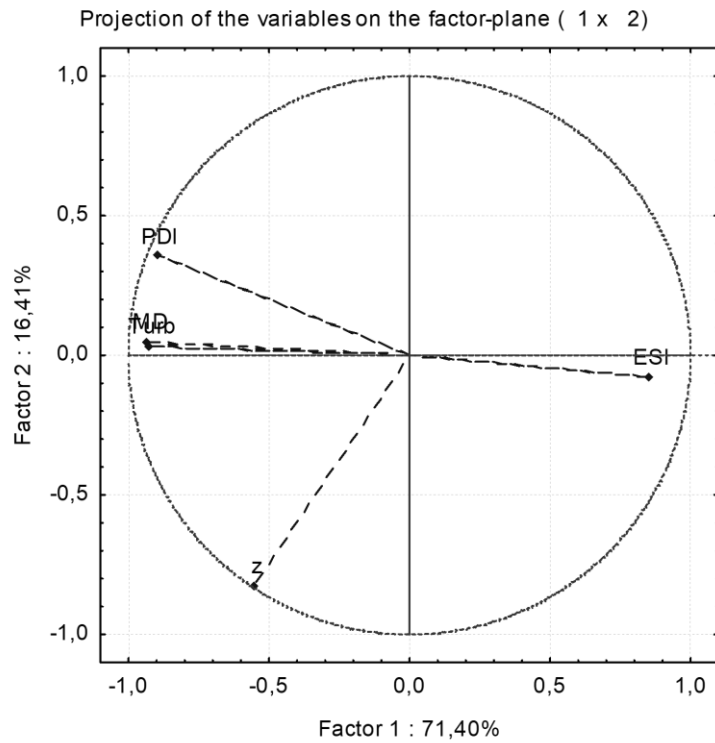
Μελετώντας παράλληλα τις Εικόνες 4.19 και 4.20 προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα.

Η ομάδα (a) αφορά στα μικρο/νανο-γαλακτώματα που περιείχαν γαλλικό οξύ, απιγενίνη και trans-σινναμικό οξύ και χαρακτηρίστηκαν από υψηλή σταθερότητα και χαμηλή θολότητα.

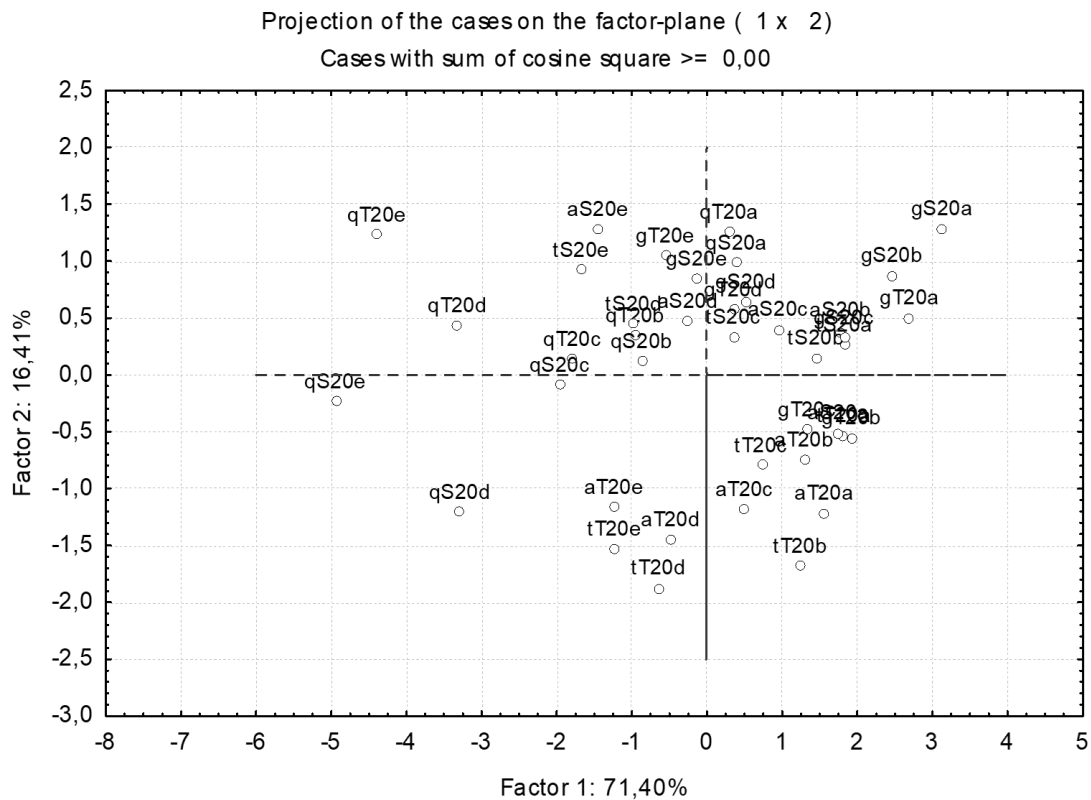
Η ομάδα (b) περιλαμβάνει μικρο/νανο-γαλακτώματα που περιείχαν κερσετίνη. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα αυτά χαρακτηρίστηκαν από χαμηλή σταθερότητα, υψηλή μέση διάμετρο σταγονιδίων, δείκτη πολυδιασποράς και θολότητα.

Η ομάδα (c) περιλαμβάνει δείγματα που περιείχαν απιγενίνη και trans-σινναμικό οξύ. Τα δείγματα αυτά παρουσίασαν υψηλές τιμές ζ-δυναμικού.

Τέλος η ομάδα (d) περιλαμβάνει τα δείγματα που περιείχαν υψηλή συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή. Τα δείγματα αυτά χαρακτηρίστηκαν από υψηλή σταθερότητα και χαμηλή μέση διάμετρο σταγονιδίων.



Διάγραμμα 4.20 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.



Διάγραμμα 4.21 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (score plot) των δειγμάτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.3.8 Προσδιορισμός Οξειδωτικής Σταθερότητας

Η οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων μελετήθηκε, ώστε να προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου και ο γαλακτωματοποιητής επέδρασαν στην οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται οι τιμές του αριθμού υπεροξειδίων που μετρήθηκαν στα δείγματα ανά 5 ημέρες αποθήκευσης σε επιταχυμένες συνθήκες οξείδωσης στους 40 °C. Οι τιμές Α.Υ. ανήχθησαν στο καθαρό ποσοστό ελαίου που περιείχε κάθε γαλάκτωμα. Η αναλογία του γαλακτωματοποιητή και το είδος του φαινολικού συστατικού του ελαιόλαδου επηρέασαν σημαντικά την οξειδωτική σταθερότητα ($P < 0,05$). Η προσθήκη γαλακτωματοποιητή έδρασε θετικά στην οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, όπως είχε ήδη αποδειχθεί και από τη 2^η σειρά πειραμάτων. Οι δύο γαλακτωματοποιητές μεταξύ τους δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές, όμως παρατηρήθηκε ότι αύξηση της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Η ενσωμάτωση όλων των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου επίσης λειτούργησε προστατευτικά όσον αφορά στην οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Τα συστατικά που μελετήθηκαν λειτούργησαν κατά παρόμοιο τρόπο εμφανίζοντας παραπλήσια αποτελέσματα. Το γαλλικό οξύ φάνηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό, παρεμποδίζοντας τη δημιουργία υπεροξειδίων.

Πίνακας 4.7 Μεταβολή τιμής Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) (οξειδωτική σταθερότητα) του περιεχόμενου ελαίου των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση επί 40 ημέρες στους 40°C. Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$). Οι τυπικές αποκλίσεις δεν παρουσιάζονται για χάρη καλύτερης ανάγνωσης των αποτελεσμάτων ($\text{max SD} = 0,16$).

Γαλ/τής	Φαινολικό συστατικό	Αναλογία	Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) - Ημέρες αποθήκευσης						
			0	5	10	15	30	35	40
Tween 20	Κερσετίνη	(88-10-2)	3,42	6,32	8,6	11,05	16,54	20,55	21,24
		(90-8-2)	3,60	6,71	8,3	11,25	17,53	22,46	21,51
		(92-6-2)	3,57	6,96	9,7	13,64	17,52	22,69	24,65
		(94-4-2)	3,78	7,28	10,4	13,54	19,06	24,12	26,76
		(96-2-2)	3,74	7,63	11,2	14,84	21,42	24,93	30,58
	Απιγενίνη	(88-10-2)	3,64	6,76	8,5	10,62	17,55	20,84	22,45
		(90-8-2)	3,43	7,19	8,9	11,95	18,76	22,58	23,63
		(92-6-2)	3,42	7,52	9,7	13,55	18,53	20,25	26,91
		(94-4-2)	3,46	8,90	11,2	14,51	20,67	24,53	28,43
		(96-2-2)	3,54	8,32	12,5	15,63	22,99	25,66	31,91
	trans-Σινναμικό οξύ	(88-10-2)	3,52	6,69	8,3	11,09	16,55	19,08	20,86
		(90-8-2)	3,31	6,76	8,6	11,54	17,28	21,59	22,62
		(92-6-2)	3,47	6,38	8,9	12,98	17,67	22,28	26,36

Αποτελέσματα - Συζήτηση

	(94-4-2)	3,50	7,59	10,6	13,29	19,55	23,69	27,88
	(96-2-2)	3,70	7,81	11,6	14,52	22,92	23,74	30,25
	(88-10-2)	3,52	6,14	7,89	10,56	16,01	19,28	20,12
	(90-8-2)	3,44	6,52	8,2	11,17	16,32	21,73	22,57
	(92-6-2)	3,61	6,60	8,8	12,52	17,13	22,14	25,17
	(94-4-2)	3,62	7,23	10,2	12,92	19,86	22,08	26,52
	(96-2-2)	3,59	7,24	11,1	14,03	20,41	21,50	29,51
	(88-10-2)	3,47	6,26	7,92	10,57	16,25	19,51	20,68
	(90-8-2)	3,52	6,50	8,23	11,15	16,98	21,32	22,57
	(92-6-2)	3,51	6,81	9,75	12,63	17,14	22,58	25,34
	(94-4-2)	3,56	7,32	10,25	13,15	19,56	22,94	26,72
	(96-2-2)	3,39	7,48	11,21	14,58	20,87	23,52	29,57
	(88-10-2)	3,60	8,77	10,66	10,30	18,21	20,36	23,35
	(90-8-2)	3,53	9,17	11,90	11,59	20,13	25,91	26,51
	(92-6-2)	3,63	9,46	11,87	15,82	20,55	26,2	27,13
	(94-4-2)	3,58	10,4	13,17	16,27	23,67	24,57	26,54
	(96-2-2)	3,55	11,6	14,24	17,85	22,37	27,89	30,65
Span 20	(88-10-2)	3,29	6,20	7,92	10,71	16,25	19,58	20,45
	(90-8-2)	3,54	6,53	8,21	11,56	16,23	22,57	23,04
	(92-6-2)	3,67	6,86	9,08	12,61	17,14	22,50	25,37
	(94-4-2)	3,41	7,65	10,27	13,13	19,50	23,21	26,79
	(96-2-2)	3,40	8,52	11,23	14,54	20,82	23,57	30,13
	(88-10-2)	3,44	6,39	7,65	10,37	15,64	18,75	19,46
	(90-8-2)	3,37	6,28	7,92	12,76	16,33	20,54	21,53
	(92-6-2)	3,58	6,52	8,06	12,01	16,48	21,62	24,33
	(94-4-2)	3,64	7,77	9,58	12,65	18,79	22,01	24,57
	(96-2-2)	3,56	7,13	10,74	13,91	20,31	22,33	28,24

4.4 4^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση της επίδρασης του ελαίου βάσης στη σταθερότητα και τις ιδιότητες ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Όπως έχει αναφερθεί στην 3^η σειρά πειραμάτων το παρθένο ελαιόλαδο περιέχει ένα πλήθος μικρο-συστατικών με αμφιφιλικές ιδιότητες τα οποία σταθεροποιούν σε σημαντικό βαθμό φυσικούς κολοειδείς σχηματισμούς σ' αυτό. Αντιθέτως, το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, λόγω της επεξεργασίας που δέχεται (2^η σειρά πειραμάτων), έχει σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση σε αυτά τα μικρο-συστατικά. Στο πλαίσιο αυτό, η 4^η σειρά πειραμάτων περιλαμβάνει την παρασκευή ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση 1) το εξευγενισμένο ελαιόλαδο και 2) το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, ώστε με σύγκριση των ιδιοτήτων τους και των συμπεριφορών τους να αξιολογηθεί ο τρόπος με τον οποίο τα επιπλέον μικρο-συστατικά του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου επιδρούν στις ιδιότητες ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση τα δύο έλαια με προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween 20 σε αναλογία 2 και 4% w/w και υδατικής φάσης 2% w/w. Ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 επιλέχθηκε βάσει των αποτελεσμάτων της 2^{ης} και 3^{ης} σειράς ως ο πιο κατάλληλος για την παρασκευή ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο. Για την παρασκευή των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα εξετάστηκαν βάσει της κινητικής και οξειδωτικής σταθερότητάς τους καθώς και βάσει της μέσης τιμής διαμέτρου σταγονιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς και της θολότητάς τους.

4.4.1 Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)

Στον Πίνακα 4.8, παρουσιάζεται ο δείκτης σταθερότητας των ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν τόσο με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο όσο και με εξευγενισμένο ελαιόλαδο μετά από αποθήκευσή τους σε σκοτεινό χώρο και σε ακινησία (6 εβδομάδες) στους 25 °C και στους 40 °C. Όπως και στις προηγούμενες σειρές πειραμάτων, η σταθερότητα όλων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν μειώθηκε σημαντικά ($P < 0,05$) κατά την αποθήκευση. Η θερμοκρασία αποθήκευσης είχε σημαντική επίδραση στα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν ($P < 0,05$).

Η αύξηση της θερμοκρασίας των γαλακτωμάτων επηρεάζει τον συντελεστή κατανομής του γαλακτωματοποιητή σε νερό και σε έλαιο. Επηρεάζει επίσης το ιξώδες των δομικών στοιχείων του γαλακτώ-

ματος. Ειδικότερα, η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης μειώνει το ιξώδες του μέσου διασποράς και αυξάνει την κινητική ενέργεια των διεσπαρμένων σταγονιδίων, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση των αποτελεσματικών συγκρούσεων ή των συγκρούσεων υψηλής ενέργειας μεταξύ τους, με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή τους. Επιπλέον, η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει το ιξώδες της διεπιφάνειας, υποβαθμίζοντας τη θωράκιση του σταγονιδίου, γεγονός που κατά την αποθήκευση οδηγεί σε ταχύτερη αποσταθεροποίησή του και ταχύτερη συσσωμάτωση των σταγονιδίων. Τα μεγαλύτερα σταγονίδια που σχηματίζονται, έλκουν τα μικρότερα σταγονίδια με ισχυρότερη δύναμη, οδηγώντας σε μία αλυσιδωτή αντίδραση συσσωμάτωσης των σταγονιδίων, έως ότου το γαλάκτωμα έχει διαχωριστεί πλήρως σε δύο διακριτές φάσεις (Li and Lu, 2016).

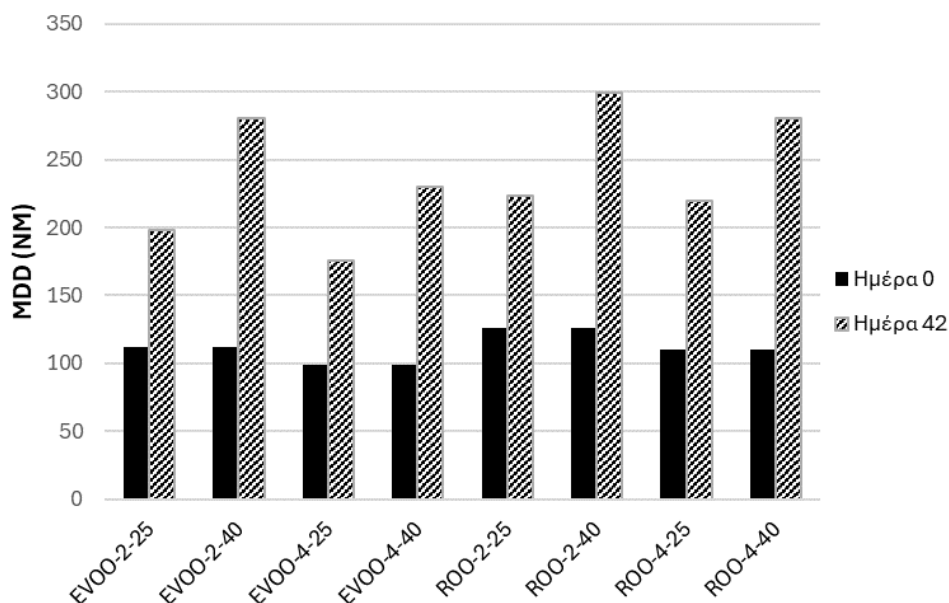
Η σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων οφείλεται σε πολλαπλούς παράγοντες, όπως έχει ήδη αναλυθεί στο θεωρητικό τμήμα της παρούσης και προκύπτει και από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν. Πράγματι όπως φαίνεται στον Πίνακας 4.8, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν στους 40 °C, επί έξι (6) εβδομάδες, εμφάνισαν σημαντικά μικρότερες τιμές ESI% σε σχέση με εκείνα που αποθηκεύτηκαν ίδιο χρόνο, αλλά στους 25 °C. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι μικρο/νανο-γαλακτώματα που είχαν παρασκευαστεί α) με εξαιρετικό παρθένο και β) με εξευγενισμένο ελαιόλαδο, ως βάσεις, παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά σταθερότητας. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη σταθερότητα, προφανώς αποδεικνύοντας τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες των αμφιφιλικών μικρο-συστατικών που περιέχονται φυσικά σε αυτό. Τέλος, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που περιείχαν μεγαλύτερη αναλογία γαλακτωματοποιητή, εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές σταθερότητας γαλακτώματος ($P < 0,05$).

Πίνακας 4.8 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), υποδεικνύοντας την έκταση του βαρυτικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 25 °C και 40 °C για 6 εβδομάδες (max SD=0,2).

Έλαιο	Κωδικοποίηση δειγμάτων	Αναλογία γαλ/τή (% w/w)	Θερμοκρασία αποθήκευσης (°C)	ESI%
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	EVOO-2-25	2	25	100
	EVOO-2-40		40	98,7
	EVOO-4-25	4	25	100
	EVOO-4-40		40	97,3
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	ROO-2-25	2	25	100
	ROO-2-40		40	94,6
	ROO-4-25	4	25	100
	ROO-4-40		40	95,9

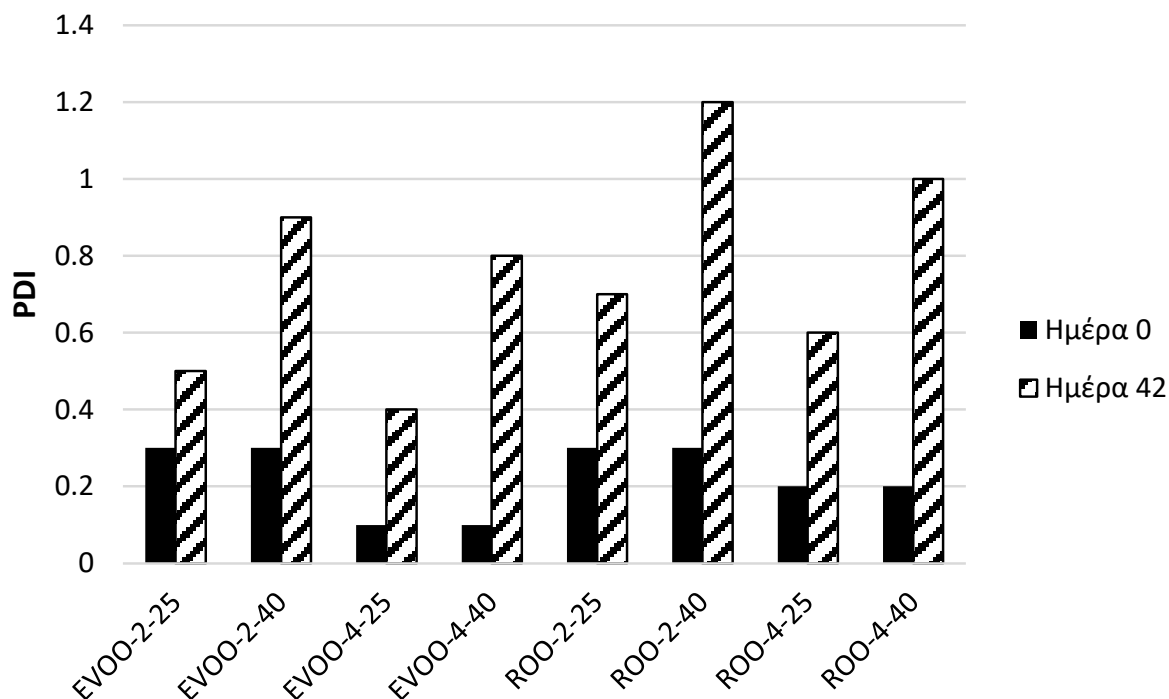
4.4.2 Προσδιορισμός δυναμικής σκέδασης φωτός

Στο Διάγραμμα 4.22, παρουσιάζεται η μεταβολή σε χρόνο 42 ημερών της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, που παρασκευάστηκαν με διαφορετικά έλαια βάσης, καθώς και η επίδραση στη μεταβολή αυτή της περιεκτικότητάς τους σε γαλακτωματοποιητή, όπως και της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι όλες οι παραπάνω παράμετροι επηρέασαν σημαντικά το MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Η μέση διάμετρος των σταγονιδίων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που είχαν ως βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ήταν μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που είχαν ως βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο, εξαιτίας των αμφιφιλικών μικρο-συστατικών που περιέχονται στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Διαπιστώθηκε η αύξηση του MDD κατά την παραμονή σε όλα τα μικρο/νανο-γαλακτώματα. Αυτό επιβεβαιώνει ότι τα μελετώμενα κολλοειδή δεν χαρακτηρίζονται από υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα εμφάνισαν μικρότερο MDD κατά την ημέρα παρασκευής σε σύγκριση με την τελευταία ημέρα αποθήκευσης. Η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης επηρέασε αρνητικά το MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, όπως ήταν αναμενόμενο και όπως εξηγήθηκε και στην § 4.4.1. Τέλος, η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε μείωση της μέσης τιμής διαμέτρου των σταγονιδίων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, ανεξάρτητα από το είδος του ελαίου που είχε χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παρασκευή τους. Συγκεκριμένα η ελάχιστη τιμή MDD που επιτεύχθηκε ήταν 99,2 nm με συνθήκες παρασκευής 4% w/w Tween 20 και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ως βάση, ενώ με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο 110,7 nm με προσθήκη 4% w/w Tween 20.



Διάγραμμα 4.22 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

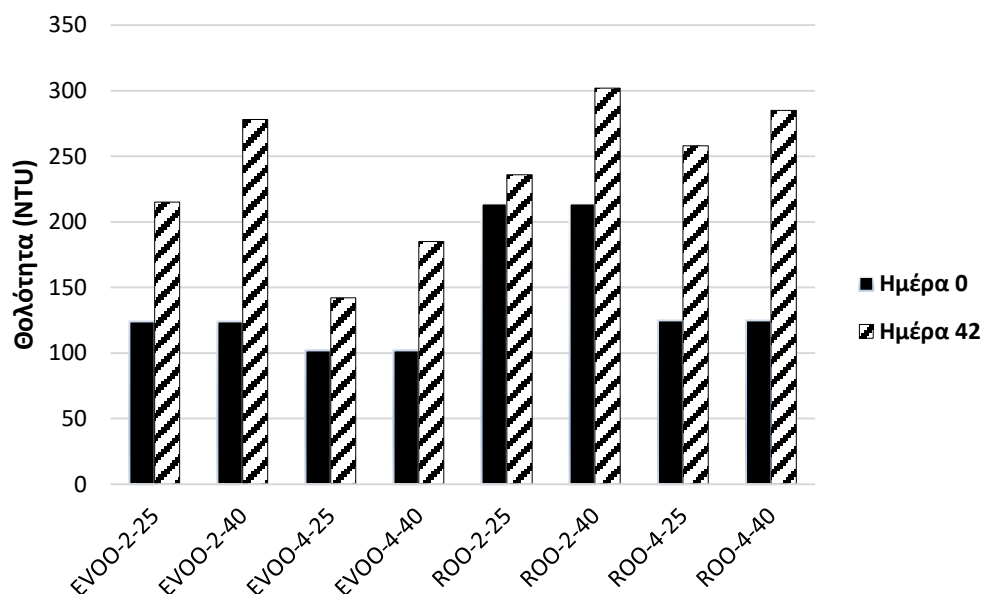
Στο Διάγραμμα 4.23 φαίνεται ο δείκτης πολυδιασποράς των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά της μέσης τιμής διαμέτρου των σταγονιδίων. Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ως βάση οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, κάτι που αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερης σταθερότητας. Πράγματι όπως συζητήθηκε και στην § 4.4.1., τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο παρουσίασαν μεγαλύτερη σταθερότητα. Η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης αύξησε την πολυδιασπορά και στους δύο τύπους των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Επιπλέον η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές PDI όπως είχε επιβεβαιωθεί και στις προηγούμενες σειρές πειραμάτων.



Εικόνα 4.23 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στο δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.4.3 Προσδιορισμός Θολότητας

Η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων όπως έχει αναφερθεί συσχετίζεται άμεσα με τη μέση διάμετρο των περιεχόμενων σταγονιδίων και με τη μορφή της διασποράς τους. Τούτο επιβεβαιώθηκε από τα συμπεράσματα για τη θολότητα που προέκυψαν από τις δοκιμές και τα οποία ήταν ανάλογα με εκείνα του προσδιορισμού δυναμικής σκέδασης. Η αύξηση της θερμοκρασίας και η αποθήκευση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων για παρατεταμένο χρόνο αύξησε σημαντικά ($P < 0,05$) τη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές θολότητας από εκείνα με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο ($P < 0,05$). Ακόμη, η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή μείωσε τη θολότητα των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

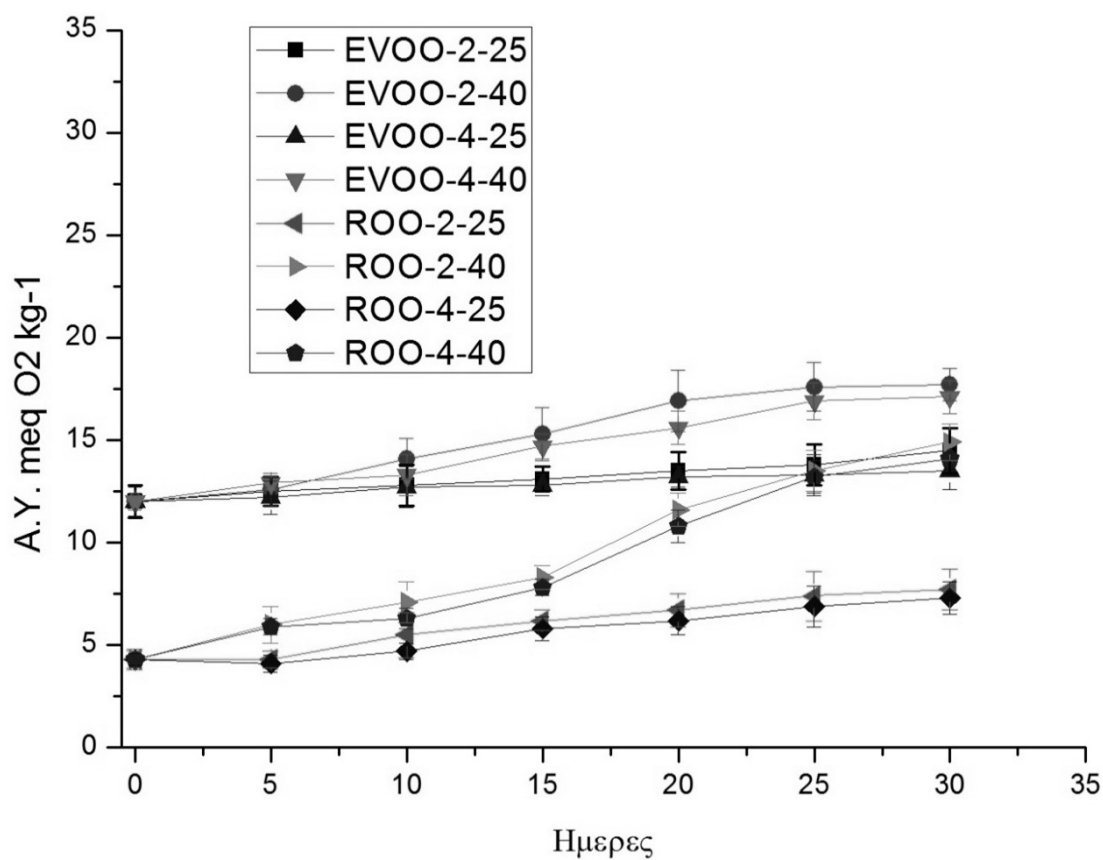


Διάγραμμα 4.24 Επίδραση του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή στη Θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.4.4 Προσδιορισμός Οξειδωτικής Σταθερότητας

Στο Διάγραμμα 4.25 παρουσιάζεται η μεταβολή του Αριθμού Υπεροξειδίων (Α.Υ.) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των παρασκευασμένων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων στους 25 °C και στους 40 °C. Είναι εμφανές ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχαν μεγαλύτερο αρχικό Α.Υ. σε σχέση με εκείνα που παρασκευάστηκαν με εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Αυτό οφείλεται στο ότι το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, κατά τις διαδικασίες του εξευγενισμού, απαλλάσσεται από το μεγαλύτερο μέρος των ουσιών που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του Αριθμού των Υπεροξειδίων. Ωστόσο, παρότι θα αναμενόταν ένα έλαιο με αρχικά υψηλότερο αριθμό υπεροξειδίων να οξειδωθεί με ταχύτερο ρυθμό απ' ότι ένα έλαιο με πολύ χαμηλή συγκέντρωση υπεροξειδίων, παρατηρήθηκε ότι η οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εξελίχθηκε με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με εκείνο των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Η παρατήρηση αυτή είναι περισσότερο εμφανής στα μικρο/νανο-γαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν στους 40 °C. Ενδεικτικά, το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με 4% w/w Tween 20 και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχε τιμή Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$), 12,3 στην αρχή της μελέτης και στο τέλος του χρόνου παρατήρησης στους 40°C, η τιμή εξελίχθηκε σε 17,4. Αυξήθηκε δηλαδή η τιμή κατά 5,1 μονάδα. Αντίστοιχα, το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με 4% w/w Tween 20 και εξευγενισμένο ελαιόλαδο είχε τιμή Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$), 4,8 στην αρχή της μελέτης και στο τέλος

του χρόνου παρατήρησης στους 40°C, η τιμή εξελίχθηκε σε 12,7. Αυξήθηκε δηλαδή η τιμή κατά 7,9 μονάδες. Όπως και στις σειρές 2 και 3, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή, μείωσε το ρυθμό οξείδωσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.



Διάγραμμα 4.25 Μεταβολή τιμής Α. Υ (Αριθμού Υπεροξειδίων) ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$) του περιεχόμενου ελαίου των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση για 40 ημέρες στους 40°C

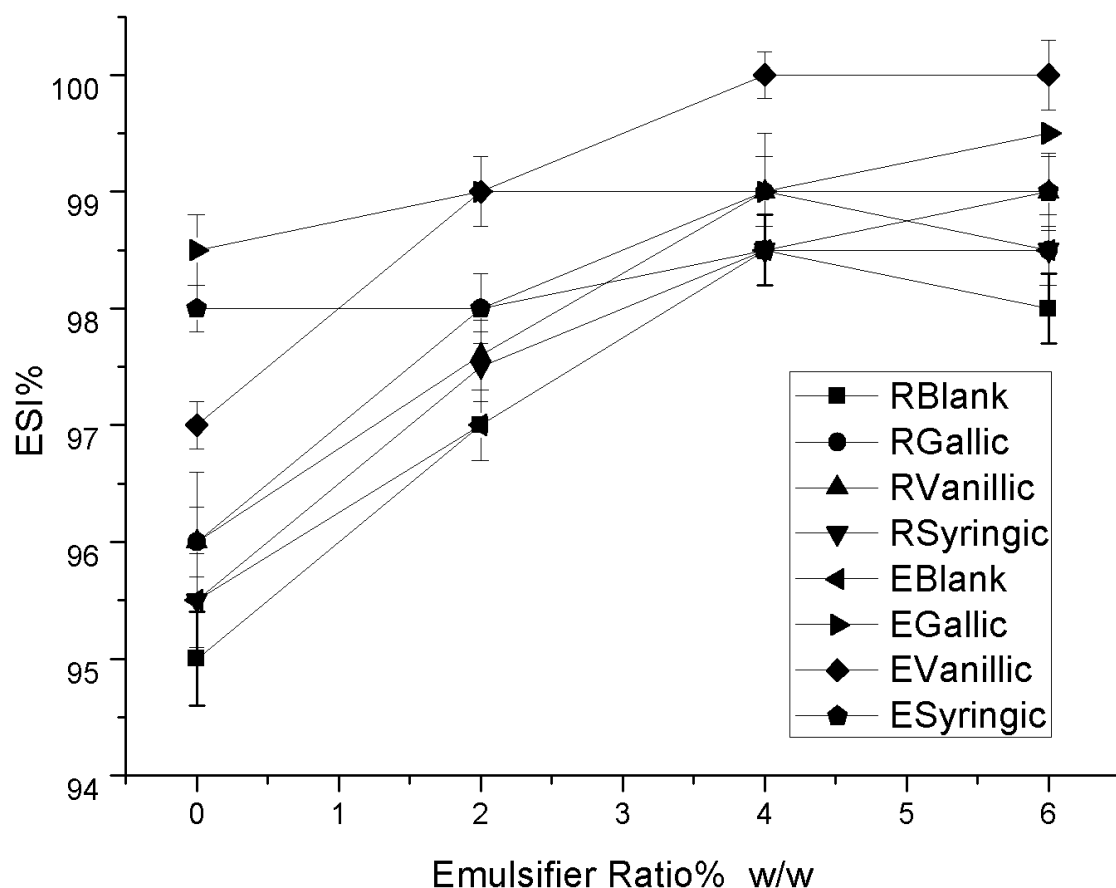
4.5 5^η σειρά πειραμάτων: Παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο και εξευγενισμένο ελαιόλαδο με ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου

Σκοπός της 5^{ης} σειράς πειραμάτων είναι να μελετηθεί εκτεταμένως η επίδραση των μικρο-συστατικών που περιέχονται στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο στην παρασκευή συστημάτων ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξευγενισμένο και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, ενώ παράλληλα προστέθηκαν στην υδατική φάση βιοδραστικά φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου, προκειμένου να διερευνηθούν οι αντιοξειδωτικές και επιφανειοδραστικές ιδιότητές τους. Τα συστατικά που επιλέχθηκαν ήταν το συριγγικό οξύ, το βανιλικό οξύ, καθώς επίσης και το γαλλικό οξύ, που όπως αποδείχθηκε στην 3^η σειρά πειραμάτων έχει επιφανειοδραστικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Το συριγγικό και το βανιλικό οξύ επιλέχθηκαν καθώς είναι φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου και έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ισχυρές βιοδραστικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Sahan et al., 2017; Di Mattia, Sacchetti, & Pittia, 2011). Ο γαλακτωματοποιητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Tween 20 σε αναλογία 0%, 2%, 4% και 6% w/w και η αναλογία της υδατικής φάσης ήταν 2% w/w επί του συνολικού γαλακτώματος. Παρότι σε προηγούμενες σειρές πειραμάτων, σε κάποιες περιπτώσεις, οι αναλογίες γαλακτωματοποιητή σε συγκέντρωση 8% και 10% w/w οδήγησαν σε καλές φυσικοχημικές ιδιότητες, δεν επιλέχθηκαν, καθώς η Ευρωπαϊκή νομοθεσία επιτρέπει τη χρήση του σε αναλογία quantum satis (Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1130/2011) ενώ παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις του Tween 20 επηρεάζουν δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Τα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα εξετάστηκαν ως προς την κινητική και οξειδωτική τους σταθερότητα καθώς επίσης και ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μέση διάμετρος σταγονιδίων, μορφή διασποράς, θολότητα). Η μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητάς τους περιέλαβε τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων και των ολικών φαινολικών συστατικών τους κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε επιταχυμένες συνθήκες, καθώς και του σημείου επαγωγής που αντιστοιχεί στο χρόνο που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί το αρχικό στάδιο οξείδωσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με χρήση του αντιδραστήρα Oxitest[®]. Επίσης εξετάστηκε η επίδραση της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή στην επιφανειακή τάση της λιπαρής φάσης και της περιεκτικότητας των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στην επιφανειακή τάση της υδατικής φάσης, ώστε να προσδιοριστεί ο βαθμός που τα συστατικά αυτά επιδρούν στο σχηματισμό των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

4.5.1 Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%)

Ο δείκτης σταθερότητας των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων μειώθηκε σημαντικά ($P < 0,05$) κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C για 8 εβδομάδες. Ωστόσο, παρά τον περιορισμένο διαχωρισμό που παρατηρήθηκε, η κύρια φάση του γαλακτώματος παρέμεινε διαυγής με οπτική παρατήρηση. Στο Διάγραμμα 4.26, φαίνεται ο δείκτης σταθερότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (ESI%) την τελευταία ημέρα της αποθήκευσής τους. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που είχαν ως βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη σταθερότητα από εκείνα που είχαν ως βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο, αποδεικνύοντας τις αμφιφιλικές ιδιότητες των φαινολικών μικρο-συστατικών που περιέχονται στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ($P < 0,05$). Όσον αφορά στην αναλογία του γαλακτωματοποιητή παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της οδήγησε σε σημαντική αύξηση της σταθερότητας των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων το οποίο έχει αποδειχθεί και από άλλες μελέτες (Polychniatou et al., 2014; Cho et al., 2008; Davidov-Pardo et al., 2015). Εξάιρεση αποτελούν τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με 6% w/w γαλακτωματοποιητή, τα οποία παρουσίασαν μικρότερη σταθερότητα σε σχέση με εκείνα με 4% w/w γαλακτωματοποιητή. Η περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 6% w/w πιθανόν να υπερέβη την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων (CMC), οδηγώντας στο σχηματισμό μικυλλίων στη συνεχή φάση, λόγω του ότι οι διαθέσιμες διεπιφάνειες είχαν κορεστεί από γαλακτωματοποιητή. Από το Διάγραμμα 4.26, προκύπτει επίσης ότι τα ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου είχαν εξαιρετικές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, αυξάνοντας σημαντικά το ESI% των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Συγκεκριμένα, το βανιλικό οξύ αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το γαλλικό και το συριγγικό οξύ. Το γαλλικό οξύ σταθεροποίησε περισσότερο τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που δεν περιείχαν γαλακτωματοποιητή, ενώ το βανιλικό οξύ ήταν πιο αποτελεσματικό παρουσία γαλακτωματοποιητή. Ο συντελεστής κατανομής n-οκτανόλης/νερού ($\log P$) του βανιλικού οξέος (1,30) είναι μεγαλύτερος από ότι για τα άλλα δύο φαινολικά συστατικά (γαλλικό οξύ: 0,91, συριγγικό οξύ: 1,13) πλησιέστερος στο $\log P$ του Tween 20 (1,74), το οποίο μπορεί να εξηγεί την συμπληρωματική του δράση στη σταθεροποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

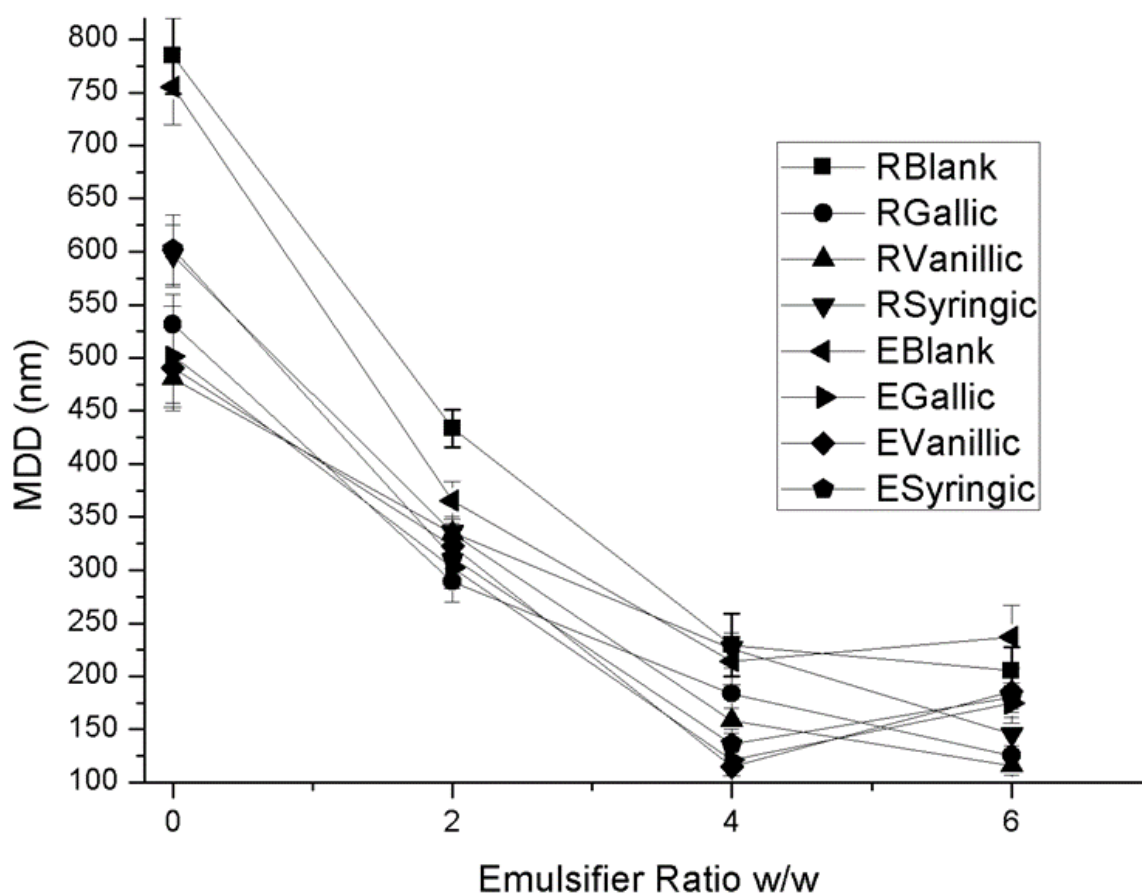


Διάγραμμα 4.26 Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI%), την τελευταία ημέρα αποθήκευσης που υποδεικνύει την έκταση του βαρυντικού διαχωρισμού των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 25 °C για 2 μήνες (8 εβδομάδες)

4.5.2 Προσδιορισμός Δυναμικής σκέδασης φωτός

Στα παρασκευασμένα γαλακτώματα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός δυναμικής σκέδασης φωτός, προκειμένου να αξιολογηθεί πώς επέδρασε η σύστασή τους στη μέση διάμετρο των σταγονιδίων (MDD) και στον δείκτη πολυδιασποράς τους (PDI). Όσον αφορά στη μέση διάμετρο των σταγονιδίων προέκυψε ότι όλα τα μελετώμενα συστήματα που περιείχαν γαλακτωματοποιητή παρουσίασαν τιμές μικρότερες των 500nm και επομένως μπόρεσαν να χαρακτηριστούν ως μικρο/νανο-γαλακτώματα. Από το Διάγραμμα 4.27 είναι εμφανές ότι η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε σημαντική μείωση του MDD ($P < 0,05$). Ωστόσο, όπως και στη μελέτη δείκτη σταθερότητας γαλακτώματος παρατηρήθηκε ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο και γαλακτωματοποιητή 6% w/w παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές από εκείνα με 4% w/w γαλακτωματοποι-

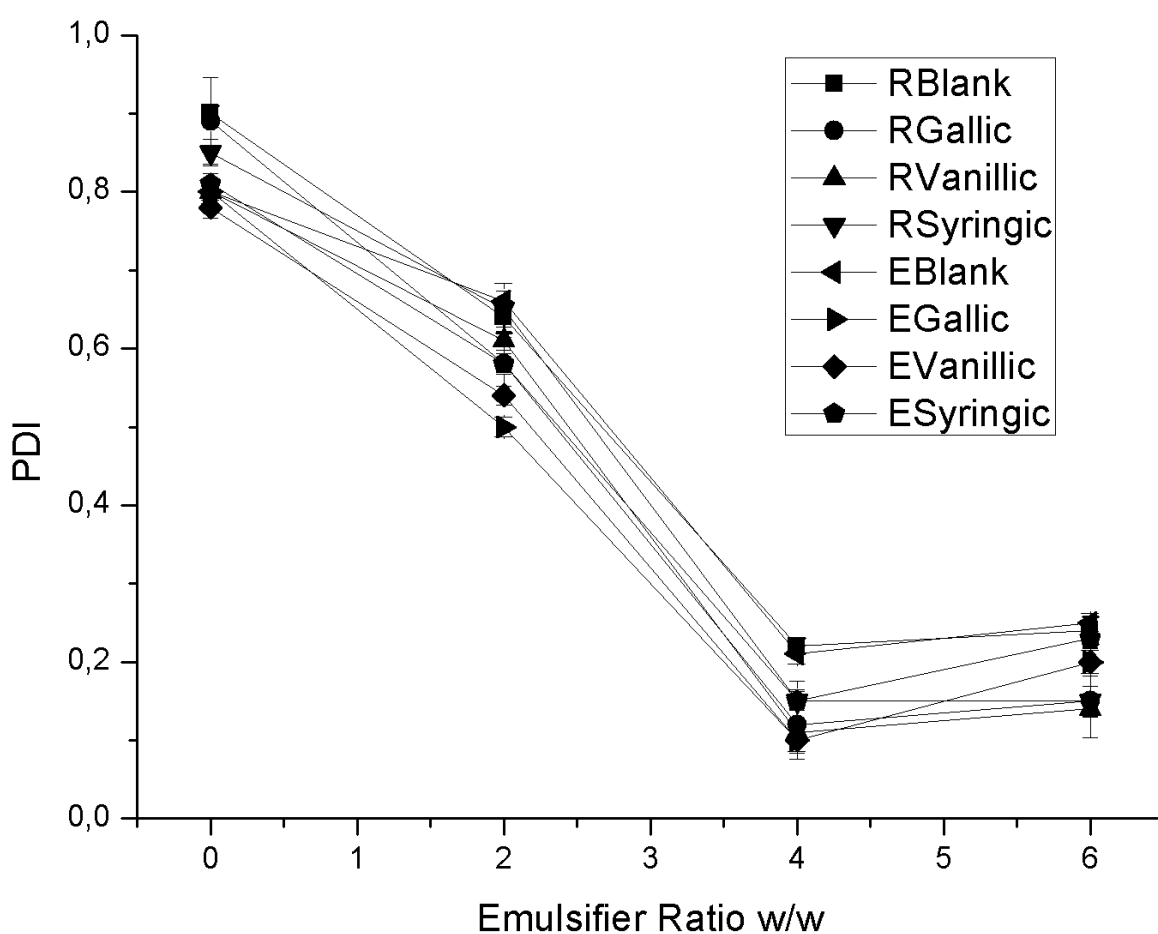
ητή. Η υπέρβαση της κρίσιμης συγκέντρωσης μικυλλίων που πιθανόν έλαβε χώρα οδήγησε στο σχηματισμό μικυλλίων τα οποία οδήγησαν σε συσσωμάτωση σταγονιδίων και αύξηση του MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Η ενσωμάτωση των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου βελτίωσε σημαντικά το MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, επαληθεύοντας τα συμπεράσματα της μελέτης ESI%, ότι δηλαδή διαθέτουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Το βανιλικό οξύ και πάλι αποδείχτηκε το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το γαλλικό και το συριγγικό οξύ. Η συνθήκη που οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές MDD ήταν το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, 4% Tween 20 w/w και ενσωμάτωση του βανιλικού οξέος στην υδατική φάση.



Διάγραμμα 4.27 Επίδραση της σύστασης γαλακτώματος στη Μέση Διάμετρο των σταγονιδίων (nm) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Οι τιμές του δείκτη διασποράς των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4.28. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο και εκείνων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά το PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, οδηγώντας σε λιγότερο πολυδιασπαρμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα ($P < 0,05$). Όπως και στις μελέτες

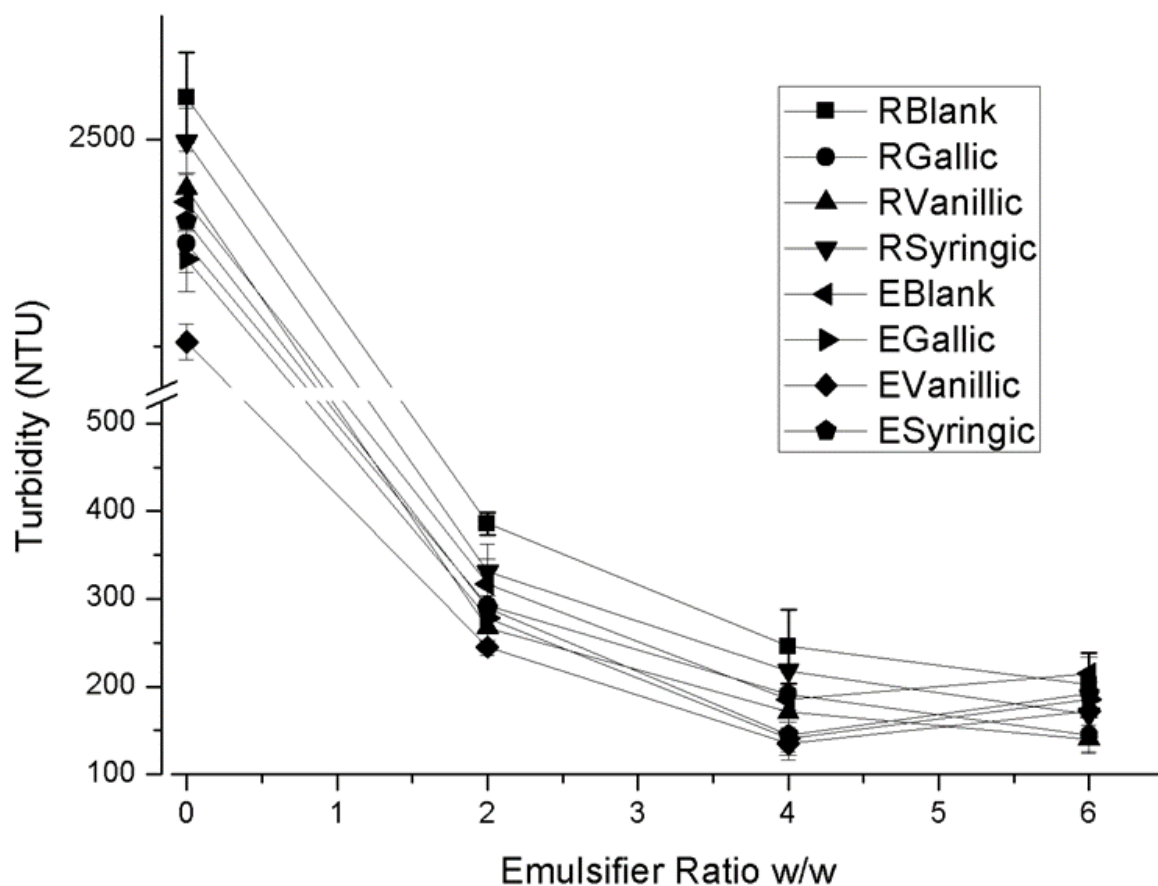
ESI% και MDD τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και γαλακτωματοποιητή 6% w/w παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές PDI από εκείνα με 4% w/w γαλακτωματοποιητή. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς ο σχηματισμός μικυλλίων και συσσωματώσεων σταγονιδίων και μικυλλίων στα γαλακτώματα αυτά οδήγησε στη διεύρυνση της κατανομής μεγέθους των σταγονιδίων. Τα ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου μείωσαν σημαντικά το PDI των νανογαλακτώματων ($P < 0,05$), με την ίδια σειρά αποτελεσματικότητας όπως στις προηγούμενες μελέτες (προσδιορισμός ESI% και MDD). Η συνθήκη που οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές του δείκτη PDI είναι τα γαλακτώματα με τα γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, 4% Tween 20 w/w και ενσωμάτωση του βανιλικού οξέος ή γαλλικού οξέος.



Διάγραμμα 4.28 Επίδραση της σύστασης γαλακτώματος στο Δείκτη Πολυδιασποράς (PDI) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.5.3 Προσδιορισμός Θολότητας

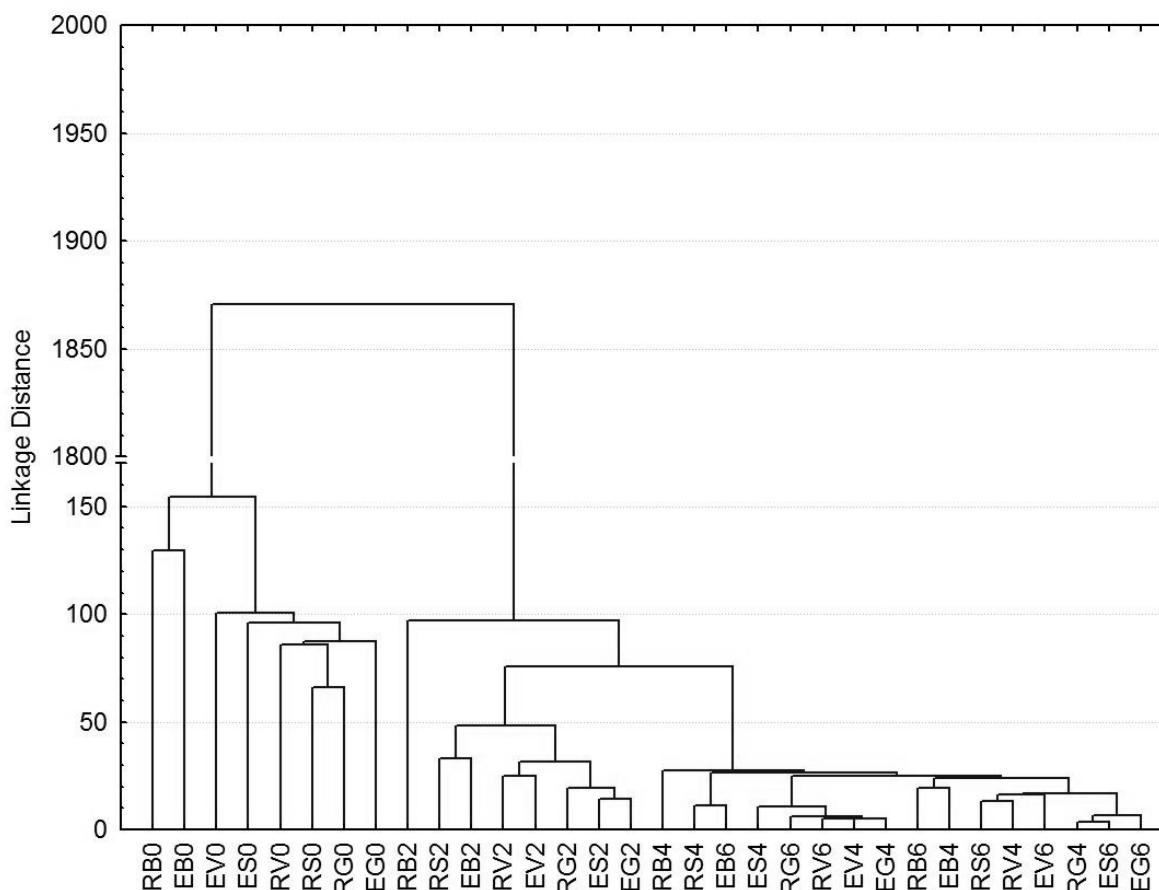
Η θολότητα των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4.29. Οι τιμές της θολότητας κυμάνθηκαν κατά παρόμοιο τρόπο με εκείνες του MDD και PDI, όπως ήταν αναμενόμενο, αφού εξαρτάται άμεσα από τη μορφή διασποράς των σταγονιδίων στα γαλακτώματα. Η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή μείωσε σημαντικά τη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$), εκτός από εκείνα τα οποία είχαν ως βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και αναλογία γαλακτωματοποιητή 6% w/w. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της θολότητας, με το βανιλικό οξύ να είναι το πιο αποτελεσματικό. Οι τιμές της θολότητας κυμάνθηκαν από 135 NTU μέχρι 2551 NTU και αντιστοιχούσαν στο μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με προσθήκη βανιλικού οξέος και στο τυφλό γαλάκτωμα χωρίς προσθήκη γαλακτωματοποιητή και φαινολικού συστατικού αντιστοιχώς.



Διάγραμμα 4.29 Επίδραση της σύστασης γαλακτώματος στη θολότητα (NTU) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

4.5.4 Συσχέτιση φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η σχέση σύστασης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, τα δεδομένα που προέκυψαν αναλύθηκαν με τη στατιστική μέθοδο ανάλυσης ομαδοποίησης (Cluster Analysis). Συγκεκριμένα, οι ιδιότητες που αναλύθηκαν ήταν ο δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος, η μέση διάμετρος και ο δείκτης πολυδιασποράς των σταγονιδίων και η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.30, διακρίθηκαν δύο κύριες κατηγοριοποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων: Η πρώτη αφορούσε στα δείγματα που δεν περιείχαν γαλακτωματοποιητή και η δεύτερη στα δείγματα που περιείχαν. Τα δείγματα χωρίς γαλακτωματοποιητή χαρακτηρίστηκαν από χαμηλό δείκτη σταθερότητας γαλακτώματος, μεγάλη μέση διάμετρο, υψηλό δείκτη πολυδιασποράς σταγονιδίων και μεγάλη θολότητα. Στη δεύτερη κατηγοριοποίηση μπορούν να διακριθούν επιπλέον τρεις υπο-ομαδοποιήσεις που κατηγοριοποιήθηκαν, κυρίως βάσει της αναλογίας γαλακτωματοποιητή (2, 4, 6% w/w). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και 4% w/w περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή, ομαδοποιήθηκαν με τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο με αναλογία γαλακτωματοποιητή 6% w/w, παρουσιάζοντας δηλαδή παρόμοια ή και καλύτερα χαρακτηριστικά με μικρότερη αναλογία γαλακτωματοποιητή. Επιπροσθέτως, όπως φαίνεται από τη σειρά κατάταξης των δειγμάτων στις τρεις αυτές υπο-ομάδες τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου στην υδατική φάση παρουσίασαν ανώτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με εκείνα των οποίων η υδατική φάση αποτελείτο απλά από απιονισμένο νερό.



Διάγραμμα 4.30 Διερεύνηση της συσχέτισης των δειγμάτων βάσει των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιώντας τη στατιστική μέθοδο ανάλυσης συσταδιοποίησης (Cluster Analysis, Ward's method). Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν ως εξής: Ο πρώτος χαρακτήρας αντιστοιχεί στο έλαιο που χρησιμοποιήθηκε ως βάση (E: εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, R: Εξευγενισμένο ελαιόλαδο), ο δεύτερος χαρακτήρας αντιστοιχεί στο φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου που ενσωματώθηκε στην υδατική φάση (B: τυφλό, G: γαλλικό οξύ, V: βανιλικό οξύ, S: συριγγικό οξύ) και ο τρίτος χαρακτήρας αντιστοιχεί στην αναλογία γαλακτωματοποιητή (0: 0%, 2: 2%, 4: 4%, 6: 6%).

4.5.5 Προσδιορισμός Επιφανειακής τάσης

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επιφανειοδραστική ιδιότητα του γαλακτωματοποιητή Tween 20 και των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου που εξετάστηκαν, έγινε προσδιορισμός της επιφανειακής τάσης των επιμέρους φάσεων των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η επιφανειακή τάση αέρα/λιπαρής φάσης με αναλογίες γαλακτωματοποιητή 0, 1,92, 3,76 και 5,52% w/w λιπαρής φάσης, όπως σχεδιάστηκαν για την παρασκευή γαλακτωμάτων με αναλογία 0, 2, 4 και 6% w/w αντιστοίχως τόσο για το εξαιρετικό παρθένο όσο και για το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η επιφανειακή τάση αέρα/ υδατικής φάσης με

ενσωμάτωση 1% w/w των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.9, το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχε χαμηλότερη επιφανειακή τάση σε σχέση με το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, γεγονός που διευκολύνει την παρασκευή γαλακτώματος. Επιπλέον, η προσθήκη του γαλακτωματοποιητή Tween 20, μείωσε περαιτέρω την επιφανειακή τάση των δύο ελαίων, όπως ήταν αναμενόμενο. Η προσθήκη των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου μείωσε επίσης την επιφανειακή τάση της υδατικής φάσης, το οποίο αποδεικνύει τις επιφανειοδραστικές τους ιδιότητες. Το γαλλικό οξύ μείωσε την επιφανειακή τάση του απιονισμένου νερού κατά 17,9%, το βανιλικό οξύ κατά 18,4% και το συριγγικό κατά 19,7%. Από τα αποτελέσματα αυτά και μόνο θα ήταν αναμενόμενο, το συριγγικό οξύ να είναι το πιο αποτελεσματικό στη σταθεροποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε σχέση με τα άλλα δύο εξεταζόμενα φαινολικά οξέα. Ωστόσο, οι προσδιορισμοί ESI%, MDD, PDI και θολότητας απέδειξαν ότι το βανιλικό και στη συνέχεια το γαλλικό οξύ ήταν τα πιο αποτελεσματικά. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι το συριγγικό οξύ είναι εξαιρετικά υδρόφιλο και δεν κατανεμήθηκε ομοιογενώς στη διπλοστοιβάδα νερού-ελαίου, ώστε να συνεισφέρει αντιστοίχως στη γαλακτωματοποίηση (Di Mattia, Sacchetti and Pittia, 2011).

Πίνακας 4.9. Επιφανειακή τάση των επιμέρους φάσεων που περιέχονται στα μελετώμενα μικρο/νανο-γαλακτώματα

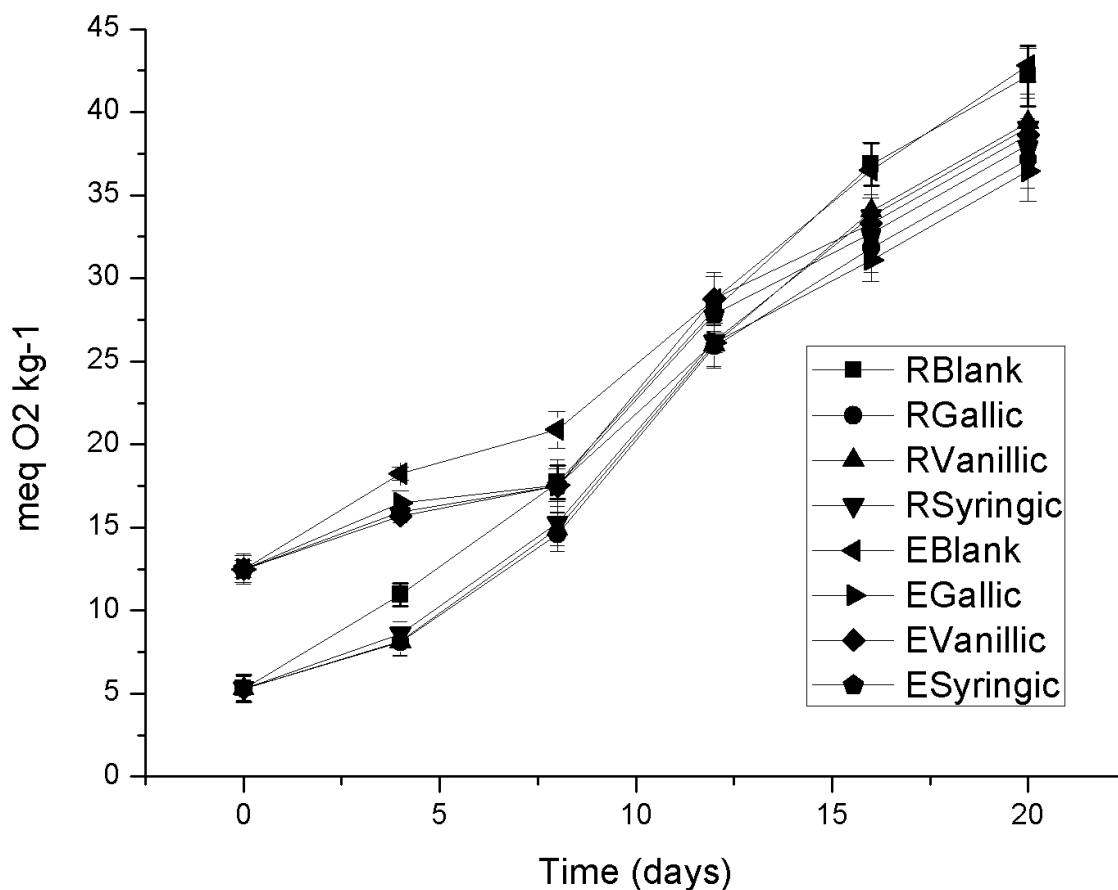
Φάση	Επιφανειακή τάση (mN/m)
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	35,808 ± 0,162
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο-Tween 20 (1,92%)	35,723 ± 0,132
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο -Tween 20 (3,76%)	35,256 ± 0,221
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο -Tween 20 (5,52%)	33,489 ± 0,234
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	32,182 ± 0,213
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο -Tween 20 (1,92%)	32,114 ± 0,138
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο -Tween 20 (3,76%)	31,971 ± 0,129
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο -Tween 20 (5,52%)	31,802 ± 0,181
Νερό	66,525 ± 0,173
Νερό - Γαλλικό οξύ (1%w/w)	54,616 ± 0,166
Νερό – Βανιλικό οξύ (1%w/w)	54,161 ± 0,241
Νερό - Συριγγικό οξύ (1%w/w)	53,385 ± 0,189

4.5.6 Μελέτη οξείδωσης

4.5.6.1 Προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίων (Α.Υ.)

Προσδιορίστηκε ο Αριθμός Υπεροξειδίων (Α.Υ.) μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με προσθήκη 4% γαλακτωματοποιητή, και με ενσωμάτωση των τριών υπό εξέταση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης επιταχυμένων συνθηκών. Η επιλογή της περιεκτικότητας 4% για τον γαλακτωματοποιητή επιβλήθηκε ως βέλτιστη με βάση τις μετρήσεις που προηγήθηκαν. Στο Διάγραμμα 4.31 παρουσιάζεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης 20 ημερών στους 60 °C. Προέκυψε ότι η μεταβολή του Α.Υ. έγινε με γραμμικό ρυθμό και υπολογίστηκε η σταθερά ρυθμού μεταβολής των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (4.10). Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 4.31, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχαν αρχικά μεγαλύτερη τιμή Α.Υ. σε σχέση με αυτά που είχαν ως βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Τούτο οφείλεται στο ότι το εξευγενισμένο ελαιόλαδο είχε απαλλαγεί από το μεγαλύτερο μέρος πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης κατά τη διαδικασία του εξευγενισμού, όπως ήδη αναφέρθηκε. Εντούτοις, όπως φαίνεται από τον 4.10, ο ρυθμός μεταβολής του Α.Υ. των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον των αντίστοιχων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο ($P < 0,05$), τουλάχιστον για το διάστημα των πρώτων δέκα ημερών. Η αντίσταση στην οξείδωση κατά το διάστημα αυτό, την οποία παρουσίασαν με σαφήνεια τα μικρο/νανο-γαλακτώματα βάσης εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου αποδίδεται βεβαίως στο πλήθος αντιοξειδωτικών μικρο-συστατικών που περιέχονται φυσικά στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Η αντιοξειδωτική δράση των μικρο-συστατικών αυτών οφείλεται γενικά στην τάση τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες που παράγονται με τον αλυσιδωτό μηχανισμό της αυτοοξείδωσης των λιπαρών υλών, παρεμβαίνοντας έτσι σ' αυτόν και διακόπτοντας τη διάδοση της οξείδωσης. Βέβαια, αποτέλεσμα της αντίδρασης των μικρο-συστατικών με τις ελεύθερες ρίζες και της μετέπειτα εξέλιξης του φαινομένου με παραγωγή δευτερογενών προϊόντων είναι η μείωση της συγκέντρωσης των ενεργών μικρο-συστατικών και η αναστολή της αντιοξειδωτικής προστασίας που προσέφεραν κατά το πρώτο διάστημα. Για αυτό, σε δεύτερο στάδιο, ο ρυθμός οξείδωσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο αυξήθηκε σημαντικά. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στην υδατική φάση μείωσε σημαντικά τη σταθερά ρυθμού μεταβολής Α.Υ. των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Ακόμη, στην περίπτωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ν/ε η αντιοξειδωτική ιδιότητα των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου συνδέεται άμεσα με την επιφανειοδραστική τους ικανότητα που τα οδηγεί να μετατοπιστούν στη διπλοστοιβάδα των

σταγονιδίων όπου πραγματοποιείται το κύριο μέρος των οξειδωτικών διεργασιών (Bravo-Diaz, 2022b). Επομένως αποδείχθηκε ότι τα τρία αυτά φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου λειτούργησαν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά, προστατεύοντας το ελαιόλαδο – βάση από την οξείδωση. Συγκεκριμένα το γαλλικό οξύ αποδείχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το συριγγικό και μετά από το βανιλικό οξύ.



Διάγραμμα 4.31 Μεταβολή τιμής A.Y. των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ) εκφρασμένη ως meq O₂ / kg περιεχόμενου ελαίου.

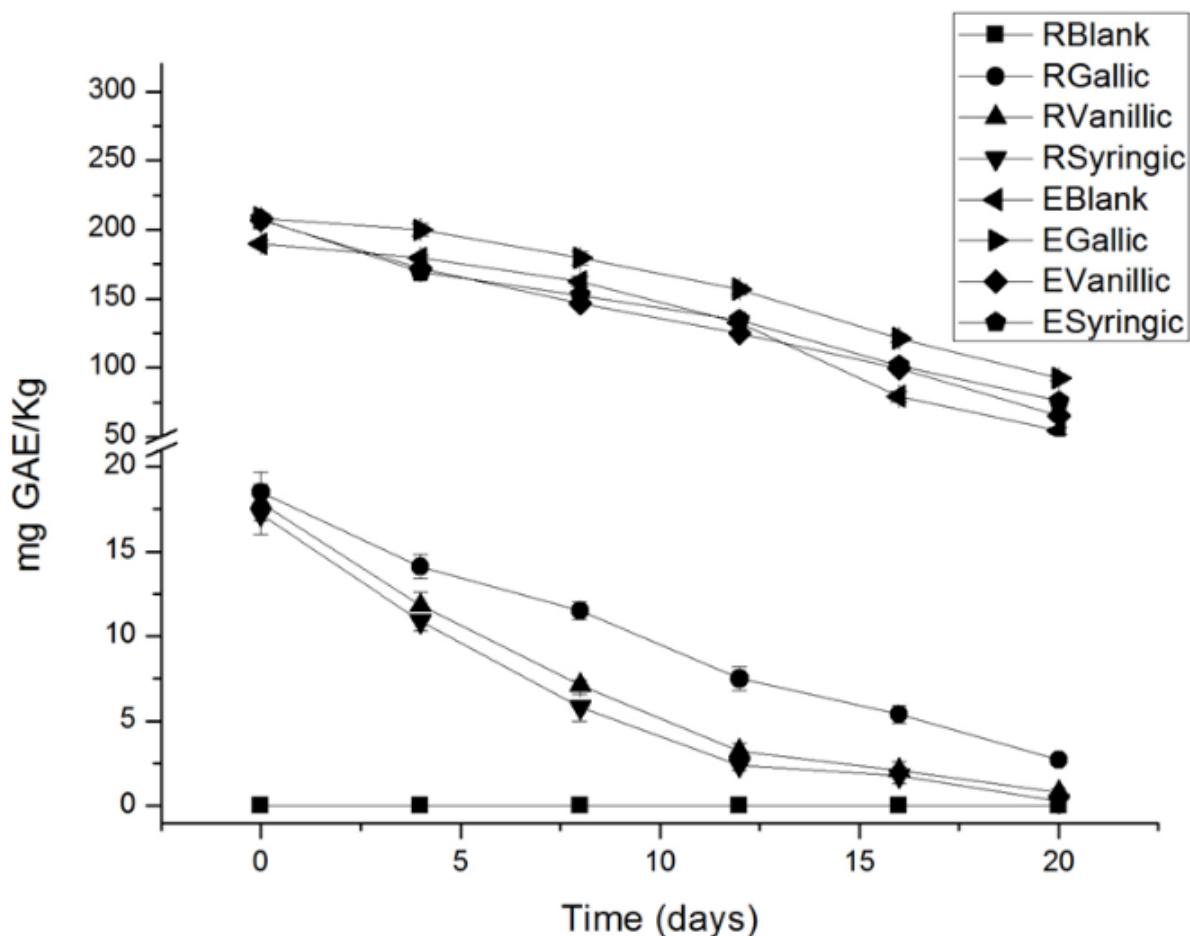
Πίνακας 4.10 Ρυθμός μεταβολής του Α.Υ. (k , d^{-1}) των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$)

	Έλαιο							
	Εξευγενισμένο ελαιόλαδο				Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο			
Φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου	Τυφλό	Γαλλικό οξύ	Βανιλικό οξύ	Συριγγικό οξύ	Τυφλό	Γαλλικό οξύ	Βανιλικό οξύ	Συριγγικό οξύ
k (d^{-1})	1,7272 ^a	1,4394 ^d	1,6412 ^a	1,5116 ^b	1,431 ^b	1,2714 ^d	1,3813 ^c	1,3445 ^c
R^2	0,977	0,967	0,963	0,9813	0,9829	0,9907	0,9573	0,9617

4.5.6.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών (Ο.Φ.Σ.)

Η επωφελής δράση των φαινολικών συστατικών στην προστασία λιπών και ελαίων από την οξειδωση έχει μελετηθεί εκτενώς. Η οξειδωτική σταθερότητα των ελαίων έχει συσχετιστεί άμεσα με τη συγκέντρωση των περιεχόμενων Ολικών Φαινολικών Συστατικών (Ο.Φ.Σ.) καθώς και τη μοριακή τους δομή (Raikos, Konstantinidi and Duthie, 2015). Στα πλαίσια της μελέτης αυτής προσδιορίστηκε η μεταβολή των Ο.Φ.Σ των μελετώμενων με προσθήκη 4% γαλακτωματοποιητή, και με ενσωμάτωση των τριών υπό εξέταση φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης 20 ημερών στους 60 °C. Ο προσδιορισμός των Ο.Φ.Σ έγινε βάσει καμπύλης αναφοράς (Εξίσωση 3.4) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg γαλλικού οξέος/kg γαλακτώματος (mg GAE/kg). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.32, το τυφλό μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο (χωρίς ενσωμάτωση φαινολικού συστατικού στην υδατική φάση), δεν παρουσίασε μετρήσιμα αποτελέσματα Ο.Φ.Σ. Το αντίστοιχο μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχε αρχική περιεκτικότητα Ο.Φ.Σ 189,98 mg GAE/kg. Όπως ήταν αναμενόμενο η ενσωμάτωση των φαινολικών συστατικών στην υδατική φάση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, αύξησε τη συγκέντρωση των Ο.Φ.Σ των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Κατά το τέλος της χρονικής διάρκειας παρατήρησης για τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, το γαλλικό οξύ (95,1 mg GAE/kg) προέκυψε ως το πιο προστατευτικό έναντι της οξειδωσης ακολουθούμενο από το συριγγικό (77,2 mg GAE/kg) και μετά από το βανιλικό οξύ (61,7 mg GAE/kg). Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη μεταβολή της συγκέντρωσης των Ο.Φ.Σ των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων συμφωνούν με τα

αποτελέσματα του προσδιορισμού μεταβολής του Α.Υ., αποδεικνύοντας την άμεση συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών και οξειδωσιμότητας του ελαίου.



Διάγραμμα 4.32 Μεταβολή Ολικών Φαινολικών Συστατικών των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ) εκφρασμένη ως mg γαλλικού οξέος/ kg γαλακτώματος.

4.5.6.3 Ταχεία μελέτη οξείδωσης

Επιπροσθέτως για την καλύτερη μελέτη της οξείδωσης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, πραγματοποιήθηκε μία ταχεία τεχνική προσδιορισμού οξειδωτικής σταθερότητας με χρήση του αντιδραστήρα Oxitest®, σύμφωνα με τους (Verardo *et al.*, 2013; Genc *et al.*, 2024). Το σημείο επαγωγής που προέκυψε για το κάθε υπό εξέταση μικρο/νανο-γαλάκτωμα, παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.11. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο χωρίς ενσωμάτωση φαινολικού συστατικού στην υδατική φάση ξεκίνησε να οξειδώνεται στις 8.78 h, ενώ το αντίστοιχο μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ξεκίνησε να οξειδώνεται στις 12.14h.

Αυτό αποδεικνύει άμεσα ότι το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, ως βάση μικρο/νανο-γαλακτώματος, παρέχει μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα από το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Η ενσωμάτωση των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου επηρέασε σημαντικά την οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ($P < 0,05$). Όπως και στον προσδιορισμό Α.Υ. και Ο.Φ.Σ, το γαλλικό οξύ αποδείχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό συστατικό ακολουθούμενο από το συριγγικό και το βανιλικό οξύ.

Πίνακας 4.11 Οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με 4% w/w Tween 20, στην υδατική φάση των οποίων ενσωματώθηκαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου (γαλλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ) εκφρασμένη ως σημείο επαγωγής (IP, h). Οι τιμές με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά ($P < 0,05$)

	Έλαιο							
	Εξευγενισμένο ελαιόλαδο				Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο			
Φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου	Τυφλό	Γαλλικό οξύ	Βανιλικό οξύ	Συριγγικό οξύ	Τυφλό	Γαλλικό οξύ	Βανιλικό οξύ	Συριγγικό οξύ
IP (h)	8,78 ± 0,32 ^a	11,15 ± 0,21 ^b	9,01 ± 0,15 ^a	10,09 ± 0,24 ^b	12,14 ± 0,11 ^c	14,87 ± 0,19 ^d	13,66 ± 0,33 ^c	14,43 ± 0,62 ^d

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ της σταθεράς του ρυθμού μεταβολής του Α.Υ. με τις τιμές του σημείου επαγωγής (IP) που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης. Προέκυψε ότι οι δύο αυτοί προσδιορισμοί μπορούν να συσχετιστούν σε ικανοποιητικό βαθμό ($R^2 = 0,8994$, $P < 0,001$). Αυτό βεβαιώνει ότι η ταχεία μέθοδος προσδιορισμού της οξειδωτικής σταθερότητας που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να εξαγάγει συγκρίσιμα αποτελέσματα με τον πολύ πιο χρονοβόρο προσδιορισμό της μεταβολής του Α. Υ. μικρο/νανο-γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε επιταχυμένες συνθήκες. Η εξίσωση 4.1 περιγράφει τη συσχέτιση των δύο μεθόδων.

$$PV (k) = 33.65 - 14.899 \times IP$$

(Εξίσωση 4-1)

Αντίστοιχα πειράματα συσχέτισης των δύο μεθόδων έχουν πραγματοποιηθεί και από άλλους ερευνητές σε διαφορετικά προϊόντα τροφίμων με θετικά αποτελέσματα (Verardo *et al.*, 2013).

4.6 6^η σειρά πειραμάτων: Αριστοποίηση σταθερότητας και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με χρήση της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης

Με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραματικών σειρών επιλέχθηκαν η λιπαρή βάση (εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο), ο γαλακτωματοποιητής (Tween 20), και το φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου προς ενσωμάτωση στην υδατική φάση (γαλλικό οξύ), με χρήση των οποίων μπορεί να παραχθεί μικρο/νανο-γαλάκτωμα με τις βέλτιστες και επιθυμητές ιδιότητες. Η αριστοποίηση του μικρο/νανο-γαλακτώματος, που ακολουθεί, επιχειρήθηκε με χρήση μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης (RSM). Έτσι, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με διαφορετικές αναλογίες γαλακτωματοποιητή και διαφορετικές αναλογίες γαλλικού οξέος στην υδατική φάση, τα οποία αποτέλεσαν τις ανεξάρτητες μεταβλητές.

Στόχος της πειραματικής σειράς ήταν η εύρεση μαθηματικών μοντέλων που θα επιτρέπουν την πρόβλεψη των ιδιοτήτων του τελικού μικρο/νανο-γαλακτώματος (Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος, Μέση διάμετρος και Δείκτης Πολυδιασποράς σταγονιδίων και η θολότητα γαλακτώματος) συναρτήσει των επιπέδων των ανεξάρτητων μεταβλητών (της αναλογίας γαλακτωματοποιητή και γαλλικού οξέος), και ο υπολογισμός των βέλτιστων επιπέδων των ανεξάρτητων μεταβλητών στο τελικό σύστημα, προκειμένου να προκύψει ένα μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βέλτιστα ποιοτικά χαρακτηριστικά όσον αφορά στη σταθερότητα και τις άλλες ιδιότητές του.

4.6.1 Κεντρικός σχεδιασμός της 6^{ης} πειραματικής σειράς

Ο κεντρικός σχεδιασμός της 6^{ης} πειραματικής σειράς φαίνεται στον Πίνακα 4.12. Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (RSM), και συγκεκριμένα η μέθοδος Box-Behnken (BBD), προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των δύο ανεξάρτητων μεταβλητών (αναλογία γαλακτωματοποιητή και αναλογία γαλλικού οξέος) στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (Box and Behnken, 1960). Τα επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών και η κωδικοποίησή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.12. Οι αναλογίες γαλακτωματοποιητή επιλέχθηκαν βάσει των αποτελεσμάτων προηγούμενων μελετών (Polychniatou and Tzia, 2014, 2016), ενώ οι αναλογίες του γαλλικού οξέος περιορίστηκαν έως 1% w/w από τη μέγιστη διαλυτότητα του γαλλικού οξέος στο νερό (1.19 g/100 mL σε κανονική θερμοκρασία).

Επιλέχθηκαν τρία επίπεδα για κάθε παράγοντα και πραγματοποιήθηκαν 10 πειράματα που περιελάμβαναν 8 συνδυασμούς παραγόντων και 2 επαναλήψεις στο κεντρικό σημείο. Επιλέχθηκαν 4 εξαρτημένες μεταβλητές, ως αντιπροσωπευτικές για να περιγράψουν τη σταθερότητα και τη μορφή του γαλακτώματος: ο δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI%), η Μέση τιμή διαμέτρου (MDD) και ο δείκτης πολυδιασποράς των σταγονιδίων (PDI) και η Θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Οι τιμές των μεταβλητών αυτών που προσδιορίστηκαν για τα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα παρουσιάζονται στον Πίνακας 4.13. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τυχαία σειρά, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση της ανεξήγητης διακύμανσης στις παρατηρούμενες αποκρίσεις. Το μαθηματικό μοντέλο που αντιστοιχεί στη μεθοδολογία Box Behnken φαίνεται στην Εξίσωση 4.2:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Εξίσωση 4-2}$$

Όπου:

Y είναι η εξαρτημένη μεταβλητή,

β_0 , β_i , β_{ii} και β_{ij} είναι οι συντελεστές παλινδρόμησης λόγω των όρων αλληλεπίδρασης και των γραμμικών και τετραγωνικών όρων αντιστοίχως, και

X_i και X_j είναι οι ανεξάρτητες μεταβλητές.

Η επάρκεια των μοντέλων αξιολογήθηκε βάσει του εξαγόμενου συντελεστή παλινδρόμησης R^2 .

Πίνακας 4.12 Κεντρικός σχεδιασμός της 6ης πειραματικής σειράς (αριστοποίηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και ενσωμάτωση της υδατικής φάσης με φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου) με χρήση της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης, όπου παρουσιάζονται οι κωδικοποιημένες και οι πραγματικές τιμές των μεταβλητών.

Ανεξάρτητες μεταβλητές	Κωδικοποίηση	Επίπεδα		
		-1	0	1
Αναλογία γαλλικού οξέος (w/w %)	X_1	0	0,5	1
Αναλογία γαλ/τή (w/w %)	X_2	2	4	6

4.6.2 Αποτελέσματα

Η παρασκευή σταθερών μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά αποτελεί μία πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων. Έχει αποδειχθεί από προηγούμενες έρευνες ότι

οι ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάζονται άμεσα από την παρουσία και τη συγκέντρωση γαλακτωματοποιητών και άλλων επιφανειοδραστικών μικρο-συστατικών τόσο στην υδατική όσο και στη λιπαρή φάση (Hamid, Wais and Sawant, 2021). Επομένως, η αριστοποίηση της σύστασής τους είναι ιδιαίτερα σημαντική, προκειμένου να παρασκευαστούν σταθερά προϊόντα μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Στον Πίνακα 4.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειραματικού προσδιορισμού της Μέσης Διαμέτρου των σταγονιδίων (MDD), της πολυδιασποράς (PDI), του δείκτη σταθερότητας (ESI%) και της θολότητας, ως συνάρτηση της αναλογίας του γαλλικού οξέος (X_1) και του γαλακτωματοποιητή (X_2) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν βάσει του σχεδιασμού Box Behnken.

Πίνακας 4.13 Αποτελέσματα των προσδιορισμών των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν βάσει του σχεδιασμού RSM: Αναλογία γαλλικού οξέος (X_1); Αναλογία γαλ/τή (X_2).

Δοκιμή	Κωδικοποιημένες τιμές		Εξαρτημένες μεταβλητές			
	Αναλογία γαλλικού οξέος X_1	Αναλογία γαλ/τή X_2	MDD (nm)	PDI	Θολότητα (NTU)	ESI%
1	-1	-1	401,16 ± 5,23	0,621 ± 0,019	272,85 ± 4,52	98,4 ± 0,4
2	-1	0	275,76 ± 7,25	0,362 ± 0,27	195,43 ± 6,51	98,9 ± 0,5
3	-1	1	305,82 ± 6,17	0,451 ± 0,57	231,81 ± 4,86	98,4 ± 0,2
4	0	-1	311,32 ± 4,95	0,513 ± 0,036	228,64 ± 3,22	98,9 ± 0,4
5	0	0	182,79 ± 3,26	0,286 ± 0,017	140,3 ± 5,36	99,6 ± 0,3
6	0	0	178,87 ± 4,68	0,282 ± 0,32	137,38 ± 6,71	99,5 ± 0,1
7	0	1	221,25 ± 4,77	0,452 ± 0,23	184,29 ± 3,32	99,2 ± 0,2
8	1	-1	229,14 ± 6,69	0,465 ± 0,014	209,35 ± 7,78	99,4 ± 0,1
9	1	0	145,69 ± 3,41	0,152 ± 0,009	128,16 ± 6,98	100 ± 0,0
10	1	1	195,87 ± 2,69	0,395 ± 0,021	175,37 ± 5,44	99,5 ± 0,2

4.6.3 Προσαρμογή του μοντέλου

Εφαρμόστηκε η μέθοδος RSM, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (MDD, PDI, θολότητα και ESI%). Η στατιστική σημαντικότητα των παραγόντων του μοντέλου προσδιορίστηκε μέσω ανάλυσης παλινδρόμησης και διακύμανσης. Η αποδεκτότητα των μοντέλων αξιολογήθηκε με βάση την τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R^2) και των δεικτών F-value και p-value (Yolmeh, Habibi Najafi and Farhoosh, 2014; Yolmeh and Jafari, 2017).

Στον Πίνακα 4.14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσαρμογής του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Φαίνεται ότι το προκύπτον πολυωνυμικό μοντέλο βρίσκεται σε καλή συμφωνία σε σχέση με τις πειραματικές τιμές, δεδομένου ότι τα R^2 των MDD, PDI, θολότητας και ESI% ήταν 0,993, 0,968, 0,997 και 0,989 αντιστοίχως, και ένα μοντέλο θεωρείται ότι έχει καλή προσαρμογή όταν ο συντελεστής παλινδρόμησης (R^2) είναι μεγαλύτερος από 0,8 (Yuan *et al.*, 2008).

Πίνακας 4.14 Ανάλυση διακύμανσης των επιφανειακών αποκρίσεων των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με την ενσωμάτωση γαλλικού οξέος.

Εξαρτημένη μεταβλητή		Συντελεστές	Άθροισμα τετραγώνων	Df	F-value
MDD ^a (nm)	Μοντέλο	184,596	54396,12	4	118,2602***
	X_1	-68,673	28296,16	1	307,5871***
	X_1^2	22,362	1166,82	1	1166,82*
	X_2	-36,447	7970,16	1	86,6378***
	X_2^2	77,922	14167,67	1	154,0065***
	X_1X_2	15,518	963,17	1	10,4699*
	Υπόλοιπο		367,98	4	
	Σύνολο		54764,09	9	
PDI ^b	Μοντέλο	0,276	0,156	5	23,9399**
	X_1	-0,070	0,023	1	22,8058**
	X_1^2	-0,011	0,000	1	0,2284 ^{NS}
	X_2	-0,050	0,015	1	11,626*
	X_2^2	0,214	0,107	1	82,2707***
	X_1X_2	0,025	0,003	1	1,9209 ^{NS}
	Υπόλοιπο		0,005	4	
	Σύνολο		0,161	9	
Θολότητα ^c (NTU)	Μοντέλο	140,8614	19751,43	5	238,5981***
	X_1	-31,2017	5841,26	1	352,8135***
	X_1^2	18,9121	834,56	1	50,4077**
	X_2	-19,895	2374,87	1	143,4424***
	X_2^2	63,5821	9432,94	1	569,7515***
	X_1X_2	1,7650	12,46	1	0,7526 ^{NS}
	Υπόλοιπο		66,22	4	
	Σύνολο		19817,65	9	
ESI ^d (%)	Μοντέλο	99,449	2,434	5	74,0269***
	X_1	0,532	1,696	1	257,8909***
	X_1^2	-0,113	0,030	1	4,5190 ^{NS}
	X_2	0,068	0,028	1	4,2601 ^{NS}
	X_2^2	-0,513	0,614	1	93,3202***
	X_1X_2	0,023	0,002	1	0,3079 ^{NS}
	Υπόλοιπο		0,026	4	
	Σύνολο		2,460	9	

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, NS – Μη σημαντικές διαφορές,

a. R² = 0,986

b. R² = 0,996

c. R² = 0,993

d. R² = 0,909

Τα προσαρμοσμένα μοντέλα των MDD (nm), PDI, θολότητας (NTU) και ESI (%) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων παρουσιάζονται στις εξισώσεις 4.3, 4.4, 4.5. και 4.6 αντιστοίχως:

$$\text{MDD} = 184,596 - 68,673X_1 + 22,362X_1^2 - 36,447X_2 + 77,922X_2^2 + 15,518 X_1 X_2 \quad (\text{Εξίσωση 4-3})$$

$$\text{PDI} = 0,276 - 0,070X_1 - 0,050X_2 + 0,214X_2^2 \quad (\text{Εξίσωση 4-4})$$

$$\text{Θολότητα} = 140,861 - 31,202X_1 + 18,912 X_1^2 - 19,895X_2 + 63,582X_2^2 \quad (\text{Εξίσωση 4-5})$$

$$\text{ESI (\%)} = 99,449 + 0,532X_1 - 0,513X_2^2 \quad (\text{Εξίσωση 4-6})$$

Μέση τιμή διαμέτρου των σταγονιδίων (MDD)

Η μέση τιμή διαμέτρου των σταγονιδίων επηρεάστηκε σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και του γαλλικού οξέος. Οι μεταβλητές με τη μεγαλύτερη επίδραση στο MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ενσωματωμένο γαλλικό οξύ ήταν οι γραμμικοί και τετραγωνικοί όροι της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή και του γαλλικού οξέος καθώς και η αλληλεπίδραση τους (X_1 , X_2 , X_2^2 , $p < 0,001$, X_1^2 , X_1X_2 $p < 0,05$) (model F-value: 118,26, $p < 0,001$),

Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)

Ο PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάστηκε επίσης σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και του γαλλικού οξέος. Συγκεκριμένα, ο γραμμικός όρος της αναλογίας του γαλλικού οξέος (X_1 , $p < 0,01$) και ο γραμμικός και τετραγωνικός όρος της αναλογίας γαλακτωματοποιητή (X_2 , $p < 0,05$, X_2^2 , $p < 0,001$) επηρέασαν σημαντικά την πολυδιασπορά των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

Θολότητα

Η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, όπως και οι προηγούμενες ιδιότητες επηρεάστηκαν σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και του γαλλικού οξέος. Ειδικότερα η θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάστηκε σημαντικά από τους γραμμικούς και τετραγωνικούς όρους της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή και γαλλικού οξέος (X_1 , X_2 , X_2^2 , $p < 0,001$, X_1^2 $p < 0,01$) (model F-value: 238,60, $p < 0,001$).

Δείκτης σταθερότητας (ESI%)

Ο δείκτης σταθερότητας ESI% των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάστηκε σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και του γαλλικού οξέος, όπως ήταν αναμενόμενο βάσει των προηγούμενων παρατηρήσεων. Ο γραμμικός όρος της αναλογίας του γαλλικού οξέος (X_1 , $p < 0.001$) και ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας της αναλογίας γαλακτωματοποιητή (X_2^2 , $p < 0.001$) είχαν σημαντική επίδραση στη σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (model F-value: 74.03, $p < 0.001$).

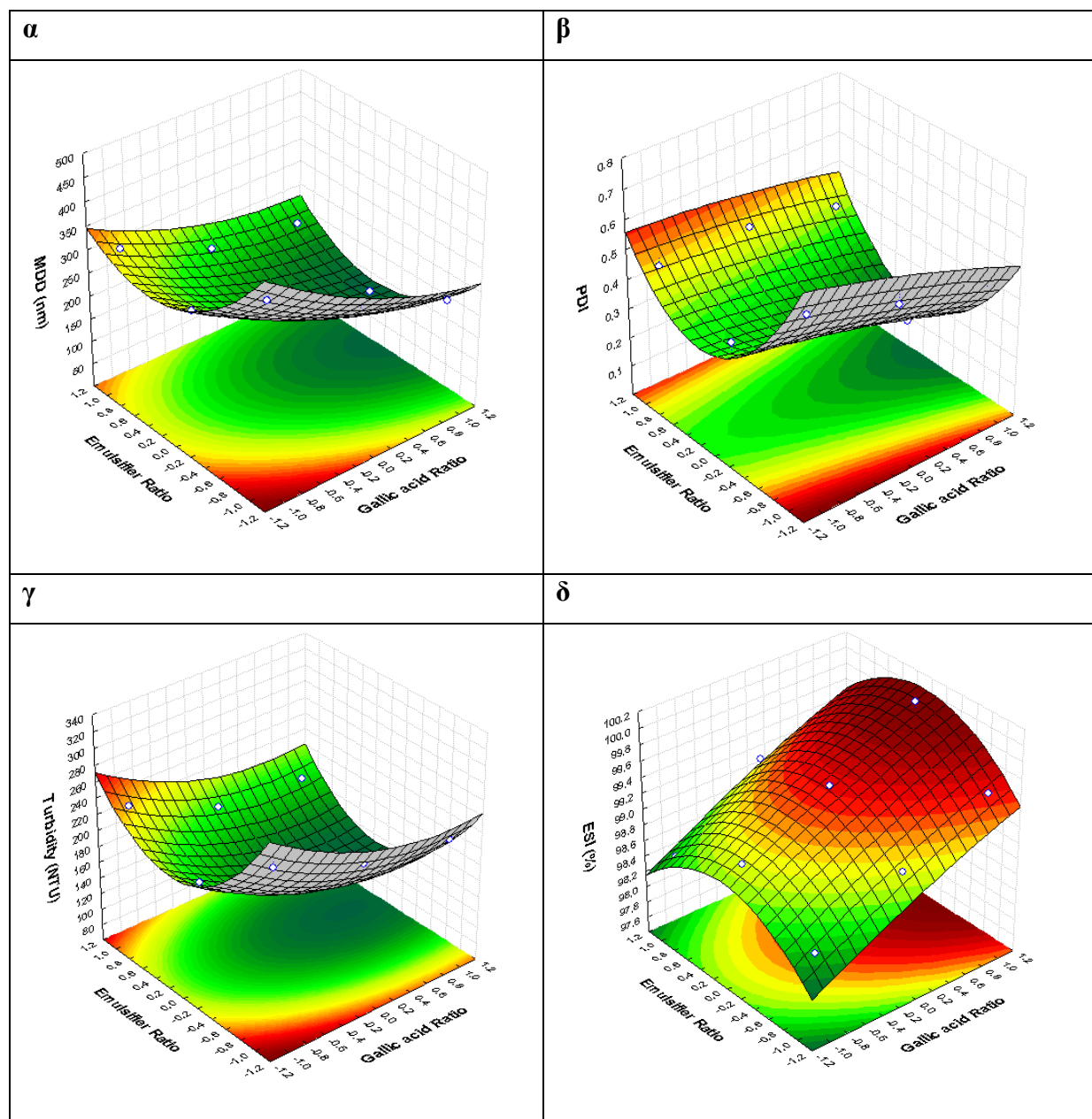
4.6.4 Ερμηνεία του μοντέλου επιφανειακής απόκλισης

Ένα χρήσιμο εργαλείο για να γίνει καλύτερα κατανοητή η συσχέτιση μεταξύ κάθε παράγοντα και απόκρισης προσφέρεται με την αποτύπωση των επιφανειών απόκρισης, κατά την οποία η επίδραση 2 παραγόντων σε μία συγκεκριμένη απόκριση αποτυπώνεται σε τρεις διαστάσεις. Οι επιφάνειες που προκύπτουν από την ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν (Εικόνα 4. 33). Οι χαμηλότερες τιμές των MDD, PDI, θολότητας και οι υψηλότερες του ESI% αντιστοιχούν στις βέλτιστες ζώνες των διαγραμμάτων της Εικόνας 4.33.

Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε μικρο/νανο-γαλακτώματα με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Ωστόσο, όπως είχε παρατηρηθεί και στην 5^η πειραματική σειρά, όταν η αναλογία γαλακτωματοποιητή ήταν μεγαλύτερη ή ίση του 6% w/w, οι ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ν/ε με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο υποβαθμίζονται, πιθανόν λόγω υπερβολής της κρίσιμης συγκέντρωσης μικυλλίων (CMC) του συστήματος, που οδήγησε το σχηματισμό μικυλλίων και συσσωματώσεων στη συνεχή φάση. Επιπλέον η αύξηση της αναλογίας του γαλλικού οξέος οδήγησε σε βελτίωση των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

Η συνεισφορά του στη σταθεροποίηση κολλοειδών συστημάτων έχει αποδειχθεί και από άλλους ερευνητές και έχει αποδοθεί στην ιδιότητά του να δημιουργεί απωθητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων, εμποδίζοντας τη συσσωμάτωσή τους (Di Mattia *et al.*, 2009; Polychniatou and Tzia, 2016).

Οι συνδυασμοί παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ενσωμάτωση γαλλικού οξέος που μπορεί να οδηγήσουν σε μικρο/νανο-γαλακτώματα με τις πιο επιθυμητές ιδιότητες είναι: 3,14-4,45% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το MDD (Εικόνα 4.33α), 2,95-4,56% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το PDI (Εικόνα 4.33β), 2,35%-5,21% Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για τη θολότητα (Εικόνα 4.33γ) και 3,21-5,25% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ (Εικόνα 4.33δ) για το ESI%.



Διάγραμμα 4.33 Επίδραση της αναλογίας γαλλικού οξέος και γαλακτωματοποιητή στις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων (α) MDD (nm) (β) PDI (γ) Θολότητα (NTU) και (δ) ESI (%).

4.6.5 Αριστοποίηση των προβλεπόμενων μοντέλων

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.7.5, οι βέλτιστες τιμές των MDD (138,29 nm), PDI (0,195), θολότητα (128,57 NTU) και ESI% (99,98%) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη 4% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ. Προκειμένου να επαληθευτούν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με την υποδεικνυόμενη σύσταση και προσδιορίστηκαν πειραματικά οι ιδιότητές τους (Πίνακας 41.5). Οι πειραματικές τιμές που

προέκυψαν δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές από τις προβλεπόμενες τιμές, γεγονός που σημαίνει ότι η προσαρμογή του μοντέλου ήταν καλή και ότι το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση της παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ν/ε με βάση ελαιόλαδο και ενσωμάτωση γαλλικού οξέος.

Πίνακας 4.15 Προβλεπόμενες και μετρούμενες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (αποκρίσεων) για τις βέλτιστες παραμέτρους σύστασης των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ενσωμάτωση γαλλικού οξέος στην υδατική φάση.

Εξαρτημένες Μεταβλητές	Επίπεδα ανεξάρτητων μεταβλητών		Προβλεπόμενες τιμές	Πειραματικές τιμές
	X ₁	X ₂		
MDD (nm)	1	0	138,29	140,89 ± 5,21
PDI	1	0	0,195	0,189 ± 0,051
Θολότητα (NTU)	1	0	128,57	126,328 ± 5,32
ESI (%)	1	0	99,98	99,95 ± 0,41

Συμπεράσματα

- Προτάσεις - Προκλήσεις

5.1 Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των ιδιαίτερων συνθηκών επίτευξης μικρο/νανο-γαλακτωμάτων τύπου νερό σε έλαιο (ν/ε) με βάση το ελαιόλαδο, καθώς και της δυνατότητας ενσωμάτωσης φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου σε αυτά, επιδιώκοντας ταυτόχρονα τη διερεύνηση και την αναπαραγωγή των κολλοειδών σχηματισμών που από τη φύση του περιέχει το παρθένο ελαιόλαδο πρόσφατης παραγωγής.

Αρχικά διερευνήθηκαν οι τεχνικές και οι συνθήκες ομογενοποίησης/παρασκευής που μπορούν να οδηγήσουν στην παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτώματος με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επιλέχθηκαν δύο τεχνικές, η ομογενοποίηση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε διάφορες ταχύτητες περιστροφής (8.000, 10.000, και 12.000 rpm), και η δεύτερη ήταν η ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων υψηλής ισχύος σε διάφορα επίπεδα έντασης ισχύος (150, 225, και 300 W) για δύο διαφορετικούς χρόνους (10, 20 min). Στόχος ήταν να βρεθεί η βέλτιστη τεχνική ομογενοποίησης και οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας που μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλής σταθερότητας γαλακτώματα με μέση διάμετρο σταγονιδίων μεταξύ 5 και 500 nm. Από τη μελέτη προέκυψε ότι η τεχνική ομογενοποίησης με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα από ότι η τεχνική ομογενοποίησης με υπερήχους. Παρότι με τη χρήση υπερήχων επιτεύχθηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με χαμηλότερη Μέση Τιμή Διαμέτρου σταγονιδίων - MDD (45,6 nm με χρήση υπερήχων στα 300 W για 20 min έναντι των 114,4 nm που επιτεύχθηκαν με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε 12.000rpm για 20 min), η τεχνική υστερεί λόγω του υψηλού βαθμού πολυδιασποράς των περιεχόμενων σταγονιδίων, γεγονός που επηρεάζει δυσμενώς το δείκτη σταθερότητας. Ο Δείκτης Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI) των γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας κυμάνθηκε μεταξύ 99-100% κατά την περίοδο παρατήρησης (δύο μήνες), σε αντίθεση με τα γαλακτώματα

που παρασκευάστηκαν με υπέρηχους των οποίων ο δείκτης ESI κυμάνθηκε μεταξύ 96-100%. Όσον αφορά στον Δείκτη Πολυδιασποράς (PDI), οι τιμές του με χρήση υπερήχων ήταν περίπου 6 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας. Το τελευταίο καθίσταται εμφανές και από τις μετρήσεις της θολότητας όπου οι τιμές κυμάνθηκαν με αντίστοιχο τρόπο όπως με το PDI και του χρώματος των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Τα παρασκευαζόμενα με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας μικρο/νανο-γαλακτώματα είναι περισσότερο διαυγή και εκδηλώνουν λιγότερη γαλακτοχρωμία λόγω διάχυσης του διερχόμενου φωτός. Γενικώς, ανεξάρτητα από την τεχνική ομογενοποίησης που επιλέχθηκε, από τις δοκιμές που έγιναν προέκυψε ότι η αύξηση της έντασης ομογενοποίησης και η αύξηση της χρονικής διάρκειας της ομογενοποίησης βελτιώνει τα χαρακτηριστικά των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων που παράγονται, τουλάχιστον ως προς την κινητική τους σταθερότητα και την εμφάνισή τους. Η μέθοδος ομογενοποίησης με υψηλή ταχύτητα και συγκεκριμένα στις 12.000 rpm για 20 min κρίθηκε η καλύτερη για τη συνέχιση της μελέτης παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων.

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν τριαδικά διαγράμματα φάσης με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητών (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 20 ή Span 80), ώστε να προσδιοριστεί το πεδίο των αναλογιών των τριών συστατικών (νερό, ελαιόλαδο, γαλ/τής) που με ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν μικρο/νανο-γαλακτώμα χωρίς την προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε αρχικά ότι είναι εφικτή η παρασκευή σταθερών μικρο- και νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο χωρίς την προσθήκη συν-επιφανειοδραστικής ουσίας. Συγκεκριμένα, ο γαλακτωματοποιητής Span 20 αποδείχθηκε ότι έχει την πιο αποτελεσματική γαλακτωματοποιητική ικανότητα - προσθήκη 27,3% w/w αυτού οδήγησε σε ομογενοποίηση 8,39% w/w νερού. Η σταθεροποιητική δράση του Span 20 μπορεί επίσης να εξηγηθεί από την υψηλή απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού του σε σχέση με τους άλλους γαλακτωματοποιητές. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με χαμηλή αναλογία γαλακτωματοποιητή είχαν τάση να κορυφώνονται, ενώ τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με υψηλή αναλογία γαλακτωματοποιητή έτειναν να δημιουργούν καταβυθιζόμενη φάση. Από την περαιτέρω ανάλυση κάποιων από τις αναλογίες γαλακτωματοποιητή (0%, 2%, 4%, 6%, 8% και 10% w/w), που κρίθηκαν πιο κατάλληλες, με προσθήκη 2% w/w νερού, προέκυψε ότι, οι γαλακτωματοποιητές Span 20 και Tween 20 έχουν τις καλύτερες γαλακτωματοποιητικές ικανότητες επιτυγχάνοντας 100% σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων για όλη την περίοδο παρατήρησης σε αναλογία 2% και 4% w/w. Κατώτερες μέσες τιμές διαμέτρου είχαν τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με Tween 40, Tween 20 και Span 20. Το μικρότερο μέγεθος των σταγονιδίων επιτεύχθηκε με Tween 40, 6% w/w και ήταν 45 nm. Οι περισσότεροι γαλακτωματοποιητές από τους εξετασθέντες

(Tween 20, Tween 40, Tween 80, Span 20) έδειξαν χαμηλή πολυδιασπορά (0,1-10,2). Ανώτερες απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού έδωσαν οι γαλακτωματοποιητές Span 20 και Tween 20. Χαμηλότερες τιμές θολότητας έδωσαν οι Tween 20, Tween 40 και Span 20 (35, 26 και 36 NTU) αντιστοίχως. Το χρώμα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάστηκε σημαντικά από τον τύπο του γαλακτωματοποιητή και όχι από την αναλογία του. Όλα τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που εξετάστηκαν παρουσίασαν συμπεριφορά νευτωνικού ρευστού. Το ιξώδες των γαλακτωμάτων έτεινε να αυξάνεται με αύξηση της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με Span 20 και Tween 60 είχαν μεγαλύτερες τιμές ιξώδους. Οι γαλακτωματοποιητές Tween 60 και Tween 80 δεν εμφάνισαν καλά αποτελέσματα. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με τους γαλακτωματοποιητές αυτούς χαρακτηρίστηκαν από υψηλή θολότητα, χαμηλή σταθερότητα και υψηλό δείκτη πολυδιασποράς. Όσον αφορά στην οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωμάτων, οι γαλακτωματοποιητές Span 80 και Tween 80 είχαν την καλύτερη προστατευτική δράση, με Αριθμό Υπεροξειδίων (Α.Υ.) στο τέλος της χρονικής διάρκειας παρατήρησης 20,25 και 20,52 αντίστοιχα σε αναλογία γαλ/τή 10% w/w σε σύγκριση με το τυφλό δείγμα που έδωσε τιμή Α.Υ. 32,84 meqO₂ kg⁻¹. Η παρατήρηση αυτή ερμηνεύεται από το γεγονός ότι οι μη-ιοντικοί γαλακτωματοποιητές με χαμηλή τιμή Υδροφιλικής-Λιποφιλικής Ισορροπίας (HLB) ή αλλιώς με έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπαρών σε συστήματα γαλακτωμάτων τύπου νερό-σε-έλαιο.

Κατόπιν κατασκευάστηκαν ψευδο-τριαδικά διαγράμματα με προκαθορισμένες αναλογίες των γαλακτωματοποιητών Tween 20 και Span 20 και προσθήκη τεσσάρων φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στην υδατική φάση σε αναλογία 1% w/w. Προέκυψε ότι όλα τα συστατικά που δοκιμάστηκαν πλην της κερσετίνης, βελτίωσαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωση υδατικής φάσης (1% w/w γαλλικό οξύ) που επιτεύχθηκε στα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα ήταν 8,99 % w/w με την προσθήκη 30,1% w/w Span 20, και 8,82% w/w με προσθήκη 34,8% w/w Tween 20. Η προσθήκη των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου σε συνδυασμό με τους γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Span 20 δεν είχε σημαντική επίδραση στα διαγράμματα φάσης των μελετώμενων συστημάτων.

Το γαλλικό οξύ, η απιγενίνη και το trans-σινναμικό οξύ λειτούργησαν συνεργιστικά με τους γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Span 20, επιμηκύνοντας την κινητική σταθερότητά τους βελτιώνοντας παράλληλα τις ιδιότητές τους. Η αποτελεσματικότητα των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου ήταν: γαλλικό οξύ (LogP = 0.7) > trans-σινναμικό οξύ (LogP = 1.59) > απιγενίνη (LogP = 2.1) > κερσετίνη (LogP = 1.81). Η κατάταξη αυτή συμφωνεί με τη σειρά του Συντελεστή Κατανομής τους (LogP), εκτός από την περίπτωση της κερσετίνης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο αμφιφιλικός χαρακτήρας των

συστατικών αυτών τα οδήγησε να τοποθετηθούν στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων και να σταθεροποιήσουν το γαλάκτωμα. Η κερσετίνη λόγω της εξαιρετικά χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό δεν κρίθηκε αποτελεσματική και τα μικρο/νανο-γαλακτώματα στο οποία ενσωματώθηκε παρουσίασαν χαμηλή σταθερότητα, υψηλή θολότητα και υψηλή μέση τιμή σταγονιδίων. Όσον αφορά στο δείκτη $ESI\%$, καλύτερη σταθερότητα επέδειξε ο συνδυασμός του γαλακτωματοποιητή Tween 20 σε αναλογία 4% και 5% w/w και γαλλικού οξέος ενσωματωμένου στην υδατική φάση. Η μικρότερη τιμή MDD που επιτεύχθηκε ήταν 39,7 nm με προσθήκη 8 % w/w Span 20 και γαλλικού οξέος στην υδατική φάση. Όλα τα υπό εξέταση γαλακτώματα παρουσίασαν $MDD < 500\text{nm}$ επομένως χαρακτηρίστηκαν ως μικρο/νανο-γαλακτώματα. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου μείωσε το δείκτη PDI και τη θολότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, με εξαίρεση την κερσετίνη. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κερσετίνη χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, και κατά την ενσωμάτωσή της στην υδατική φάση βρισκόταν υπό μορφή εναιωρήματος. Επομένως, ήταν αναμενόμενο να μην ενσωματωθεί ομοιογενώς στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων, και να οδηγήσει σε μεγαλύτερες τιμές MDD, PDI και θολότητας. Οι βελτιωμένες αυτές ιδιότητες των μικρο/νανογαλακτωμάτων επαληθεύονται και από τις μεγαλύτερες απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού που μετρήθηκαν στα γαλακτώματα που περιείχαν φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου ενσωματωμένα στην υδατική φάση.

Η μελέτη οξειδωσης που πραγματοποιήθηκε απέδειξε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τεσσάρων συστατικών, ενώ επιβεβαίωσε την προστατευτική δράση των γαλακτωματοποιητών στην οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Το γαλλικό οξύ αποδείχτηκε ότι είχε τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή απέδειξε ότι το γαλλικό οξύ, το trans-σινναμικό οξύ και η απιγενίνη, πέρα από τις πολύτιμες για την ανθρώπινη υγεία βιοδραστικές τους ιδιότητες και την αντιοξειδωτική τους δράση, παρουσιάζουν παράλληλα και επιφανειοδραστικές ικανότητες.

Από τη μελέτη σύγκρισης της παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ή το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο προέκυψε με σαφήνεια ότι τα παρασκευασμένα μικρο/νανο-γαλακτώματα με χρήση εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου υπερτερούν σημαντικά σε κινητική σταθερότητα, όσο και σε οξειδωτική σταθερότητα, εκείνων που παρασκευάστηκαν με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Αποδεικνύεται ότι αυτό οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση των μικρο-συστατικών που περιέχονται στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως βάση παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτώματος, σε σύγκριση με την περιορισμένη αντίστοιχη του εξευγενισμένου ελαιόλαδου. Αποδείχτηκε ακόμη ότι τα μικρο-συστατικά αυτά έχουν επιφανειοδραστικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οδηγώντας σε ανώτερα, πιο σταθερά μικρο/νανο-γαλακτώματα. Πιο συγκεκρι-

κρίμένα, παρασκευάστηκαν μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση τα δύο έλαια με προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween 20 σε αναλογία 2 και 4% w/w και υδατικής φάσης 2% w/w. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εμφάνισαν μεγαλύτερο δείκτη σταθερότητας, και ειδικότερα σε συνθήκες αποθήκευσης 40 °C. Συγκεκριμένα η ελάχιστη τιμή MDD που επιτεύχθηκε ήταν 99,2 nm με συνθήκες παρασκευής 4% w/w Tween 20 και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ως βάση, ενώ με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο 110,7 nm με προσθήκη 4% w/w Tween 20. Επιπλέον, το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ως βάση οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές PDI των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, κάτι που αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερης σταθερότητας. Αντίστοιχα κινήθηκαν και οι τιμές της θολότητας.

Όσον αφορά στη μελέτη οξειδωτικής σταθερότητας των εν λόγω μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, είναι εμφανές ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχαν μεγαλύτερο αρχικό Αριθμό Υπεροξειδίων (Α.Υ.) σε σχέση με εκείνα που παρασκευάστηκαν με εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Αυτό οφείλεται στο ότι το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, κατά τις διαδικασίες του εξευγενισμού, απαλλάσσεται από το μεγαλύτερο μέρος των ουσιών που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του Αριθμού των Υπεροξειδίων. Ωστόσο, παρότι θα αναμενόταν ένα έλαιο με αρχικά υψηλότερο αριθμό υπεροξειδίων να οξειδωθεί με ταχύτερο ρυθμό απ' ότι ένα έλαιο με πολύ χαμηλή συγκέντρωση υπεροξειδίων, παρατηρήθηκε ότι η οξείδωση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εξελίχθηκε με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με εκείνο των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Ενδεικτικά, το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με 4% w/w Tween 20 και εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχε τιμή Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$), 12,3 στην αρχή της μελέτης και στο τέλος του χρόνου παρατήρησης στους 40°C, η τιμή εξελίχθηκε σε 17,4. Αντίστοιχα, το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με 4% w/w Tween 20 και εξευγενισμένο ελαιόλαδο είχε τιμή Α.Υ. ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$), 4,8 στην αρχή της μελέτης και στο τέλος του χρόνου παρατήρησης στους 40°C, η τιμή εξελίχθηκε σε 12,7.

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων όπου δοκιμάστηκε η παρασκευή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξευγενισμένο ελαιόλαδο ή το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με προσθήκη γαλακτωματοποιητή Tween 20 σε αναλογίες 0%, 2%, 4% και 6% w/w, και ενσωμάτωση των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου συριγγικό, βανιλικό και γαλλικό οξύ, επιβεβαιώθηκε ότι το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο αποτελεί ανώτερη βάση για την παρασκευή ν/ε μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε σχέση με το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, όσον αφορά στην κινητική και οξειδωτική τους σταθερότητα εξαιτίας των επιφανειοδραστικών και αντιοξειδωτικών φαινολικών μικροσυστατικών που περιέχει. Επιπλέον προέκυψε ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο που περιείχαν 4% w/w Tween 20, εμφάνισαν παρόμοια ή και ανώτερα χαρακτηριστικά με τα μικρο/νανο-γαλακτώματα

με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο που περιείχαν 6% w/w Tween 20. Τα ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου είχαν εξαιρετικές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, αυξάνοντας σημαντικά το ESI% των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα, το βανιλικό οξύ αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το γαλλικό και το συριγγικό οξύ. Το γαλλικό οξύ σταθεροποίησε περισσότερο τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που δεν περιείχαν γαλακτωματοποιητή, ενώ το βανιλικό οξύ ήταν πιο αποτελεσματικό παρουσία γαλακτωματοποιητή. Ο συντελεστής κατανομής η-οκτανόλης/νερού (logP) του βανιλικού οξέος (1,30) είναι μεγαλύτερος από ότι για τα άλλα δύο φαινολικά συστατικά (γαλλικό οξύ: 0,91, συριγγικό οξύ: 1,13) πλησιέστερος στο logP του Tween 20 (1,74), το οποίο μπορεί να εξηγεί τη συμπληρωματική του δράση στη σταθεροποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Όσον αφορά στη μέση διάμετρο των σταγονιδίων προέκυψε ότι τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και γαλακτωματοποιητή 6% w/w παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές από εκείνα με 4% w/w γαλακτωματοποιητή. Η υπέρβαση της κρίσιμης συγκέντρωσης μικυλλίων που πιθανόν έλαβε χώρα οδήγησε στο σχηματισμό μικυλλίων τα οποία οδήγησαν σε συσσωμάτωση σταγονιδίων και αύξηση του MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Η ενσωμάτωση των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου βελτίωσε σημαντικά το MDD των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, επαληθεύοντας τα συμπεράσματα της μελέτης ESI%, ότι δηλαδή διαθέτουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Το βανιλικό οξύ και πάλι αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το γαλλικό και το συριγγικό οξύ. Η συνθήκη που οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές MDD ήταν το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, 4% Tween 20 w/w και ενσωμάτωση του βανιλικού οξέος στην υδατική φάση. Αντίστοιχα κινήθηκε και η μεταβολή του δείκτη PDI με τις καλύτερες συνθήκες να είναι τα γαλακτώματα με τα γαλακτώματα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, 4% Tween 20 w/w και ενσωμάτωση του βανιλικού οξέος ή γαλλικού οξέος. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της θολότητας, με το βανιλικό οξύ να είναι το πιο αποτελεσματικό. Οι τιμές της θολότητας κυμάνθηκαν από 135 NTU μέχρι 2551 NTU και αντιστοιχούσαν στο μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με προσθήκη βανιλικού οξέος και στο τυφλό γαλάκτωμα χωρίς προσθήκη γαλακτωματοποιητή και φαινολικού συστατικού αντιστοίχως.

Από τον προσδιορισμό της επιφανειακής τάσης των επιμέρους φάσεων των παραπάνω γαλακτωμάτων προέκυψε το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είχε χαμηλότερη επιφανειακή τάση σε σχέση με το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, γεγονός που διευκολύνει την παρασκευή γαλακτώματος. Επιπλέον, η προσθήκη του γαλακτωματοποιητή Tween 20, μείωσε περαιτέρω την επιφανειακή τάση των δύο ελαίων, όπως ήταν αναμενόμενο. Η προσθήκη των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου μείωσε επίσης την επιφανειακή τάση της υδατικής φάσης, το οποίο αποδεικνύει τις επιφανειοδραστικές τους ιδιότητες. Το γαλλικό οξύ μείωσε την επιφανειακή τάση του απιονισμένου νερού κατά 17,9%,

το βανιλικό οξύ κατά 18,4% και το συριγγικό κατά 19,7%. Από τα αποτελέσματα αυτά και μόνο θα ήταν αναμενόμενο, το συριγγικό οξύ να είναι το πιο αποτελεσματικό στη σταθεροποίηση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων σε σχέση με τα άλλα δύο εξεταζόμενα φαινολικά οξέα. Ωστόσο, οι προσδιορισμοί ESI%, MDD, PDI και θολότητας απέδειξαν ότι το βανιλικό και στη συνέχεια το γαλλικό οξύ ήταν τα πιο αποτελεσματικά. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι το συριγγικό οξύ είναι εξαιρετικά υδρόφιλο και δεν κατανεμήθηκε ομοιογενώς στη διπλοστοιβάδα νερού-ελαίου, ώστε να συνεισφέρει αντιστοίχως στη γαλακτωματοποίηση.

Η μελέτη οξειδωτικής σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυμένης οξείδωσης των παραπάνω γαλακτωμάτων έδειξε ότι η μεταβολή του Α.Υ. έγινε με γραμμικό ρυθμό. Ο ρυθμός μεταβολής του Α.Υ. των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον των αντίστοιχων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση εξευγενισμένο ελαιόλαδο, τουλάχιστον για το διάστημα των πρώτων δέκα ημερών λόγω του πλήθους αντιοξειδωτικών μικρο-συστατικών που περιέχονται φυσικά στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου στην υδατική φάση μείωσε σημαντικά τη σταθερά ρυθμού μεταβολής Α.Υ. των μελετώμενων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα το γαλλικό οξύ αποδείχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το συριγγικό και μετά από το βανιλικό οξύ με ρυθμό μεταβολής Α.Υ. ($k(d-1)$) ίσο με 1,2714, 1,3445 και 1,3813 αντιστοίχως. Τα συμπεράσματα της μελέτης της οξειδωτικής σταθερότητας με βάση τον Α.Υ. επιβεβαιώθηκαν από την τεχνική προσδιορισμού οξειδωτικής σταθερότητας με χρήση του αντιδραστήρα Oxitest®. Η ενσωμάτωση των τριών φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου επηρέασε σημαντικά την οξειδωτική σταθερότητα των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων. Όπως και στον προσδιορισμό Α.Υ., το γαλλικό οξύ (Σημείο Επαγωγής - IP (h)= 14,87) αποδείχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό συστατικό ακολουθούμενο από το συριγγικό (IP (h)= 14,43) και το βανιλικό οξύ (IP (h)= 13,66). Τέλος τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μελετήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των περιεχόμενων Ολικών Φαινολικών Συστατικών (Ο.Φ.Σ.) σε επιταχυμένες συνθήκες οξείδωσης και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg γαλλικού οξέος/kg γαλακτώματος (mg GAE/kg). Κατά το τέλος της χρονικής διάρκειας παρατήρησης για τα μικρο/νανο-γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, το γαλλικό οξύ (95,1 mg GAE/kg) προέκυψε ως το πιο προστατευτικό έναντι της οξείδωσης ακολουθούμενο από το συριγγικό (77,2 mg GAE/kg) και μετά από το βανιλικό οξύ (61,7 mg GAE/kg). Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη μεταβολή της συγκέντρωσης των Ολικών Φαινολικών Συστατικών (Ο.Φ.Σ.) των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων συμφωνούν με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού μεταβολής του Α.Υ., αποδεικνύοντας την άμεση συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών και οξειδωσιμότητας του ελαίου.

Τέλος, με βάση τα προηγούμενα συμπεράσματα, πραγματοποιήθηκε μία μελέτη εύρεσης μαθηματικών μοντέλων που θα επιτρέπουν την πρόβλεψη των ιδιοτήτων του τελικού μικρο/νανο-γαλακτώματος συναρτήσει των επιπέδων των ανεξάρτητων μεταβλητών (της αναλογίας γαλακτωματοποιητή Tween 20: 2%, 4%, 6% w/w γαλακτώματος και γαλλικού οξέος: 0%, 0,5%, 1% w/w υδατικής φάσης), και ο υπολογισμός των βέλτιστων επιπέδων των ανεξάρτητων μεταβλητών στο τελικό σύστημα, προκειμένου να προκύψει ένα μικρο/νανο-γαλάκτωμα με βέλτιστα ποιοτικά χαρακτηριστικά όσον αφορά στη σταθερότητα και τις άλλες ιδιότητές του. Παρότι σε προηγούμενες σειρές πειραμάτων, σε κάποιες περιπτώσεις, οι αναλογίες γαλακτωματοποιητή σε συγκέντρωση 8% και 10% w/w οδήγησαν σε καλές φυσικοχημικές ιδιότητες, ωστόσο δεν επιλέχθηκαν σε αυτήν τη μελέτη, καθώς η Ευρωπαϊκή νομοθεσία επιτρέπει τη χρήση του σε αναλογία *quantum satis* (Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1130/2011), ενώ παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις του Tween 20 επηρεάζουν δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Αποδείχθηκε ότι η Μεθοδολογία Επιφανειών Απόκρισης (RSM) αποτελεί μία χρήσιμη τεχνική για την αξιόπιστη μοντελοποίηση της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών που αντιστοιχούν στη σύσταση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και την εύρεση των βέλτιστων ιδιοτήτων τους. Αναπτύχθηκαν πολυωνυμικά μοντέλα δευτέρου βαθμού για την πρόβλεψη των MDD, PDI, θολότητας και ESI% μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ν/ε με βάση ελαιόλαδο και ενσωμάτωση γαλλικού οξέος στην υδατική φάση και οι προκύπτουσες εξισώσεις αποδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές με τον συντελεστή συσχέτισης R^2 να ισούται με 0,993, 0,968, 0,997 και 0,989 αντιστοίχως. Οι ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων επηρεάστηκαν σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και του γαλλικού οξέος. Η αύξηση της αναλογίας γαλακτωματοποιητή βελτίωσε τις ιδιότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων έως την αναλογία των 6% w/w. Η αύξηση της αναλογίας του γαλλικού οξέος οδήγησε σε βελτίωση των ιδιοτήτων των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων, επαληθεύοντας τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του γαλλικού οξέος.

Οι συνδυασμοί παρασκευής μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με ενσωμάτωση γαλλικού οξέος που μπορεί να οδηγήσουν σε μικρο/νανο-γαλακτώματα με τις πιο επιθυμητές ιδιότητες είναι: 3,14-4,45% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το MDD, 2,95-4,56% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το PDI, 2,35%-5,21% Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για τη θολότητα και 3,21-5,25% w/w Tween 20 και 1% w/w γαλλικό οξύ για το ESI%.

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τον σχεδιασμό και την παρασκευή βελτιστοποιημένων μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ν/ε με υψηλή σταθερότητα και επιθυμητά χαρακτηριστικά και ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά.

5.2 Προτάσεις

Οι καινοτομίες στη βιομηχανία τροφίμων συνεχίζουν να εξελίσσονται, καθοδηγούμενες από την αυξανόμενη ζήτηση για πιο υγιεινά, πιο βιώσιμα και γευστικά προϊόντα διατροφής και τον ανταγωνισμό για καινοφανή τρόφιμα με πρωτόγνωρες ιδιότητες. Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο αντιπροσωπεύουν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο στην τεχνολογία τροφίμων, προσφέροντας πολλές ευκαιρίες για την ενίσχυση του θρεπτικού περιεχομένου, τη βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων και την κάλυψη των προτιμήσεων των καταναλωτών για καθαρά συστατικά. Η παρούσα διατριβή φιλοδοξεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων ή και συστημάτων χορήγησης βιοδραστικών ή αντιμικροβιακών συστατικών. Η επιλογή του ελαιόλαδου ως βάση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων οδήγησε σε εκτεταμένη διάρκεια ζωής, και υψηλή διατροφική αξία. Οι γαλακτωματοποιητές που επιλέχθηκαν είναι όλοι εγκεκριμένοι για τη χρήση τους στα τρόφιμα, αποφεύχθηκε η χρήση συν-επιφανειοδραστικών συστατικών που θα δυσκόλευαν τη χρήση σε τρόφιμα, και τέλος διερευνήθηκε η προσθήκη φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου που αποδείχθηκε ότι είχαν αντιοξειδωτικές και επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Παρακάτω ακολουθούν μερικές προτάσεις για περαιτέρω μελέτη επί του αντικειμένου της παρούσας διατριβής:

Συστήματα μικροεγκλεισμού βιοδραστικών συστατικών: Τα γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο προσφέρουν μία πολλά υποσχόμενη οδό για την παροχή βιοδραστικών ενώσεων και θρεπτικών συστατικών σε λειτουργικά τρόφιμα. Θα μπορούσαν λοιπόν, σε αντίστοιχα συστήματα, να δοκιμαστούν άλλα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου και όχι μόνο, ή υδατοδιαλυτές βιταμίνες ή εκχυλίσματα φυτών με σκοπό την ενίσχυση της σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητάς τους, προάγοντας την υγεία των καταναλωτών.

Βελτίωση υφής και παραγωγή τροφίμων με μειωμένα λιπαρά: Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο μπορούν να παίξουν καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της υφής διαφόρων προϊόντων διατροφής. Για παράδειγμα, σε εναλλακτικά γαλακτοκομικά φυτικής προέλευσης όπως το γάλα αμυγδάλου ή βρώμης, τα μικρο/νανο-γαλακτώματα μπορούν να προσδώσουν μία κρεμώδη αίσθηση παρόμοια με τα παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα. Ομοίως, σε επικαλύψεις για σαλάτες και μαγιονέζες, η ενσωμάτωση μικρο/νανο-γαλακτωμάτων μπορεί να προσφέρει μία λεία και κρεμώδη υφή, χωρίς την ανάγκη υπερβολικών ποσοτήτων λίπους, διατηρώντας παράλληλα τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως η υφή και η αίσθηση στο στόμα.

Εκτεταμένη διάρκεια ζωής: Το ελαιόλαδο περιέχει φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως φαινολικές ενώσεις και τοκοφερόλες, καθιστώντας το ιδανικό υποψήφιο για την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων διατροφής. Με τον μικροεγκλεισμό αυτών των αντιοξειδωτικών συστατικών σε μικρο/νανο-

γαλακτώματα ν/ε, είναι δυνατό να ανασταλεί η οξείδωση των λιπιδίων και να καθυστερήσει η εμφάνιση οξείδωσης σε τρόφιμα πλούσια σε λιπίδια, όπως ξηρούς καρπούς, σνακ μπάρες και προϊόντα αρτοποιίας. Επιπλέον, η ενσωμάτωση αντιμικροβιακών παραγόντων σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο μπορεί να βοηθήσει στην αναστολή της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών, επεκτείνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής ευπαθών τροφίμων, όπως ντιπ και σάλτσες.

Συνθέσεις καθαρής ετικέτας: Οι καταναλωτές απαιτούν ολοένα και περισσότερο προϊόντα καθαρής ετικέτας με ελάχιστα πρόσθετα και συνθετικά συστατικά. Τα γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο που μάλιστα περιέχουν φαινολικά αντιοξειδωτικά συστατικά προσφέρουν μία φυσική εναλλακτική λύση σε σχέση με τους συμβατικούς γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές, που ευθυγραμμίζονται με τις τάσεις καθαρής ετικέτας. Για παράδειγμα, στη σύνθεση των σαλτσών σαλάτας (dressings), η χρήση γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο και φαινολικά του συστατικά ως σταθεροποιητές μπορεί να ενισχύσει τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Ομοίως, σε εφαρμογές αρτοποιίας, τα γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο μπορούν να χρησιμεύσουν ως φυσικό υποκατάστατο για συνθετικά βελτιωτικά ζύμης, διασφαλίζοντας τη συμμόρφωση με την ετικέτα.

Η επιστήμη των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων και η δυνατότητα παρασκευής δομημένων συστημάτων όπως αυτά που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, πέρα από την επιστήμη των τροφίμων, μπορεί να έχουν πάμπολλες εφαρμογές σε πολλούς άλλους επιστημονικούς κλάδους. Στη φαρμακευτική, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας φαρμακευτικών ουσιών, επιτρέποντας καλύτερη απορρόφηση και στοχευμένη απελευθέρωση δραστικών ουσιών. Στην κοσμητική, θα μπορούσαν να προσφέρουν βελτιωμένη ενυδάτωση και διείσδυση δραστικών συστατικών στο δέρμα, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των προϊόντων περιποίησης. Στην περιβαλλοντική επιστήμη, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση ρύπων και την επεξεργασία αποβλήτων καθώς αντίστοιχα συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δέσμευση και τη διάσπαση ρυπογόνων ουσιών από νερό και έδαφος, όπως πετρελαιοειδή και οργανικούς ρύπους.

5.3 Προκλήσεις

Τα μικρο/νανο-γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο έχουν σημαντικές δυνατότητες για επαναστατικές συνθέσεις προϊόντων διατροφής στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων με τη δημιουργία καινοφανών τροφίμων με χρήσιμες νέες ιδιότητες. Με τις μοναδικές τους ιδιότητες και τα οφέλη τους, αυτά τα γαλακτώματα προσφέρουν ευκαιρίες για τη δημιουργία πιο υγιεινών, πιο νόστιμων και πιο βιώσιμων τροφίμων. Ωστόσο, μαζί με αυτές τις ευκαιρίες έρχονται και αρκετές προκλήσεις που πρέπει

να αντιμετωπιστούν για την πλήρη αξιοποίηση των δυνατοτήτων των γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο στη βιομηχανία τροφίμων. Παρακάτω παρατίθενται μερικές από αυτές τις προκλήσεις:

Σταθερότητα και διάρκεια ζωής: Η επίτευξη μακροπρόθεσμης σταθερότητας και διάρκειας ζωής των γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο σε σκευάσματα τροφίμων παραμένει μία σημαντική πρόκληση. Παράγοντες όπως οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας κατά την αποθήκευση, οι διακυμάνσεις του pH και οι αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά τροφίμων μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Η χρήση προηγμένων τεχνικών γαλακτωματοποίησης και η επιλογή κατάλληλων επιφανειοδραστικών και συν-γαλακτωματοποιητών είναι κρίσιμης σημασίας για την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων σταθερότητας.

Παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα: Η παραγωγή μικρο/νανο-γαλακτωμάτων για βιομηχανικές εφαρμογές διατηρώντας παράλληλα σταθερή ποιότητα και σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας αποτελεί σημαντική πρόκληση.

Κανονιστική συμμόρφωση: Η διασφάλιση της συμμόρφωσης με τα ρυθμιστικά πρότυπα και η απόκτηση έγκρισης για τη χρήση νέων συστατικών με βάση τα μικρο/νανο-γαλακτώματα σε προϊόντα διατροφής μπορεί να είναι μία χρονοβόρα και πολύπλοκη διαδικασία.

Συμβατότητα συστατικών: Καθώς τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα συστήματα, η χρήση των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων ως συστατικά τροφίμων και όχι ως αυτούσια προϊόντα ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα συμβατότητας μεταξύ γαλακτωματοποιητών, ελαίων και άλλων συστατικών να προκύψουν κατά την ανάπτυξη της σύνθεσης, που απαιτούν εκτεταμένες δοκιμές.

Οργανοληπτική αποδοχή: Η οργανοληπτική αποδοχή παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία των γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο σε εφαρμογές τροφίμων. Οι κακές γεύσεις, οι αλλαγές χρώματος ή οι ασυνέπειες στην υφή μπορούν να αποτρέψουν την αποδοχή των καταναλωτών. Η διεξαγωγή οργανοληπτικών αξιολογήσεων και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων της σύνθεσης είναι ουσιαστικά βήματα για τη διασφάλιση ότι τα προϊόντα με βάση τα μικρο/νανο-γαλακτώματα ανταποκρίνονται στις προσδοκίες των καταναλωτών, ενώ παρέχουν θρεπτικά και λειτουργικά οφέλη.

Ανάλυση κόστους: Οι εκτιμήσεις κόστους αποτελούν σημαντική πρόκληση στην ευρεία υιοθέτηση γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο σε σκευάσματα τροφίμων. Ενώ το ελαιόλαδο αποτελεί μία πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ενώσεων και αντιοξειδωτικών, το κόστος του σε σύγκριση με άλλα φυτικά έλαια μπορεί να είναι υψηλότερο. Η αξιολόγηση της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας της ενσωμάτωσης γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο και η αριστοποίηση των διαδικασιών παραγωγής είναι κρίσιμα βήματα για να καταστούν τα προϊόντα με βάση το γαλάκτωμα οικονομικά βιώσιμα για τους καταναλωτές.

Αντιμετωπίζοντας αυτές τις προτάσεις και προκλήσεις, οι βιομηχανίες τροφίμων μπορούν να εκμεταλλευτούν τις δυνατότητες των μικρο/νανο-γαλακτωμάτων με βάση το ελαιόλαδο για τη δημιουργία πιο υγιεινών, ελκυστικότερων και βιώσιμων προϊόντων διατροφής που ανταποκρίνονται στις εξελισσόμενες ανάγκες και προτιμήσεις των καταναλωτών.

Έτσι, κατανοώντας τις δυνατότητες που παρέχουν τα γαλακτώματα στην κατεύθυνση της λύσης προβλημάτων που συναντάμε στον τομέα των τροφίμων, αλλά και σε μύριες άλλες εφαρμογές στους τομείς της υγείας, της ένδυσης, των κατασκευών, της γεωργίας, της έρευνας, του περιβάλλοντος, κλ.π., άρα έμμεσα και της οικονομίας, αντιλαμβανόμαστε ότι η επιστήμη των γαλακτωμάτων δεν θα πάψει να εξελίσσεται και μάλιστα με τον ρυθμό που αυξάνονται οι ανάγκες του σύγχρονου ανθρώπου. Η φύση έδωσε λύση στα ζητήματα που αντιμετώπισε με την εκλεκτική διαλυτότητα των ουσιών. Εφαρμόζοντας τεχνικές γαλακτωματοποίησης «διάλυσε» λάδι σε νερό και δημιούργησε αίμα, γάλα, χυμούς, δηλαδή ζωή. Εμείς, ασθμαίνοντες αντιγραφείς της φύσης, προσπαθούμε να συμβάλουμε στη βελτίωση των συνθηκών της ζωής.

- Abbas, S. *et al.* (2013) 'An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions', *Food Engineering Reviews*, 5(3), pp. 139–157. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3>.
- Abd-El salam, K. and Murugan, K. (2022) *Bio-based nanoemulsions for agri-food applications*. 1st edn. Edited by K.M. Kamel A. Abd-El salam. Elsevier.
- Abdou, E.S., Galhoum, G.F. and Mohamed, E.N. (2018) 'Curcumin loaded nanoemulsions/pectin coatings for refrigerated chicken fillets', *Food Hydrocolloids*, 83, pp. 445–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.05.026>.
- Abismaïl, B. *et al.* (1999) 'Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability', *Ultrasonics Sonochemistry*, 6(1–2), pp. 75–83. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(98\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(98)00027-3).
- Aboudzadeh, M.A. *et al.* (2018) 'Low-Energy Encapsulation of α -Tocopherol Using Fully Food Grade Oil-in-Water Microemulsions'. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01272>.
- Ahmad, J. and Nollet, Leo M. L. (2021) *Nanoemulsions in food technolog : development, characterization, and applications*. Edited by Javed Ahmad and Leo M.L. Nollet. CRC Press.
- Ahmed, K. *et al.* (2012) 'Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties', *Food Chemistry*, 132(2), pp. 799–807. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.11.039>.
- Akbas, E., Soyler, B. and Oztop, M.H. (2018) 'Formation of capsaicin loaded nanoemulsions with high pressure homogenization and ultrasonication', *LWT*, 96, pp. 266–273. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.05.043>.
- Alarcón-De-la-lastra, C. (2022) 'Olive Oil Antioxidants', *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11050996>.
- Alexandre, E.M.C. *et al.* (2016) 'Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications', *Food Packaging and Shelf Life*, 10, pp. 87–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2016.10.004>.
- Ali, F. *et al.* (2017) 'Health functionality of apigenin: A review', *International Journal of Food Properties*, 20(6), pp. 1197–1238. Available at: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1207188>.

- Allahverdiyev, A.M. *et al.* (2013) 'Chapter 17 - Development of New Antiherpetic Drugs Based on Plant Compounds', in M.K. Rai and K.V. Kon (eds) *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*. San Diego: Academic Press, pp. 245–259. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123985392000173>.
- Allied Market Research (2024) *Nanoemulsion Market by Type and Application: Global Opportunity Analysis and Industry Forecast 2019-2026*. Available at: https://www.reportlinker.com/p05837017/Nanoemulsion-Market-by-Type-and-Application-Global-Opportunity-Analysis-and-Industry-Forecast.html?utm_source=GNW (Accessed: 13 January 2024).
- Alves, E., Domingues, M.D.R. and Domingues, P. (2023) 'Olive oil', in *Functional Foods and Their Implications for Health Promotion*. Elsevier, pp. 97–129. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128238110000122>.
- Ambrosone, L. *et al.* (2002) 'The Role of Water in the Oxidation Process of Extra Virgin Olive Oils', *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79(6), pp. 577–582. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0525-3>.
- Ambrosone, L., Mosca, M. and Ceglie, A. (2006) 'Oxidation of water emulsified olive oils', *Food Hydrocolloids*, 20(7), pp. 1080–1086. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.12.004>.
- Amiri-Rigi, A., Abbasi, S. and Emmambux, M.N. (2022) 'Background, Limitations, and Future Perspectives in Food Grade Microemulsions and Nanoemulsions', *Food Reviews International*, 39(8), pp. 5048–5086. Available at: <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2059808>.
- Anton, N. and Vandamme, T.F. (2011) 'Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences', *Pharmaceutical Research*. Springer US, pp. 978–985. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>.
- AquaNova 2024* (no date). Available at: <https://aquanova.de/> (Accessed: 13 January 2024).
- Arabi, M., Ghaedi, M. and Ostovan, A. (2017) 'Synthesis and application of in-situ molecularly imprinted silica monolithic in pipette-tip solid-phase microextraction for the separation and determination of gallic acid in orange juice samples', *Journal of Chromatography B*, 1048, pp. 102–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2017.02.016>.
- Arn, H. and Acree, T.E. (1998) 'Flavornet: A database of aroma compounds based on odor potency in natural products', in *Developments in Food Science*. Elsevier, p. 27. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167450198800290>.
- Ashaolu, T.J. (2021) 'Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review', *Environmental Chemistry Letters* 2021 19:4, 19(4), pp. 3381–3395. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10311-021-01216-9>.

- Aswathanarayan, J.B. and Vittal, R.R. (2019) 'Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry', *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, p. 438537. Available at: <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2019.00095/BIBTEX>.
- Atkins, P.W. (Peter W. and De Paula, Julio. (2010) *Physical chemistry*. W.H. Freeman and Co.
- Banasaz, S. *et al.* (2020a) 'Encapsulation of Lipid-Soluble Bioactives by Nanoemulsions', *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3966, 25(17), p. 3966. Available at: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25173966>.
- Banasaz, S. *et al.* (2020b) 'Encapsulation of Lipid-Soluble Bioactives by Nanoemulsions', *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3966, 25(17), p. 3966. Available at: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25173966>.
- Bao, Y. and Pignitter, M. (2023) 'Mechanisms of lipid oxidation in water-in-oil emulsions and oxidomics-guided discovery of targeted protective approaches', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(4), pp. 2678–2705. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13158>.
- Barzegar, H. *et al.* (2018) 'Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: Effect of preparing conditions on droplet size', *Flavour and Fragrance Journal*, 33(5), pp. 351–356. Available at: <https://doi.org/10.1002/FFJ.3455>.
- Bayçın, D. *et al.* (2007) 'Adsorption of Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Antioxidants on Silk Fibroin', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), pp. 1227–1236. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf062829o>.
- Bayram, I. and Decker, E.A. (2023) 'Underlying mechanisms of synergistic antioxidant interactions during lipid oxidation', *Trends in Food Science & Technology*, 133, pp. 219–230. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.02.003>.
- Beauchamp, G.K. *et al.* (2005) 'Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil', *Nature*, 437(7055), pp. 45–46. Available at: <https://doi.org/10.1038/437045A>.
- Bedoya-Serna, C.M. *et al.* (2018) 'Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese', *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), pp. 929–935. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2018.05.004>.
- Bendini, A. *et al.* (2007) 'Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade Alessandra', *Molecules*, 12(8), pp. 1679–1719. Available at: <https://doi.org/10.3390/12081679>.
- Bera, A. *et al.* (2012) 'Water solubilization capacity, interfacial compositions and thermodynamic parameters of anionic and cationic microemulsions', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*

- Engineering Aspects*, 404, pp. 70–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2012.04.013>.
- Bermúdez-Oria, A. *et al.* (2024) 'Isolation and structural determination of cis- and trans-p-coumaroyl-secologanoside (comselogoside) from olive oil waste (alperujo). Photoisomerization with ultraviolet irradiation and antioxidant activities', *Food Chemistry*, 432, p. 137233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137233>.
- Berton-Carabin, C.C., Ropers, M.H. and Genot, C. (2014) 'Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), pp. 945–977. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>.
- and Food Safety*, 13(5), pp. 945–977. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>.
- Berton-Carabin, C.C., Sagis, L. and Schroën, K. (2018) 'Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions', *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, pp. 551–587. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030117-012405>.
- Bhattacharjee, K. and Bhattacharjee, K. (2019) 'Importance of Surface Energy in Nanoemulsion', *Nanoemulsions - Properties, Fabrications and Applications* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.84201>.
- Borjan, D. *et al.* (2020) 'Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract', *Molecules*, 25(24), p. 5946. Available at: <https://doi.org/10/gs3r7k>.
- Boskou, Dimitrios. and Society., A.O.C. (2006) *Olive oil : chemistry and technology*. AOCS Press.
- Bourbon, A.I. *et al.* (2018) 'Characterization of Particle Properties in Nanoemulsions', *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*, pp. 519–546. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00016-3>.
- Box, G.E.P. and Behnken, D.W. (1960) 'Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables', *Technometrics*, 2(4), p. 455. Available at: <https://doi.org/10.2307/1266454>.
- Bravo-Diaz, C. (2022a) *Lipid Oxidation in Food and Biological Systems, Lipid Oxidation in Food and Biological Systems*. Springer International Publishing.
- Bravo-Diaz, C. (2022b) 'Lipid Oxidation in Food and Biological Systems: A Physical Chemistry Perspective', *Lipid Oxidation in Food and Biological Systems: A Physical Chemistry Perspective*, pp. 1–477. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-87222-9/COVER>.
- Breschi, C. *et al.* (2023) 'Composition and Physical Stability of the Colloidal Dispersion in Veiled Virgin Olive Oil', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 125(4). Available at: <https://doi.org/10.1002/EJLT.202200151>.
- Briguglio, G. *et al.* (2020) 'Polyphenols in cancer prevention: New insights (Review)', *International Journal of Functional Nutrition*, 1(2), p. 9. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijfn.2020.9>.

- Bucciantini, M. *et al.* (2021) 'Olive Polyphenols: Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties', *Antioxidants*, 10(7), p. 1044. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox10071044>.
- Burt, S. (2004) 'Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review', *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), pp. 223–253. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022>.
- Cárdeno, A. *et al.* (2014) 'Extra virgin olive oil polyphenolic extracts downregulate inflammatory responses in LPS-activated murine peritoneal macrophages suppressing NFκB and MAPK signalling pathways', *Food Funct.*, 5(6), pp. 1270–1277. Available at: <https://doi.org/10.1039/C4FO00014E>.
- Cayuela-Sánchez, J.A. and Caballero-Guerrero, B. (2019) 'Fresh extra virgin olive oil, with or without veil', *Trends in Food Science & Technology*, 83, pp. 78–85. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.11.014>.
- Chaiyasit, W. *et al.* (2000) 'Ability of surfactant hydrophobic tail group size to alter lipid oxidation in oil-in-water emulsions', *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), pp. 3077–3080. Available at: <https://doi.org/10.1021/JF000323E>.
- Chaiyasit, W. *et al.* (2008) 'Impact of Surface-Active Compounds on Physicochemical and Oxidative Properties of Edible Oil', Chaiyasit, Wilailuk, D. Julian McClements, Jochen Weiss, and Eric A. Decker. 2008. "Impact of Surface-Active Compounds on Physicochemical and Oxidative Properties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), pp. 550–556. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf072071o>.
- Chang, Y., McLandsborough, L. and McClements, D.J. (2012) 'Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: Influence of ripening inhibitors', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), pp. 12056–12063. Available at: https://doi.org/10.1021/JF304045A/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2012-04045A_0006.JPEG.
- Chaudhari, R., Patel, V. and Kumar, A. (2023) 'Application of nanoemulsions in food industries: Recent progress, challenges, and opportunities', *Impact of Engineered Nanomaterials in Genomics and Epigenomics*, pp. 229–250. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781119896258.ch9>.
- Chavda, V.P. (2017) 'A review on Novel Emulsification Technique: A Nanoemulsion', *Research and Reviews: Journal of Pharmacology and Toxicological Studies*, 5(1), pp. 29–37. Available at: <http://www.rroj.com/open-access/a-review-on-novel-emulsification-technique-a-nanoemulsion-.pdf> (Accessed: 6 December 2017).
- Chen, L. (2015) 'Emulsifiers as food texture modifiers', in *Modifying Food Texture*. Elsevier, pp. 27–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-333-1.00002-4>.
- Cheng, C. *et al.* (2022) 'Review on the Regulation of Plant Polyphenols on the Stability of Polyunsaturated-Fatty-Acid-Enriched Emulsions: Partitioning Kinetic and Interfacial Engineering', *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 70(12), pp. 3569–3584. Available at: <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C05335>.
- Cheong, A.M., Tan, C.P. and Nyam, K.L. (2018) 'Stability of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Kenaf Seed Oil-in-Water Nanoemulsions under Different Storage Temperatures', *Journal of Food Science*, 83(10), pp. 2457–2465. Available at: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14332>.
- Chime, S.A., Kenechukwu, F.C. and Attama, A.A. (2014) 'Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery', in *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech. Available at: <https://doi.org/10.5772/58673>.
- Cho, Y.H. *et al.* (2008) 'Formulation of a cosurfactant-free O/W microemulsion using nonionic surfactant mixtures', *Journal of Food Science*, 73(3), pp. 115–121. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00688.x>.
- Chouaibi, M. *et al.* (2019) 'Experimental study of quercetin microencapsulation using water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsion', *Journal of Molecular Liquids*, 273, pp. 183–191. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2018.10.030>.
- Chtourou, F. *et al.* (2021) 'Characterization of virgin olive oils obtained from minor Tunisian varieties for their valorization', *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(6), pp. 5060–5070. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01066-7>.
- Cicerale, S. *et al.* (2008) 'Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), pp. 218–236. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408390701856223>.
- Cinelli, G. *et al.* (2019) 'Red wine-enriched olive oil emulsions: Role of wine polyphenols in the oxidative stability', *Colloids and Interfaces*, 3(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/COLLOIDS3030059>.
- Cinelli, G., Cofelice, M. and Venditti, F. (2020) 'Veiled Extra Virgin Olive Oils: Role of Emulsion, Water and Antioxidants', *Colloids and Interfaces 2020, Vol. 4, Page 38*, 4(3), p. 38. Available at: <https://doi.org/10.3390/COLLOIDS4030038>.
- Conte, L. *et al.* (2020) 'Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future', *Trends in Food Science & Technology*, 105, pp. 483–493. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.02.025>.
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D. and Dumay, E. (2009) 'Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage', *Food Hydrocolloids*, 23(3), pp. 640–654. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2008.07.023>.

- Cvetanović, A. *et al.* (2017) 'Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process', *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, pp. 32–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2016.10.012>.
- Dammak, I. *et al.* (2017) 'Properties of active gelatin films incorporated with rutin-loaded nanoemulsions', *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, pp. 39–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.01.094>.
- Dasgupta, N. and Ranjan, S. (2018) *An Introduction to Food Grade Nanoemulsions*. 1st edn, *An Introduction to Food Grade Nanoemulsions*. 1st edn. Tamil Nadu, India: Springer (Environmental Chemistry for a Sustainable World). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6986-4>.
- Deen, G.R., Skovgaard, J. and Pedersen, J.S. (2011) *Nanotechnology in the Agri-Food Sector, EMULSIONS Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Volume 3*. Edited by L.J. Frewer *et al.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Available at: <https://doi.org/10.1002/9783527634798>.
- Delaquis, P., Stanich, K. and Toivonen, P. (2005) 'Effect of pH on the Inhibition of *Listeria* spp. by Vanillin and Vanillic Acid', *Journal of Food Protection*, 68(7), pp. 1472–1476. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1472>.
- Delgado-Ad, J., Franco Baltasar, M.N. and Ayuso Yuste, M.C. (2014) 'Oxidative Stability, Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of a Virgin Olive Oil Enriched with Natural Bioactive Compounds', *Journal of Oleo Science*, 63(1), pp. 55–65. Available at: <https://doi.org/10.5650/jos.ess13114>.
- Deng, L. *et al.* (2015) 'Solubilization of Tea Seed Oil in a Food-Grade Water-Dilutable Microemulsion', *PLOS ONE*, 10(5), p. e0127291. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127291>.
- Dhiman, S. and Mukherjee, G. (2021) 'Gallic Acid (GA): A Multifaceted Biomolecule Transmuting the Biotechnology Era', in R. Prasad *et al.* (eds) *Recent Developments in Microbial Technologies*. Singapore: Springer Nature Singapore, pp. 163–202. Available at: https://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4439-2_8.
- Ding, S. *et al.* (2018) 'Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective', *Journal of Controlled Release*, 295, pp. 31–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.037>.
- Donsì, F. *et al.* (2012) 'Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier', *Journal of Biotechnology*, 159(4), pp. 342–350. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2011.07.001>.
- Donsì, F. and Velikov, K.P. (2019) 'Encapsulation of food ingredients by single O/W and W/O nanoemulsions', in *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes: Volume 2 in the*

- Nanoencapsulation in the Food Industry series*. Academic Press, pp. 37–87. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815673-5.00002-7>.
- Eisinaite, V. *et al.* (2017) 'Food-grade double emulsions as effective fat replacers in meat systems', *Journal of Food Engineering*, 213, pp. 54–59. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2017.05.022>.
- El-Seedi, H.R. *et al.* (2018) 'Chapter 8 - Hydroxycinnamic Acids: Natural Sources, Biosynthesis, Possible Biological Activities, and Roles in Islamic Medicine', in Atta-ur-Rahman (ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp. 269–292. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444640680000085>.
- Erlund, I. (2004) 'Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology', *Nutrition Research*, 24(10), pp. 851–874. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.07.005>.
- Espitia, P.J.P., Fuenmayor, C.A. and Otoni, C.G. (2019) 'Nanoemulsions: Synthesis, Characterization, and Application in Bio-Based Active Food Packaging', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), pp. 264–285. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12405>.
- Evageliou, V., Panagopoulou, E. and Mandala, I. (2019) 'Encapsulation of EGCG and esterified EGCG derivatives in double emulsions containing Whey Protein Isolate, Bacterial Cellulose and salt', *Food Chemistry*, 281, pp. 171–177. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.12.105>.
- Faci, M. *et al.* (2021) 'Changes in secoiridoids content and chemical characteristics of cultivated and wild Algerian olive oil, in term of fruit maturation', *PLoS ONE*, 16(11), p. e0260182. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260182>.
- Fanali, C. *et al.* (2018) 'Extraction, Analysis, and Antioxidant Activity Evaluation of Phenolic Compounds in Different Italian Extra-Virgin Olive Oils', *Molecules*, 23(12), p. 3249. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23123249>.
- Fang, R. *et al.* (2011) 'Bovine Serum Albumin Nanoparticle Promotes the Stability of Quercetin in Simulated Intestinal Fluid', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), pp. 6292–6298. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf200718j>.
- Fanun, M. (2009) 'Microemulsions Formation on Water/Nonionic Surfactant/Peppermint Oil Mixtures', *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(3), pp. 399–405. Available at: <https://doi.org/10.1080/01932690802548619>.
- Faraji, H., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2004) 'Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions', *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(14), pp. 4558–4564. Available at: <https://doi.org/10.1021/JF035346I>.

- Faridi Esfanjani, A., Jafari, S.M. and Assadpour, E. (2017) 'Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets', *Food chemistry*, 221, pp. 1962–1969. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.11.149>.
- Fatehi, P. *et al.* (2020) 'Preparation and characterization of palm oil in water microemulsion for application in the food industry', *British Food Journal*, 122(10), pp. 3077–3088. Available at: <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2020-0018/FULL/PDF>.
- Fathi, M. *et al.* (2021) 'Food-Grade Colloidal Systems for the Delivery of Essential Oils', *Food Reviews International*, 37(1), pp. 1–45. Available at: <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1687514>.
- FDA 2014 (no date) 'Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology Contains Nonbinding Recommendations'. Available at: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm> (Accessed: 3 December 2023).
- FDA 2015 (no date) #220 *Guidance for Industry Use of Nanomaterials in Food for Animals, F*. Available at: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm300661.h> (Accessed: 3 December 2023).
- Fei, P. *et al.* (2018) 'Antimicrobial activity and mechanism of action of olive oil polyphenols extract against *Cronobacter sakazakii*', *Food Control*, 94, pp. 289–294. Available at: <https://doi.org/10/gs3r7h>.
- Fuentes, E. *et al.* (2012) 'Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV–visible Spectrometry and Multivariate Calibration', *Food Analytical Methods*, 5(6), pp. 1311–1319. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9379-5>.
- Galanakis, C.M. *et al.* (2013) 'A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents', *International Journal of Food Properties*, 16(2), pp. 382–396. Available at: <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.522750>.
- Galanakis, C. M. (2018). Polyphenols: Properties, recovery, and applications. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, 1–438. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-05057-X>
- Galanakis, C.M. (2019) 'Innovations in traditional foods', *Innovations in Traditional Foods*, pp. 1–348. Available at: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02480-1>.
- Galvão, K.C.S., Vicente, A.A. and Sobral, P.J.A. (2018) 'Development, Characterization, and Stability of O/W Pepper Nanoemulsions Produced by High-Pressure Homogenization', *Food and Bioprocess Technology*, 11(2), pp. 355–367. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11947-017-2016-Y/TABLES/5>.

- Ganachaud, F. and Katz, J.L. (2005) 'Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices', *Chem-PhysChem*, 6(2), pp. 209–216. Available at: <https://doi.org/10.1002/CPHC.200400527>.
- Gandul-Rojas, B., Roca, M. and Gallardo-Guerrero, L. (2016) 'Chlorophylls and Carotenoids in Food Products from Olive Tree', in D. Boskou and M.L. Clodoveo (eds) *Products from Olive Tree*. InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/products-from-olive-tree/chlorophylls-and-carotenoids-in-food-products-from-olive-tree>.
- Garavand, F. *et al.* (2021) 'Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review', *Food Chemistry*, 364, p. 130376. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOOD-CHEM.2021.130376>.
- Genc, E. *et al.* (2024) 'Fabrication and characterisation of Pickering emulsion-based oleogel stabilised by citrus fibre and whey protein isolate colloidal complex: application in cookie formulation', *International Journal of Food Science & Technology*, 59(3), pp. 1709–1723. Available at: <https://doi.org/10.1111/IJFS.16925>.
- Ghelichi, S., Hajfathalian, M., Yesiltas, B., Sørensen, A.D.M., *et al.* (2023) 'Oxidation and oxidative stability in emulsions', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(3), pp. 1864–1901. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13134>.
- Ghosh, V., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. (2013) 'Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity', *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), pp. 338–344. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2012.08.010>.
- Ginwala, R. *et al.* (2019) 'Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin', *Antioxidants*, 8(2), p. 35. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox8020035>.
- Di Giovacchino, L. (2013) 'Technological aspects', *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*, pp. 57–96. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_3.
- Gitzinger, M. *et al.* (2012) 'The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice', *Nucleic Acids Research*, 40(5), pp. e37–e37. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1251>.
- Golfomitsou, I. *et al.* (2018) 'Development of food grade O/W nanoemulsions as carriers of vitamin D for the fortification of emulsion based food matrices: A structural and activity study', *Journal of Molecular Liquids*, 268, pp. 734–742. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2018.07.109>.
- Gorjian, H., Mihankhah, P. and Khaligh, N.G. (2022) 'Influence of tween nature and type on physico-chemical properties and stability of spearmint essential oil (*Mentha spicata* L.) stabilized with basil

- seed mucilage nanoemulsion', *Journal of Molecular Liquids*, 359, p. 119379. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2022.119379>.
- Graves, S. *et al.* (2005) 'Structure of concentrated nanoemulsions', *Journal of Chemical Physics*, 122(13), p. 134703. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.1874952/925820>.
- Grosso, G. *et al.* (2018) 'Dietary polyphenol intake and risk of hypertension in the Polish arm of the HAPIEE study', *European Journal of Nutrition*, 57(4), pp. 1535–1544. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1438-7>.
- Guerrini, L. and Parenti, A. (2016) 'Stabilization of Extra-Virgin Olive Oil', *Products from Olive Tree* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.5772/64401>.
- Gupta, A. *et al.* (2016) 'Nanoemulsions: formation, properties and applications', *Soft Matter*, 12(11), pp. 2826–2841. Available at: <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>.
- Gurpreet, K. and Singh, S.K. (2018a) 'Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques', *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5), pp. 781–789. Available at: <https://doi.org/10.4172/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.1000422>.
- Gutiérrez, J.M. *et al.* (2008) 'Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation', *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), pp. 245–251. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2008.01.005>.
- Hamid, K.M., Wais, M. and Sawant, G. (2021) 'A review on nanoemulsions: formulation, composition, and applications', *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 14, pp. 22–28. Available at: <https://doi.org/10.22159/AJPCR.2021.V14I4.40859>.
- Hashemi Gahruie, H. *et al.* (2017) 'Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with Zataria multiflora essential oil nanoemulsion', *Carbohydrate Polymers*, 166, pp. 93–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.02.103>.
- Henry, J.V.L. *et al.* (2009) 'Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters', *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), pp. 201–206. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2009.05.077>.
- Hoar, T.P. and Schulman, J.H. (1943) 'Transparent water-in-oil dispersions: The oleopathic hydro-micelle [1]', *Nature. Faraday Soc*, pp. 102–103. Available at: <https://doi.org/10.1038/152102a0>.
- Hoeller, S., Sperger, A. and Valenta, C. (2009) 'Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation', *International Journal of Pharmaceutics*, 370(1–2), pp. 181–186. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2008.11.014>.

- Van Der Hoeven, Ph.C. and Lyklema, J. (1992) 'Electrostatic stabilization in non-aqueous media', *Advances in Colloid and Interface Science*, 42, pp. 205–277. Available at: [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(92\)80024-R](https://doi.org/10.1016/0001-8686(92)80024-R).
- Hollman, P.C.H. *et al.* (1997) 'Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man', *FEBS Letters*, 418(1–2), pp. 152–156. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01367-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01367-7).
- Hong, I.K., Kim, S.I. and Lee, S.B. (2018) 'Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index', *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 67, pp. 123–131. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JIEC.2018.06.022>.
- Hui, Y.H. (Yiu H.) (2006) *Handbook of food science, technology, and engineering*. Taylor & Francis.
- Hwang, Y.Y. *et al.* (2013) 'Antimicrobial activity of nanoemulsion in combination with cetylpyridinium chloride in multidrug-resistant acinetobacter baumannii', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), pp. 3568–3575. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.02109-12/FORMAT/EPUB>.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R.L. (2012) 'Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components', *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), p. 20029. Available at: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00012/BIBTEX>.
- Ilyasoglu Buyukkestelli, H. and El, S.N. (2019) 'Development and characterization of double emulsion to encapsulate iron', *Journal of Food Engineering*, 263, pp. 446–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2019.07.026>.
- Ilyasoglu Buyukkestelli, H. and El, S.N. (2021) 'Enhancing sweetness using double emulsion technology to reduce sugar content in food formulations', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 74, p. 102809. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2021.102809>.
- Islam, F. *et al.* (2022) 'Investigating Polyphenol Nanoformulations for Therapeutic Targets against Diabetes Mellitus', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/5649156>.
- Islam, F. *et al.* (2023) 'Food grade nanoemulsions: promising delivery systems for functional ingredients', *Journal of Food Science and Technology*, 60, pp. 1461–1471. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05387-3>.
- Israelachvili, J.N. (2011) *Intermolecular and surface forces*. 3rd edn. Academic Press.
- Jafari, S.M. (2017) *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. Edited by S.M. Jafari. Academic Press, Elsevier.
- Jafari, S.M. (2019) *Handbook of Food Nanotechnology*. 1st edn. Gorgan, Iran: Academic Press, Elsevier.
- Jafari, S.Mahdi. (2020) 'Handbook of food nanotechnology : applications and approaches'.

- Jain, A. *et al.* (2018) 'Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), pp. 297–317. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1160363>.
- Jeong, S.-H. *et al.* (2010) 'Risk Assessment of Growth Hormones and Antimicrobial Residues in Meat', *Toxicological Research*, 26(4), pp. 301–313. Available at: <https://doi.org/10.5487/TR.2010.26.4.301>.
- Jiang, W. *et al.* (2023) 'Current Status, Challenges, and Prospects for the Biological Production of Vanillin', *Fermentation*, 9(4), p. 389. Available at: <https://doi.org/10.3390/fermentation9040389>.
- Johnson, D.R. and Decker, E.A. (2015) 'The Role of Oxygen in Lipid Oxidation Reactions: A Review', <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015532>, 6, pp. 171–190. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-022814-015532>.
- Joseph, T. and Morrison, M. (2006) 'Nanotechnology in Agriculture and Food'. Available at: www.nanoforum.org (Accessed: 3 December 2023).
- Joshi T., J. *et al.* (2023) 'Identification and characterization techniques for engineered nanomaterials in food', *Nanotechnology Applications for Food Safety and Quality Monitoring*, pp. 71–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85791-8.00018-5>.
- Jukić Špika, M. *et al.* (2022) 'Quantitatively Unraveling Hierarchy of Factors Impacting Virgin Olive Oil Phenolic Profile and Oxidative Stability', *Antioxidants*, 11(3), p. 594. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11030594>.
- Kabaran, S. (2019) 'Olive Oil: Antioxidant Compounds and Their Potential Effects over Health', in V. Lagouri (ed.) *Functional Foods*. IntechOpen. Available at: <https://www.intechopen.com/books/functional-foods/olive-oil-antioxidant-compounds-and-their-potential-effects-over-health>.
- Kalogianni, E.P., Georgiou, D. and Hasanov, J.H. (2019) 'Olive Oil Processing: Current Knowledge, Literature Gaps, and Future Perspectives', *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(5), pp. 481–507. Available at: <https://doi.org/10.1002/aocs.12207>.
- Karthik, P. and Anandharamakrishnan, C. (2016) 'Enhancing omega-3 fatty acids nanoemulsion stability and in-vitro digestibility through emulsifiers', *Journal of Food Engineering*, 187, pp. 92–105. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2016.05.003>.
- Karthik, P., Ezhilarasi, P.N. and Anandharamakrishnan, C. (2017) 'Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), pp. 1435–1450. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1006767>.

- Kashyap, D. *et al.* (2018) 'Apigenin: A natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function', *Journal of Functional Foods*, 48, pp. 457–471. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.037>.
- Katsaros, G. *et al.* (2020) 'Effect of storage on the rheological and viscoelastic properties of mayonnaise emulsions of different oil droplet size', *Heliyon*, 6(12), p. e05788. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E05788>.
- Katsouli, M., Polychniatou, V., & Tzia, C. (2017). Influence of surface-active phenolic acids and aqueous phase ratio on w/o nano-emulsions properties; model fitting and prediction of nano-emulsions oxidation stability. *Journal of Food Engineering*, 214. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.017>
- Katsouli, M., Polychniatou, V. and Tzia, C. (2018) 'Optimization of water in olive oil nano-emulsions composition with bioactive compounds by response surface methodology', *LWT - Food Science and Technology*, 89. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.046>.
- Katsouli, M., Papatheodorou, S. A., Giannou, V., & Tzia, C. (2022). Development of extra virgin olive and olive pomace oil nanoemulsions (o/w and w/o) enriched with surface-active phenolic compounds. *Journal of Food Process Engineering*, 45(7), e13869. <https://doi.org/10.1111/JFPE.13869>
- Kentish, S. *et al.* (2008) 'The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), pp. 170–175. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.07.005>.
- Khalil, M.M.H. *et al.* (2014) 'Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity', *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), pp. 1131–1139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.007>.
- Kim, J.Y. *et al.* (2016) 'Effects of pH on the rates of lipid oxidation in oil–water system', *Applied Biological Chemistry*, 59(2), pp. 157–161. Available at: <https://doi.org/10.1007/S13765-015-0146-3/METRICS>.
- Kiokias, S. and Oreopoulou, V. (2022) 'Review on the Antioxidant Activity of Phenolics in o/w Emulsions along with the Impact of a Few Important Factors on Their Interfacial Behaviour', *Colloids and Interfaces 2022, Vol. 6, Page 79*, 6(4), p. 79. Available at: <https://doi.org/10.3390/COLLOIDS6040079>.
- Kiritsakis, A. and Shahidi, F. (2017) *Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing*, *Functional food science and technology series*. Hoboken (N.J.): Wiley.
- Koidis, A. and Boskou, D. (2006) 'The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), pp. 323–328. Available at: <https://doi.org/10.1002/EJLT.200500319>.
- Koidis, A. and Boskou, D. (2015) 'Virgin Olive Oil', in *Processing and Impact on Active Components in Food*. Elsevier, pp. 267–274. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00032-9>.

- Koidis, A., Triantafillou, E. and Boskou, D. (2008) 'Endogenous microflora in turbid virgin olive oils and the physicochemical characteristics of these oils', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(2), pp. 164–171. Available at: <https://doi.org/10.1002/EJLT.200700055>.
- Kralova, I. and Sjöblom, J. (2009) 'Surfactants used in food industry: A review', *Journal of Dispersion Science and Technology*. Taylor & Francis Group, pp. 1363–1383. Available at: <https://doi.org/10.1080/01932690902735561>.
- Kruglyakov, P.M. (2000) *Hydrophile - Lipophile Balance of Surfactants and Solid Particles: Physicochemical aspects and applications*. Elsevier Science B.V. Available at: <https://books.google.com/books?id=IIWKIb9RIiYC&pgis=1> (Accessed: 9 December 2017).
- Kumar, A. *et al.* (2022) 'New insights into water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions: Properties, fabrication, instability mechanism, and food applications', *Trends in Food Science & Technology*, 128, pp. 22–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2022.07.016>.
- Kumar, M. *et al.* (2019) 'Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review', *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(3), p. 225. Available at: <https://doi.org/10.3746/PNF.2019.24.3.225>.
- Kuorwel, K.K. *et al.* (2011) 'Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films', *Journal of Food Science*, 76(9). Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2011.02384.X>.
- Lagrecia, E. *et al.* (2020) 'Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery', *Progress in Biomaterials 2020 9:4*, 9(4), pp. 153–174. Available at: <https://doi.org/10.1007/S40204-020-00139-Y>.
- Laguerre, M. *et al.* (2017) 'Mass Transport Phenomena in Lipid Oxidation and Antioxidation', <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025812>, 8, pp. 391–411. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030216-025812>.
- Lanza, Fabrizia. (2011) *Olive : a global history*. London: Reaktion Books.
- Lee, S.J. and McClements, D.J. (2010) 'Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach', *Food Hydrocolloids*, 24(6–7), pp. 560–569. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.02.002>.
- Lee, Y. and Choe, E. (2011) 'Interaction of Phosphatidylcholine and α -Tocopherol on the Oxidation of Sunflower Oil and Content Changes of Phosphatidylcholine and Tocopherol in the Emulsion under Singlet Oxygen', *Journal of Food Science*, 76(3), pp. C498–C503. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02096.x>.
- De Leonardis, A. (2014) *Virgin olive oil: production, composition, uses and benefits for man*. [Hauppauge] New York: Nova Science Publishers, Inc.

- Leong, T., Ashokkumar, M. and Kentish, S. (2011) 'The fundamentals of power ultrasound – a review', *Acoustics Australia*, 39(2). Available at: https://www.acoustics.asn.au/journal/2011/2011_39_2_Leong.pdf (Accessed: 13 January 2018).
- Lévai, G. *et al.* (2017) 'Quercetin loaded particles production by means of supercritical fluid extraction of emulsions: Process scale-up study and thermo-economic evaluation', *Food and Bioprocess Processing*, 103, pp. 27–38. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2017.02.008>.
- Li, G. *et al.* (2021) 'Nanoemulsion-based delivery approaches for nutraceuticals: fabrication, application, characterization, biological fate, potential toxicity and future trends', *Food & Function*, 12(5), pp. 1933–1953. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0FO02686G>.
- Li, J. *et al.* (2022) 'Hybrid liposomes composed of hydrophilic emulsifiers and lecithin: Physicochemical, interaction and curcumin loading properties', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 655, p. 130210. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2022.130210>.
- Li, L. *et al.* (2020) 'Resourcing potential of olive oil pomace', *Thermal Science*, 24(3 Part A), pp. 1761–1768. Available at: <https://doi.org/10.2298/TSCI190603049L>.
- Li, N. *et al.* (2022) 'Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the emulsion of hemp seed oil stabilized with hemp seed protein', *Ultrasonics Sonochemistry*, 86, p. 106021. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2022.106021>.
- Li, P.-H. and Lu, W.-C. (2016) 'Effects of storage conditions on the physical stability of d-limonene nanoemulsion', *Food Hydrocolloids*, 53, pp. 218–224. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.01.031>.
- Liang, R. *et al.* (2012) 'Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), pp. 7548–7555. Available at: https://doi.org/10.1021/JF301129K/SUPPL_FILE/JF301129K_SI_001.PDF.
- Lin, Y.-H. *et al.* (2018) 'Microemulsion formulation design and evaluation for hydrophobic compound: Catechin topical application', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, pp. 121–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.10.015>.
- Liu, Q. *et al.* (2019) 'Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds', *Molecules*, 24(23). Available at: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234242>.
- Liu, Y., McKeever, L.C. and Malik, N.S.A. (2017) 'Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens', *Frontiers in Microbiology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00113>.

- Lombardo, L. *et al.* (2018) 'Broad-Spectrum Health Protection of Extra Virgin Olive Oil Compounds', in *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp. 41–77. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640574000028>.
- López Rubio, A. *et al.* (2018) 'Nanomaterials for food applications', *Nanomaterials for Food Applications*, pp. 1–444. Available at: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-01042-X>.
- Lukić, M. *et al.* (2015) 'Variability of 4-Monomethylsterols and 4,4'-Dimethylsterols in Olive Oil and Their Use as Indicators of Olive Variety, Ripening Degree, and Oil Storage Temperature', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), pp. 5499–5508. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01638>.
- Lukić, M., Lukić, I. and Moslavac, T. (2021) 'Sterols and Triterpene Diols in Virgin Olive Oil: A Comprehensive Review on Their Properties and Significance, with a Special Emphasis on the Influence of Variety and Ripening Degree', *Horticulturae*, 7(11), p. 493. Available at: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110493>.
- Luykx, D.M.A.M. *et al.* (2008) 'A Review of Analytical Methods for the Identification and Characterization of Nano Delivery Systems in Food', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), pp. 8231–8247. Available at: <https://doi.org/10.1021/JF8013926>.
- Lv, S. *et al.* (2018) 'Vitamin e Encapsulation in Plant-Based Nanoemulsions Fabricated Using Dual-Channel Microfluidization: Formation, Stability, and Bioaccessibility', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(40), pp. 10532–10542. Available at: https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B03077/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2018-030774_0012.JPEG.
- Manzoor, M. *et al.* (2023) 'Fabrication, characterization, and interventions of protein, polysaccharide and lipid-based nanoemulsions in food and nutraceutical delivery applications: A review', *International Journal of Biological Macromolecules*, 241, p. 124485. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124485>.
- Mao, L. *et al.* (2010) 'Effects of Homogenization Models and Emulsifiers on the Physicochemical Properties of β -Carotene Nanoemulsions', *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(7), pp. 986–993. Available at: <https://doi.org/10.1080/01932690903224482>.
- Markin, D., Duek, L. and Berdicevsky, I. (2003) 'In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro', *Mycoses*, 46(3–4), pp. 132–136. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00859.x>.
- Marzuki, N.H.C., Wahab, R.A. and Hamid, M.A. (2019) 'An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications', *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), pp. 779–797. Available at: <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1620124>.

- Mason, T.G. *et al.* (2006) 'Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties', *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), pp. R635–R666. Available at: <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>.
- Di Mattia, C. *et al.* (2014) 'Effect of Olive Oil Phenolic Compounds and Maltodextrins on the Physical Properties and Oxidative Stability of Olive Oil O/W Emulsions', *Food Biophysics*, 9(4), pp. 396–405. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11483-014-9373-0>.
- Di Mattia, C.D. *et al.* (2009) 'Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions', *Food Research International*, 42(8), pp. 1163–1170. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.05.017>.
- Di Mattia, C.D., Sacchetti, G. and Pittia, P. (2011) 'Interfacial Behavior and Antioxidant Efficiency of Olive Phenolic Compounds in O/W Olive oil Emulsions as Affected by Surface Active Agent Type', *Food Biophysics*, 6(2), pp. 295–302. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9195-7>.
- McClements, D.J. (2011) 'Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance', *Soft Matter*, 7(6), pp. 2297–2316. Available at: <https://doi.org/10.1039/C0SM00549E>.
- McClements, D.J. (2012) 'Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities', *Soft Matter*, 8(6), pp. 1719–1729. Available at: <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>.
- McClements, D.J. (2015a) *Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems*, *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868615000299?via%3Dihub> (Accessed: 17 December 2017).
- McClements, D.J. (2015b) 'Nanoscale Nutrient Delivery Systems for Food Applications: Improving Bioactive Dispersibility, Stability, and Bioavailability', *Journal of Food Science*, 80(7), pp. N1602–N1611. Available at: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12919>.
- McClements, D.J. (2016) *Food Emulsions: : principles, practices, and techniques*. 3rd edn. Edited by D.J. McClements. Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D.J. (2019) 'The Science of Foods: Designing Our Edible Future', in *Future Foods*. Springer International Publishing, pp. 1–25. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-12995-8_1.
- McClements, D.J. (2022) 'Food nanotechnology', *Food Nanotechnology*, pp. 1–194. Available at: <https://doi.org/10.1515/9783110788457/EPUB>.
- McClements, D.J., Lu, J. and Grossmann, L. (2022) 'Proposed Methods for Testing and Comparing the Emulsifying Properties of Proteins from Animal, Plant, and Alternative Sources', *Colloids and Interfaces 2022*, Vol. 6, Page 19, 6(2), p. 19. Available at: <https://doi.org/10.3390/COLLOIDS6020019>.
- McClements, D.J. and McClements, D.J. (2016) *Food Emulsions: : principles, practices, and techniques*. 3rd edn. Boca Raton: CRC Press.

- McClements, D.J. and Rao, J. (2011) 'Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), pp. 285–330. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>.
- Mehmood, A. *et al.* (2020) 'A review on management of cardiovascular diseases by olive polyphenols', *Food Science & Nutrition*, 8(9), pp. 4639–4655. Available at: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1668>.
- Melguizo-Rodríguez, L., Illescas-Montes, R., *et al.* (2021) 'Antimicrobial properties of olive oil phenolic compounds and their regenerative capacity towards fibroblast cells', *Journal of Tissue Viability*, 30(3), pp. 372–378. Available at: <https://doi.org/10/gs3r7n>.
- Melguizo-Rodríguez, L., de Luna-Bertos, E., *et al.* (2021) 'Potential Effects of Phenolic Compounds That Can Be Found in Olive Oil on Wound Healing', *Foods*, 10(7), p. 1642. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods10071642>.
- de Melo Barbosa, R. *et al.* (2019) 'Lipid-based colloidal carriers for transdermal administration of bioactives', *Materials for Biomedical Engineering: Organic Micro and Nanostructures*, pp. 369–397. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818433-2.00011-X>.
- Meng, Q. *et al.* (2019) 'Improved absorption of β -carotene by encapsulation in an oil-in-water nanoemulsion containing tea polyphenols in the aqueous phase', *Food Research International*, 116, pp. 731–736. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.09.004>.
- Miho, H. *et al.* (2020) 'The phenolic profile of virgin olive oil is influenced by malaxation conditions and determines the oxidative stability', *Food Chemistry*, 314, p. 126183. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126183>.
- Moghassemi, S. *et al.* (2022) 'Nanoemulsion applications in photodynamic therapy', *Journal of Controlled Release*, 351, pp. 164–173. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.09.035>.
- Mohammed, A.N., Ishwarya, S.P. and Nisha, P. (2021) 'Nanoemulsion Versus Microemulsion Systems for the Encapsulation of Beetroot Extract: Comparison of Physicochemical Characteristics and Beta-lain Stability', *Food and Bioprocess Technology*, 14(1), pp. 133–150. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11947-020-02562-2/FIGURES/10>.
- Mosca, M. *et al.* (2013) 'Role of emulsifier layer, antioxidants and radical initiators in the oxidation of olive oil-in-water emulsions', *Food Research International*, 50(1), pp. 377–383. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.10.046>.
- Mousavi, S. *et al.* (2022) 'Bioactive Compound Profiling of Olive Fruit: The Contribution of Genotype', *Antioxidants*, 11(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11040672/S1>.
- Murakami, A., Ashida, H. and Terao, J. (2008) 'Multitargeted cancer prevention by quercetin', *Cancer Letters*, 269(2), pp. 315–325. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.046>.

- Musazzi, U.M. *et al.* (2017) 'Is the European regulatory framework sufficient to assure the safety of citizens using health products containing nanomaterials?', *Drug discovery today*, 22(6), pp. 870–882. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2017.01.016>.
- Musazzi, U.M. *et al.* (2018) 'Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product?', *Drug delivery and translational research*, 8(2), pp. 414–421. Available at: <https://doi.org/10.1007/S13346-017-0390-7>.
- Muschiolik, G. and Dickinson, E. (2017) 'Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc., pp. 532–555. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12261>.
- Mushtaq, A. *et al.* (2023) 'Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications', *Food Chemistry: X*, 18, p. 100684. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2023.100684>.
- Najan, A. (2023) 'Review on Nano-Emulsion', *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 11(2), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.36648/2321-547X.23.11.011>.
- Nakajima, H., Tomomasa, S., Okabe, M. (1993) 'Preparation of nanoemulsions: proceedings first world congress on emulsions', *Proceedings first world congress on emulsions, Paris, France*, pp. 19–22.
- Negi, P.S. (2012) 'Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application', *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), pp. 7–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.03.006>.
- NutraLease (2011) <http://www.nutralease.com/Nutra/Templates/show-page.asp?DBID=1&LNGID=1&TMID=84&FID=768>.
- Oğraş, Ş.Ş. (2022) 'Comparative study of phenolic compounds in olive oils from different geographic regions', *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 46(3), pp. 318–326. Available at: <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3005>.
- Ohtani, S.G. and Rasert, W.P. (2014) 'Nano-Emulsions ; Emulsification Using Low Energy Methods', *Japan Journal of Food Engineering*, 15(3), pp. 119–130. Available at: https://www.jst-age.jst.go.jp/article/jsfe/15/3/15_119/_pdf (Accessed: 13 January 2018).
- O'Keefe, S.F. and Pike, O.A. (1994) 'Fat Characterization', in S. S. Nielsen (ed.) *Introduction to the Chemical Analysis of Foods*. New York: Springer, Boston, MA, pp. 239–260. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_14.
- Onyeaka, H. *et al.* (2022) 'The safety of nanomaterials in food production and packaging', *Current Research in Food Science*, 5, pp. 763–774. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2022.04.005>.
- OOC (2015) *International Agreement on Olive Oil and Table Olives*.

- Otoni, C.G. *et al.* (2014) 'Edible films from methylcellulose and nanoemulsions of clove bud (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils as shelf life extenders for sliced bread', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), pp. 5214–5219. Available at: https://doi.org/10.1021/JF501055F/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2014-01055F_0004.JPEG.
- Ozogul, Y. *et al.* (2017) 'Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage', *LWT*, 75, pp. 677–684. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.10.009>.
- Ozturk, O.K. and Turasan, H. (2021) 'Applications of microfluidization in emulsion-based systems, nanoparticle formation, and beverages', *Trends in Food Science & Technology*, 116, pp. 609–625. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.07.033>.
- Pandey, S.K. *et al.* (2015) 'Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation', *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, pp. 521–529. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.011>.
- Park, C.Y. *et al.* (2017) 'Changes in hepatic gene expression and serum metabolites after oral administration of overdosed vitamin-E-loaded nanoemulsion in rats', *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 109(Pt 1), pp. 421–427. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.09.031>.
- Park, E.-J. and Pezzuto, J.M. (2015) 'The pharmacology of resveratrol in animals and humans', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), pp. 1071–1113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.01.014>.
- Pathak, M. (2017) 'Nanoemulsions and Their Stability for Enhancing Functional Properties of Food Ingredients', in *Nanotechnology Applications in Food*. Elsevier, pp. 87–106. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811942-6.00005-4>.
- Pedan, V. *et al.* (2019) 'Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil', *Molecules*, 24(11), p. 2041. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24112041>.
- Peng, F. *et al.* (2019) 'The influence of organically intercalated montmorillonites on the interfacial tension and structure of oil-in-water nanoemulsions', *RSC Advances*, 9(24), pp. 13378–13385. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8RA10595B>.
- Peng, L.C. *et al.* (2010) 'Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 370(1–3), pp. 136–142. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2010.08.060>.

- Pereira, A. *et al.* (2007) 'Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves', *Molecules*, 12(5), pp. 1153–1162. Available at: <https://doi.org/10.3390/12051153>.
- Pérez-Masiá, R., Lagaron, J.M. and López-Rubio, A. (2014) 'Development and Optimization of Novel Encapsulation Structures of Interest in Functional Foods Through Electrospraying', *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), pp. 3236–3245. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1304-z>.
- Peri, C. (Claudio) (2014) *The extra virgin olive oil handbook*. 1st edn. Edited by C. (Claudio) Peri. Wiley-Blackwell.
- Pieckowski, M. *et al.* (2022) 'Nanoemulsion supported microemulsion electrokinetic chromatography coupled with selected preconcentration techniques as an approach for analysis of highly hydrophobic compounds', *Journal of Chromatography A*, 1677, p. 463339. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2022.463339>.
- Pimentel-Moral, S. *et al.* (2018) 'Development and stability evaluation of water-in-edible oils emulsions formulated with the incorporation of hydrophilic Hibiscus sabdariffa extract', *Food Chemistry*, 260, pp. 200–207. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.03.146>.
- Polychniatou, V. and Tzia, C. (2014) 'Study of formulation and stability of co-surfactant free water-in-olive oil nano- and submicron emulsions with food grade non-ionic surfactants', *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), pp. 79–88.
- Polychniatou, V. and 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). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1668-8>.
- Polychniatou, V. and 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. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.044>.
- Preedy, V.R. (2020) *Pathology: oxidative stress and dietary antioxidants*. London ; San Diego, CA: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Preedy, V.R. and Watson, R.R. (Ronald R. (2020) *Olives and olive oil in health and disease prevention*. 2nd edn. Elsevier.
- Prichapan, N. and Klinkesorn, U. (2014) 'Factor affecting the properties of water-in-oil-in-water emulsions for encapsulation of minerals and vitamins', *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 36(6), pp. 651–661. Available at: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/36-6/36-6-8.pdf> (Accessed: 7 December 2017).

- Qian, C. *et al.* (2012) 'Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type', *Food Chemistry*, 132(3), pp. 1221–1229. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.11.091>.
- Qian, C. and McClements, D.J. (2011) 'Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size', *Food Hydrocolloids*, 25(5), pp. 1000–1008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.017>.
- Qiu, S. *et al.* (2020) 'Tracking in vitro digestion and in vivo metabolism of water-in-oil-in-water microemulsion as a delivery carrier for α -linolenic acid', *Journal of Molecular Liquids*, 320, p. 114471. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2020.114471>.
- Raikos, V., Konstantinidi, V. and Duthie, G. (2015) 'Processing and storage effects on the oxidative stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) oil-in-water emulsions', *International Journal of Food Science & Technology*, 50(10), pp. 2316–2322. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12896>.
- Rajan, V.K. and Muraleedharan, K. (2017) 'A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid', *Food Chemistry*, 220, pp. 93–99. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.09.178>.
- Rao, J. and McClements, D.J. (2011a) 'Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil', *Food Hydrocolloids*, 25(6), pp. 1413–1423. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.004>.
- Rao, J. and McClements, D.J. (2011b) 'Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), pp. 5026–5035. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf200094m>.
- Rao, J. and McClements, D.J. (2012) 'Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability', *Food Hydrocolloids*, 29(2), pp. 326–334. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.008>.
- Reboredo-Rodríguez, P. *et al.* (2014) 'Quality of extra virgin olive oils produced in an emerging olive growing area in north-western Spain', *Food Chemistry*, 164, pp. 418–426. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.043>.
- Relkin, P., Jung, J.M. and Ollivon, M. (2009) 'Factors affecting vitamin degradation in oil-in-water nanoemulsions', *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 98(1), pp. 13–18. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10973-009-0340-9/TABLES/3>.
- Rezaei, A., Fathi, M. and Jafari, S.M. (2019) 'Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers', *Food Hydrocolloids*, 88, pp. 146–162. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.10.003>.

- Robledo, N. *et al.* (2018) 'Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes', *Food Chemistry*, 246, pp. 211–219. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.11.032>.
- Rodrigues, N. *et al.* (2021) 'Olive oil characteristics of eleven cultivars produced in a high-density grove in Valladolid province (Spain)', *European Food Research and Technology*, 247(12), pp. 3113–3122. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03858-z>.
- Romani, A. *et al.* (2019) 'Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L.', *Nutrients*, 11(8), p. 1776. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11081776>.
- Salehi, B. *et al.* (2019) 'The Therapeutic Potential of Apigenin', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), p. 1305. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>.
- Salvia-Trujillo, L. *et al.* (2017) 'Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review', *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), pp. 439–466. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025908>.
- Sánchez-González, C. *et al.* (2017) 'Health benefits of walnut polyphenols: An exploration beyond their lipid profile', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), pp. 3373–3383. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126218>.
- Sanchez-Martin, V. *et al.* (2022) 'Gallic Acid: A Natural Phenolic Compound Exerting Antitumoral Activities in Colorectal Cancer via Interaction with G-Quadruplexes', *Cancers*, 14(11), p. 2648. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14112648>.
- Sarkar, A. *et al.* (2009) 'Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model', *Food Hydrocolloids*, 23(6), pp. 1563–1569. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2008.10.014>.
- Sarubbo, L.A. *et al.* (2022) 'Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives', *Biochemical Engineering Journal*, 181, p. 108377. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2022.108377>.
- Saura C. Sahu (2023) *Impact of Engineered Nanomaterials in Genomics and Epigenomics, Impact of Engineered Nanomaterials in Genomics and Epigenomics*. Wiley. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781119896258>.
- Schreiber, C.H. and Rowley, D. (2016) 'Augmentation of oncology immunotherapies by pterostilbene containing compositions', *Drugs Exp Clin Res*.
- Schwegmann, H., Feitz, A.J. and Frimmel, F.H. (2010) 'Influence of the zeta potential on the sorption and toxicity of iron oxide nanoparticles on *S. cerevisiae* and *E. coli*', *Journal of colloid and interface science*, 347(1), pp. 43–48. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2010.02.028>.

- Servili, M. *et al.* (2013) 'Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil', *Antioxidants*, 3(1), pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>.
- Shadman, S. *et al.* (2017) 'Evaluation of the effect of a sunflower oil-based nanoemulsion with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the physicochemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during cold storage', *LWT - Food Science and Technology*, 79, pp. 511–517. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.01.073>.
- Sharifi, F. *et al.* (2021) 'Zeta potential changing nanoemulsions based on a simple zwitterion', *Journal of Colloid and Interface Science*, 585, pp. 126–137. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2020.11.054>.
- Sharma, D. *et al.* (2023) 'Biosurfactants: Forthcomings and Regulatory Affairs in Food-Based Industries', *Molecules*, 28(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28062823>.
- Shukla, S. and Gupta, S. (2010) 'Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention', *Pharmaceutical Research*, 27(6), pp. 962–978. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0089-7>.
- Silva, B.S. and Schmiele, M. (2021) 'From olive to olive oil: a general approach', *Research, Society and Development*, 10(3), p. e32210313408. Available at: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13408>.
- Silva, H.D. *et al.* (2018) 'Evaluating the behaviour of curcumin nanoemulsions and multilayer nanoemulsions during dynamic in vitro digestion', *Journal of Functional Foods*, 48, pp. 605–613. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.08.002>.
- Silva, H.D., Cerqueira, M.Â. and Vicente, A.A. (2012) 'Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization', *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), pp. 854–867. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>.
- Singh, B. (Of P.U., Hakkarainen, M. and Singh, K.K. (2018) *NanoNutraceuticals*. CRC Press. Available at: <https://www.routledge.com/NanoNutraceuticals/Singh/p/book/9780815399926> (Accessed: 3 December 2023).
- Sjöblom, J. (2001) *Encyclopedic handbook of emulsion technology*. Edited by J. Sjöblom. New York: Marcel Dekker.
- Sneha, K. and Kumar, A. (2022) 'Nanoemulsions: Techniques for the preparation and the recent advances in their food applications', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 76, p. 102914. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2021.102914>.
- Sotiroudis, T.G. *et al.* (2005) 'The role of endogenous amphiphiles on the stability of virgin olive oil-in-water emulsions', *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(6), pp. 415–420. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1086-1>.

- Srinivasulu, C. *et al.* (2018) 'Syngic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, pp. 547–557. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.069>.
- Sudjana, A.N. *et al.* (2009) 'Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), pp. 461–463. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026>.
- Sun, B. and Yeo, Y. (2012) 'Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs', *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 16(6), pp. 295–301. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2012.10.004>.
- Sun, Y.E. *et al.* (2011) 'Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsion', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 453–466. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408391003672086>.
- Sungpud, C. *et al.* (2020) 'Techno-biofunctionality of mangostin extract-loaded virgin coconut oil nanoemulsion and nanoemulgel', *PLOS ONE*, 15(1), p. e0227979. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227979>.
- Szterk, A., Roszko, M. and Górnicka, E. (2013) 'Chemical Stability of the Lipid Phase in Concentrated Beverage Emulsions Colored with Natural β -Carotene.', *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(4), pp. 483–491. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2194-8>.
- Tadros, T.F. (2005) *Applied surfactants: principles and applications*. Wiley-VCH. Available at: <https://www.wiley.com/en-gr/Applied+Surfactants:+Principles+and+Applications-p-9783527306299> (Accessed: 17 December 2017).
- Tadros, T.F. (2016) *Emulsions : Formation, Stability, Industrial Applications*. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH.
- Tadros, T.F. (2018) *Tharwat F. Tadros: Formulation Science and Technology/[Set Formulation Science and Technology, Vol 1-4]*. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG. Available at: https://books.google.com/books/about/Formulation_Science_and_Technology.html?hl=el&id=goXntgEACAAJ (Accessed: 17 December 2023).
- Talhaoui, N. *et al.* (2016) 'From Olive Fruits to Olive Oil: Phenolic Compound Transfer in Six Different Olive Cultivars Grown under the Same Agronomical Conditions', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), p. 337. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms17030337>.
- Tan, C.P. and Nakajima, M. (2005) ' β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation', *Food Chemistry*, 92(4), pp. 661–671. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.08.044>.

- Tang, S.Y., Shridharan, P. and Sivakumar, M. (2013) 'Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions – Comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer', *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), pp. 485–497. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2012.04.005>.
- Tawfik, N.M. *et al.* (2023) 'A Novel Nanoemulsion Formula for an Improved Delivery of a Thalidomide Analogue to Triple-Negative Breast Cancer; Synthesis, Formulation, Characterization and Molecular Studies', *International journal of nanomedicine*, 18, pp. 1219–1243. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S385166>.
- Thomsen, B.R. *et al.* (2013) 'Investigation of oxidative degradation and non-enzymatic browning reactions in krill and fish oils', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(12), pp. 1357–1366. Available at: <https://doi.org/10.1002/EJLT.201300141>.
- Topuz, O.K. *et al.* (2016) 'Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens', *Food Chemistry*, 203, pp. 117–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.02.051>.
- Trendafilova, I. *et al.* (2017) 'Preparation of efficient quercetin delivery system on Zn-modified mesoporous SBA-15 silica carrier', *Materials Science and Engineering: C*, 73, pp. 285–292. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.12.063>.
- Tsiailanis, A.D. *et al.* (2023) 'Development of a Novel Apigenin Dosage form as a Substitute for the Modern Triple Antithrombotic Regimen', *Molecules*, 28(5), p. 2311. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules28052311>.
- Tsimidou, M.Z. *et al.* (2005) 'Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage', *Food Chemistry*, 93(3), pp. 377–383. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.033>.
- Uchiyama, H. *et al.* (2019) 'Formation of Food Grade Microemulsion with Rice Glycosphingolipids to Enhance the Oral Absorption of Coenzyme Q10', *Foods 2019, Vol. 8, Page 502*, 8(10), p. 502. Available at: <https://doi.org/10.3390/FOODS8100502>.
- Ushikubo, F.Y. and Cunha, R.L. (2014) 'Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions', *Food Hydrocolloids*, 34, pp. 145–153. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2012.11.016>.
- Valli, E. *et al.* (2014) 'Sensory analysis and consumer acceptance of 140 high-quality extra virgin olive oils', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(10), pp. 2124–2132. Available at: <https://doi.org/10.1002/JSFA.6535>.
- Varzakas, T., Polychniatou, V. and Tzia, C. (2015) 'Mixing Emulsions', in T. Varzakas and C. Tzia (eds) *Food engineering handbook : food process engineering*. Boca Raton: CRC Press. Available at: <https://www.crcpress.com/Food-Engineering-Handbook-Two-Volume-Set/Varzakas-Tzia/p/book/9781466582262> (Accessed: 2 December 2017).

- Varzakas, T. and Tzia, C. (2014) *Food Engineering Handbook*. Edited by T. Varzakas and C. Tzia. CRC Press (Contemporary Food Engineering). Available at: <https://doi.org/10.1201/b17843>.
- Vecchione, R. *et al.* (2016) 'Curcumin bioavailability from oil in water nano-emulsions: In vitro and in vivo study on the dimensional, compositional and interactional dependence', *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 233, pp. 88–100. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.05.004>.
- Verardo, V. *et al.* (2013) 'Effect of nitrogen fertilisation rates on the content of fatty acids, sterols, tocopherols and phenolic compounds, and on the oxidative stability of walnuts', *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), pp. 732–738. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.07.018>.
- Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. and Tabanelli, G. (2020) 'Bioactive Components in Fermented Foods and Food By-Products', *Foods*, 9(2), p. 153. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods9020153>.
- Villeneuve, P. *et al.* (2023) 'Lipid oxidation in emulsions and bulk oils: a review of the importance of micelles', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(20), pp. 4687–4727. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2006138>.
- Visioli, F. *et al.* (2008) 'Olive-oil Phenolics and Health: Potential Biological Properties', *Natural Product Communications*, 3(12), p. 1934578X0800301227. Available at: <https://doi.org/10.1177/1934578X0800301227>.
- Visioli, F., Poli, A. and Gall, C. (2002) 'Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil', *Medicinal Research Reviews*, 22(1), pp. 65–75. Available at: <https://doi.org/10.1002/med.1028>.
- Wadhwa, K. *et al.* (2023) 'Insights on prospective role of Gallic acid as a Bioavailability Enhancer', *Research Journal of Pharmacy and Technology*, pp. 983–988. Available at: <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2023.00164>.
- Walker, R., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2015) 'Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry', *Food & Function*, 6(1), pp. 41–54. Available at: <https://doi.org/10.1039/C4FO00723A>.
- Wang, Y. *et al.* (2020) 'Chemical Profiles of Twenty-three Monovarietal Olive Oils Produced in Liangshan Region of China', *Journal of Oleo Science*, 69(6), pp. 605–615. Available at: <https://doi.org/10.5650/jos.ess19265>.
- Wang, Y. *et al.* (2023) 'Emulsion and its application in the food field: An update review', *eFood*, 4(4), p. e102. Available at: <https://doi.org/10.1002/EFD2.102>.

- Wang, Y. and Wang, X. (2015) 'Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles', *Food Chemistry*, 188, pp. 24–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.127>.
- Wani, T.A. *et al.* (2016) 'Suitability of Different Food Grade Materials for the Encapsulation of Some Functional Foods Well Reported for Their Advantages and Susceptibility', *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(15), pp. 2431–2454. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.845814>.
- Waraho, T., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2011) 'Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions', *Trends in Food Science & Technology*, 22(1), pp. 3–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2010.11.003>.
- Watson, R.R. and Preedy, V.R. (2012) *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases: Bioactive Food in Chronic Disease States, Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases: Bioactive Food in Chronic Disease States*. Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780123971562/bioactive-food-as-dietary-interventions-for-arthritis-and-related-inflammatory-diseases> (Accessed: 17 December 2023).
- Wulff-Pérez, M. *et al.* (2009) 'Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant', *Food Hydrocolloids*, 23(4), pp. 1096–1102. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2008.09.017>.
- Xenakis, A., Papadimitriou, V. and Sotiroudis, T.G. (2010) 'Colloidal structures in natural oils', *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1–2), pp. 55–60. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.007>.
- Yi, J. *et al.* (2014) 'Influence of aqueous phase emulsifiers on lipid oxidation in water-in-walnut oil emulsions', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(9), pp. 2104–2111. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf404593f>.
- Yildirim, S.T., Oztop, M.H. and Soyer, Y. (2017) 'Cinnamon oil nanoemulsions by spontaneous emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity', *LWT*, 84, pp. 122–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.05.041>.
- Ying, X. *et al.* (2021) 'Preparation and drying of water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion to encapsulate soy peptides', *Food Research International*, 141, p. 110148. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110148>.
- Yolmeh, M., Habibi Najafi, M.B. and Farhoosh, R. (2014) 'Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM)', *Food Chemistry*, 155, pp. 319–324. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.01.059>.

- Yolmeh, M. and Jafari, S.M. (2017) 'Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes', *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), pp. 413–433. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2>.
- Yuan, Y. *et al.* (2008) 'Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions', *Food Research International*, 41(1), pp. 61–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2007.09.006>.
- Zabetakis, I. *et al.* (2022) *Functional Foods and their Implications for Health Promotion*, *Functional Foods and their Implications for Health Promotion*. Elsevier, Academic Press. Available at: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-00556-6>.
- Zamora, R., Alaiz, M. and Hidalgo, F.J. (2001) 'Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), pp. 4267–4270. Available at: <https://doi.org/10.1021/JF0104634>.
- Zhang, R. *et al.* (2016) 'Encapsulation of β -carotene in Nanoemulsion-Based Delivery Systems Formed by Spontaneous Emulsification: Influence of Lipid Composition on Stability and Bioaccessibility', *Food Biophysics*, 11(2), pp. 154–164. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11483-016-9426-7/FIGURES/10>.
- Zhao, C. *et al.* (2020) 'Encapsulation of lycopene within oil-in-water nanoemulsions using lactoferrin: Impact of carrier oils on physicochemical stability and bioaccessibility', *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, pp. 912–920. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.03.063>.
- Zhou, L. *et al.* (2021) 'Applications and effects of ultrasound assisted emulsification in the production of food emulsions: A review', *Trends in Food Science & Technology*, 110, pp. 493–512. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.008>.
- Ziani, K. *et al.* (2011) 'Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), pp. 6247–6255. Available at: https://doi.org/10.1021/JF200450M/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2011-00450M_0002.JPEG.
- EE 1169/2011 (no date) *Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1169/2011 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 25ης Οκτωβρίου 2011.*
- EE 1333/2008 (no date) *Β ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ.*
- EE 2022/2104 (2022) *Κανονισμός - προδιαγραφές εμπορίας του ελαιολάδου.* Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX:32022R2104> (Accessed: 21 January 2024).

ΕΕ 2568/91 (1991) *Κανονισμός προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων καθώς και με τις μεθόδους προσδιορισμού.*

ΕΕ 2015/2283 (no date) *ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2015/ 2283 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ - της 25ης Νοεμβρίου 2015.*

Κ.Τ.Π. (2009) *Κώδικας Τροφίμων και Ποτών.*