



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

*Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και
Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων*

**«Μελέτη σταθερότητας και οξείδωσης μακρο-
και νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη κρόκου
Κοζάνης (*Crocus Sativus L.*)»**



Μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία: Σπηλιοπούλου Νεολαία

Τριμελής επιτροπή: Ιωάννα Μαντάλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Πολυσίου Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Γιαννιώτης Σταύρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2014

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Μαντάλα Ιωάννας.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό την καθοδήγηση της επιβλέπουσας Επίκουρου Καθηγήτριας Ιωάννας Μαντάλα, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την καθοδήγηση, την συμπαράσταση, τον πολύτιμο χρόνο και γνώσεις που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τη θερμή ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτωρ Όλγα Καλτσά για τη βοήθεια, την υπομονή και τις χρήσιμες παρατηρήσεις της, που με βοήθησαν να ολοκληρώσω την πειραματική έρευνα και τη συγγραφή αυτής της διατριβής.

Πολλές ευχαριστίες σε όλο το Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων και συγκεκριμένα στις υποψήφιες διδάκτορες Κλεοπάτρα Τσατσαράκου, Στέλλα Πρωτονοταρίου και Εύη Παξιμαδά καθώς και στη Μαίρη, τη Μαρία και τη Χριστίνα για την άψογη συνεργασία που υπήρξε μέσα στο εργαστήριο.

Τον Καθηγητή Μόσχο Πολυσίου και τον Καθηγητή Σταύρο Γιαννιώτη ευχαριστώ για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους

Ευχαριστώ επίσης, την κα Προξενιά Νίκη για τη βοήθεια της και το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για τη φιλοξενία στο εργαστήριο, και την εν γένει υποστήριξη.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και την αγάπη μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την κατανόηση, τη διαρκή ηθική τους συμπαράσταση και την υπομονή τους.

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η να εξεταστεί η επίδραση της μείωσης του μεγέθους των λιποσφαιρίων στην περιοχή της νανο-κλίμακας στην φυσική και οξειδωτική σταθερότητα γαλακτωμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιολάδου. Επίσης, επιλέχθηκε κατάλληλη ποσότητα βιολογικού Κρόκου Κοζάνης και εξετάστηκε η πιθανή δράση του ως αντιοξειδωτικός παράγοντας κατά την διάρκεια της αποθήκευσης.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν μακρο-γαλακτώματα ελαίου σε νερό με 3 συγκεντρώσεις ελαιολάδου 2.5 % wt, 5 % wt και 10 % wt, που περιείχαν 10 % wt πρωτεΐνη ορού γάλακτος ως γαλακτωματοποιητή (Whey Protein Isolate, WPI) και κόμμα τριγωνέλλας ως σταθεροποιητή σε συγκεντρώσεις 0.5, 0.75 και 1 % wt. Τα μακρο-γαλακτώματα με συγκέντρωση 0.5 και 0.75 % wt κόμμεως τριγωνέλλας ήταν ασταθή και παρουσίασαν διαχωρισμό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, επομένως δε μελετήθηκαν περαιτέρω. Σταθερά μακρο-γαλακτώματα παρήχθησαν με την προσθήκη 1 % wt σταθεροποιητή, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης του ελαιολάδου. Τα μακρο-γαλακτώματα αυτά συγκρίθηκαν με τα ομόλογα νανο-γαλακτώματά τους τα οποία παρασκευάστηκαν με τη χρήση υπερήχων. Η γαλακτωματοποίηση με υπερήχους είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων με τα νανο-γαλακτώματα με 2.5 % wt ελαιόλαδο να παρουσιάζουν το μικρότερο μέγεθος (207.3 nm) και την μικρότερη πολυδιασπορά (0.219). Τα νανο-γαλακτώματα με 5 % wt ελαιόλαδο ήταν τα πιο σταθερά καθώς η μεταβολή της σκέδασης ήταν 1.02%. Η χρήση των υπερήχων επηρέασε τα ιξωδοελαστικά χαρακτηριστικά καθώς τα νανο-γαλακτώματα παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές ιξώδους, συντελεστή αποθήκευσης και απώλειας συγκριτικά με τα μακρο-γαλακτώματα ενώ το νανο-γαλακτώμα με 10 % wt ελαιόλαδο παρουσίασε τις μεγαλύτερες τιμές. Για την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης κρόκου πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος με χρήση εμπορικών προτύπων όπου μελετήθηκαν τα εξής χαρακτηριστικά χρώμα, άρωμα, γεύση, πικρότητα, επίγευση και συνολική εντύπωση. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 100 mg/kg καθώς συγκέντρωσε τις καλύτερες βαθμολογίες στα περισσότερα χαρακτηριστικά. Τέλος, μελετήθηκε η οξείδωση των γαλακτωμάτων. Βρέθηκε ότι τα νανο-γαλακτώματα παρουσίαζαν μεγαλύτερη οξείδωση από τα αντίστοιχα μακρο-γαλακτώματα, η αύξηση της συγκέντρωσης του ελαιολάδου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξείδωσης ενώ ο κρόκος παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση

Abstract

The aim of this study is to investigate the effect of the droplet size reduction within the nano-submicron range on the physical and oxidative stability of olive oil emulsions containing different concentrations of olive oil. Furthermore, the addition of specific amount of organic saffron (*Crocus sativus L.*) in nano-emulsion containing 5 % wt olive oil was evaluated for its antioxidant activity during storage.

Initially, coarse oil in water emulsions were prepared with 3 different concentrations of olive oil 2.5% wt , 5% wt and 10% wt, containing 10% wt whey protein isolate (WPI) as emulsifier and fenugreek gum (0.5, 0.75 and 1% wt) as stabilizer. Coarse emulsions containing 0.5 and 0.75% wt fenugreek gum were unstable and exhibited phase separation during storage; therefore they were no further tested. Stable coarse emulsions were prepared by addition of 1 % wt stabilizer, regardless of the oil content. These coarse emulsions were compared to their nano-submicron counterparts produced by ultrasonication. The ultrasonication resulted in droplet size reduction, whereas the nano-emulsions containing 2.5 % wt olive oil exhibited the smallest droplet size (207.3 nm) and the smallest polydispersity (0.219). Nano-emulsions with 5 % wt olive oil were the most stable (1.02% backscattering reduction after 10 days). The use of the ultrasound affected the viscoelastic properties: nano-emulsions exhibited higher values for viscosity, storage modulus (G') and loss modulus (G'') compared to coarse emulsions, while nano-emulsions containing 10 % wt olive oil showed the highest values. The concentration of saffron was evaluated by a sensory test by using a commercial product. The color, the aroma, the flavor, the bitterness, the aftertaste and the overall impression were tested. The concentration of 100 mg/kg had the best rating for most of the properties and was added to nano-emulsions containing 5 % wt olive oil. Finally, the oxidation of emulsions was studied. Nano-emulsions exhibited higher oxidation rates compared to their coarse emulsions counterparts. The increase of the volume fraction of oil resulted in increase of oxidation while the saffron showed antioxidant effect.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη	3
Abstract	4
1. Γαλακτώματα	7
1.1 Γενικά.....	7
1.2 Βασικές αρχές παρασκευής γαλακτωμάτων	8
1.2.1 Γαλακτωματοποίηση υψηλής ενέργειας.....	9
1.2.2 Γαλακτωματοποίηση χαμηλής ενέργειας	14
1.3. Μηχανισμοί αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων	20
1.3.1 Ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald Ripening).....	21
1.3.2 Αποκορύφωση (Creaming).....	22
1.3.3 Κροκίδωση (Flocculation).....	23
1.3.4 Συνένωση (Coalescence)	24
1.3.5 Αναστροφή φάσεων (Phase Inversion)	25
2. Γαλακτωματοποιητές	26
2.1 Λειτουργία των γαλακτωματοποιητών	26
2.2 Κατηγορίες γαλακτωματοποιητών	28
2.2.1 Οι πρωτεΐνες ως γαλακτωματοποιητές.....	28
2.2.2 Γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους	31
3. Υδροκολλοειδή	33
3.1 Γενικά.....	33
3.2 Ταξινόμηση και ιδιότητες υδροκολλοειδών.....	33
3.3 Κόμμι τριγωνέλλας (Fenugreek gum).....	35
4. Ο Κρόκος Κοζάνης-Σαφράν (<i>Crocus Sativus</i>)	37
4.1 Χημική σύσταση	38
4.2 Ποιοτικές προδιαγραφές για το Σαφράν (κατά ISO 3632-1:1993 (E) και Ελληνικό Κώδικας Τροφίμων Ποτών).....	40
4.2.1 Ορισμοί.....	40
4.2.2 Προδιαγραφές.....	41
4.2.3 Συσκευασία.....	41
4.2.4 Επισήμανση	41
4.3 Γενικά χαρακτηριστικά των κροκινών-αντιοξειδωτική δράση.....	43
4.3.1 Αντιοξειδωτική δράση κρόκου.....	44
5. Οξείδωση	45
5.1 Μηχανισμοί οξείδωσης	45

5.2 Σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων – Πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης	47
5.3 Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης.....	48
5.4 Μέθοδοι μέτρησης των προϊόντων της οξείδωσης	48
6. Υλικά & Μέθοδοι.....	50
6.1 Πιστοποίηση του κρόκου κατά ISO	51
6.2 Παρασκευή γαλακτωμάτων	53
6.3 Εκτίμηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων (zetasizer)	54
6.4 Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση υπό ψύξη.....	55
6.5 Μέτρηση του ιξώδες και της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς	57
6.6 Οργανοληπτικός έλεγχος για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας κρόκου.....	57
6.7 Μέθοδοι μέτρησης της οξείδωσης	58
6.7.1 Μέθοδος μέτρησης συζυγών διενίων	58
6.7.2 Μέθοδος μέτρησης p-ανισιδίνης	59
7. Αποτελέσματα & Συζήτηση	60
7.1 Πιστοποίηση του κρόκου κατά ISO	60
7.2 Εκτίμηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων.....	61
7.3 Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση υπό ψύξη.....	63
7.4 Μέτρηση του ιξώδες και της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς	66
7.5 Οργανοληπτικός έλεγχος για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας κρόκου.....	71
7.6 Προσδιορισμός προϊόντων οξείδωσης	75
7.7 Συμπεράσματα.....	79
8. Βιβλιογραφία	81

1. Γαλακτώματα

1.1 Γενικά

Ως γαλάκτωμα ορίζεται ένα κολλοειδές σύστημα δύο ή περισσότερων μη μιγνυόμενων υγρών στο οποίο ένα εξ' αυτών βρίσκεται σε διασπορά, με τη μορφή σταγονιδίων, σε ένα άλλο. Το υγρό σε διασπορά αναφέρεται ως ασυνεχής ή εσωτερική φάση, ενώ η υδατική φάση ως συνεχής ή εξωτερική. Στα περισσότερα τρόφιμα που αποτελούν γαλακτώματα, τις δύο φάσεις αποτελούν συνήθως το νερό και το έλαιο, ενώ ανάλογα με το ποιο από τα δύο σχηματίζει τη συνεχή φάση, αυτά διακρίνονται σε :

- Γαλακτώματα τύπου «**ελαίου σε νερό**» (oil in water, o/w), όπου τα σταγονίδια του ελαίου (λιποσφαίρια) διασπείρονται στη συνεχή υδατική φάση. Παραδείγματα τέτοιων τροφίμων αποτελούν οι επικαλύψεις σαλάτας (salad dressings), η μαγιονέζα, το γάλα, τα παγωτά, οι σάλτσες και οι σούπες.
- Γαλακτώματα τύπου «**νερό σε έλαιο**» (water in oil, w/o), όπου το έλαιο είναι η συνεχή φάση και σε αυτή βρίσκονται σε διασπορά σταγονίδια νερού. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται τρόφιμα όπως οι μαργαρίνες και το βούτυρο.
- **Διπλά γαλακτώματα (double emulsions)**, δηλαδή του τύπου έλαιο-σε νερό-σε έλαιο (o/w/o) και νερό-σε έλαιο-σε νερό (w/o/w), όπου σταγονίδια ελαίου ή νερού βρίσκονται σε διασπορά σε σταγονίδια νερού ή ελαίου αντίστοιχα, τα οποία με τη σειρά τους βρίσκονται σε διασπορά στη συνεχή φάση ελαίου ή νερού. Πρόκειται για πολύπλοκα συστήματα των οποίων η παρασκευή και ο έλεγχος είναι δύσκολος αφού τα σταγονίδια νερού μέσα στα λιποσφαίρια θα πρέπει να είναι σταθερά, όπως και τα λιποσφαίρια μέσα στην υδατική φάση. Είναι χρήσιμα στην προστασία ασταθών συστατικών, την ελεγχόμενη απελευθέρωση συγκεκριμένων συστατικών και τη διαμόρφωση προϊόντων χαμηλών λιπαρών.
- **Πολλαπλά γαλακτώματα (multiple emulsions)** του τύπου w/o/w/o.

Ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων, και συγκεκριμένα με τη μέση διάμετρό τους, τα γαλακτώματα διακρίνονται σε μακρο-γαλακτώματα (macroemulsions, 0,5-100 μm), μικρο-γαλακτώματα (microemulsions, 100-500 nm), μινι-γαλακτώματα (miniemulsions, 500-1000 nm) και νανο-γαλακτώματα (nanoemulsions, 10-100 nm), με τα τελευταία να είναι και τα πλέον επιθυμητά. Το πολύ μικρό μέγεθος λιποσφαιρίων τους υποδηλώνει ότι ρέουν εύκολα, είναι οπτικά διαφανή, έχουν

μοναδικές ιδιότητες ροής και υφής, είναι σταθερά και προσφέρονται για τον εγκλεισμό βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα (McClements, 2005).

1.2 Βασικές αρχές παρασκευής γαλακτωμάτων

Τα συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για την προετοιμασία ενός γαλακτώματος είναι: έλαιο, νερό, γαλακτωματοποιητής και ενέργεια. Η συνολική ελεύθερη ενέργεια για την δημιουργία ενός γαλακτώματος (ΔG) μπορεί να βρεθεί με την χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\Delta G = \Delta A\gamma + T\Delta S \quad (1)$$

Όπου ΔA είναι η αύξηση της διεπιφάνειας, γ η διεπιφανειακή τάση, T η θερμοκρασία και ΔS η μεταβολή της εντροπίας. Η τιμή της ΔG είναι θετική επειδή η τιμή της εντροπίας της διασποράς $T\Delta S$, η οποία είναι θετική, είναι μεγαλύτερη από την απόλυτη τιμή της καταναλισκόμενης ενέργειας. Η θετική τιμή της ΔG οδηγεί σε μη αυθόρμητη δημιουργία γαλακτώματος και ως εκ τούτου απαιτείται ενέργεια για την παραγωγή των σταγονιδίων. Η δημιουργία γαλακτωμάτων με μεγάλα σταγονίδια (μακρο-γαλακτώματα) είναι εύκολη. Για τον λόγο αυτό, για την παρασκευή μακρο-γαλακτωμάτων, αρκεί η χρήση αναδευτήρα υψηλής ταχύτητας. Αντίθετα, η δημιουργία μικρών σταγονιδίων σε ένα γαλάκτωμα είναι δύσκολη και απαιτεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας.

Κατά την διάρκεια την γαλακτωματοποίησης λαμβάνουν χώρα διάφορες διεργασίες, όπως είναι η διατάραξη των σταγονιδίων, η προσρόφηση των γαλακτωματοποιητών και η σύγκρουση των σταγονιδίων. Κάθε μια από της παραπάνω διεργασίες λαμβάνει χώρα πολλαπλές φορές κατά την γαλακτωματοποίηση και ο χρόνος διάρκειας της κάθε μίας είναι πολύ μικρός. Αυτό δείχνει την δυναμική φύση της διεργασίας αυτής, όπως επίσης δίνει και έμφαση σε γεγονότα που συμβαίνουν σε δέκατα του δευτερολέπτου, αλλά είναι μεγάλης σημασίας.

Ο γαλακτωματοποιητής που θα χρησιμοποιηθεί μειώνει την διεπιφανειακή τάση (γ) και συνεπώς μειώνεται και το μέγεθος των σταγονιδίων. Μερικά μίγματα γαλακτωματοποιητών οδηγούν σε μικρότερη διεπιφανειακή τάση από ότι η χρήση του καθενός ξεχωριστά. Επιπρόσθετα, οι γαλακτωματοποιητές έχουν σημαντική επίδραση στην παραμόρφωση και στην διάσπαση των σταγονιδίων και αποτρέπουν την συσσωμάτωσή τους κατά την διάρκεια της γαλακτωματοποίησης. Το κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης (ϕ) είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κατά την

διάρκεια της γαλακτωματοποίησης. Μια αύξηση στο κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης προκαλεί αύξηση στην σύγκρουση των σταγονιδίων και ως εκ τούτου την συσσωμάτωσή τους κατά την διεργασία. Επίσης, η αύξηση του κλάσματος όγκου οδηγεί στην αύξηση του ιξώδους του γαλακτώματος, κάτι που μπορεί να αλλάξει τη ροή. Η αύξηση του κλάσματος όγκου επάγει την πτώση/κατάρρευση των τυρβών κατά την τυρβώδη ροή με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεγαλύτερα σταγονίδια.

Η απαιτούμενη ενέργεια για την δημιουργία των νανο-γαλακτωμάτων μπορεί να ληφθεί από συσκευές ή από το χημικό δυναμικό των συστατικών του. Η προετοιμασία των νανο-γαλακτωμάτων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο ομάδες; α) διασπορά ή υψηλής ενέργειας γαλακτωματοποίηση και β) συμπύκνωση ή χαμηλής ενέργειας γαλακτωματοποίηση (Maali and Mosavian, 2013)

1.2.1 Γαλακτωματοποίηση υψηλής ενέργειας

Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούν έντονες μηχανικές δυνάμεις για την διάσπαση των σταγονιδίων σε μικρότερα και συνήθως περιλαμβάνουν (την χρήση) συγκεκριμένες διεργασίες (συσκευών) (Οι μέθοδοι σε αυτήν την κατηγορία έχουν συνήθως ένα μειονέκτημα, απαιτούν μεγάλες ποσότητες ενέργειας για την προετοιμασία νανο-γαλακτωμάτων και συνεπώς δεν είναι συμφέρουσες για μεγάλες βιομηχανικές εφαρμογές. Αντίθετα για μεγάλες παραγωγές μπορεί να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας όπως η αντιστροφή φάσεων. Ο σχηματισμός σταγονιδίων νανο-γαλακτωμάτων εξαρτάται άμεσα από την ενέργεια, την ποσότητα του γαλακτωματοποιητή και την φύση των συστατικών του

Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (High Pressure Homogenization, HPH) β) μικρορευστοποίηση (Microfluidization) και γ) ομογενοποίηση με υπερήχους (Ultrasonic emulsification).

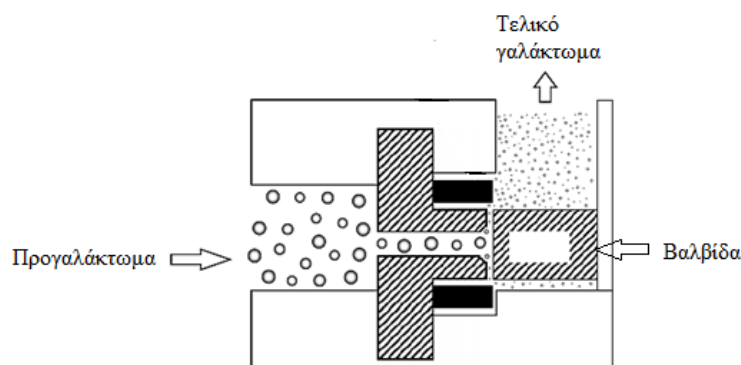
Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και η μικρορευστοποίηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα, ενώ η χρήση υπερήχων χρησιμοποιείται πρωτίστως σε εργαστηριακή κλίμακα. Παρόλο που οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας είναι αποτελεσματικές στην μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, δεν είναι επιθυμητές για ασταθή φάρμακα και μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, για τα οποία γίνεται χρήση των μεθόδων χαμηλής ενέργειας.

1.2.1.1 Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης

Η συμβατή ομογενοποίηση υψηλής πίεσης λειτουργεί σε πιέσεις 50-100 MPa.

Στην κανονική διαδικασία, τα υλικά του γαλακτώματος περνάνε μέσα από το στενό άνοιγμα του ομογενοποιητή με υψηλή πίεση (50-200MPa) (Εικόνα 1). Αυτή η υψηλή πίεση δημιουργεί ισχυρές δυνάμεις διάσπασης όπως διάτμηση, σύγκρουση και σπηλαίωση (cavitation). Οι έντονες τύρβες και η υδραυλική διάτμηση έχουν ως αποτέλεσμα την μετατροπή των μακρο-γαλακτωμάτων σε νανο-γαλακτώματα. Το μέγεθος των σταγονιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων, την πίεση και την θερμοκρασία του συστήματος. Όσο περισσότεροι είναι οι κύκλοι και η πίεση, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σταγονιδίων που παράγονται.

Επίσης, το μέγεθος των σταγονιδίων εξαρτάται από την σύσταση του γαλακτώματος (για παράδειγμα οργανική, υδάτινη φάση και γαλακτωματοποιητής), τα χαρακτηριστικά του (κινητική προσρόφησης, πτώση της διεπιφανειακής τάσης, και σταθεροποιητικά χαρακτηριστικά), τη φυσικοχημική κατάσταση των διαφορετικών φάσεων (ιζώδες και διεπιφανειακή τάση). Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης μπορεί να γίνει σε υψηλές θερμοκρασίες (θερμή τεχνική) ή σε χαμηλές θερμοκρασίες (ψυχρή τεχνική) η οποία στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για φάρμακα τα οποία είναι ασταθή στη θερμοκρασία. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα όπως η εύκολη αναβάθμιση, η αποφυγή οργανικών διαλυτών και ο μικρός χρόνος κατεργασίας. Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές βιομηχανίες ειδικά σε φάρμακα και καλλυντικά (Maali and Mosavian, 2013).



Εικόνα 1. Σχηματική διάταξη τυπικού ομογενοποιητή με βαλβίδα υψηλής πίεσης (McClements,2005)

1.2.1.2 Μικρορευστοποίηση

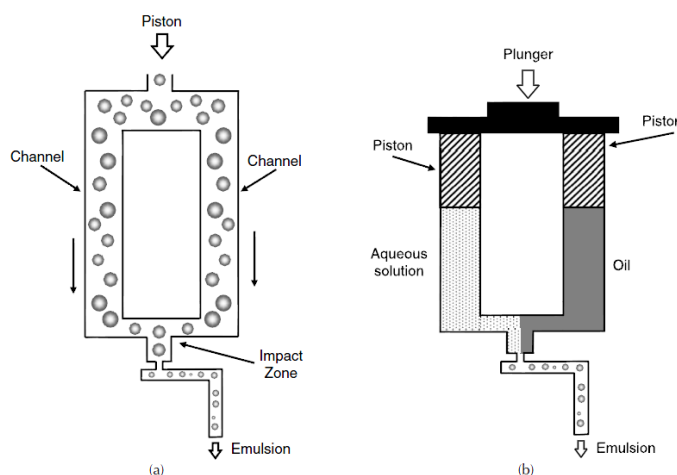
Το έλαιο και η υδάτινη φάση αναμειγνύονται και τοποθετούνται στον ομογενοποιητή για την παρασκευή του μακρο-γαλακτώματος. Αυτό το μακρο-γαλάκτωμα μπαίνει

στην συνέχεια στον μικρορευστοποιητή για την παραγωγή του σταθερού νανο-γαλακτώματος. Στον μικρορευστοποιητή χρησιμοποιείται μια αντλία υψηλής πίεσης. Η αντλία αυτή, η οποία δουλεύει με υψηλές πιέσεις έως 2000 psi, εξαναγκάζει το γαλάκτωμα να περάσει μέσα από ένα θάλαμο, ο οποίος αποτελείται από μικροκανάλια. Για τον λόγο αυτό τα σταγονίδια του γαλακτώματος που προκύπτουν έχουν πολύ μικρό μέγεθος. Η διάμετρος των σταγονιδίων εξαρτάται από την πίεση της λειτουργίας και από τον αριθμό των μικροκαναλιών στον θάλαμο. Το παραχθέν νανο-γαλάκτωμα μπορεί να φιλτραριστεί μέσα από φίλτο 0.2 μm υπό συνθήκες αζώτου για να αφαιρεθούν τα μεγάλα σταγονίδια και να προκύψει ένα ομοιόμορφο νανο-γαλάκτωμα.

Γενικά, οι δυνάμεις αδράνειας μαζί με την σπηλαιώση κατά την τυρβώδη ροή έχουν ως αποτέλεσμα την διάσπαση των σταγονιδίων στον μικρορευστοποιητή. Το πλεονέκτημα του μικρορευστοποιητή είναι ότι η κατανομή των σταγονιδίων στο γαλάκτωμα είναι πιο μικρή σε σύγκριση με άλλα μηχανήματα γαλακτωματοποίησης. Ωστόσο, η μικρορευστοποίηση είναι δύσκολη σε ειδικές περιπτώσεις, όπως όταν χρησιμοποιούνται υψηλές πιέσεις και μεγάλης διάρκειας χρόνοι γαλακτωματοποίησης, καθώς αυτές οι συνθήκες οδηγούν στην επανασυσσώματωση των σταγονιδίων και στην αύξηση του μεγέθους τους. Η θερμοκρασία του νανο-γαλακτώματος κατά την έξοδο από τον θάλαμο αλληλεπίδρασης έχει γραμμική εξάρτηση με την πίεση και το χρόνο γαλακτωματοποίησης. Υψηλότερες θερμοκρασίες οδηγούν σε μείωση του ιξώδους και της διεπιφανειακής τάσης και διευκολύνουν της διάσπαση των σταγονιδίων. Το κύριο πρόβλημα στην γαλακτωματοποίηση υψηλής ενέργειας είναι η αύξηση της θερμοκρασίας η οποία οδηγεί στην επανασυνένωση των σταγονιδίων και στην αύξηση του μεγέθους τους. Για να προληφθεί αυτό και να δημιουργηθούν μικρά σταγονίδια, χρησιμοποιείται ένας ψυχρός μανδύας.

Η εισαγόμενη ενέργεια κατά την μικρορευστοποίηση μπορεί να βελτιωθεί με την αύξηση της πίεσης λειτουργίας σε δύο ή περισσότερους κύκλους. Το τελικό μέγεθος των σταγονιδίων του γαλακτώματος είναι το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού της διάσπασης και της επανασυνένωσης των σταγονιδίων. Λόγω του ότι εισάγεται μεγάλη ποσότητα ενέργειας, η διάσπαση των σταγονιδίων είναι μεγάλη. Όσο η διάσπαση είναι πετυχημένη, δημιουργούνται καινούργια σταγονίδια. Ωστόσο, τα νέα σταγονίδια είναι θερμοδυναμικά ασταθή και τείνουν να επανασυσσώματωθούν. Αν η συνένωση είναι πιο συχνή από την διάσπαση, το μέγεθος των σταγονιδίων αυξάνεται.

Η αύξηση της ενέργειας πάνω από το βέλτιστο όριο προκαλεί υπερ-επεξεργασία, και σε μεγάλους ρυθμούς ροής, ο μέσος χρόνος παραμονής του γαλακτώματος μειώνεται. Επομένως, η σταθερότητα της νέας διεπιφάνειας είναι μικρή λόγω της μικρής προσρόφησης του γαλακτωματοποιητή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η επανασυνένωση και να αυξάνεται ο χρόνος παραμονής και επακόλουθα το μέγεθος των σταγονιδίων. Η γρήγορη σταθεροποίηση της νέας διεπιφάνειας μέσω της σωστής επιλογής και ποσότητας γαλακτωματοποιητή μπορεί να εμποδίσει την επανασυνένωση των σταγονιδίων μετά από την διάσπαση των μεγαλύτερων. Η πρόληψη αυτή μπορεί να γίνει με υδρο-δυναμικές επιδράσεις, όπως για παράδειγμα, η αύξηση του ιξώδους της συνεχής φάσης (Maali and Mosavian, 2013).



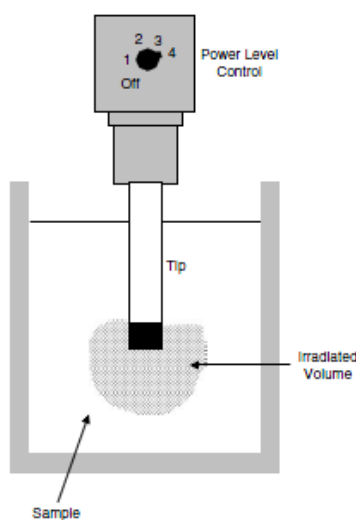
Εικόνα 2. Σχηματική διάταξη μικρορευστοποιητή για δευτερογενή ομογενοποίηση (α), για γαλακτωματοποίηση (β) (McClements, 2005)

1.2.1.3 Υπέρηχοι

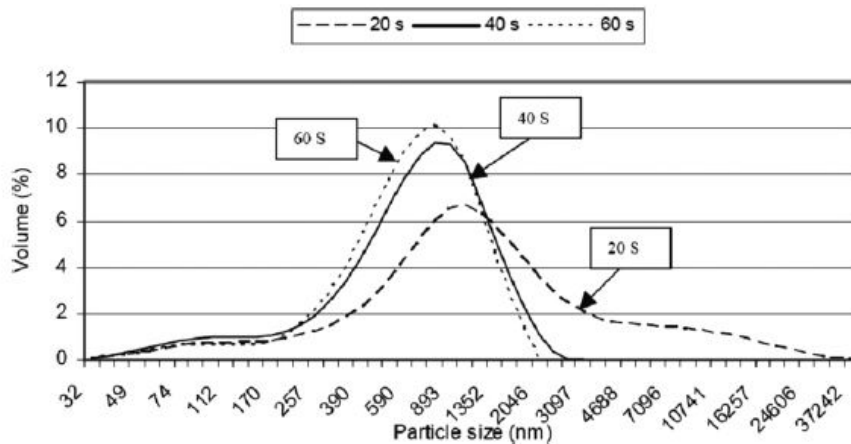
Η χρήση των υπέρηχων είναι πολύ αποτελεσματική για την μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, όμως είναι κατάλληλη μόνο για μικρές ποσότητες δειγμάτων. Η αποτελεσματικότητα της διεργασίας εξαρτάται πολύ από τον χρόνο κατεργασίας και το πλάτος ταλάντωσης. Με αυτόν τον εξοπλισμό, η ενέργεια των υπέρηχων διασπά μεγάλα σταγονίδια σε μικρότερα. Η χρήση υπέρηχων έχει την ίδια συμπεριφορά με την μικρορευστοποίηση σε μεγάλες θερμοκρασίες. Ο χρόνος που παραμένει το γαλάκτωμα στους υπέρηχους έχει σημαντική επίδραση στο μέγεθος των σταγονιδίων. Όσο αυξάνεται ο χρόνος αυξάνεται και η ποσότητα της ενέργειας, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μεγαλύτερη διάσπαση των σταγονιδίων και έτσι σε μείωση του μεγέθους τους. Αύξηση του χρόνου παραμονής πάνω από το βέλτιστο όριο δεν έχει καμία

επίδραση στο μέγεθος των σταγονιδίων, αλλά αποτελεί σπατάλη ενέργειας. Επομένως, κάποιος δεν θα έπρεπε να περιμένει την αύξηση της διάσπασης των σταγονιδίων και την μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων όσο αυξάνεται η ενέργεια. Η ενέργεια που εισάγεται πρέπει να διατηρείται στο επίπεδο όπου το μέγεθος των σταγονιδίων είναι κατά δυνατόν μικρότερο. Συνήθως με τη χρήση των υπέρηχων δεν υπάρχει υπερ-επεξεργασία. Αυτό συμβαίνει επειδή ο χρόνος παραμονής του γαλακτώματος στην περιοχή της γαλακτωματοποίησης, ο οποίος ισούται με τον χρόνο που παραμένει στους υπέρηχους, είναι μεγάλος στον εξοπλισμό αυτό, ενώ ο χρόνος παραμονής στον θάλαμο κατά την μικρορευστοποίηση είναι ένα δέκατο του δευτερολέπτου.

Παρόλο που η χρήση των υπέρηχων είναι εύκολη, δεν έχει ως αποτέλεσμα της βέλτιστη κατανομή του μεγέθους των νανο-σταγονιδίων. Επίσης τα συστατικά μπορούν να υποφέρουν από βλάβες λόγω της εισαγωγής ενέργειας σε μεγάλες ποσότητες. Η κατανομή του μεγέθους των νανο-σταγονιδίων εξαρτάται από το μακρο-γαλάκτωμα που έχει τοποθετηθεί στους υπέρηχους. Αν το μακρο-γαλάκτωμα που τοποθετείται στους υπέρηχους έχει μεγάλο μέγεθος σταγονιδίων και ευρεία κατανομή, το νανο-γαλάκτωμα που παράγεται θα έχει σταγονίδια με μεγάλη διάμετρο. Στην εικόνα 4 φαίνεται η συσχέτιση του χρόνου παραμονής με το μέγεθος των σταγονιδίων (Maali and Mosavian, 2013).



Εικόνα 3. Σχηματική διάταξη τυπικής συσκευής υπέρηχων με μετατροπέα (McClements, 2005)



Εικόνα 4. Επίδραση του χρόνου παραμονής στους υπέρηχους στο μέγεθος των σταγονιδίων (Jafari et al., 2006)

1.2.2 Γαλακτωματοποίηση χαμηλής ενέργειας

Εκτός από τις μεθόδους υψηλής ενέργειας, τα νανο-γαλακτώματα μπορούν να παραληφθούν και με μεθόδους χαμηλής ενέργειας. Αυτές οι μέθοδοι απαιτούν μόνο ήπια ανάδευση και περιλαμβάνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτωματοποιητών και συν-επιφανειοδραστικών ουσιών (co-surfactants). Για την δημιουργία ενός νανο-γαλακτώματος, οι μέθοδοι αυτοί απαιτούν μόνο μικρή ποσότητα ενέργειας. Για την διαδικασία της ανάδευσης, ο μαγνητικός αναδευτήρας πρέπει να είναι αρκετά γρήγορος. Όμως η ανάδευση δεν διασπάει τα σταγονίδια και η απόδοση της γαλακτωματοποίησης και του μεγέθους των σταγονιδίων δεν εξαρτώνται από τον ρυθμό περιστροφής του μαγνητικού αναδευτήρα.

Αυτές οι μέθοδοι έχουν υπάρξει ελκυστικές σε θεωρητικές έρευνες και σε πρακτικές εφαρμογές, λόγω του μικρού κόστους του εξοπλισμού. Οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας βασίζονται στην αυθόρμητη δημιουργία γαλακτωμάτων κάτω από ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες είναι αποτέλεσμα αλλαγών των διεπιφανειακών ιδιοτήτων. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να πραγματοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους, όπως με την διατήρηση σταθερής σύστασης μεταβάλλοντας την θερμοκρασία και με την διατήρηση της θερμοκρασίας σταθερής και μεταβάλλοντας την σύσταση.

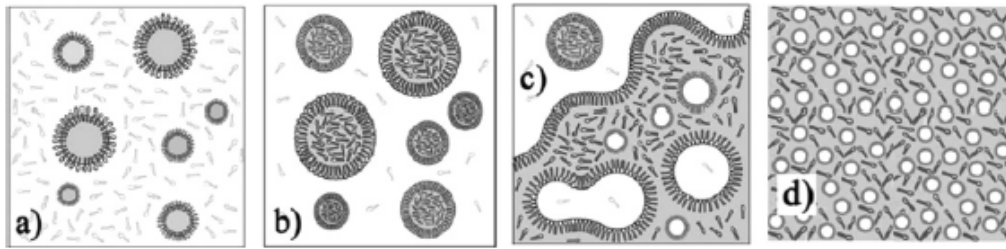
Η γαλακτωματοποίηση χαμηλής ενέργειας μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες: α) αναστροφή φάσης λόγω θερμοκρασίας (Phase Inversion temperature, PIT), β)

αναστροφής φάσης λόγω σύστασης (Phase Inversion Composition, PIC), γ) διάχυση διαλυτών (solvent diffusion).

1.2.2.1 Αναστροφή φάσης λόγω Θερμοκρασίας (Phase Inversion Temperature, PIT)

Η μέθοδος αναστροφή φάσης λόγω θερμοκρασία η οποία παρουσιάστηκε από τον Shinoda, είναι μια τεχνική γαλακτωματοποίησης με χαμηλή ενέργεια, η οποία παρέχει την δημιουργία γαλακτώματος χωρίς την χρήση μεγάλων δυνάμεων διάτμησης. Πλεονεκτήματα όπως το μειωμένο κόστος έκαναν ελκυστική τη μέθοδο αυτή τα τελευταία χρόνια. Η γενική ιδέα της μεθόδου βασίζεται σε έναν τύπο αναστροφής φάσης στο γαλάκτωμα (μεταβατική αναστροφή) η οποία επάγεται με την αλλαγή της θερμοκρασίας, η οποία στην συνέχεια επηρεάζει την υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία τους συστήματος. Όταν η συγγένεια του γαλακτωματοποιητή για την υδάτινη φάση ισορροπήσει με την συγγένειά του για την λιπαρή φάση, τότε συμβαίνει η μεταβατική αναστροφή φάσης. Η τροποποίηση στην έλξη ή την υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία (Hydrophylic-Lipophylic Balance, HLB) του γαλακτωματοποιητή μπορεί να πραγματοποιηθεί με την τροποποίηση της θερμοκρασίας. Η τροποποίηση αυτή βασίζεται σε αλλαγές στην συγγένεια των μη ιοντικών γαλακτωματοποιητών όπως π.χ. του πολυοξυαιθυλενίου με την θερμοκρασία. Σε χαμηλή θερμοκρασία, η μονοστιβάδα του μορίου έχει μια μεγάλη θετική αυθόρμητη καμπυλότητα (κυρτή) και γίνεται υδρόφιλος και συνεπώς παράγεται γαλάκτωμα τύπου έλαιο σε νερό. Σε υψηλή θερμοκρασία, λόγω της αφυδάτωσης της υδρόφιλου άκρου που είναι ένας μη ιοντικός γαλακτωματοποιητής, η αυθόρμητη καμπυλότητα γίνεται αρνητική (κοίλη) και ο γαλακτωματοποιητής γίνεται λιπόφιλος. Έτσι παράγεται γαλάκτωμα τύπου νερό σε έλαιο. Σε ενδιάμεση θερμοκρασία (θερμοκρασία ισορροπίας), η αυθόρμητη καμπυλότητα φτάνει κοντά στο μηδέν (ούτε κυρτή ούτε κοίλη) και εμφανίζεται ένα μικρο-γαλάκτωμα ή μια υγρή στρωματική κρυσταλλική περιοχή. Η διεπιφανειακή τάση είναι πολύ μικρή στην θερμοκρασία HLB και ως εκ τούτου παράγονται γαλακτώματα μικρού μεγέθους. Είναι πιθανό αυτά τα συσσωματώματα νανο-σταγονιδίων να δημιουργήσουν μακρο-γαλακτώματα με σταγόνες σε μέγεθος 1-10 mm και πέρα. Εάν υπάρχει μεγάλη ποσότητα γαλακτωματοποιητή και/ή έχει δημιουργηθεί μια υγρή κρυσταλλική δομή κοντά στην τιμή 0 της HLB, τα σταγονίδια του νάνο-γαλακτώματος δεν

συσσωματώνονται αμέσως. Όσο η HLB μεταφέρεται από την ασταθή περιοχή, το μέγεθος των σταγονιδίων παραμένει στην περιοχή των 50-100 nm. Επομένως, παρόλο που η γαλακτωματοποίηση είναι προτιμότερη στην θερμοκρασία της HLB, τα γαλακτώματα δεν είναι σταθερά. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια διαδικασία απόσβεσης για να παραχθούν σταθερά και λεπτά γαλακτώματα, ενώ το τελικό νανο-γαλάκτωμα πρέπει να αποθηκευτεί σε θερμοκρασίες μακριά από το σημείο PIT. Αν το γαλάκτωμα που έχει παραχθεί σε μια θερμοκρασία κοντά στο σημείο PIT ψυχθεί η θερμανθεί γρήγορα, μπορεί να παραχθεί ένα γαλάκτωμα το οποίο είναι κινητικά σταθερό και να έχει μικρό μέγεθος σταγονιδίων και στενή κατανομή μεγέθους. Αν το γαλάκτωμα ψυχθεί γρήγορα, το γαλάκτωμα τύπου νερό σε έλαιο αντιστρέφεται και γίνεται τύπου έλαιο σε νερό, αν αντίθετα θερμανθεί γρήγορα, το γαλάκτωμα τύπου έλαιο σε νερό αντιστρέφεται σε τύπου νερό σε έλαιο. Αν η διαδικασία ψύξης ή θέρμανσης δεν είναι γρήγορη, παράγεται ένα μακρο-γαλάκτωμα. Ο μηχανισμός για την δημιουργία ενός νανο-γαλακτώματος τύπου νερό σε έλαιο από ένα D μικρο-γαλάκτωμα, φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 5. Στην εικόνα 5α, η θερμοκρασία είναι από κάτω από την PIT, επομένως, ο μη ιοντικός γαλακτωματοποιητής είναι υδρόφιλος και επομένως παράγεται μακρο-γαλάκτωμα τύπου έλαιο σε νερό. Αν αυξηθεί η θερμοκρασία, ο γαλακτωματοποιητής σταδιακά γίνεται λιπόφιλος και διαλύεται στην λιπάρη φάση (εικόνα 5β). Στην εικόνα 5γ, η θερμοκρασία αυξάνει και άλλο και φτάνει την PIT και επομένως δημιουργείται ένα μη συνεχές νανο-γαλάκτωμα. Αν η θερμοκρασία αυξηθεί πάνω από την PIT, το γαλάκτωμα τύπου έλαιο σε νερό θα αντιστραφεί σε τύπου νερό σε έλαιο, και λόγω ελάχιστης διεπιφανειακής τάσης στην PIT, το μέγεθος των σταγονιδίων είναι μικρό και παράγεται ένα νανο-γαλάκτωμα τύπου νερό σε έλαιο. Η διαφορά στο μέγεθος των σταγονιδίων πριν και μετά την αναστροφή φαίνεται καθαρά (εικόνα 6). Τα ακατέργαστα γαλακτώματα (πριν την αναστροφή) είναι γαλακτώδες και αδιαφανή κάτι που σημαίνει ότι έχουν μεγάλα σταγονίδια. Όμως τα νανο-γαλακτώματα (μετά την αναστροφή) είναι σχεδόν διάφανα.



Εικόνα 5. Ο μηχανισμό της αναστροφής φάσης με θερμοκρασία για την παραγωγή νανο-γαλακτώματος νερό σε έλαιο, α) η θερμοκρασία είναι κάτω από την PIT β) αύξηση της θερμοκρασίας, γ) η θερμοκρασία είναι στο σημείο PIT, δ) η θερμοκρασία είναι πάνω από το σημείο PIT (Anton and Vandamme, 2009)



Εικόνα 6. Νανο-γαλάκτωμα πριν (δεξιά) και μετά την αναστροφή φάσεων (αριστερά) (Regev et al., 2009)

Τα εργαλεία για τον χαρακτηρισμό του σημείο PIT περιλαμβάνουν, την αγωγιμότητα, το ιζώδες, την δυναμική σκέδαση του φωτός, την μικροσκοπία φωτός, την θολερότητα και την οπτική μικροσκοπία.

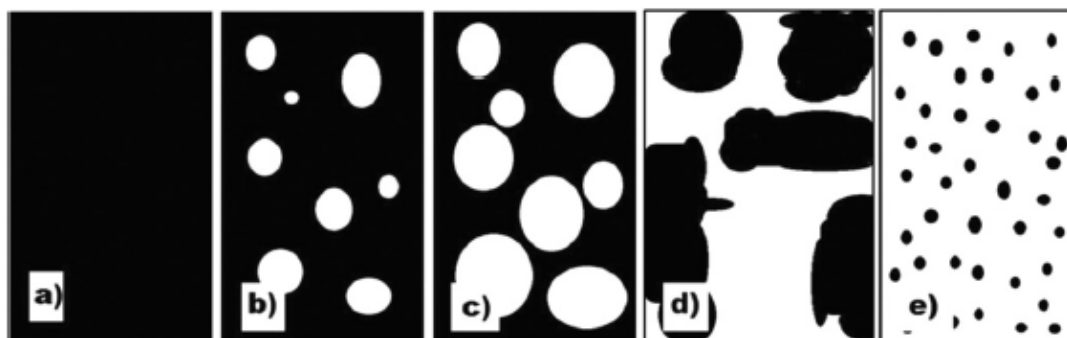
Με την παρακολούθηση των αλλαγών στην αγωγιμότητα και στην θολερότητα σε σχέση με την θερμοκρασία, σε ένα γαλάκτωμα με μη ιοντικούς γαλακτωματοποιητές για την παρασκευή νανο-γαλακτώματος τύπου νερό σε έλαιο, μπορεί να παρατηρηθεί μια ξαφνική πτώση στην καμπύλη της αγωγιμότητας και μια ξαφνική αύξηση στην καμπύλη της θολερότητας (αντίστροφη σχέση). Αυτό συμβαίνει, επειδή με την αύξηση της θερμοκρασίας το γαλάκτωμα τύπου έλαιο σε νερό αλλάζει σε μια ενδιάμεση φάση και στη συνέχεια γίνεται γαλάκτωμα τύπου νερό σε έλαιο. Για την παρασκευή νανο-γαλακτώματος τύπου έλαιο σε νερό, το αποτέλεσμα αυτού του

πειράματος αντιστρέφεται. Μια μέση θερμοκρασία μεταξύ των θερμοκρασιών με την ελάχιστη και την μέγιστη αγωγιμότητα και θολερότητα θεωρείται το σημείο PIT (Maali and Mosavian, 2013).

1.2.2.2 Αναστροφής φάσης λόγω Σύστασης (Phase Inversion Composition, PIC)

Σε αυτήν την τεχνική παρατηρείται μια μετάπτωση στην αυθόρμητη καμπυλότητα, η οποία γίνεται με την τροποποίηση του κλάσματος όγκου του νερού και όχι της θερμοκρασίας. Αυτή η μετάπτωση αναφέρεται ως καταστροφική αναστροφή φάσης. Κατά την PIC, για την γαλακτωματοποίηση τα συστατικά της συνεχής φάσης προστίθενται σιγά σιγά στα συστατικά της διεσπαρμένης φάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κατά την διαδικασία της γαλακτωματοποίησης να συμβαίνει μια μετάπτωση φάσης στην οποία εμφανίζεται μια μη συνεχή φάση. Παρόλο που η γαλακτωματοποίηση είναι μια αυθόρμητη διαδικασία, οι κινητήριες δυνάμεις είναι μικρές και το σύστημα απαιτεί πολύ χρόνο για να ισορροπήσει. Τα γαλακτώματα προετοιμάζονται με την χρήση μεθόδων PIC όπως φαίνεται στην εικόνα 7 σε πέντε βήματα: α) γαλακτωματοποιητής και συνεπιφανειοδραστική ουσία (Smix) αναμειγνύονται, και στη συνέχεια αναμειγνύεται το έλαιο με την Smix για να σχηματιστεί η λιπαρή φάση, β) νερό προστίθεται ανά σταγόνες στο μείγμα του ελαίου και του γαλακτωματοποιητή (ο ρυθμός που γίνεται η προσθήκη είναι πολύ σημαντικός και πρέπει να προσαρμοστεί έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι είναι αρκετά αργός έτσι ώστε να σχηματιστεί η μη συνεχής D φάση ή η φάση ελαίου σε νερό). Αν ο ρυθμός αυτός είναι πολύ μικρός, το μέγεθος των σταγονιδίων αυξάνεται λόγω της αποσταθεροποίησης του γαλακτώματος. Τα σταγονίδια του νερού παράγονται στην συνεχή φάση του ελαίου, με την προσθήκη νερού στο έλαιο γ) καθώς αυξάνεται το κλάσμα όγκου του νερού, τα σταγονίδια αρχίζουν να γίνονται μεγαλύτερα δ) μια αύξηση στο κλάσμα όγκου του νερού έχει ως αποτέλεσμα τα σταγονίδια να συσσωματώνονται μαζί και να σχηματίζουν ασυνεχείς ή πεταλοειδείς δομές. Αυτή τη στιγμή έχει φτάσει το σημείο αναστροφής φάσης του γαλακτώματος, στο οποίο αλλάζει η καμπυλότητα του γαλακτωματοποιητή και επιτυγχάνεται ελάχιστη διεπιφανειακή τάση και συνεπώς, παράγεται ένα νανο-γαλάκτωμα με μικρό μέγεθος σταγονιδίων. Το σημείο αναστροφής του γαλακτώματος μπορεί να βρεθεί με την μέτρηση της αγωγιμότητας. Αν στην ζώνη αναστροφής, αναστραφεί γαλάκτωμα τύπου w/o σε o/w, θα παρατηρηθεί μια οξεία αύξηση της αγωγιμότητας. Αντίθετα, αν

ένα γαλάκτωμα τύπου ο/w αναστραφεί σε w/o, θα παρατηρηθεί μια οξεία μείωση της αγωγιμότητας, ε) με μια περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του νερού, ξεπερνιέται το σημείο αναστροφής φάσης και γίνεται αποσύνθεση της ασυνεχούς φάσης σε μικρότερα σταγονίδια ελαίου, από αυτό το σημείο και μετά περαιτέρω προσθήκη νερού δεν αλλάζει το μέγεθος των σταγονιδίων. Για την ολοκληρωτική διαλυτότητα του ελαίου κοντά στο σημείο αναστροφής φάσης, απαιτείται υψηλή συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή.



Εικόνα 7. Ο μηχανισμός της σύστασης αναστροφής φάσης για την παραγωγή γαλακτώματος έλαιο σε νερό: α) φάση του ελαίου, καθώς αυξάνεται ο όγκος του νερού: β) χρηματίζονται σταγονίδια νερού, γ) τα σταγονίδια μεγαλώνουν δ) δημιουργία γαλακτώματος έλαιο σε νερό (Maali and Mosavian, 2013).

Η μέθοδος γαλακτωματοποίησης PIC για την παρασκευή νανο-γαλακτωμάτων έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως το μικρό κόστος παρασκευής, η απουσία ανόργανων διαλυτών, συμφέρουσα παραγωγή, μεγάλη σταθερότητα και θερμοδυναμική σταθερότητα (Maali and Mosavian, 2013).

1.2.2.3 Διάχυση διαλυτών

Η διάχυση διαλυτών ως τεχνική γαλακτωματοποίησης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως, η διεπιφανειακή τάση, το διεπιφανειακό και ολικό ιξώδες, η περιοχή μετάπτωσης φάσης και η δομή και η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή. Στην θεωρία, η γαλακτωματοποίηση με διάχυση διαλυτών μπορεί να παρέχει την ίδια ποσότητα γαλακτωμάτων τύπου έλαιο σε νερό όσο και τύπου νερό σε έλαιο, αλλά οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στα γαλακτώματα τύπου έλαιο σε νερό. Αυτή η τεχνική βασίζεται στην γρήγορη διάχυση οργανικών διαλυτών (ακετόνη, αιθανόλη κλπ) από την λιπαρή στην υδάτινη φάση. Η εξέλιξη του συστήματος βελτιώνεται με την διάχυση ενός διαλύτη στη φάση αυτή στην οποία έχει την μεγαλύτερη διαλυτότητα.

Τα νανο-γαλακτώματα μπορούν να δημιουργηθούν χωρίς την παρουσία γαλακτωματοποιητή και υψηλών διατημήσεων, κάτι που είναι γνωστό ως «φαινόμενο του ούζου». Στο φαινόμενο αυτό, παράγονται σταγονίδια ελαίου, και η διάμετρος τους αποτελεί συνάρτηση του ποσοστού του ελαίου που περισεύει προς τον υδατοδιαλυτό διαλύτη. Σε μερικές έρευνες που αναφέρονται σε αυτή τη μέθοδο έχει γίνει προσθήκη γαλακτωματοποιητών στο σύστημα.

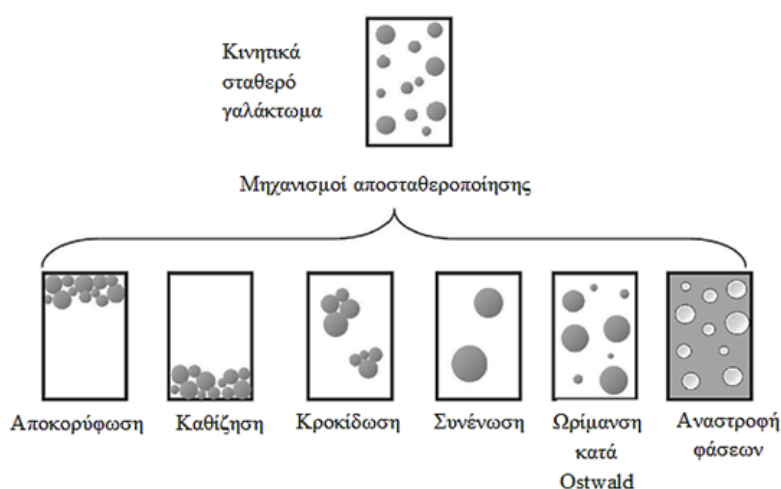
Στη μέθοδο αυτή για να γίνει παραλαβή νανο-γαλακτώματος απαιτούνται τρία βήματα: α) προετοιμασία της οργανικής και υδάτινης φάσης. Η οργανική φάση αποτελείται από το έλαιο, έναν λιπόφιλο γαλακτωματοποιητή μέσα σε ένα οργανικό διαλύτη ενώ η υδάτινη φάση αποτελείται από νερό και έναν υδρόφιλο γαλακτωματοποιητή, β) υπό ανάδευση με μαγνήτη, η οργανική φάση εισάγεται στην υδάτινη φάση. Μέσω διάχυσης του οργανικού διαλύτη στην υδάτινη φάση, σχεδόν στιγμιαία δημιουργούνται σταγονίδια ελαίου, ενώ για να φτάσει το σύστημα σε ισορροπία, η ανάδευση πρέπει να διατηρηθεί για μισή ώρα γ) μέσω εξάτμισης σε συνθήκες μειωμένης πίεσης για 45 λεπτά, αφαιρείται ο οργανικός διαλύτης από το σύστημα και τα σταγονίδια του ελαίου διασπείρονται στην υδάτινη φάση.

Το ιξώδες του ελαίου, η HLB του γαλακτωματοποιητή και η διαλυτότητα στο νερό του οργανικού διαλύτη είναι σημαντικοί παράμετροι για να καθοριστεί η ποιότητα του γαλακτώματος, το οποίο παραλαμβάνεται με την μέθοδο της διάχυσης των διαλυτών. Με βάση την φύση του ελαίου που χρησιμοποιείται, υπάρχει μεγάλη διαφορά το μέσο μέγεθος των σταγονιδίων. Το έλαιο με το μεγαλύτερο ιξώδες, δίνει σταγονίδια με το μικρότερο μέγεθος. Όμως για να εξασφαλιστεί ότι το γαλάκτωμα έχει μικρά σταγονίδια, δεν αρκεί ως μοναδική συνθήκη το υψηλό ιξώδες του ελαίου. Μερικοί περιορισμοί της μεθόδου αυτής είναι: α) μόνο μια μικρή ποσότητα του ελαίου διασπείρεται στην υδάτινη φάση (συνήθως 1%) β) ο οργανικός διαλύτης πρέπει να είναι υδατοδιαλυτός σε όλες τις συγκεντρώσεις γ) η αφαίρεση του διαλύτη.

1.3. Μηχανισμοί αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων

Ο όρος “σταθερότητα γαλακτώματος” αναφέρεται στην ικανότητα ενός γαλακτώματος να αντιστέκεται στις μεταβολές των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων με την πάροδο του χρόνου (McClements, 2005). Τα μακρο-γαλακτώματα είναι από θερμοδυναμική άποψη ασταθή συστήματα, δεδομένου ότι η ανάμιξη ελαίου και νερού δεν ευνοείται ενεργειακά, με αποτέλεσμα ο συνολικός αριθμός, τα μεγέθη και

η διευθέτηση στο χώρο των σταγονιδίων να μεταβάλλονται, έστω και ανεπαίσθητα, με την πάροδο του χρόνου. Η αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων οφείλεται σε φυσικούς μηχανισμούς όπως η αποκορύφωση (creaming), η συσσωμάτωση (flocculation), η συνένωση (coalescence), η αναστροφή φάσης (phase inversion) και η ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald ripening) (Εικόνα 8). Από τα παραπάνω, η συνένωση θεωρείται μη αποδεκτή σε οποιοδήποτε βαθμό σε ένα γαλάκτωμα-τρόφιμο, ενώ η αποκορύφωση και η συσσωμάτωση είναι έως ενός σημείου ανεκτά καθότι αποτελούν φαινόμενα αναστρέψιμα και δεν οδηγούν σε ανεπιθύμητες μεταβολές στην εμφάνιση ή την υφή ενός προϊόντος.



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων (McClements, 2005)

1.3.1 Ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald Ripening)

Το φαινόμενο παρατηρείται λόγω διαφοράς στη διεπιφανειακή ελεύθερη ενέργεια μεταξύ ενός μικρού και ενός μεγαλύτερου λιποσφαιρίου. Συγκεκριμένα, μόρια των μικρότερων λιποσφαιρίων διαχέονται στη συνεχή φάση του γαλακτώματος και συνενώνονται με μεγαλύτερα λιποσφαίρια, τα οποία είναι ενεργειακά σταθερότερα λόγω μικρότερου λόγου επιφάνειας προς όγκο. Για να λάβει χώρα το φαινόμενο θα πρέπει το έλαιο να είναι σε σημαντικό βαθμό διαλυτό στη συνεχή φάση και δεδομένου ότι η διαλυτότητα των περισσοτέρων τριγλυκεριδίων σε υδατικά συστήματα είναι αμελητέα, το φαινόμενο είναι σπάνιο σε τρόφιμα που αποτελούν γαλακτώματα ο/w.

1.3.2 Αποκορύφωση (Creaming)

Η αποκορύφωση οφείλεται στο διαχωρισμό των λιποσφαιρίων λόγω της βαρύτητας και παρατηρείται όταν η πυκνότητα των σταγονιδίων της ασυνεχούς φάσης είναι μικρότερη από αυτή της συνεχούς. Τα σταγονίδια ελαίου/νερού κινούνται ανοδικά λόγω της μικρότερης πυκνότητάς τους από το μέσο που τα περιβάλλει, δηλαδή από τη συνεχή φάση, με αποτέλεσμα την ανομοιογενή κατανομή τους στο γαλάκτωμα. Ωστόσο, το φαινόμενο είναι αντιστρεπτό, με την έννοια ότι το γαλάκτωμα επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση και τα σταγονίδια ανακατανέμονται ομοιόμορφα μέσω απλής ανακίνησης.

Στα γαλακτώματα τύπου o/w, στα αρχικά στάδια της αποκορύφωσης εμφανίζεται μία κάθετη διαβάθμιση στη συγκέντρωση των λιποσφαιρίων, ενώ σταδιακά διακρίνονται δύο ξεχωριστές στοιβάδες, εκ των οποίων η ανώτερη είναι εμπλουτισμένη σε σταγονίδια ελαίου (cream layer) και η κατώτερη έχει υδατική σύσταση (serum layer). Τα περισσότερα γαλακτώματα-τρόφιμα συνίστανται από σταγονίδια με εύρος μεγεθών, τα οποία ανέρχονται στην επιφάνεια με διαφορετικές ταχύτητες. Γενικά, η ταχύτητα αποκορύφωσης είναι υψηλότερη για τα μεγαλύτερα σε μέγεθος λιποσφαίρια σε σχέση με τα μικρότερα.

Αν ένα λιποσφαίριο θεωρηθεί ως ένα μεμονωμένο σφαιρικό σωματίδιο, τότε η ταχύτητα της ανοδικής του κίνησης μέσα σε ένα ιδανικό νευτώνειο υγρό, θα υπακούει στον νόμο του Stokes, σύμφωνα με τον οποίο :

$$U = \frac{2}{9} \frac{g r^2 (\rho_2 - \rho_1)}{\eta_1} \quad (2)$$

όπου r η ακτίνα του λιποσφαιρίου, ρ_2 και ρ_1 η πυκνότητα της ασυνεχούς και συνεχούς φάσης αντίστοιχα, g η επιτάχυνση λόγω βαρύτητας και η_1 ο συνσυντελεστής ιξώδους της συνεχούς φάσης. Πρακτικά, ο νόμος του Stokes μπορεί να προβλέψει το ρυθμό αποκορύφωσης μόνο σε συνθήκες άπειρης αραιώσης και απουσία φαινομένου κροκίδωσης. Με αύξηση του κλάσματος όγκου της λιπαρής φάσης (ϕ), η ταχύτητα αποκορύφωσης είναι μικρότερη από αυτή που υπολογίζεται από τον νόμο του Stokes, κυρίως γιατί σε ένα γαλάκτωμα που περιέχεται σε συγκεκριμένο όγκο, κάθε ανοδική κίνηση ενός λιποσφαιρίου συνοδεύεται από καθοδική κίνηση αντίστοιχου όγκου υδατικής φάσης, γεγονός που εμποδίζει την κίνηση των λιποσφαιρίων.

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει, ότι η αποκορύφωση σε ένα γαλάκτωμα μπορεί να καθυστερήσει είτε με μείωση της διαφοράς των πυκνοτήτων μεταξύ συνεχούς και ασυνεχούς φάσης, είτε με μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων, ή με αύξηση του ιξώδους της συνεχούς φάσης.

Πέρα από τη πολυδιασπορά μεγέθους των λιποσφαιρίων, σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα αποκορύφωσης σε ένα ασταθές γαλάκτωμα παίζει και ο βαθμός συσσωμάτωσης. Ένα γαλάκτωμα που έχει υποστεί συσσωμάτωση είναι ευπαθές στην αποκορύφωση, αφού τα συσσωματώματα σταγονιδίων κινούνται ταχύτερα από τα μεμονωμένα και μικρότερου μεγέθους σταγονίδια, συμπαρασύροντας τα τελευταία κατά την ανοδική τους πορεία. Ταυτόχρονα όμως η αποκορύφωση ευνοεί την εκδήλωση φαινομένων συσσωμάτωσης (κροκίδωση ή συνένωση) λόγω της κοντινής απόστασης των λιποσφαιρίων στη λιπαρή στοιβάδα.

1.3.3 Κροκίδωση (Flocculation)

Η κροκίδωση αποτελεί φαινόμενο κατά το οποίο δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια ενώνονται χωρίς ωστόσο να χάνουν την ατομική τους ακεραιότητα, διατηρούν δηλαδή το σχήμα και το μέγεθός τους. Κροκίδωση παρατηρείται σε ένα γαλάκτωμα όταν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των λιποσφαιρίων (δυνάμεις Van der Waal's, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις εξασθένησης, βαρύτητα, κίνηση Brown) υπερσχούν των απωστικών (δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσεως, πολυμερικές δυνάμεις).

Είναι μηχανισμός αποσταθεροποίησης αρκετά συχνός στα γαλακτώματα τύπου o/w, ο οποίος δύσκολα ελέγχεται, επιδρά εμφανώς στη δομή του γαλακτώματος και ευνοεί φαινόμενα αποκορύφωσης και συνένωσης. Κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την έκταση της συσσωμάτωσης είναι: το κλάσμα όγκου του ελαίου, ο λόγος πρωτεΐνη:έλαιο (για γαλακτώματα όπου χρησιμοποιείται πρωτεΐνη ως γαλακτωματοποιητής), η μέση διάμετρος των λιποσφαιρίων, η θερμοκρασία, το pH, η ιονική ισχύς και η συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου.

Σε ένα σταθερό γαλάκτωμα, η κροκίδωση αποτρέπεται είτε με ηλεκτροστατική σταθεροποίηση είτε με πολυμερική. Στην πρώτη περίπτωση, τα λιποσφαίρια διατηρούνται σε απόσταση λόγω της παρουσίας ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνειά τους (ή πιο συχνά στο στρώμα του προσροφημένου γαλακτωματοποιητή), κάτι που επιτυγχάνεται σε συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος και σε τιμές pH μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης-γαλακτωματοποιητή. Η πολυμερική σταθεροποίηση απαιτεί την ύπαρξη ενός πολυμερικού (steric) στρώματος στην επιφάνεια του λιποσφαιρίου, σε συγκέντρωση ικανή να καλύπτει τη διεπιφάνεια ελαίου-νερού επαρκώς και μόνιμα. Στα γαλακτώματα σταθεροποιημένα με πρωτεΐνη,

η συμβολή του ενός ή του άλλου μηχανισμού εξαρτάται από τη δομή της πρωτεΐνης και το pH του διαλύματος.

1.3.4 Συνένωση (Coalescence)

Η συνένωση είναι μηχανισμός αποσταθεροποίησης κατά τον οποίο δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια συνενώνονται για να σχηματίσουν ένα μεγαλύτερο σταγονίδιο, χωρίς να διατηρούν την ακεραιότητά τους. Σε αντίθεση με την κροκίδωση, η συνένωση είναι φαινόμενο μη αντιστρεπτό που οδηγεί στην κατάρρευση του γαλακτώματος και τελικά στο διαχωρισμό των δύο φάσεων. Ο σχηματισμός μεγαλύτερου μεγέθους λιποσφαιρίων ευνοεί την εκδήλωση αποκορύφωσης ή καθίζησης. Στα γαλακτώματα τύπου έλαιο σε νερό, η συνένωση οδηγεί σταδιακά στη δημιουργία μιας στοιβάδας ελαιώδους σύστασης στο άνω μέρος του γαλακτώματος (oiling off), ενώ στα γαλακτώματα τύπου νερό σε έλαιο, σχηματίζεται υδατική στοιβάδα στο κάτω μέρος.

Η συνένωση μπορεί να συμβεί αμέσως μόλις δύο λιποσφαίρια έρθουν σε επαφή ή, όπως συμβαίνει πιο συχνά στα τρόφιμα-γαλακτώματα, όταν έχει προηγηθεί κροκίδωση ή αποκορύφωση, οπότε και τα σταγονίδια είναι σε κοντινή απόσταση για καιρό. Για να εμφανιστεί το φαινόμενο της συνένωσης, θα πρέπει τόσο η στοιβάδα συνεχούς φάσης που διαχωρίζει τα λιποσφαίρια μεταξύ τους, όσο και η διεπιφανειακή στοιβάδα του γαλακτωματοποιητή που τα περιβάλλει, να διαρρηχθούν ώστε τα μόρια των λιπιδίων να έρθουν σε επαφή (Onwulata C., Huth J., 2008). Τη διάρρηξη της στοιβάδας του γαλακτωματοποιητή, προηγείται η λέπτυνση του υμενίου της συνεχούς φάσης μέχρι ενός σημείου, οπότε και διαρρηγνύεται. Η απομάκρυνση συνεχούς φάσης ανάμεσα από τα λιποσφαίρια προκαλεί ουσιαστικά απομάκρυνση μορίων του γαλακτωματοποιητή (καθώς τα συμπαρασύρει) με αποτέλεσμα η διεπιφανειακή τάση να αυξάνεται. Η ιξωδοελαστικότητα του υμενίου που σχηματίζει ο γαλακτωματοποιητής σχετίζεται θετικά με τη σταθερότητα του γαλακτώματος απέναντι στη συνένωση. Τα μακρομόρια σχηματίζουν ανθεκτικότερα υμένια σε σχέση με τους γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους.

1.3.4.1 Μερική συνένωση (Partial Coalescence)

Η μερική συνένωση είναι μηχανισμός κατά τον οποίο δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια που μπορεί να περιέχουν κρυστάλλους στο εσωτερικό τους έρχονται σε επαφή και σχηματίζουν ένα ακανόνιστου σχήματος συσσωμάτωμα. Το συσσωμάτωμα διατηρεί

εν μέρει το σχήμα των αρχικών σταγονιδίων, δεδομένου ότι η μηχανική αντοχή του κρυσταλλικού πλέγματος δεν επιτρέπει στα λιποσφαίρια να συνενωθούν πλήρως. Η μερική συνένωση εμφανίζεται μόνο σε γαλακτώματα με κρυσταλλικές περιοχές, έτσι ώστε οι κρύσταλλοι του ελαίου να διεισδύουν στην υγρή φάση. Αν όλα τα λιποσφαίρια είναι σε υγρή φάση λαμβάνει χώρα συνένωση, ενώ αν είναι σε στερεή πιο πιθανό είναι να εμφανιστεί κροκίδωση. Τα λιποσφαίρια παραμένουν σε συσσωμάτωμα γιατί ευνοείται θερμοδυναμικά η κατάσταση στην οποία τα λιποσφαίρια περιβάλλονται από μόρια λιπιδίων παρά από μόρια νερού (μικρότερη διεπιφανειακή ενέργεια).

Η έκταση της μερικής συνένωσης σε ένα γαλάκτωμα επηρεάζεται από τα μεγέθη και τη διάταξη των κρυστάλλων μέσα στα λιποσφαίρια, από τις απωστικές και ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιποσφαιρίων, αλλά και από τις ιδιότητες της διεπιφανειακής στοιβάδας του γαλακτωματοποιητή.

1.3.5 Αναστροφή φάσεων (Phase Inversion)

Η αναστροφή φάσεων είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα σύστημα μετατρέπεται από γαλάκτωμα τύπου έλαιο-σε-νερό σε γαλάκτωμα τύπου νερό-σε-έλαιο, ή αντίστροφα. Η μετατροπή της συνεχούς φάση στην εν διασπορά φάση (και αντίστροφα) είναι επιθυμητή διαδικασία στην παραγωγή τροφίμων όπως το βούτυρο και η μαργαρίνη, ενώ είναι ανεπιθύμητη σε άλλα προϊόντα όταν επηρεάζει την υφή, τη σταθερότητα και την εμφάνισή τους.

Η αναστροφή φάσεων συνήθως προκαλείται από κάποια μεταβολή στη σύνθεση του γαλακτώματος ή στις συνθήκες του συστήματος, όπως για παράδειγμα στο κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης, τον τύπο και τη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή, τη θερμοκρασία ή μετά από μηχανική ανάδευση (McClements, 2005).

2. Γαλακτωματοποιητές

2.1 Λειτουργία των γαλακτωματοποιητών

Ως γαλακτωματοποιητής ορίζεται μία οργανική ουσία με την ιδιότητα να μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ ελαίου-νερού, διευκολύνοντας έτσι τη γαλακτωματοποίηση και παράλληλα να αυξάνει τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Οι γαλακτωματοποιητές είναι αμφίφιλα μόρια, αποτελούνται δηλαδή από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα και για το λόγο αυτό δεν είναι απόλυτα διαλυτά ούτε στη λιπαρή ούτε στην υδατική φάση. Σε ένα γαλάκτωμα, το λιπόφιλο (υδρόφοβο) τμήμα του μορίου στρέφεται προς το λιπιδιακό (μη πολικό) περιβάλλον ενώ το υδρόφιλο προς το υδατικό (πολικό). Το λιπόφιλο τμήμα είναι συνήθως μία επιμήκης αλυσίδα λιπαρών οξέων, ενώ το υδρόφιλο μπορεί να είναι ανιονικού, αμφοτερικού (π.χ λεκιθίνη), κατιονικού ή μη ιονικού χαρακτήρα.

Ένας γαλακτωματοποιητής ανάλογα με τα πολικά και μη πολικά του τμήματα του μορίου του μπορεί να είναι υδροφιλικού ή λιποφιλικού χαρακτήρα και ως αποτέλεσμα να είναι περισσότερο διαλυτός στο νερό ή στο έλαιο αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον κανόνα του Bancroft: *η φάση στην οποία ο γαλακτωματοποιητής είναι πιο διαλυτός είναι η εξωτερική*, δηλαδή η φύση του γαλακτωματοποιητή καθορίζει τι τύπου γαλάκτωμα θα προκύψει. Υδρόφιλοι γαλακτωματοποιητές σχηματίζουν συνήθως γαλακτώματα τύπου έλαιο-σε-νερό ενώ υδρόφοβοι τύπου νερό-σε-έλαιο.

Όλοι οι γαλακτωματοποιητές ανήκουν στις επιφανειοδραστικές (surface-active) ή τασιενεργές ουσίες, προσροφώνται δηλαδή στην επιφάνεια ενός υγρού και μειώνουν την επιφανειακή τάση. Το αντίστροφο ωστόσο δεν ισχύει, με την έννοια ότι όλες οι επιφανειοδραστικές ουσίες δεν είναι αποτελεσματικοί γαλακτωματοποιητές. Ο ρόλος ενός γαλακτωματοποιητή δε συνίσταται μόνο στη προσρόφηση στη διεπιφάνεια και τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης, αλλά και στη δημιουργία ενός σταθερού, συνεκτικού και ιξωδοελαστικού υμενίου που θα περιβάλλει τα λιποσφαίρια και θα αποτρέπει τη συνένωσή τους όταν αυτά συγκρούονται. Ανάλογα με τη φύση του τροφίμου ένας γαλακτωματοποιητής μπορεί να εμφανίζει επιπλέον λειτουργίες, όπως τροποποίηση της κρυστάλλωσης του λίπους, αλληλεπιδράσεις με άλλες οργανικές ουσίες και συστατικά του τροφίμου, έλεγχο της μεταφοράς οξυγόνου/υγρασίας κ.α

Τα λιποσφαίρια μέσα σε ένα γαλάκτωμα βρίσκονται σε διαρκή κίνηση, υπό την επίδραση βαρύτητας, θερμικής ενέργειας ή μηχανικής δύναμης, με αποτέλεσμα να

έρχονται συνεχώς σε επαφή με τα γειτονικά τους. Η ανθεκτικότητα του υμενίου του γαλακτωματοποιητή καθορίζει τη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής (shelf life) του γαλακτώματος. Τα μεγάλα μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, σχηματίζουν ανθεκτικότερα υμένια και αλληλεπιδρούν με άλλες ομάδες στο ίδιο μόριο ή σε άλλα. Οι μικρού μοριακού βάρους γαλακτωματοποιητές συνήθως δε σχηματίζουν σταθερά διεπιφανειακά υμένια και η χρήση τους περιορίζεται στη μείωση της διεπιφανειακής τάσης.

Συνοπτικά, ένας αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής θα πρέπει να τηρεί τις εξής προϋποθέσεις:

1. Να προσροφάται στη διεπιφάνεια νερού/ελαίου και να μειώνει γρήγορα τη διεπιφανειακή τάση, ώστε να διευκολύνεται ο σχηματισμός του γαλακτώματος.
2. Να σχηματίζει ένα προστατευτικό υμένιο γύρω από τα λιποσφαίρια και να αποτρέπει ή να καθυστερεί φαινόμενα κροκίδωσης και συνένωσης.

Μια μέθοδος χρήσιμη για την εκτίμηση της καταλληλότητας ενός γαλακτωματοποιητή σε μία συγκεκριμένη εφαρμογή, είναι ο υπολογισμός της υδρόφιλης-λιποφιλικής ισορροπίας (Hydrophilic/Lipophilic Balance, HLB) (Πίνακας 1)

Ο Griffin, βασισμένος στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων, εισήγαγε την έννοια της υδρόφιλης-λιπόφιλης ισορροπίας (HLB). Ο αριθμός HLB χρησιμοποιείται για την μέτρηση του μεγέθους και της δύναμης των δύο υδρόφιλων και λιπόφιλων ομάδων σε ένα μόριο γαλακτωματοποιητή. Αντί για την ολική αποδοτικότητα του γαλακτωματοποιητή, αυτό ο αριθμός δείχνει τη είδος γαλάκτωμα θα παραχθεί.

Συνιστάται να χρησιμοποιείται μείγμα γαλακτωματοποιητών με τον ίδιο αριθμό HLB.

Οι μικτές τιμές HLB υπολογίζονται από την παρακάτω εξίσωση:

$$HLB_{mix} = HLB_1 W_1\% + HLB_2 W_2\% + \dots, \quad (3)$$

όπου το W% είναι το κατά βάρος ποσοστό του κάθε γαλακτωματοποιητή. Ο αριθμός HLB επηρεάζει την αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση και το μέγεθος των σταγονιδίων (EDS). Για την δημιουργία γαλακτωμάτων του τύπου έλαιο σε νερό, είναι κατάλληλοι γαλακτωματοποιητές με $HLB > 10$ (Mollet, 2007).

Πίνακας 1. Εύρος τιμών HLB και αντίστοιχη εφαρμογή γαλακτωματοποιητών (Mollet, 2007)

HLB	ΕΦΑΡΜΟΓΗ
0-3	Αντι-αφριστικός παράγοντας
4-6	Γαλακτωματοποιητής σε γαλακτώματα τύπου ν/ε
7-9	Τασιενεργή ουσία (Διαβρεκτικοί παράγοντες)
8-18	Γαλακτωματοποιητής σε γαλακτώματα τύπου ε/ν
13-15	Απορρυπαντικά
10-18	Διαλυτοποιητές (solubilisers)

2.2 Κατηγορίες γαλακτωματοποιητών

Οι γαλακτωματοποιητές κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες: (α) τα μακρομόρια (πρωτεΐνες) και (β) τους γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους (surfactants).

2.2.1 Οι πρωτεΐνες ως γαλακτωματοποιητές

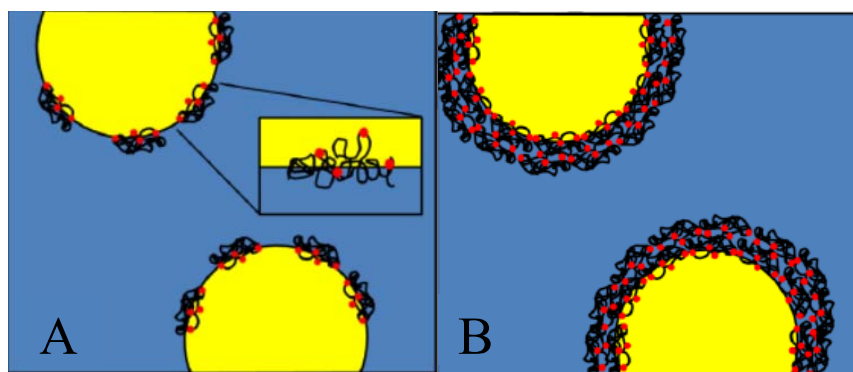
Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα αμφίφιλα βιομόρια που αποτελούνται από επιμήκεις αλυσίδες αμινοξέων τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς. Κατά το σχηματισμό ενός πολυπεπτιδίου (πρωτεΐνης), η αλυσίδα των αμινοξέων περιελίσσεται στο χώρο με τρόπο ώστε οι υδρόφοβες πλευρικές ομάδες να είναι προσανατολισμένες προς το εσωτερικό του μορίου ενώ οι υδρόφιλες προς το εξωτερικό. Πολλές πρωτεΐνες είναι επιφανειοδραστικά μόρια που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές εξαιτίας της ιδιότητάς τους να διευκολύνουν τη γαλακτωματοποίηση, να βελτιώνουν τη σταθερότητα και να προσδίδουν επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες σε γαλακτώματα τύπου έλαιο σε νερό. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες προσροφώνται στις επιφάνειες των λιποσφαιρίων που έχουν προκύψει από την ομογενοποίηση του μίγματος ελαίο-νερό-πρωτεΐνη και διευκολύνουν την περαιτέρω διάσπαση των λιποσφαιρίων με μείωση της διεπιφανειακής τάσης. Παράλληλα, καθυστερούν τη συνένωση τους με το σχηματισμό προστατευτικών μεμβρανών γύρω από τα λιποσφαίρια.

Η φυσική δομή του μορίου της πρωτεΐνης επηρεάζει και τον τρόπο της προσρόφησής του στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Η διάταξη μιας πρωτεΐνης με ευέλικτη δομή (π.χ β-καζεΐνη), περιλαμβάνει τους συρμούς, δηλαδή το τμήμα του μορίου που είναι σε επαφή με τη διεπιφάνεια, τους βρόγχους και τα ελεύθερα άκρα που εκτείνονται προς την υδατική φάση. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που προσροφώνται στις διεπιφάνειες

υφίστανται μεταβολές στη διαμόρφωσή τους, είτε αμέσως μετά την προσρόφηση, είτε αργότερα. Ειδικότερα, η δευτεροταγής και τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών (όσων διαθέτουν) καταστρέφεται και αναδιατάσσεται ώστε να εκτεθούν τα υδρόφοβα τμήματα στη μη πολική φάση. Οι μεταβολές αυτές αναφέρονται ως ‘‘μετουσίωση επιφάνειας’’ (surface denaturation) και ο χρόνος ολοκλήρωσής τους διαφέρει ανάλογα με την ευελιξία και το πακετάρισμα των προσροφημένων μορίων. Πρωτεΐνες με ευέλικτη δομή, όπως οι καζείνες εκδηλώνουν αυτές τις μεταβολές γρηγορότερα σε σχέση με τις σφαιρικές, άκαμπτης δομής πρωτεΐνες (π.χ λυσοζύμη, β-λακτογλοβουλίνη).

Παρουσία μίας διεπιφάνειας ελαίου- νερού, η πολυπεπτιδική αλυσίδα ξεδιπλώνεται και τα υδρόφοδα τμήματά της διευσδύουν στη λιπαρή φάση, ενώ τα υδρόφιλα παραμένουν στην υδατική. Παράλληλα, τα προσροφημένα στη διεπιφάνεια μόρια πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δεσμούς Van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, σχηματίζοντας ένα ιξωδοελαστικό υμένιο που αυξάνει τις απωστικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα λιποσφαίρια (Εικόνα 9).

Οι πρωτεΐνες υπερτερούν των γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους σε ό,τι αφορά στην ανθεκτικότητα και την ιξωδοελαστικότητα της σχηματιζόμενης μεμβράνης (Lam, 2013).



Εικόνα 9. Αναπαράσταση σφαιρικής πρωτεΐνης που επαναπροσανατολίζεται στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού α) και σχηματίζει ιξωδοελαστικό υμένιο β) τα κόκκινα σημεία αναπαριστούν τις υδρόφοβες περιοχές του μορίου (Lam, 2013).

Η αρχική διαλυτότητα της πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για το σχηματισμό και τη σταθερότητα ενός γαλακτώματος. Οι μηχανικές και ρεολογικές ιδιότητες του υμενίου που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες επηρεάζονται από το pH, την ιονική ισχύ, τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, τη θερμοκρασία, την παρουσία αλάτων, καθώς και από φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης όπως το φορτίο επιφάνειας, την

υδροφοβικότητα, την ευελιξία του μορίου και την ανθεκτικότητα στη μετουσίωση. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις επηρεάζονται από το pH και συνήθως τα υμένια που σχηματίζονται υπό τιμή pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο, όπου μεγιστοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις, είναι πιο πυκνά και συμπαγή. Η παρουσία άλατος μπορεί να αποδυναμώσει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στο υμένιο, ενώ παράλληλα επηρεάζει τη διάχυση και την εκτύλιξη της πρωτεΐνης στη διεπιφάνεια.

Οι πρωτεΐνες διαφέρουν ως προς την ταχύτητα με την οποία προσροφώνται στις επιφάνειες των λιποσφαιρίων κατά την ομογενοποίηση, την ελάχιστη ποσότητα που απαιτείται για πλήρη κάλυψη των επιφανειών, καθώς και την ικανότητά τους να προστατεύουν τα λιποσφαίρια από συνένωση κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

2.2.1.1 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος (*Whey proteins*)

Το κλάσμα του ορού γάλακτος, που αποτελεί περίπου το 20% του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου του γάλακτος, περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που παραμένουν διαλυτές μετά την ισοηλεκτρική κατακρήμνιση των καζεϊνών σε pH 4,6. Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος είναι μία ιδιαίτερη ετερογενής ομάδα ενώσεων και περιλαμβάνουν την β-λακτογλοβουλίνη (~59%), την α-λακταλβουμίνη (~22%), την αλβουμίνη του ορού, τις ανοσογλοβουλίνες και το κλάσμα πρωτεοζών-πεπτοζών.

Συγκρίνοντας την πρωτοταγή τους δομή με αυτή των καζεϊνών, έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε προλίνη, πιο συχνούς δισουλφυδικούς δεσμούς και φορτία πιο ομοιόμορφα κατανομημένα. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος διαθέτουν οργανωμένη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή και οι περισσότερες είναι σφαιρικές.

Διάφοροι τύποι σκόνης ορού γάλακτος είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο, μεταξύ των οποίων οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι είναι το πρωτεϊνικό συμπύκνωμα ορού γάλακτος (*Whey protein concentrate, WPC*) και το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα ορού γάλακτος (*Whey protein isolate, WPI*), το οποίο έχει πρωτεϊνικό περιεχόμενο μεγαλύτερο του 90% σε ξηρό βάρος.

Στα πλεονεκτήματά τους συμπεριλαμβάνονται το χαμηλό περιεχόμενο σε θερμίδες, λίπος και νάτριο, η απουσία παθογενών ή τοξικών ουσιών, η καλή γαλακτωματοποιητική ικανότητα, η συμβατότητα με άλλα συστατικά, η εύκολη διαθεσιμότητά τους, το γεγονός ότι είναι προϊόντα φυσικής προέλευσης και η γλυκιά, αρωματική τους γεύση.

Τα διεπιφανειακά υμένια που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος γύρω από τα λιποσφαίρια είναι σχετικά λεπτά (1-10 nm) και ηλεκτρικά φορτισμένα (-80 έως +80 mV). Επειδή σε αυτήν τη περίπτωση ο κύριος μηχανισμός σταθεροποίησης ενάντι της κροκίδωσης είναι η ηλεκτροστατική άπωση, τα γαλακτώματα είναι ευαίσθητα στο pH και την ιονική ισχύ. Σε τιμές pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των προσροφημένων πρωτεϊνών η πυκνότητα του επιφανειακού φορτίου είναι χαμηλή, ενώ σε υψηλές τιμές ιονικής ισχύος η ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των λιποσφαιρίων δεν είναι αρκετά ισχυρή ώστε να υπερνικήσει τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις (Van der Waals, υδρόφοβες, depletion).

Τα γαλακτώματα που σταθεροποιούνται με πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη θερμική επεξεργασία, δεδομένου ότι οι σφαιρικές πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει μία οριακή τιμή και εκθέτουν στην επιφάνεια μη πολικές ή δυσουλφυδικές ομάδες. Οι ομάδες αυτές αυξάνουν τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που βρίσκονται είτε στο ίδιο είτε σε γειτονικά λιποσφαίρια, μειώνοντας τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων απέναντι στην κροκίδωση και τη συνένωση (Lam, 2013).

2.2.2 Γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους

Είναι επιφανειοδραστικές (ή τασιενεργές) ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους με αμφίφιλο χαρακτήρα. Η υδρόφοβη «κεφαλή» αποτελείται συνήθως από μία επιμήκη αλυσίδα λιπαρών οξέων ενώ η υδρόφιλη «ουρά» μπορεί να είναι ανιονικού, αμφοτερικού, κατιονικού ή μη ιονικού χαρακτήρα. Ανάλογα με τη φύση του υδρόφιλου τμήματος, οι γαλακτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους διακρίνονται σε ανιονικούς, κατιονικούς και ουδέτερους. Οι κατιονικοί έχουν συνήθως βακτηριοκτόνο, τοξική δράση και δεν ενδείκνυνται ως πρόσθετα τροφίμων. Οι μη ιονικοί είναι ανθεκτικοί σε μεταβολές του pH και τη συγκέντρωση αλάτων στην υδατική φάση, ενώ η λειτουργικότητα των ιονικών επηρεάζεται από το pH και την ιονική ισχύ.

Οι γαλακτωματοποιητές μπορεί να είναι φυσικοί (π.χ λεκιθίνη), ημισυνθετικοί ή συνθετικοί, δηλαδή να προκύπτουν από σύνθετες αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού. Κατηγοριοποιούνται με κριτήριο διάφορα χαρακτηριστικά, όπως η προέλευσή τους, η τιμή HLB, η παρουσία λειτουργικών ομάδων στο μόριό τους και ο ιονισμός. Ανάλογα με τις συνθήκες αντίδρασης της παρασκευής τους, οι γαλακτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους

ως προς τη σύσταση αλλά κατηγοριοποιούνται με βάση την κύρια δομική τους μονάδα σε: (Hoefler, 2004)

- Λεκιθίνη και παράγωγα λεκιθίνης
- Μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και παράγωγά τους
- Εστέρες μονο- και διγλυκεριδίων
- Πολυγλυκερολικοί εστέρες των λιπαρών οξέων
- Στεατικοί εστέρες του γαλακτικού οξέος
- Σορβικοί εστέρες του μονοστεατικού οξέος
- Προπυλενογλυκολικοί εστέρες των λιπαρών οξέων
- Εστέρες σακχαρόζης με λιπαρά οξέα

3. Υδροκολλοειδή

3.1 Γενικά

Τα υδροκολλοειδή είναι ετεροπολυσακχαρίτες μεγάλου μοριακού βάρους με υδρόφιλο χαρακτήρα και κολλοειδείς ιδιότητες. Παρουσία νερού σχηματίζουν πηκτές, δηλαδή αιωρήματα υψηλού ιξώδους, ή διαλύματα με χαμηλό σε ξηρή ουσία περιεχόμενο. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση της μικροδομής, της γεύσης, της υφής και του χρόνου ζωής των προϊόντων. Συγκεκριμένα, η χρήση τους αφορά στην πήξη και τη δημιουργία πηκτών, τη σταθεροποίηση και δημιουργία γαλακτωμάτων, το σχηματισμό αιωρημάτων, αφρών και την ενθυλάκωση ουσιών.

Ο όρος “υδροκολλοειδή” περιλαμβάνει όλους τους πολυσακχαρίτες που παραλαμβάνονται από φυτά, φύκη και μικροβιακές πηγές, κόμμεα από φυτικά εξιδρώματα και τροποποιημένα βιοπολυμερή από τη χημική και ενζυμική επεξεργασία αμύλου ή κυτταρίνης. Στα υδροκολλοειδή κατατάσσεται κατ’εξάιρεση και μία πρωτεΐνη, η ζελατίνη, λόγω του έντονα υδροφιλικού της χαρακτήρα.

Η δομή των μορίων των υδροκολλοειδών μπορεί να είναι είτε γραμμική, όπως στην περίπτωση της κυτταρίνης, της αμυλόζης και της πηκτίνης, είτε διακλαδισμένη. Η γραμμική μορφή είναι η πλέον διαδεδομένη στη φύση και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες απλών σακχάρων ή παραγώγων τους, με πλευρικές διακλαδώσεις που μπορεί να είναι σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, μεθυλεστέρες, θειϊκές ομάδες ή καρβοξυλομάδες. Οι πλευρικές ομάδες των μορίων έχουν σημαντική επίδραση στις ιδιότητες των υδροκολλοειδών.

Τα μόρια των πολυσακχαριτών εμφανίζουν πολύ μικρή επιφανειοδραστικότητα, καθότι υδρόφιλα, και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν προσροφώνται σε υδρόφιλες επιφάνειες. Εξάιρεση στο παραπάνω αποτελούν η ζελατίνη, το αραβικό κόμμι, κάποιες φυσικές γαλακτομαννάνες (κόμμι γκούαρ), τροποποιημένα παράγωγα αμύλου ή κυτταρίνης, ακετυλιωμένη πηκτίνη από ζαχαρότευτλα και αποπολυμερισμένη πηκτίνη από κίτρο (Hoefler, 2004).

3.2 Ταξινόμηση και ιδιότητες υδροκολλοειδών

Τα υδροκολλοειδή μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την πηγή προέλευσης (Πίνακας 2), τη δομή τους, τις χημικές, λειτουργικές και φυσικές τους ιδιότητες.

Πίνακας 2. Ταξινόμηση υδροκολλοειδών με βάση την προέλευσή τους (Hoefler, 2004)

ΠΡΟΕΥΛΕΥΣΗ	ΥΔΡΟΚΟΛΛΟΕΙΔΗ
Σπόροι	Κόμμι γκουάρ Κόμμι χαρουπιού Κόμμι τάρα Κόμμι τριγωνέλλας
Εκχυλίσματα	Αραβικό κόμμι Κόμμι τραγακάνθου Κόμμι καράγιας
Ρίζες	Κόμμι konjac
Εκχυλίσματα φυκών	
<ul style="list-style-type: none"> • Ερυθρά 	Άγαρ Καρραγενάνη
<ul style="list-style-type: none"> • Φαιοφύκη 	Αλγινικό νάτριο Αλγινική προπυλενογλυκόλη
Φυτικά εκχυλίσματα	Πηκτίνη Αμυλόζη
Ζωικά εκχυλίσματα	Ζελατίνη
Μικροβιολογικής προέλευσης	Κόμμι ξανθάνης Ζελάνη Πουλλουάνη Κυτταρίνη
Παράγωγα κυτταρίνης	Μεθλοκυτταρίνη Υδροξυπροπυλοκυτταρίνη Μεθυλοϋδροξυπροπυλο-κυτταρίνη Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη
Άλλα παράγωγα	Αλγινική προπυλενογλυκόλη Αμιδούχος πηκτίνη

3.3 Κόμμι τριγωνέλλας (Fenugreek gum)

Οι γαλακτομαννάνες του ενδοσπερμίου του σπόρου της τριγωνέλλας δεν υπήρχαν σε βιομηχανική παραγωγή μέχρι το 1993. Αυτή τη στιγμή, μερικές βιομηχανίες παράγουν και προωθούν αρκετά μεγάλες ποσότητες κόμμι από τριγωνέλλα, ενώ και άλλα προϊόντα από τριγωνέλλα αρχίζουν να αποκτούν πολλαπλές εφαρμογές. Το κόμμι γκουάρ και το κόμμι χαρουπιού υπάρχουν στις βιομηχανικές εφαρμογές για αρκετό καιρό. Όπως το κόμμι γκουάρ έτσι και το κόμμι από τριγωνέλλα είναι ένα προϊόν από ένα φυτό που καλλιεργείται ευρέως και έτσι είναι δυνατόν να εξασφαλιστεί ο βιώσιμος εφοδιασμός του. Οι σπόροι της τριγωνέλλας περιέχουν πικάντικα έλαια, σαπωνίνες και εδώδιμες πρωτεΐνες, και έτσι αποτελούν μια αποδοτική καλλιέργεια. Οι σπόροι της τριγωνέλλας έχουν χρησιμοποιηθεί ως καρυκεύματα και ως συστατικό μπαχαρικών στην Ινδία και στην μέση Ανατολή για αιώνες και η μη τοξική και αβλαβής τους φύση ως πρόσθετο τροφίμων έχει καθιερωθεί. Λαμβάνοντας υπόψη αυτούς τους παράγοντες, το ερευνητικό σκέλος της γεωπονίας του Καναδά, ξεκίνησε ένα σχέδιο για την παραγωγή καλλιέργειας τριγωνέλλας από βελτιωμένους σπόρους.

Η τριγωνέλλα ή *Methi* (*Trifonella foenum-graecum*) είναι μια παλιά καλλιεργούμενη σοδειά μπαχαρικών-σπόρων, εγχώρια στην Ινδία, Μέση Ανατολή και Νότιο Ευρώπη. Αυτή τη στιγμή καλλιεργείται στην Μέση Ανατολή, στη Βόρειο Αφρική, στην Νότιο Ευρώπη και πρόσφατα στην Βόρειο Αμερική. Η Ινδία είναι η κύρια χώρα που εξάγει την τριγωνέλλα, Είναι ένα όρθιο φυτό, 30-60 εκατοστά σε ύψος. Αποτελείται από λεπτός ξηφοειδής λοβούς 10-15 εκατοστά σε μέγεθος που περιέχουν 10-20 σπόρους.

Οι δικοτυλήδονοι μακρόστενοι καφέ-κίτρινοι σπόροι αποτελούνται από ένα κέλυφος, έχοντας στο εσωτερικό τους δύο υπόλευκα διάφανα ενδοσπέρμια που αποτελούνται κυρίως από διαλυτούς πολυσακχαρίτες γαλακτομαννανών. Οι σπόροι περιέχουν (σε ξηρή βάση): υγρασία 3.6%, πρωτεΐνες 25-30%, εκχύλισμα αιθέρα 7-9%, εστέρες σαπωνίων 5-7%, γαλακτομαννάνες 25-30%, μη διαλυτές φυτικές ίνες 20-24% και τέφρα 3-4%. Μεταξύ των δύο ενδοσπερμίων υπάρχει το υποκίτρινο φύτρο, το οποίο αποτελείται από υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες, από εκχυλίσματα αιθέρα (7-9% λιπαρά και αρωματικά αιθέρια έλαια), από εκχυλίσματα αλκοόλης (5-7%), αποτελείται από κίτρινες χρωστικές, διοσγενίνη, τριγωνελλίνη, ελεύθερα αμινοξέα, βιταμίνες του Β συμπλέγματος και φαλαβονοειδή. Το ινώδες υλικό αποτελείται από μη διαλυτές κυτταρίνες, ενώ οι γαλακτομαννάνες του ενδοσπερμίου είναι διαλυτές. Στα όσπρια, οι γαλακτομαννάνες του ενδοσπερμίου είναι οι αντίστροφοι

πολυσακχαρίτες του σπόρου, οι οποίοι χρησιμοποιούνται κατά την βλάστηση και την ανάπτυξη του φυτού μέχρι να ξεκινήσει η φωτοσύνθεση. Σπόροι οσπρίων που βλασταίνουν παράγουν ένζυμα (α-μαννάση, α-γαλακτάση) τα οποία χρησιμοποιούνται για την διάσπαση των πολυσακχαριτών, ενώ οι γαλακτομαννάνες έχουν ισχυρή τάση να δεσμεύουν υγρασία.

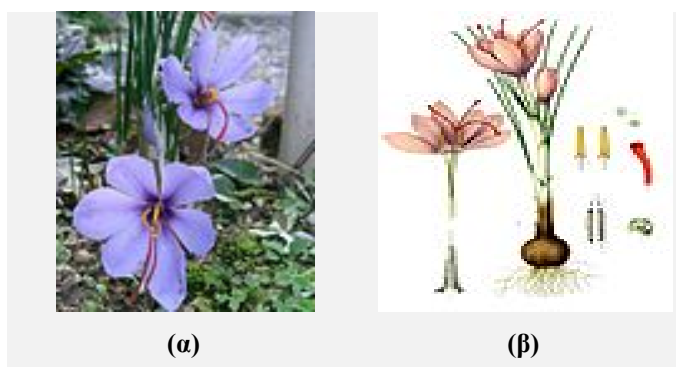
Στα διαλύματα από κόμμι τριγωνέλλας μειώνεται το ιξώδες με την αύξηση της υγρασίας και τα διαλύματα συμπεριφέρονται ως μη νευτώνεια ρευστά (ψευδοπλαστικά) με εξαίρεση τα πολύ αραιά (0.2%). Το ιξώδες σε μια δεδομένη συγκέντρωση είναι μικρότερο από ότι σε ένα διάλυμα από κόμμι γκουάρ και χαρουπιού, λόγω του μικρότερου μοριακού βάρους. Λόγω ενός πλήρως υποκατεστημένου σκελετού δεν αλληλεπιδρά με άλλους πολυσακχαρίτες (καραγενάνες ή ξανθάνη) για να προκύψει συνεργική αύξηση του ιξώδες και της ζελατινοποίησης. Η θωράκιση του σκελετού των μαννοζών από γαλακτόζη, έχει ως αποτέλεσμα ο σκελετός από πολυσακχαρίτες στην τριγωνέλλα να μην μπορεί να διασπαστεί από τις β-μαννάσες, η οποίες χρησιμοποιούνται για την μερικοί από πολυμέρηση άλλων γαλακτομαννανών.

Σε τέτοιες γαλακτομαννάνες με ισχυρά υποκατεστημένο σκελετό μαννοζών, μια αρχική αντίδραση με την α-γαλακτοσιδάση αφαιρεί κάποια μόρια γαλακτόζης, εκθέτοντας κάποια μόρια της αλυσίδας των μαννοζών στην β-μαννάση η οποία με την σειρά της διασπάει τον πολυσακχαρίτη, και έτσι προκαλείται μείωση του ιξώδες του διαλύματος.

Οι περισσότεροι διαλυτοί πολυσακχαρίτες έχουν ως ένα βαθμό την δυνατότητα να σταθεροποιούν τα γαλακτώματα, η οποία έχει αποδοθεί στις πηκτικές τους ιδιότητες όπως επίσης δεν προκαλούν μείωση στην επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση. Σε αντίθεση με αυτό τα διαλύματα τριγωνέλλας, έχουν την μοναδική ικανότητα να μειώνουν την επιφανειακή και την διεπιφανειακή τάση, η οποία συγκρίνεται με αυτή του αραβικού κόμμεος. Έχει προταθεί ότι μόρια πολυσακχαριτών σε πλήρη έκταση τοποθετούνται στα γαλακτοποιημένα μόρια ελαίου στο νερό, προστατεύοντάς τα από την συνένωση και την συσσωμάτωση. Αυτή η ιδιότητα σε συνδυασμό με την ικανότητα συγκράτησης υγρασίας, ανοίγει ενδιαφέρον δυνατότητες χρήσης κόμμι τριγωνέλλας στα καλλυντικά (Mathur and Mathur, 2005).

4. Ο Κρόκος Κοζάνης-Σαφράν (*Crocus Sativus*)

Το φυτό *Crocus Sativus*, ανήκει στην οικογένεια Iridaceae (Ιριδωδών) και αποτελεί ένα πολυετές φυτό χωρίς ποδίσκο που καλλιεργείται σε πολλές χώρες στον κόσμο όπως Ελλάδα, Ινδία και Ιράν. Ο εμπορικός κρόκος αποτελείται από τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα. Η αρχαιότερη προφανή αναφορά για την καλλιέργεια του κρόκου χρονολογείται το 2300 π.Χ. Ένας ακριβής προσδιορισμός του κρόκου έγινε το 1700-1600 π.Χ. στην μορφή μιας τοιχογραφίας στο παλάτι του Μίνωα, βασιλιά στην Κνωσό της Κρήτης. Ειδικοί πιστεύουν ότι ο κρόκος αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 7000 π.Χ. σε μια ασσυριακή βοτανολογική αναφορά. Από τότε στην διάρκεια 4000 χρόνων έχει καταγραφεί η χρήση του κρόκου στην θεραπεία πάνω από 90 ασθενειών. Στη Ελλάδα ο κρόκος καλλιεργήθηκε αρχικά στα νησιά του Αιγαίου ενώ στην νεώτερη Ελλάδα η καλλιέργεια ξεκινάει όταν Κοζανίτες έμποροι τον μετέφεραν από την Αυστρία τον 17^ο αιώνα. Τα άνθη έχουν έξι πέταλα, τρία εσωτερικά και τρία εξωτερικά που ενώνονται στο μακρύ σωλήνα που βγαίνει στο ανώτερο τμήμα της ωοθήκης. Το σχήμα των ανθέων είναι ίσο και κανονικό. Έχουν συνήθως μωβ χρώμα, ενώ σε άλλα είδη του κρόκου μπορεί να έχουν κίτρινο, άσπρο ή γαλάζιο. Στο κέντρο του άνθους υπάρχουν 3 κίτρινοι στήμονες και η ωοθήκη με το στύλο. Ο κρόκος είναι σε βλάστηση από τον Οκτώβρη μέχρι τον Μάιο και ανθίζει τον Οκτώβρη. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και γονιμοποιούνται από μέλισσες και πεταλούδες. Ο κρόκος αναπτύσσεται το ίδιο καλά τόσο σε ήπιο ηπειρωτικό όσο και μεσογειακό ηπειρωτικό κλίμα. Οι ιδανικές συνθήκες για την ανθοφορία είναι οι 18-20°C.





Εικόνα 10. Απεικόνιση φυτικών μερών *Crocus sativus* α) κατά Köhler ([Köhler's Medizinal-Pflanzen](#), 1897), β) άνθη, γ) στίγματα και δ) σπόροι (πηγή: Wikipedia).

4.1 Χημική σύσταση

Λόγω των πολλών ιατρικών χρήσεων ο κρόκος έχει χρησιμοποιηθεί για πολλές φυτοχημικές και βιοχημικές αναλύσεις ενώ πολλά βιοδραστικά του μόρια έχουν απομονωθεί. Στον πίνακα 3 φαίνεται η χημική σύσταση του κρόκου. Τα χαρακτηριστικά συστατικά του κρόκου είναι οι κροκίνες που είναι υπεύθυνες για το χρώμα, οι πικροκροκίνες που είναι υπεύθυνες για την πικρή γεύση και η σαφρανάλη που είναι υπεύθυνη για την οσμή και το άρωμα του κρόκου. Ο κρόκος περιέχει πάνω από 150 ουσίες που είναι πτητικές και προσδίδουν το άρωμά του. Επίσης ο κρόκος περιέχει μη πτητικές ενεργές ουσίες, οι περισσότερες εκ των οποίων είναι καροτενοειδή όπως το λυκοπένιο, ζεαξανθίνη και διάφορα α και β καροτενοειδή. Τα πτητικά συστατικά του κρόκου που έχουν πολλή έντονη οσμή αποτελούνται από πάνω από 34 συστατικά τα οποία είναι κυρίως τερπένια, αλκοόλες τερπενίων και οι εστέρες τους. Τα μη πτητικά συστατικά του περιλαμβάνουν 14 κροκίνες που είναι υπεύθυνες για το κόκκινο ή κοκκινο-καφέ χρώμα των στιγμάτων μαζί με καροτένια, κροκετίνες, την πικροκροκίνη (μια γλυκοζυδική πρόδρομη ένωση της σαφρανάλης) και την σαφρανάλη το κύριο οργανοληπτικό στοιχείο των στιγμάτων. Ωστόσο, το χρυσό κίτρινο χρώμα του κρόκου προέρχεται από μια α-κροκίνη.

Στον πίνακα 4 φαίνεται η χημική ανάλυση του κρόκου. Οι κροκίνες είναι μια σειρά από υδρόφιλα καροτενοειδή τα οποία είναι είτε μονογλυκοζυλ- οι δυγλυκοζυλπολυεστέρες κροκετίνης. Η κροκετίνη αποτελεί ένα συζευγμένο δικαρβοξυλικό οξύ πολυενίου το οποίο είναι υδρόφοβο και έτσι είναι λιποδιαλυτό. Όταν η κροκετίνη εστεροποιείται με δύο υδατοδιαλυτές γεντιοβιόζες (οι οποίες είναι σάκχαρα), έχει ως αποτέλεσμα ένα προϊόν το οποίο είναι υδατοδιαλυτό. Η παραχθείσα α-κροκετίνη είναι καροτενοειδής το οποίο αποτελεί περισσότερο από 10% του ξηρού βάρους του κρόκου. Οι δύο εστεροποιημένες γεντιοβιόζες κάνουν την

α-κροκετίνη ιδανική για την βαφή τροφίμων με βάση το νερό όπως το ρύζι. Μια υποθετική προ-κροκίνη από το φρέσκο φυτό αποσυντίθεται κατά την ξήρανση σε ένα μόριο κροκίνης και σε δύο μόρια πικροκροκίνης. Η κροκίνη κατά την υδρόλυση της παράγει γεντιοβιόζη και κροκετίνη, ενώ η πικροκροκίνη παράγει γλυκόζη και σαφρανάλη. Η πικρή πικροκροκίνη είναι υπεύθυνη για το άρωμα του κρόκου. Η πικροκροκίνη (χημικός τύπος $C_{16}H_{26}O_7$) είναι μια ενότητα από μια υποομάδα μιας αλδεΐδης που είναι γνωστή ως σαφρανάλη και ενός υδατάνθρακα. Έχει την ιδιότητα εντομοκτόνου και παρασιτοκτόνου και μπορεί να αποτελέσει έως 4% του ξηρού κρόκου. Η σαφρανάλη είναι λιγότερο πικρή από την πικροκροκίνη και μπορεί να αποτελέσει έως το 70% του πτητικού κλάσματος του ξηρού κρόκου. Ο ξηρός κρόκος είναι πολύ ευαίσθητος σε κυμαινόμενες τιμές pH και διασπάται γρήγορα χημικά στην παρουσία φωτός και μέσων οξείδωσης. Για τον λόγο αυτό πρέπει να αποθηκεύεται σε στεγανές συσκευασίες για να ελαχιστοποιηθεί η επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (Srivastava et al., 2010). Στην εικόνα 11 φαίνεται η δομή των κύριων συστατικών του κρόκου.

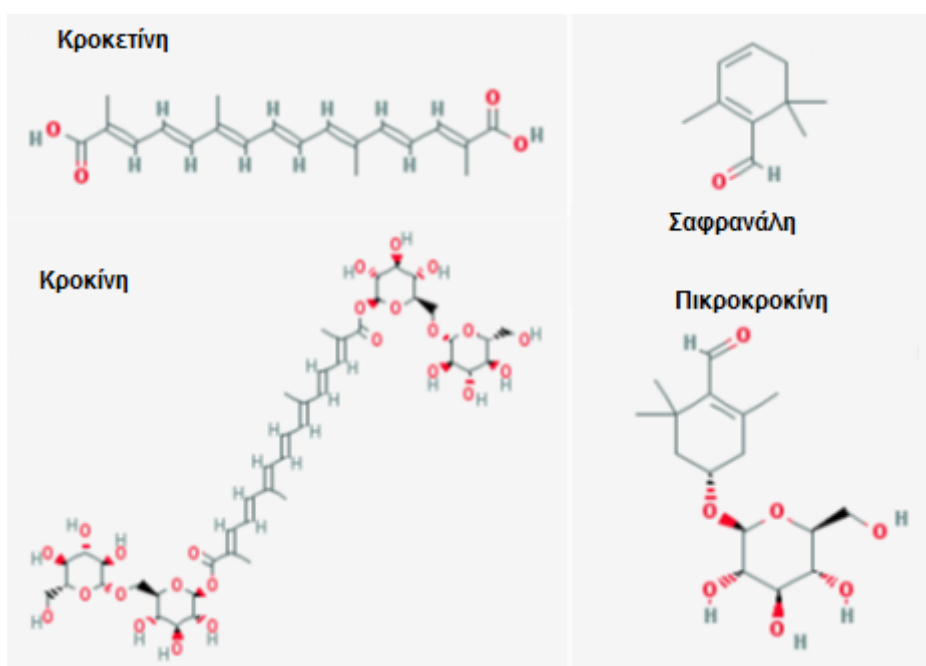
Πίνακας 3. Χημική σύσταση Κρόκου (Srivastava et al., 2010)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΑΖΑΣ (%)
Υδατάνθρακες	12-15
Νερό	9-14
Πολυπεπίδια	11-14
Κυτταρίνη	4-7
Λιπίδια	3-8
Ιχνοστοιχεία	1-1,5
Διάφορα, μη-νιτρικά	40

Πίνακας 4: Χημική ανάλυση Κρόκου (Srivastava et al., 2010)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΑΖΑΣ (%)
Υδατοδιαλυτά συστατικά	53
Κόμμι	10
Πεντοζάνες	8
Πηκτίνες	6
Άμυλο	6
α-κροκίνη	1-1,5
Καροτενοειδή	1

Λιπίδια	12
Μη πτητικά έλαια	6
Πτητικά έλαια	1
Πρωτεΐνη	12
Τέφρα	6
Νερό	10
Φυτικές ίνες	5



Εικόνα 11. Δομή των συστατικών του κρόκου (Mashmoul et al. 2013)

Ο ελληνικός “Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσεως”, στο άρθρο 42 που αναφέρεται στα “Είδη Κυρίως Αρτυμάτων” στην παράγραφο 6 γράφει: “Κρόκος” (κ.ν. Ζαφουρά ή Σαφράνι: Saffron) χαρακτηρίζονται τα αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού (*Crocus sativus* L.), που πρέπει να είναι απαλλαγμένα τμημάτων του στύλου ή άλλα μέρη του άνθους, καθώς και από στίγματα άλλων ειδών κρόκου ή άλλων λουλουδιών (π.χ. των φυτών *Carthamus tinctorius* L., *Calendula officinalis* L. κ.λπ.).

4.2 Ποιοτικές προδιαγραφές για το Σαφράν (κατά ISO 3632-1:1993 (E) και Ελληνικό Κώδικας Τροφίμων Ποτών)

4.2.1 Ορισμοί

Σαφράν σε νήματα : Είναι τα αποξηραμένα στίγματα των ανθέων του φυτού *Crocus sativus* L., που έχουν έντονο κόκκινο χρώμα, περιελίσσονται σε σχήμα κέρατος, οδοντωτά ή δαντελωτά στα άκρα τους. Το μήκος τους είναι από 20 έως 40 mm.

Μπορούν να είναι είτε μεμονωμένα είτε ενωμένα ανά δύο ή τρία στην άκρη ενός τεμαχίου στύλου, ερυθρού χρώματος.

Σαφράν σε κομμένα νήματα : Τα στίγματα αφαιρούνται μαζί με τους στύλους από το άνθος του *Crocus sativus* L., και διαχωρίζονται το ένα από το άλλο.

Κίτρινα νήματα : Είναι οι αποξηραμένοι κίτρινοι στήμονες των ανθέων του φυτού *Crocus sativus* L.

Υπολείμματα ανθέων : Κίτρινα νήματα, γύρη, στήμονες, μέρη ωοθήκης και άλλα μέρη του άνθους του φυτού *Crocus sativus* L.

Ξένες ύλες : Φύλλα στελέχη, άχυρα και άλλες φυτικές ύλες. Οι μόνες ορυκτές ύλες που είναι ανεκτές είναι άμμος, χρώμα και σκόνη.

4.2.2 Προδιαγραφές

Κατάταξη του Σαφράν στη μορφή ολοκλήρων νημάτων: Ο κρόκος σε πλήρη στίγματα κατατάσσεται σε τέσσερες κατηγορίες, σύμφωνα με τον πίνακα 5, με κριτήρια τα υπολείμματα ανθέων και το ποσό των ξένων υλών που περιέχει.

Γεύση - Άρωμα : Η γεύση του Σαφράν πρέπει να είναι ειδική, ελαφρά πικρή και λίγο πικάντικη. Το προϊόν πρέπει να είναι απαλλαγμένο από ξένες οσμές. Απουσία από μούχλες, έντομα κ.λ.π.: Το Σαφράν πρέπει να είναι απαλλαγμένο από έντομα, μούχλες, νεκρά έντομα, τεμάχια εντόμων και περιττώματα τρωκτικών, ορατών από το γυμνό μάτι.

Χημικά Χαρακτηριστικά: Ο κρόκος σε στίγματα ή σε σκόνη πρέπει να πληροί ορισμένες χημικές προδιαγραφές, όπως φαίνονται στον πίνακα 6.

4.2.3 Συσκευασία

Το Σαφράν σε νήματα ή σε σκόνη πρέπει να συσκευάζεται σε συσκευασία άκαμπτη, στεγανή, υγιεινή, καθαρή και να έχει κατασκευασθεί από υλικά που δεν επιτρέπουν την προσθήκη, αλλά ούτε και την αφαίρεση συστατικών του προϊόντος.

4.2.4 Επισήμανση

Σαφράν σε νήματα : Σε κάθε συσκευασία θα πρέπει να γράφονται οι ακόλουθες ενδείξεις :

- Το εμπορικό όνομα του προϊόντος, το βοτανικό όνομα και την αναφορά "ολόκληρα στίγματα" ("whole filaments").
- Όνομα και διεύθυνση του παραγωγού ή συσκευαστή.
- Κωδικός αριθμός του προϊόντος.
- Καθαρό βάρος του προϊόντος.

- Κατηγορία του προϊόντος.
- Όνομα παραγωγού χώρας.
- Οποιαδήποτε άλλη ένδειξη που απαιτείται από τον αγοραστή, όπως το έτος συγκομιδής και η ημερομηνία συσκευασίας (εάν είναι γνωστή).

Σαφράν σε σκόνη : Σε κάθε συσκευασία θα πρέπει να γράφονται οι ενδείξεις α) έως ε) όπως αναφέρθηκαν παραπάνω. Εάν το μέσο συσκευασίας είναι γυάλινα δοχεία, θα πρέπει να υπάρχει η ένδειξη "Εύθραστο - Γυαλί" ("Fragile-Glass") .

Ο ελληνικός “Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσεως”, στο άρθρο 42 που αναφέρεται στα “Είδη Κυρίως Αρτυμάτων” στην παράγραφο 6 γράφει : “Κρόκος” (κ.ν. Ζαφουρά ή Σαφράνι: Saffron) χαρακτηρίζονται τα αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού (*Crocus sativus* L.), που πρέπει να είναι απηλλαγμένα τμημάτων του στύλου ή άλλα μέρη του άνθους, καθώς και από στίγματα άλλων ειδών κρόκου ή άλλων λουλουδιών (π.χ. των φυτών *Carthamus tinctorius* L., *Calendula officinalis* L. κ.λ.π.).

Ο κρόκος πρέπει να περιέχει αιθέριο έλαιο σε ποσοστό τουλάχιστον 0,6%, υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τουλάχιστον 58% (υπολογιζόμενο σε ξερή ουσία), υγρασία όχι πάνω από 12,5%, τέφρα όχι πάνω από 7% και αδιάλυτα σε υδροχλωρικό οξύ συστατικά της τέφρας όχι πάνω από 1,5%. Επιπλέον η χρωστική ισχύς του κρόκου δέον πρέπει να είναι τέτοια ώστε μέρος του διηθήματος που λαμβάνεται μετά από παραμονή μερικών ωρών κρόκου σε χιλιαπλάσια ποσότητα νερού να χρωματίζει σαφώς κίτρινη χιλιαπλάσια ποσότητα νερού (τελική αραιώση 1:1.000.000) (<http://www.iama.gr/ethno/crocus/trntls.html>).

Πίνακας 5. Κατάταξη του κρόκου στη μορφή ολοκλήρων νημάτων (ISO/TS 3632-1)

Χαρακτηριστικά	Κατηγορίες			
	Extra I	II	III	IV
Υπολείμματα ανθέων % (m/m) max.	0,5	4	7	10
Ξένες ύλες % (m/m) max.	0,1	0,5	0,1	0,1

Πίνακας 6. Χημικά Χαρακτηριστικά του κρόκου σε στίγματα ή σε σκόνη (ISO/TS 3632-1)

Χαρακτηριστικά	Σαφράν σε νήματα	Σαφράν σε σκόνη
Υγρασία & πτητικές ουσίες, % (m/m) max.	12	10
Ολική τέφρα, %(m/m), σε ξηρό max..	8	8
Αδιάλυτη σε HCl τέφρα, %(m/m), σε ξηρό, max.		
Κατηγορία I, & II	1,0	1,0
Κατηγορίες III & IV	1,5	1,5
Διαλυτό εκχύλισμα σε κρύο νερό, %(m/m), σε ξηρό, max.	65	65
Απορρόφηση της πικροκροκίνης		
E ^{1%} _{1cm} στα 257 nm Κατηγορία I	70	70
Κατηγορία II	55	55
Κατηγορία III	40	40
Κατηγορία IV	30	30
Απορρόφηση της σαφρανάλης		
E ^{1%} _{1cm} στα 330 nm		
min.	20	20
max.	50	50
Απορρόφηση των κροκινών		
E ^{1%} _{1cm} στα 440 nm Κατηγορία I	190	190
Κατηγορία II	150	150
Κατηγορία III	110	110
Κατηγορία IV	80	80
Ολικό Άζωτο, %(m/m), σε ξηρό, max.	3,0	3,0
Ακατέργαστες ίνες, % (m/m), σε ξηρό, max.	6	6

4.3 Γενικά χαρακτηριστικά των κροκινών-αντιοξειδωτική δράση

Η κροκίνη (C₄₄O₄O₂₄) είναι ένας δι-εστέρας ο οποίος σχηματίζεται από τον δισακχαριτή ζεντιοβιόζη και το δικαρβοξυλικό οξύ κροκετίνη και θεωρείται από τα λίγα καροτενοειδή που απαντώνται στην φύση τα οποία είναι διαλυτά στο νερό. Η

κροκίνη έχει δείξει διάφορες φαρμακολογικές εφαρμογές όπως η χρήση ως αντιοξειδωτικό, κατά του καρκίνου, ενίσχυση της εκμάθησης και της μνήμης. Εκτός της υψηλής της δράσης ως αντιοξειδωτικό, το ξεχωριστό πορτοκαλο-κόκκινο χρώμα της έχει αξιοσημείωτες εφαρμογές σε βιομηχανική κλίμακα όπως χρωστική για την βαφή τροφίμων, συντηρητικό, παράγοντας λεύκανσης για την αξιολόγηση προ-οξειδωτικής δράσης σε τρόφιμα μέσω τκινητικής ανάλυσης και τέλος έχει χρησιμοποιηθεί ως αντί-γηραντικός παράγοντας στην βιομηχανία των καλλυντικών (Mashmoul et al. 2013).

4.3.1 Αντιοξειδωτική δράση κρόκου

Πολλές έρευνες πάνω στις ιατρικές ιδιότητες του κρόκου έχουν δείξει ότι ο κρόκος έχει πιθανή αντιοξειδωτική δράση η οποία οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη της κροκίνης, ενός μοναδικού καροτενοειδούς. Έχει βρεθεί ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων μεθανόλης και μεθανόλης-νερού (50:50 v/v) από τα στίγματα του κρόκου ήταν μεγαλύτερες από αυτές των καρότων και της τομάτας. Οι Kanakis et al. (2007) αναφέρουν ότι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των συστατικών του κρόκου είναι μικρότερη από ότι των BHT και Trolox, ειδικά της σαφρανάλης, αλλά όσον αφορά την κροκετίνη η δράση της ήταν πιο κοντά στα BHT και Trolox. Η αντιοξειδωτική δράση της διμεθυλο-κροκετίνης ήταν εξαρτώμενη από την συγκέντρωσή της, με μέγιστη δράση στα 40μg/mL. Όμως η συνεργιστική δράση όλων των βιοδραστικών μορίων του κρόκου του απέδωσαν σημαντικά αντιοξειδωτική δράση. Η κροκίνη έδειξε υψηλή δράση εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (50 και 65% για διαλύματα 500 και 1000ppm σε μεθανόλη, αντίστοιχα), στη συνέχεια ακολουθεί η σαφρανάλη (34% για το διάλυμα 500ppm) Η υψηλή δράση εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών αυτών των συστατικών μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα τους να δίνουν ένα μόριο υδρογόνου στην ρίζα DPPH (Mashmoul et al. 2013).

5. Οξείδωση

Η οξείδωση των λιπαρών στα τρόφιμα είναι μία χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ των ακόρεστων λιπαρών οξέων και του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης επηρεάζουν τόσο τις οργανοληπτικές ιδιότητες (γεύση, οσμή) όσο και τη διατροφική αξία των τροφίμων, ώστε πολύ συχνά αυτά να καθίστανται μη αποδεκτά και ακατάλληλα για κατανάλωση. Η χημική αυτή η αντίδραση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την βιομηχανία τροφίμων, καθώς τα παραπροϊόντα της οξείδωσης υποβαθμίζουν ποιοτικά τόσο τα ίδια τα έλαια, όσο και τα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρά, μειώνοντας έτσι τη διατηρησιμότητά τους.

Για τους λόγους αυτούς, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει εντατική έρευνα για την κατανόηση όχι μόνο των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια εξέλιξης αυτού του πολύπλοκου φαινομένου, αλλά και για την ταυτοποίηση των παραπροϊόντων της οξείδωσης και των συνθηκών που επηρεάζουν τον σχηματισμό τους.

5.1 Μηχανισμοί οξείδωσης

Η οξειδωτική υποβάθμιση των λιπαρών στα τρόφιμα οφείλεται κυρίως στην αυθόρμητη αντίδραση οξείδωσης, γνωστή με τον όρο αυτοοξείδωση (autoxidation). Η αυτοοξείδωση οφείλεται προκαλείται από την αντίδραση των ακόρεστων λιπαρών οξέων με μοριακό οξυγόνο και ολοκληρώνεται μέσω μιας αυτοκαταλυόμενης διαδικασίας. Ακολουθώντας μηχανισμό αλυσιδωτών αντιδράσεων μέσω ελευθέρων ριζών. Ο βασικός μηχανισμός της αντίδρασης έχει ευρέως μελετηθεί και περιλαμβάνει τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό (Choe and Min, 2006).

Η διαδικασία της αυτοοξείδωσης των λιπαρών οξέων είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο φαινόμενο και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ενδιάμεσων αντιδράσεων και παραγωγή ποικίλων προϊόντων. Για την κατανόηση του φαινομένου αυτού χρησιμοποιούνται συνήθως απλά μοντέλα λιπαρών οξέων όπως το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ. Τα λιπαρά αυτά οξέα λόγω της ύπαρξης διπλών δεσμών στο μόριο τους είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις συνθήκες αποθήκευσης, καθώς οξειδώνονται εύκολα προς σχηματισμό υδροξυπεροξειδίων.

Στο πρώτο στάδιο της αυτοοξείδωσης, την έναρξη, σχηματίζεται μια ρίζα υπεροξειδίου ($\text{RO}_2\cdot$), αλκοξυλίου ($\text{RO}\cdot$) ή αλκυλίου ($\text{R}\cdot$) ενός λιπαρού οξέος από τη δράση μιας ενεργής ρίζας, που περιέχει συνήθως οξυγόνο και η οποία αποσπά ένα άτομο

υδρογόνου, συνήθως από το μεθυλένιο της 1,4-πενταδιενικής ομάδας του λιπαρού οξέος (αντίδραση 1). Γενικά, η έναρξη της αυτοξειδωσης μπορεί να οφείλεται σε ελεύθερες ρίζες άγνωστης προέλευσης, ίχνη μετάλλων, επίδραση θέρμανσης ή ακτινοβολίας, οπότε αποσπάται το άτομο H από συγκεκριμένες θέσεις της αλυσίδας του λιπαρού οξέος.

Στο επόμενο στάδιο της διάδοσης, η ρίζα του λιπαρού οξέος ($R\cdot$), που δημιουργήθηκε στο πρώτο στάδιο είναι ιδιαίτερα ασταθής, και έτσι αντιδρά με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο για να σχηματιστεί μια υπεροξειδική ρίζα ενός λιπαρού οξέος, $RO_2\cdot$ (αντίδραση 2). Αυτή η ρίζα και η άλλη από το πρώτο στάδιο, αντιδρούν με ένα άλλο λιπαρό οξύ και σχηματίζεται πάλι μια ελεύθερη ρίζα, $R\cdot$ και ένα υδροξυπεροξειδίο, $ROOH$ (αντίδραση 3). Λόγω της σταθερότητας των υπεροξειδικών ριζών και με βάση τις τιμές των σταθερών του ρυθμού της αντίδρασης, προκύπτει ότι το περιοριστικό στάδιο στην όλη διαδικασία δημιουργίας νέων ριζών είναι το στάδιο απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από ένα άλλο λιπαρό οξύ. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όσο χρονικό διάστημα υπάρχουν σταθερά ακόρεστα λιπαρά οξέα, καθώς η νέα ρίζα που σχηματίζεται δρα με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

Ο σχηματισμός μιας ρίζας $RO\cdot$ είναι δυνατόν να συμβεί και από τη διάσπαση ενός λιπαρού οξέος μέσω ενός μονομοριακού μηχανισμού αντίδρασης, ο οποίος επιταχύνεται παρουσία μετάλλων ή ενώσεων που περιέχουν σίδηρο (αντίδραση 5). Στη συνέχεια η συγκέντρωση των υδροξυπεροξειδίων φτάνει σε ένα επίπεδο στο οποίο αρχίζει να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες μέσω ενός διμοριακού μηχανισμού αποικοδόμησης (αντίδραση 6). Η τελευταία αντίδραση είναι εξώθερμη, σε αντίθεση με την αντίδραση 5, η οποία είναι ενδόθερμη. Ωστόσο, η αντίδραση 6 δεν διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στο μηχανισμό της οξειδωσης, καθώς η οξειδωση των λιπαρών σε ένα τρόφιμο, το καθιστά δυσάρεστο στην γεύση και μη αποδεκτό. Οι αντιδράσεις 5 και 6 είναι παράπλευρες αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελεύθερων ριζών.

Σε θερμοκρασία δωματίου μια ρίζα μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό 100 μορίων υδροϋπεροξειδίων, προτού αρχίσουν οι αντιδράσεις τερματισμού του μηχανισμού της οξειδωσης (αντιδράσεις 7, 8, και 9). Παρουσία αέρα, όλες οι αλκυλικές ρίζες ($R\cdot$) μετατρέπονται σε υπεροξειδικές μέσω της ταχείας αντίδρασης 1. Επομένως, το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης ελεύθερων ριζών συμβαίνει, μέσω της αντίδρασης δύο υπεροξειδικών ριζών (αντίδραση 9). Οι αντιδράσεις τερματισμού 7 και 8, λαμβάνουν χώρα όταν το οξυγόνο βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα προϊόντα της οξείδωσης δεν γίνονται αντιληπτά από την αρχή, αλλά αφότου έχει περάσει ορισμένο χρονικό διάστημα. Αυτό συμβαίνει διότι αρχικά αυξάνονται με βραδύ ρυθμό λόγω της αντίστασης του υποστρώματος στην οξείδωση, ενώ κατόπιν η αύξησή τους είναι εκθετική (Belitz and Grosch, 1999).

Στάδια αυτοοξείδωσης

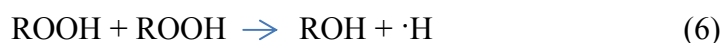
α) Στάδιο έναρξης



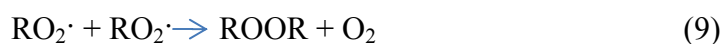
β) Στάδιο διάδοσης



Πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις



γ) Στάδιο Τερματισμού



5.2 Σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων – Πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης

Οι υπεροξειδικές ρίζες ($\text{RO}_2\cdot$) που σχηματίζονται στο στάδιο της έναρξης (αντίδραση 1) ή στο πρώτο στάδιο της διάδοσης της αυτοοξείδωσης (αντίδραση 2) αντιδρούν με αργό ρυθμό και αποσπών επιλεκτικά ένα άτομο υδρογόνου από την ανθρακική αλυσίδα ενός λιπαρού οξέος προς σχηματισμό υδροϋπεροξειδίου, ROOH (αντίδραση 3). Τα υδροϋπεροξειδία από την αυτοοξείδωση του ελαϊκού, λινελαϊκού και λινολενικού οξέος έχουν προσδιοριστεί πλήρως. Τα υδροϋπεροξειδία που σχηματίζονται από την αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος με το $^1\text{O}_2$ είναι στις θέσεις που υπάρχουν αρχικά οι διπλοί δεσμοί στο μόριο του λιπαρού οξέος. Το $^1\text{O}_2$ σχηματίζει συζυγή και μη συζυγή υδροϋπεροξειδία από την αντίδραση του με την ελεύθερη ρίζα του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος. Η αντίδραση με το $^3\text{O}_2$ οδηγεί στον σχηματισμό μόνο συζυγών υδροϋπεροξειδίων (Belitz and Grosch, 1999).

5.3 Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης

Τα υδροϋπεροξειδία όπως αναφέρθηκε, είναι τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, τα οποία είναι σχετικά σταθερές ενώσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο, παρουσία ιόντων μετάλλων ή υψηλής θερμοκρασίας, αυτά διασπώνται σε αλκοξυλικές ρίζες (RO[·]) και κατόπιν σχηματίζουν έναν μεγάλο αριθμό δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, όπως αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες (Frankel, 1987).

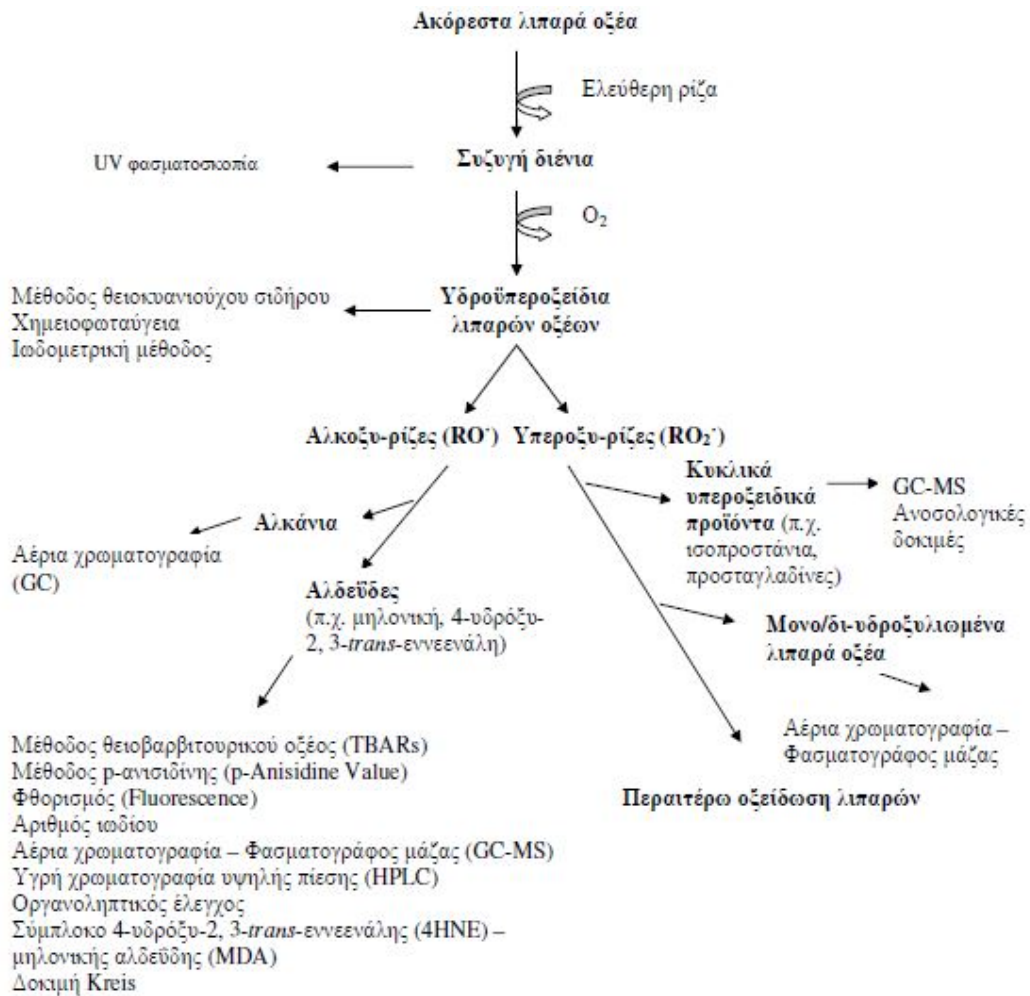
Τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης είναι άοσμα και άγευστα, οπότε η ποιότητα των τροφίμων δεν επηρεάζεται από αυτά. Η οξείδωση των τροφίμων γίνεται αντιληπτή όταν σχηματιστούν τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης και κυρίως τα πτητικά προϊόντα, ορισμένα από τα οποία παρουσιάζουν δυσάρεστη οσμή και γεύση ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων ξεκινά σχεδόν από την στιγμή που αυτά σχηματίζονται. Στα πρώτα στάδια της αυτοοξείδωσης, ο ρυθμός σχηματισμού τους υπερβαίνει το ρυθμό διάσπασής τους, γεγονός που αντιστρέφεται στα επόμενα στάδια της οξείδωσης. Ο χρόνος που απαιτείται για την έναρξη του σχηματισμού των δευτερογενών προϊόντων ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών ελαίων. Έτσι μπορεί να σχηματίζονται άμεσα από τη στιγμή που δημιουργούνται τα υδροϋπεροξειδία στο ελαιόλαδο, ενώ στο ηλιέλαιο, ο σχηματισμός τους ξεκινά από τη στιγμή που ο αριθμός των υδροϋπεροξειδίων έχει φτάσει μια ικανοποιητική συγκέντρωση (Guillen and Cabo, 2002).

5.4 Μέθοδοι μέτρησης των προϊόντων της οξείδωσης

Η οξείδωση των λιπαρών οξέων οδηγεί στο σχηματισμό μιας πληθώρας προϊόντων, για τη μέτρηση των οποίων αναπτύχθηκαν αρκετές μέθοδοι. Οι αλλαγές στις χημικές, φυσικές, και οργανοληπτικές ιδιότητες των λιπών και ελαίων που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της αποθήκευσης χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τον βαθμό της οξείδωσης. Αυτό που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι καμιά μέθοδος δεν δίνει την δυνατότητα να μετρηθούν όλα τα προϊόντα της οξείδωσης απευθείας, καμιά δεν είναι κατάλληλη να μετρήσει σε όλα στα στάδια της οξείδωσης όπως επίσης δεν είναι όλες κατάλληλες για τους ίδιους τύπους τροφίμων. Κάθε μια από τις μεθόδους προσδιορισμού είναι επιλεκτική για τον προσδιορισμό ορισμένων προϊόντων και μόνο, ενώ μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για συγκεκριμένα συστήματα, υπό ορισμένες συνθήκες. Για τον λόγο αυτό, συνιστάται ο συνδυασμός μεθόδων, έτσι

ώστε να υπάρχει μια ολοκληρωμένη εικόνα του φαινομένου της οξείδωσης. Οι διαθέσιμες μέθοδοι των προϊόντων της οξείδωσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η μια ομάδα αποτελείται από τις μεθόδους που μετρούν τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης και η άλλη αποτελείται από τις μεθόδους που μετρούν τα δευτερογενή προϊόντα. Στην εικόνα 12 φαίνονται οι μέθοδοι μέτρησης της οξείδωσης (Moore and Roberts II, 1998).



Εικόνα 12. Μέθοδοι μέτρησης της οξείδωσης λιπαρών οξέων (Moore and Roberts II, 1998)

6. Υλικά & Μέθοδοι

Για την παρασκευή γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) Lacrodan DI-9224 (Arla Foods Ingredients, Amba-Denmark). Η χημική σύσταση του προϊόντος και οι ιδιότητές του (σύμφωνα με τον παρασκευαστή) παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.
- Κόμμι τριγωνέλλας (Frutarom SA, Belgium)
- Ελαιόλαδο Άλτις (Elais Unilever, Ελλάδα)
- Κρόκος Κοζάνης (Αναγκαστικός Συνεταιρισμός Κροκοπαραγωγών Κοζάνης)

Πίνακας 7: Σύσταση και ιδιότητες του WPI Lacrodan DI-9224

ΧΗΜΙΚΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ		ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΑ	ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
Πρωτεΐνη	ελάχιστο 92 %	Νάτριο (Na) 0.5 %	pH (δ/μα 10%) 6.5-7	Υψηλή διαλυτότητα σε μεγάλο εύρος pH
Λακτόζη	μέγιστο 0.2 %	Φώσφορος (P) 0.2 %	Φαινόμενη πυκνότητα 0.4 g/cm ³	Σχεδιασμένο για διαλύματα ουδέτερου pH
Λίπος	μέγιστο 0.2 %	Χλώριο (Cl) 0.05%	Χρώμα Σκόνης λευκό έως υποκίτρινο	Δίνει διάφανα διαλύματα με χαμηλό ιξώδες
Τέφρα	μέγιστο 4.5 %	Κάλιο (K) 1.3 %	Χρώμα διαλύματος 10 % διάφανο	Ουδέτερη γεύση
Υγρασία	μέγιστο 6 %	Ασβέστιο (Ca) 0.1 %	Γεύση και άρωμα ήπια	Χαμηλό περιεχόμενο σε λίπος και υδατάνθρακες
Δείκτης διαλυτότητας 0.1 mL				

6.1 Πιστοποίηση του κρόκου κατά ISO

Για την πιστοποίηση της ποιότητας του κρόκου χρησιμοποιήθηκε το ISO/TS 3632-2:2003 (E). Αρχικά έγινε ο προσδιορισμός της υγρασίας του κρόκου. Στην αρχή προθερμάνθηκε ο φούρνος στους $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το καψίδιο τοποθετήθηκε στον φούρνο για περίπου 1 ώρα για την αποφυγή ύπαρξης υγρασίας. Στην συνέχεια ζυγίστηκε το καψίδιο μαζί με το καπάκι του και έγινε καταγραφή του βάρους. Μετά τοποθετήθηκε μέσα ποσότητα κρόκου 0.5 g με ακρίβεια 0.001 g και ακολούθησε δεύτερη ζύγιση. Στη συνέχεια το καψίδιο τοποθετήθηκε στον φούρνο όπου αφαιρέθηκε το καπάκι και παρέμεινε για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών τοποθετήθηκε πάλι το καπάκι και μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα για να κρυώσει. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ζύγιση και η ποσότητα της υγρασίας (w_{MV}) υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$w_{MV} = (m_0 - m_4) * \frac{100}{m_0} \% \quad (4)$$

Όπου, m_0 η αρχική ποσότητα του κρόκου σε g και m_4 η ποσότητα του κρόκου μετά την ξήρανση σε g.

Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός των χαρακτηριστικών του κρόκου. Αρχικά ζυγίστηκαν 100 mg κρόκου και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη περίπου 180 mL απιονισμένου νερού και η φιάλη καλύφτηκε με αλουμινόχαρτο για να υπάρχει απουσία φωτός και έγινε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 1 ώρα, μετά την ανάδευση συμπληρώθηκε η υπόλοιπη ποσότητα απιονισμένου νερού μέχρι την χαραγή της φιάλης. Μετά την ανάδευση ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 min. Μετά την φυγοκέντρηση 10 mL από το διάλυμα τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο ώστε να βεβαιωθεί ότι δεν υπάρχουν στερεά σωματίδια και το διάλυμα είναι διαυγές. Τέλος, ακολούθησε φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης όπου έγινε καταγραφή της καμπύλης απορρόφησης από τα 200 nm έως τα 700 nm. Από την καμπύλη που καταγράφηκε σημειώθηκε η απορρόφηση (D) στις εξής τρεις κορυφές:

$E_{1cm}^{1\%} 257nm$: απορρόφηση στα 257 nm (μέγιστη απορρόφηση της πικροκροκίνης)

$E_{1cm}^{1\%} 330nm$: απορρόφηση στα 330 nm (μέγιστη απορρόφηση της σαφρανάλης)

$E_{1cm}^{1\%}$ 440nm: απορρόφηση στα 440 nm (μέγιστη απορρόφηση των κροκινών)

Ενώ για την πιστοποίηση του κρόκου χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{D \cdot 10000}{m(100-H)} \quad (5)$$

Όπου, D η απορρόφηση της κάθε κορυφής, m η μάζα του κρόκου σε g και H η υγρασία του δείγματος.

6.2 Παρασκευή γαλακτωμάτων

Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιήθηκε υπερσυμπύκωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Ζυγίστηκαν 10 g σκόνης WPI τα οποία διαλύθηκαν σε κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού (ανάλογα με τη μετέπειτα συγκέντρωση ελαιολάδου) και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 90 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ως αντιβακτηριακός παράγοντας προστέθηκε στα διαλύματα αζίδιο του νατρίου 0.02 % wt Τα διαλύματα πρωτεΐνης και κόμμεος τριγωνέλλας αποθηκεύτηκαν στους 5 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας για την πλήρη ενυδάτωσή τους.

Για την παρασκευή των μακρο-γαλακτωμάτων (συνολικής μάζας 50 g) αναμίχθηκαν κατάλληλες ποσότητες διαλυμάτων πρωτεΐνης ορού και ελαιολάδου με τη χρήση συσκευής ομογενοποίησης υψηλής διάτμησης Ultraturrax T25 (IKA Werke, Staufen, Germany) σε ταχύτητα 13.500 rpm για 2 min.

Στη συνέχεια, 10 ml περίπου του κάθε μακρο-γαλακτώματος μεταφέρθηκαν στο ειδικά διαμορφωμένο ποτήρι του της συσκευής υπερήχων το οποίο είχε διπλό τοίχωμα το οποίο επέτρεπε την ανατροφοδοσία νερού έτσι ώστε η θερμοκρασία να παραμένει σταθερά στους 30 °C. Αυτό έγινε με την προσθήκη πάγου στο ποτήρι ανατροφοδοσίας του νερού. Ακολούθησε ομογενοποίηση με τη χρήση συσκευής υπερήχων. Το ειδικά διαμορφωμένο ποτήρι τοποθετήθηκε έτσι ώστε το άκρο της κυλινδρικής κεφαλής από τιτάνιο (διαμέτρου 13 mm) να βυθιστεί στο κέντρο του και σε βάθος 1 cm. Η συσκευή υπερήχων λειτουργούσε υπό σταθερές συνθήκες (συχνότητα 20 kHz, ποσοστό του πλάτους πίεσης 40%, και θερμοκρασία 30 °C). Η συσκευή υπερήχων δίνει τη δυνατότητα καθορισμού του πλάτους (65% μέγιστο ποσοστό πλάτους για τη συγκεκριμένη κεφαλή). Παράλληλα, εμφανίζει την ενέργεια (kJ) που εισάγεται στο δείγμα κατά την ομογενοποίηση. Στα παραγόμενα γαλακτώματα (μάκρο- ή νάνο-γαλακτώματα) προστέθηκε διάλυμα κόμμεως τριγωνέλλας 2% σε αναλογία 1:1 (κατά βάρος) και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 1 min. Τέλος, το pH των γαλακτωμάτων ρυθμίστηκε με την προσθήκη μερικών σταγόνων οξικού οξέος (50 % wt) μέχρι τελικού pH 3.8. Στον πίνακα 8 που ακολουθεί φαίνεται η σύσταση των γαλακτωμάτων που παράχθηκαν τελικώς.

Πίνακας 8: Τελική σύσταση των γαλακτωμάτων

Τύπος γαλακτώματος	Ελαιόλαδο (% wt)	Σκόνη πρωτεΐνης ορού (% wt)	Κόμμι τριγωνέλλας (% wt)
Μακρο-γαλακτώματα			
2.5%	2.5	10	0.5, 0.75 & 1.0
5%	5	10	0.5, 0.75 & 1.0
10%	10	10	0.5, 0.75 & 1.0
Νάνο-γαλακτώματα			
2.5%	2.5	10	1.0
5%	5	10	1.0
10%	10	10	1.0

Συνολικά δηλ, παρασκευάστηκαν μακρο-γαλακτώματα με συγκέντρωση κόμμεος 0.5, 0.75 και 1 % wt τα οποία περιείχαν τελικώς 2.5, 5 και 10 % wt ελαιόλαδο. Επίσης, για συγκέντρωση 1 % wt κόμμεος παρασκευάστηκαν ομόλογα νανο-γαλακτώματα με διάφορες συγκεντρώσεις ελαιολάδου (2.5, 5 και 10 % wt).

6.3 Εκτίμηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων (zetasizer)

Για τη μέτρηση του μεγέθους των μακρο-γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή σκέδασης φωτός (Mastersizer 2000, Malvern, UK). Τα λιποσφαίρια του γαλακτώματος χαρακτηρίστηκαν κάτω από συνθήκες υψηλής αραιώσης, με την διασπορά των δειγμάτων σε μια δεξαμενή γεμισμένη με υδροχλωρικό οξύ σε pH 3. Οι δείκτες διάθλασης του νερού και του ελαιολάδου ελήφθησαν ως 1.330 και 1.47 αντίστοιχα, και για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η θεωρία του Mie. Υπολογίστηκαν η μέση διάμετρος (κατά όγκο) D_{50} και ο δείκτης πολυδιασποράς Span σύμφωνα με την εξίσωση

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (6)$$

Όπου D_{90} , η μέση διάμετρος των σωματιδίων που αντιστοιχούν στο 90% του όγκου, D_{10} , η μέση διάμετρος των σωματιδίων που αντιστοιχούν στο 10% του όγκου και D_{50} η μέση διάμετρος των σωματιδίων που αντιστοιχούν στο 50% του όγκου.

Οι μετρήσεις του μεγέθους των λιποσφαιρίων των νανο-γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκαν με την χρήση δυναμικού αναλυτή σκέδασης φωτός (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). Αυτή η τεχνική μετράει την ένταση της διακύμανσης του

σκεδαζόμενου φωτός από τα σωματίδια όταν αυτά υποβληθούν σε κίνηση Brownian. Από την ένταση της διακύμανση υπάρχει η δυνατότητα να μετρηθεί ο χρόνος συνοχής T_c , πράγμα που δίνει την δυνατότητα να βρεθεί η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης g_1 . Η συνάρτηση αυτή μειώνεται εκθετικά με την χρόνο καθυστέρησης τ . Για ένα γαλάκτωμα με μια μόνο διεσπαρμένη φάση, μια γραφική παράσταση του $\ln(g_1)$ προς το τ δίνει μια ευθεία γραμμή της οποίας η κλίση συσχετίζεται με τον συντελεστή διάχυσης D . Από τον συντελεστή D μπορεί να υπολογιστεί η ακτίνα των λιποσφαιρίων R με χρήση την εξίσωση των Stokes-Einstein. Για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί το zetasizer διαλύματα πρέπει να αραιωθούν έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι η απόσταση των λιποσφαιρίων μεταξύ τους είναι συγκρίσιμη με αυτή του laser που χρησιμοποιείται (633 nm). Τα γαλακτώματα αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό πριν από κάθε μέτρηση μέχρι συγκέντρωσης 0.05%. Επίσης η αραιώση έχει το πλεονέκτημα ότι το γαλάκτωμα αποκτά ιξώδες ίσο με του νερού οπότε διευκολύνονται και οι μετρήσεις. Μετρήθηκαν η μέση διάμετρος (z-average) και η πολυδιασπορά των νανο-γαλακτωμάτων (Polydispersity Index, PDI). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές.

6.4 Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση υπό ψύξη

Η εκτίμηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων έγινε με τη χρήση του αναλυτή κάθετης σάρωσης (Turbiscan MA 2000) κατά την αποθήκευσή τους στους 5 °C για 10 συνεχόμενες ημέρες και στη συνέχεια κάθε δέκα μέρες για συνολικά ένα μήνα. Η συσκευή πολλαπλής σκέδασης του φωτός επιτρέπει τον οπτικό χαρακτηρισμό κάθε είδους αιωρήματος μέσω μιας κινητής κεφαλής ανάγνωσης που αποτελείται από μία δίοδο εκπομπής ακτινοβολίας στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου ($\lambda=850$ nm) και δύο σύγχρονους ανιχνευτές της διερχόμενης μέσω του δείγματος (T , transmitted) και σκεδαζόμενης (BS , backscattered) ακτινοβολίας με λήψεις κάθε 40 μm σε όλο το ύψος του δείγματος. Ο πρώτος αισθητήρας βρίσκεται 180° από το σημείο εκπομπής της ακτινοβολίας, ενώ ο ανιχνευτής σκέδασης 45° πίσω από το σημείο πρόπτωσης της ακτινοβολίας. Το πρόγραμμα του Turbiscan προσφέρει τη δυνατότητα ρύθμισης σε λειτουργία σάρωσης (scanning mode), κατά την οποία η κεφαλή ανάγνωσης σαρώνει το δείγμα και εμφανίζει στην οθόνη τις καμπύλες σκεδαζόμενης και διερχόμενης ακτινοβολίας συναρτήσει του ύψους του δείγματος. Η σάρωση επαναλαμβάνεται κάθε 24 ώρες, παρέχοντας και διαφορετική καμπύλη, έτσι ώστε συγκεντρώνοντας όλες τις καμπύλες σε ένα γράφημα προκύπτει το προφίλ

σταθερότητας/αποσταθεροποίησης των δειγμάτων με το χρόνο. Παράλληλα, είναι δυνατή η ρύθμιση του μακρο-γράμματος σε λειτουργία αναφοράς (reference mode), κατά την οποία ουσιαστικά “αφαιρείται” η πρώτη καμπύλη από τις ακόλουθες και έτσι φαίνεται η απόκλιση/μεταβολή σε σχέση με την αρχική κατάσταση, δηλαδή η μείωση ή αύξηση στη σκέδαση με προφίλ αναφοράς το πρώτο ($t = 0$). Οι καμπύλες της διερχόμενης ακτινοβολίας (Transmission, T) χρησιμοποιούνται συνήθως για διαυγή έως και θολά αιωρήματα, ενώ αυτές της σκέδασης για την ανάλυση αδιαφανών δειγμάτων, όπως τα υπό εξέταση γαλακτώματα.

Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σχετίζεται με την ποσότητα των λιποσφαιρίων μέσα στο γαλάκτωμα, ώστε αύξηση του ποσοστού σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στον πυθμένα του σωλήνα υποδηλώνει αύξηση των λιποσφαιρίων στον πυθμένα, δηλαδή καθίζηση. Αντίθετα, η μείωση υποδηλώνει αποκορύφωση. Μεταβολή της σκέδασης κατά το ύψος του δείγματος υποδεικνύει μία γενικευμένη μεταβολή του αριθμού των σωματιδίων, άρα συνένωση. Αν το προφίλ σκέδασης δε μεταβάλλεται σημαντικά με το χρόνο και σε όλο το μήκος του δείγματος, ο αριθμός των λιποσφαιρίων και των διεπιφανειών παραμένει ο ίδιος, δε λαμβάνουν δηλαδή χώρα φαινόμενα αποσταθεροποίησης.

Δείγματα των γαλακτωμάτων, όγκου 6 ml περίπου, τοποθετήθηκαν σε γυάλινους σωλήνες και σαρώθηκαν από τον πυθμένα τους μέχρι το ύψος των 80 mm, σε καθημερινή βάση, ώστε να ληφθούν τα αντίστοιχα προφίλ εκπομπής και σκέδασης καθημερινά για σύνολο 10 ημερών, και κάθε δέκα μέρες για σύνολο ένα μήνα. Μέσω αυτών, υπολογίστηκε στη συνέχεια η αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων λόγω φαινομένων όπως η αποκορύφωση, η καθίζηση και η συνένωση.

Η αστάθεια ενός γαλακτώματος που εκδηλώνεται με διαύγαση στον πυθμένα του σωλήνα και την εμφάνιση στοιβάδας ορού (serum layer), εκφράζεται με τον δείκτη συναίρεσης (Serum Index, SI), ο οποίος υπολογίζεται από το ύψος της στοιβάδας ορού (Hs) και το συνολικό ύψος του γαλακτώματος μέσα στο σωλήνα (He) σύμφωνα με τη σχέση:

$$SI \% = (Hs) / (He) \times 100 \quad (7)$$

Το ύψος της στοιβάδας ορού και του δείγματος υπολογίστηκαν μέσω του μέγιστου πάχους (peak thickness) και του ύψους του μηνίσκου αντίστοιχα, όπως φαίνονται στις καμπύλες σκέδασης στη λειτουργία αναφοράς. Το ύψος της στοιβάδας ορού προσδιορίστηκε ως το ύψος που αντιστοιχεί σε μείωση 50% του αρχικού ποσοστού σκέδασης (Zinoviadou et al. 2012).

6.5 Μέτρηση του ιξώδους και της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς

Με τη χρήση υβριδικού ρεόμετρου (Discovery HR-3 Hybrid Rheometer, TA instruments, United States) και γεωμετρίας παράλληλων πλακών ελήφθησαν καμπύλες ιξώδους των σταθερών μακρο- και νανο-γαλακτώματων για ρυθμό διάτμησης $0.1 - 1000 \text{ s}^{-1}$. Το διάκενο ρυθμίστηκε στα 1 mm και η διάμετρος της άνω πλάκας ήταν 20 mm. Η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) με κυκλοφορία νερού από κυκλοφορητή σταθερής θερμοκρασίας. Η συνολική διάρκεια της μέτρησης ήταν 900 s. Επίσης μελετήθηκαν οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες των δειγμάτων εντός της ιξωδοελαστικής περιοχής. Αρχικά βρέθηκε η ιξωδοελαστική περιοχή των δειγμάτων με σάρωση της περιοχής για ρυθμό διάτμησης από 0.001 έως 10 s^{-1} (υπό σταθερή συχνότητα 1 Hz), ενώ ακολούθησε ο προσδιορισμός των συντελεστών απώλειας (G'' , Loss modulus) και αποθήκευσης (G''' , Storage modulus) για ρυθμό διάτμησης 0.1 s^{-1} σε περιοχή γωνιακής συχνότητας από 0.1 έως 100 rad/s. Η συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τις μεταβολές ρεολογία των δειγμάτων. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα αμέσως μετά την παρασκευή τους και πριν εμφανιστεί διαχωρισμός φάσεων.

6.6 Οργανοληπτικός έλεγχος για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας κρόκου

Για την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης κρόκου προκειμένου να προστεθεί στα γαλακτώματα πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος σε πρότυπα προϊόντα μαγιονέζας του εμπορίου με χαμηλά λιπαρά (Hellmann's light mayonnaise, Unilever) συσκευασίας 450 g. Ο κρόκος προστέθηκε στο παραπάνω πρότυπο υπό μορφή σκόνης σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις 50, 100, 150, 200, 250 και 300 mg/1000 g μαγιονέζας και να μίγματα αναδεύτηκαν για ομογενοποίηση. Το χρώμα των δειγμάτων μετρήθηκε με τη χρήση φορητού χρωματόμετρου (Minolta, Model CR-200, Osaka, Japan) και εκφράστηκε με την παράμετρο φωτεινότητας L (Lightness), την παράμετρο a για το κόκκινο και πράσινο χρώμα και τη b για το κίτρινο και μπλε χρώμα. Για το οργανοληπτικό τεστ τα 6 δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικό πιάτο με τριπήφια κωδικοποίηση. Η ομάδα των δοκιμαστών αποτελούνταν από 39 δοκιμαστές, φοιτητές και μέλη του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου. Στους δοκιμαστές δόθηκε ένα φυλλάδιο για να αξιολογήσουν τα 6 δείγματα, 2 κριτσίνια για να συνοδεύσουν τα δείγματα και ένα ποτήρι νερό για να

ξεπλύνουν το στόμα τους μεταξύ των δειγμάτων. Η αξιολόγηση των δειγμάτων έγινε με χρήση της 9βάθμιας κλίμακας αρεσκείας των χαρακτηριστικών των δειγμάτων (χρώμα, άρωμα, γεύση, ένταση πικρότητας, επίγευση, συνολική εντύπωση) (1: δε μαρέσει καθόλου, 9: μ'αρέσει πάρα πολύ). Μετά την συλλογή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων ακολούθησε στατιστική ανάλυση με το λογισμικό StatGraphics Centurion και εφαρμόστηκε το τεστ LSD (Least Significant Difference) με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

6.7 Μέθοδοι μέτρησης της οξείδωσης

Για τη μελέτη της οξείδωσης τα παραχθέντα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας σε θερμοκρασία 25 °C για 4 εβδομάδες. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα σταθερά μακρο-γαλακτώματα με 1% wt συγκέντρωση κόμμεος τριγωνέλλας και στα ομόλογά τους νανο-γαλακτώματα. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης ποσότητας Κρόκου Κοζάνης στα νανο-γαλακτώματα με 5 % wt συγκέντρωση ελαιολάδου τα οποία προσομοίαζαν περισσότερο με ένα προϊόν της κατηγορίας των επικαλύψεων σαλάτας με εξαιρετικά χαμηλά λιπαρά. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε φρέσκα και αποθηκευμένα δείγματα σε εβδομαδιαία βάση.

6.7.1 Μέθοδος μέτρησης συζυγών διενίων

Τα συζυγή διένια αποτελούν πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Mei et al. (1998). Αρχικά, 50 μL από το κάθε γαλάκτωμα μεταφέρθηκαν σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα όπου τοποθετήθηκαν 4 mL διαλυτών μεθανόλης/βουτανόλης (2:1, v/v). Ακολούθησε καλή ανάδευση των δειγμάτων σε vortex για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 min. Επειδή η πρωτεΐνη προκαλεί θολερότητα στο δείγμα και μπορούσε να παρεμποδίσει την μέτρηση της απορρόφησης μετά την φυγοκέντρηση παραλαμβάνονταν η οργανική φάση και ακολουθούσε διήθηση της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές σύριγγες του 1 mL και το διήθημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των συζυγών διενίων. Στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 233 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες κυψελίδες του 1.5 mL. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν μέσω της απορρόφησης (Abs_{233}).

6.7.2 Μέθοδος μέτρησης p-ανισιδίνης

Η μέθοδος του βαθμού ανασιδίνης χρησιμοποιείται για την μέτρηση των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε με την τοποθέτηση 0.25 g p-ανισιδίνης σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και την συμπλήρωσή της μέχρι την χαραγή με οξικό οξύ (100%). Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για 5 min με μαγνητικό αναδευτήρα και αποθήκευση απουσία φωτός. Ποσότητα 0.5 g από κάθε γαλάκτωμα τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα όπου τοποθετήθηκαν 12.5 mL ισοοκτάνιο. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση 5 mL από την καθαρή οργανική φάση τοποθετήθηκαν σε καινούργιο πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 350 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) (A_1). Άλλα 5 mL από την καθαρή οργανική φάση τοποθετήθηκαν σε καινούργιο πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος ήταν καλυμμένος με αλουμινόχαρτο καθώς αυτό το βήμα της μεθόδου απαιτεί την απουσία του φωτός. Στο σωλήνα αυτό τοποθετήθηκε επίσης 1 mL διαλύματος p-ανισιδίνης. Μετά από παραμονή για 10 min. μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 233 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (A_2). Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες κυψελίδες του 1.5 mL. Ο υπολογισμός του βαθμού ανισιδίνης (Anisidine Value, AV) έγινε με βάση την εξίσωση (AOCS CD 18-90, 1998)

$$AV = 25 * \frac{(1.2A_2 - A_1)}{m} \quad (8)$$

Όπου A_1 και A_2 οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν και m η ποσότητα του γαλακτώματος σε g

7. Αποτελέσματα & Συζήτηση

7.1 Πιστοποίηση του κρόκου κατά ISO

Στον Πίνακα 9 απεικονίζονται οι χημικές προδιαγραφές που πρέπει να πληρεί ο κρόκος με βάση το πρότυπο ISO/TS 3632-1, όπως επίσης και οι διαμορφωμένες ποιότητες.

Πίνακας 9: Χημικά χαρακτηριστικά του κρόκου σε στίγματα

Χαρακτηριστικά	I	II	III
Περιεκτικότητα σε υγρασία και πτητικές ουσίες, ποσοστό μάζας % max	12	12	12
κρόκος σε στίγματα			
Απορρόφηση της πικροκοκίνης $E^{1\%}_{1cm}$ στα 257nm	70	55	40
Απορρόφηση της σαφρανάλης $E^{1\%}_{1cm}$ στα 330nm			
min	20	20	20
max	50	50	50
Απορρόφηση των κροκινών $E^{1\%}_{1cm}$ στα 440nm	190	150	100

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ποιοτικών χαρακτηριστικών του δείγματος κρόκου που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία, όπως ορίζονται με βάση τις μεθόδους κατά το πρότυπο ISO/TS 3632-2.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα με βάση τις μεθόδους που ορίζονται από το ISO/TS 3632-2

Χαρακτηριστικά	Αποτελέσματα	
Περιεκτικότητα σε υγρασία και πτητικές ουσίες, ποσοστό μάζας % max	10.44	
κρόκος σε στίγματα		
	Απορρόφηση (D)	$E^{1\%}_{1cm}$
Απορρόφηση της πικροκοκίνης $E^{1\%}_{1cm}$ στα 257nm	0.3939	87.96
Απορρόφηση της σαφρανάλης $E^{1\%}_{1cm}$ στα 330nm	0.1863	41.6
Απορρόφηση των κροκινών $E^{1\%}_{1cm}$ στα 440nm	1.1608	259.22

Παρατηρούμε ότι όσον αφορά την υγρασία το συγκεκριμένο δείγμα κρόκου περιέχει 10.44%, γεγονός που καθιστά το δείγμα κατάλληλο από άποψη υγρασίας καθώς η μέγιστη επιτρεπτή περιεκτικότητα είναι 12%. Η σημασία του ποσοστού υγρασίας στον κρόκο είναι διττή. Ειδικότερα, η υγρασία των αποξηραμένων σιγμάτων του κρόκου πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 10-12%. Σε διαφορετική περίπτωση, εάν η υγρασία του προϊόντος υπερβαίνει το 12% (13-14%) τότε υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης μούχλας. Αντίθετα, σε περίπτωση που η υγρασία αυτού είναι μικρότερη

από 8%, τότε το προϊόν χάνει ποσότητα από το αιθέριο έλαιο που περιέχει. Σχετικά με την απορρόφηση των κύριων συστατικών του κρόκου βλέπου ότι η απορρόφηση της πικροκροκίνης είναι 87.96 της σαφρανάλης 41.6 και των κροκινών 259.22. Από τη σύγκριση των τιμών του δείγματος με τις προδιαγραφές που ορίζονται από το πρότυπο ISO προκύπτει ότι το συγκεκριμένο δείγμα του κρόκου καλύπτει όλες τις προδιαγραφές και συγκαταλέγεται στην κατηγορία I. Ο Ελληνικός Κρόκος είναι ανώτερης ποιότητας και πολλές φορές κατά πολύ πάνω από τα ποιοτικά πρότυπα που ορίζει ο ISO (International Organization for Standardization). Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τα αποτελέσματα των αναλύσεων, που έγιναν την τελευταία δεκαετία (1989-1998) σε δείγματα κρόκου με μορφή νημάτων, του Αναγκαστικού Συνεταιρισμού Κροκοπαραγωγών Κοζάνης (<http://www.iama.gr/ethno/crocus/trnrls.html>). Τα δείγματα αυτά είχαν κατά μέσο όρο:

- υγρασία και πτητικές ουσίες 11 ± 2 %,
- ένταση της γεύσης (πικροκροκίνη) 89 ± 9 ,
- ένταση του αρώματος (σαφρανάλη) 35 ± 5 και
- χρωστική δύναμη (κροκίνες) 224 ± 25

7.2 Εκτίμηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων

Πολλές ιδιότητες των γαλακτωμάτων όπως η σταθερότητα, η ρεολογική συμπεριφορά και το χρώμα εξαρτώνται από το μέγεθος των σταγονιδίων και την κατανομή του μεγέθους τους (πολυδιασπορά) (Jafari et al., 2007) Συγκεκριμένα κατά την επεξεργασία με υπέρηχους, η κατανομή του μεγέθους των νανο-σταγονιδίων εξαρτάται από το μακρο-γαλάκτωμα που έχει τοποθετηθεί στους υπέρηχους.

Στο πίνακα 11 φαίνονται τα μεγέθη των λιποσφαιρίων των μακρο- και νανο-γαλακτωμάτων καθώς και η πολυδιασπορά τους για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιόλαδο. Όσον αφορά τα μακρο-γαλακτώματα η μικρότερη μέση διάμετρος των σωματιδίων που αντιστοιχούν στο 50% του όγκου (D_{50}) είναι σε αυτά με 2.5 % wt ελαιόλαδο. Την μεγαλύτερη διάμετρο παρουσιάζουν τα γαλακτώματα με 10 % wt ελαιόλαδο.

Σχετικά με την πολυδιασπορά, μια υψηλή τιμή του δείκτη span υποδηλώνει ευρεία κατανομή μεγέθους των λιποσφαιρίων ενώ μια χαμηλή τιμή υποδηλώνει μια στενή κατανομή. Παρατηρούμε ότι παρόλο που τα γαλακτώματα με 2.5 % wt ελαιόλαδο έχουν το μικρότερο μέγεθος λιποσφαιρίων έχουν και υψηλή τιμή span κάτι που

σημαίνει ότι το μέγεθος των λιποσφαιρίων δεν είναι ομοιόμορφο. Αντιθέτως, τα γαλακτώματα με 10 % wt ελαιόλαδο έχουν το μεγαλύτερο μέγεθος λιποσφαιρίων (15.17 μm) αλλά την μικρότερη τιμή span.

Κατά την εφαρμογή των υπερήχων, προκαλείται ακουστική σπηλαίωση, δηλαδή, ο σχηματισμός και η επακόλουθη κατάρρευση των μικροφουσαλίδων από τις διακυμάνσεις της πίεσης ενός απλού ηχητικού κύματος. Η κατάρρευση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία υψηλών αναταραχών (υψηλές πιέσεις και υψηλές θερμοκρασίες). Αυτές οι αναταραχές λειτουργούν ως μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος για την διάσπαση των σταγονιδίων του ελαίου σε μικρότερα (Kaci et al., 2014).

Σύμφωνα με αυτό βλέπουμε ότι για τα γαλακτώματα με 2.5 % wt ελαιόλαδο, το μέγεθος των λιποσφαιρίων μειώθηκε από τα 5.93 μm στα 207.3 nm (28 φορές μείωση), στα γαλακτώματα με 5 % wt ελαιόλαδο η μείωση ήταν από τα 6.65 μm στα 288.7 nm (23 φορές μείωση), ενώ με 10 % wt η μείωση ήταν από τα 15.17 μm στα 68 5nm (22 φορές μείωση). Παρατηρούμε ότι στα δείγματα με το μικρότερο μέγεθος σταγονιδίων παρατηρείται και η μεγαλύτερη μείωση μετά την επεξεργασία με τους υπέρηχους. Όπως και πριν παρατηρούμε μια μειωμένη ποσότητα ελαιόλαδου συνεπάγεται με το μικρό μέγεθος λιποσφαιρίων. Σχετικά με την πολυδιασπορά (δείκτης PDI), παρατηρούμε ότι μετά την επεξεργασία των υπέρηχων τη μικρότερη τιμή του δείκτη έχουν τα γαλακτώματα με 2.5 % wt ελαιόλαδο, ενώ την μεγαλύτερη τα γαλακτώματα με 10 % wt ελαιόλαδο. Συνολικά, βλέπουμε ότι στα γαλακτώματα με 2.5 % wt ελαιόλαδο μετά την επεξεργασία υπέρηχων παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση στο μέγεθος των λιποσφαιρίων και η μικρότερη τιμή του δείκτη PDI (0.219).

Οι Jafari et al. (2007) μελέτησαν την παραγωγή γαλακτωμάτων έλαιο σε νερό μέσω της μικρορευστοποίησης, της υπέρηχησης, της χρήσης ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Ultraturrax) και της χρήσης κολλοειδούς μύλου. Κατά την σύγκριση του μεγέθους των λιποσφαιρίων στις διαφορετικές διεργασίες βρήκαν ότι το μεγαλύτερο μέγεθος των λιποσφαιρίων παρατηρήθηκε στα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με τον ομογενοποιητή, διότι όπως εξηγούν την κινητήρια δύναμη σε αυτή τη επεξεργασία αποτελούν οι διατμητικές τάσεις, οι οποίες κατά την γραμμική ροή δεν μπορούν να προκαλέσουν καλή διάσπαση των λιποσφαιρίων. Κατά την χρήση των υπέρηχων το μέγεθος των λιποσφαιρίων ήταν συγκρίσιμο με αυτό της μικρορευστοποίησης και στην περιοχή των νανόμετρων.

Πίνακας 11: Μεγέθη και δείκτες διασποράς των λιποσφαιρίων των μακρο- και νανο-γαλακτωμάτων

Συγκέντρωση ελαιολάδου			
	2.5%	5%	10%
<i>Μακρο-γαλακτώματα</i>			
D₅₀ (μm)	5.93 (±0.93)	6.65 (±1.05)	15.17 (±1.96)
Span (-)	3.21 (±0.23)	1.35 (±0.25)	1.23 (±0.16)
<i>Νανο-γαλακτώματα</i>			
Z-average (nm)	207.3(±1)	288.7 (±17.6)	685.0 (±69.0)
PDI (-)	0.219 (±0.006)	0.381 (±0.021)	1.083 (±0.149)

7.3 Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση υπό ψύξη

Η εμπορική σημασία της αποκορύφωσης είναι πολύ σημαντική, και εκτιμάται ότι το 40% του κόστους για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος σε μορφή γαλακτώματος, πραγματοποιείται για την εκτίμηση της διάρκειας ζωής και της σταθερότητας (Robins et al., 2002).

Το μέγεθος των λιποσφαιρίων αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εκτίμηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό. Τα μεγάλα μεγέθους λιποσφαίρια παρουσιάζουν ταχύτερη συνένωση από τα μικρότερα, έτσι ένα γαλάκτωμα με μικρά λιποσφαίρια έχει μικρότερο ρυθμό συνένωσης. Στα διαγράμματα 1α και 1β απεικονίζεται η σταθερότητα των μακρο-και των νανο-γαλακτωμάτων που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιολάδου. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της σταθερότητας των μακρο-γαλακτωμάτων που περιείχαν διαφορετική συγκέντρωση κόμμιος τριγωνέλλας. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα 1α και 1β τα παραγόμενα γαλακτώματα με συγκέντρωση 0.5 και 0.75 % wt ήταν ασταθή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και διαχωρίστηκαν. Ο δείκτης συναίρεσης στην περίπτωση αυτή ήταν ανάλογος τόσο της συγκέντρωσης του σταθεροποιητή όσο και της συγκέντρωσης της διεσπαρμένης φάσης. Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα 1α το μεγαλύτερο διαχωρισμό (70%) παρουσίασαν τα μακρο-γαλακτώματα που περιείχαν 0.5 % wt κόμμι τριγωνέλλας και 2.5 % wt ελαιόλαδο, ενώ αυτά που περιείχαν 0.75 % wt κόμμι και 10 % wt ελαιόλαδο παρουσίασαν μικρότερο διαχωρισμό, της τάξης του 3%. Σταθερά μακρο-γαλακτώματα παρασκευάστηκαν μόνο στην περίπτωση που η συγκέντρωση του σταθεροποιητή ήταν 1%, ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα του ελαίου. Σύμφωνα με το νόμο του Stokes η αύξηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων εξαρτάται από το μέγεθος των σταγονιδίων, την διαφορά της πυκνότητας της συνεχούς και της διεσπαρμένης φάσης και το ιξώδες του γαλακτώματος. Ο ρυθμός αποκορύφωσης ενός γαλακτώματος μειώνεται με την

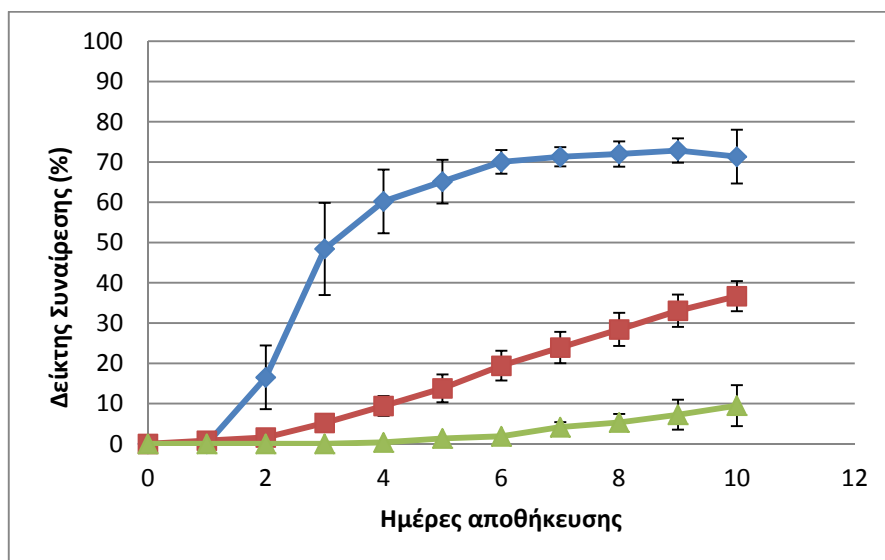
μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, όπως και με την αύξηση του ιξώδους. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η συγκέντρωση του κόμμεος των νανο-γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν 1% και οι ιδιότητές τους συγκρίθηκαν με τα ομόλογα σε περιεκτικότητα ελαιόλαδου μακρο-γαλακτώματα.

Όπως προαναφέρθηκε τα μακρο και νανο-γαλακτώματα που περιείχαν 1 % wt κόμμι τριγωνέλλας δεν παρουσίασαν διαχωρισμό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Επομένως χρησιμοποιήθηκε το ποσοστό της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (% ΣΑ) για την αποτίμηση της σταθερότητάς τους. Το ποσοστό της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται τόσο από τον αριθμό όσο και από το μέγεθος των διεσπαρμένων λιποσφαιρίων και η μείωση της τιμής της σχετίζεται με φαινόμενα συνένωσης (coalescence) και κροκίδωσης (flocculation) (Palazolo et al, 2005).

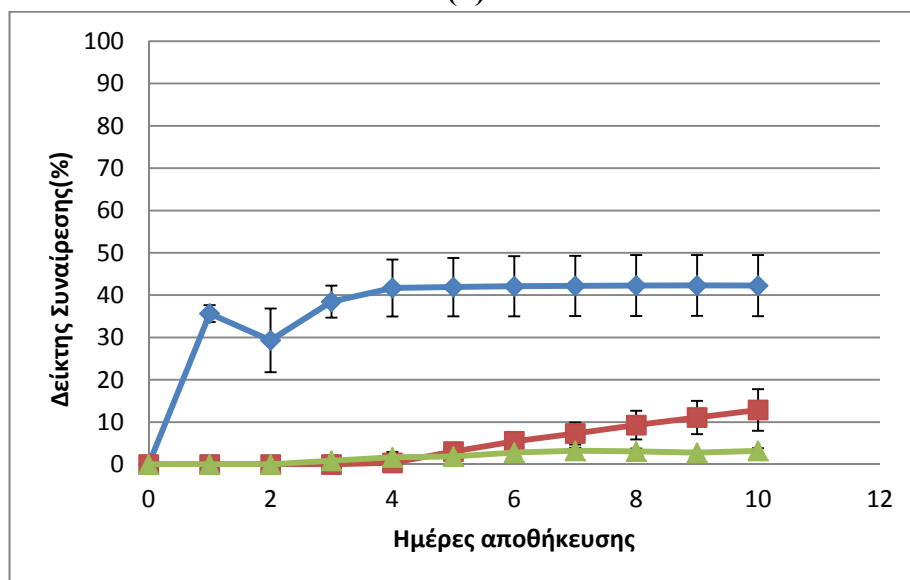
Στα διαγράμματα 2α και 2β παρουσιάζεται η σκεδαζόμενη ακτινοβολία των μακρο- και νανο-γαλακτωμάτων που περιείχαν 1 % wt κόμμι και διαφορετική συγκέντρωση ελαιόλαδου. Όπως παρατηρείται, τη μεγαλύτερη αρχική τιμή % ΣΑ παρουσίασαν τα νανο-γαλακτώματα με 10 % wt ελαιόλαδο (67.05%) ενώ την μικρότερη τα μακρο-γαλακτώματα με 2.5 % wt ελαιόλαδο (40.3%). Τα παραγόμενα νανο-γαλακτώματα χαρακτηρίζονται τόσο από υψηλότερες τιμές σκεδαζόμενης ακτινοβολίας όσο και από μικρότερη μεταβολή αυτής κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Πιο συγκεκριμένα η μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων στα δείγματα που περιείχαν 2.5 % wt ελαιόλαδο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από 40.3% σε 45.6%. Επίσης, η μεταβολή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας των νανο-γαλακτωμάτων με 2.5 % wt ελαιόλαδο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης μειώθηκε κατά 1.1% έναντι 11.4% των αντίστοιχων μακρο-γαλακτωμάτων. Γενικά τη μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσίασαν τα νανο-γαλακτώματα με 5 %wt περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο καθώς παρατηρούμε ότι κατά την διάρκεια της αποθήκευσης η μεταβολή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι μόλις 1.02%. Για τις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιόλαδου τα νανο-γαλακτώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα αντίστοιχα μακρο-γαλακτώματα., γεγονός που υποδηλώνει την μείωση στο μέγεθος των λιποσφαιρίων. Η μεταβολή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας για τα νανο-γαλακτώματα με 2.5 % wt, 5 %wt και 10 % wt ελαιόλαδο είναι, 1.1%, 1.02% και 3.87% αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τα ευρήματα των Huck-Iriart et al. (2011), οι οποίοι επισημαίνουν ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων. Αυτοί μελέτησαν την

επίδραση των υπερήχων στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων. Τα μακρο-γαλακτώματα που είχαν παρασκευαστεί με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Ultraturrax) παρουσίασαν γρηγορότερο ρυθμό από τα γαλακτώματα που παρασκευαστήκαν με υπέρηχους. Η διαφορά αυτή στη συμπεριφορά αποκορύφωσης εξηγήθηκε με βάση δύο φαινόμενα, από την μια η μετανάστευση μεμονωμένων σωματιδίων και από την άλλη η μετανάστευση συσσωματωμάτων .

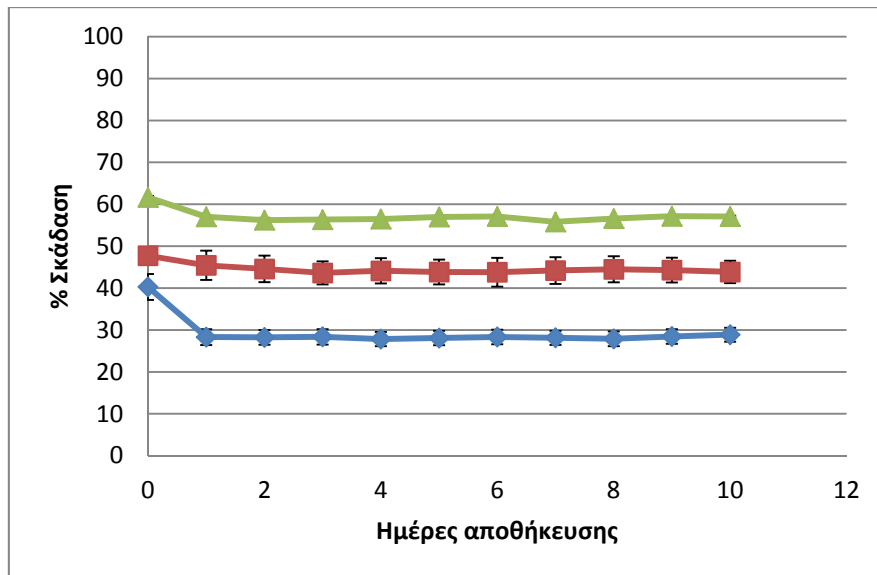


(α)

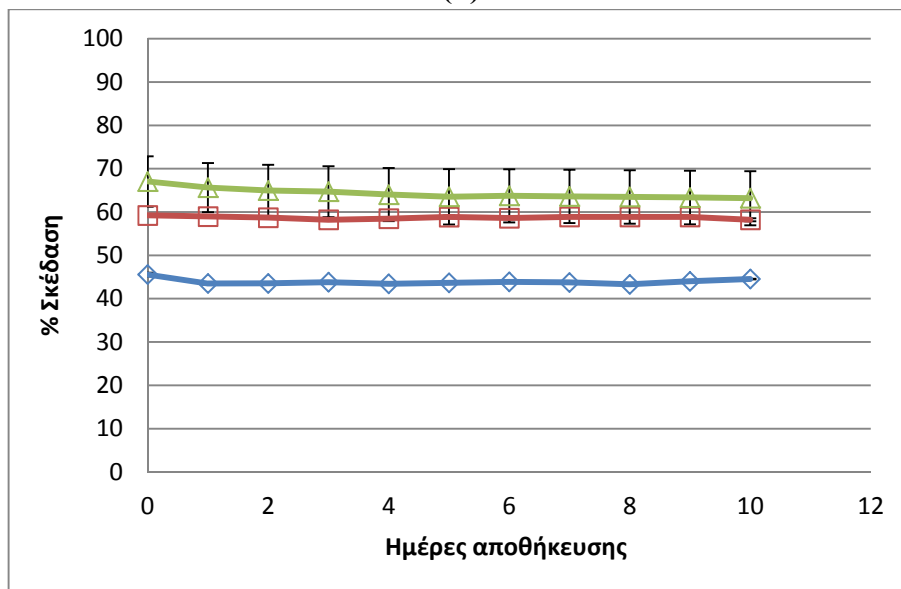


(β)

Διάγραμμα 1. Σταθερότητα των μάκρο-γαλακτωμάτων με συγκέντρωση α) 0.5% και β) 0.75% κόμμι τριγωνέλλας κατά την αποθήκευση (10 ημέρες, 5 °C, ♦ 2.5%, ■ 5%, ▲ 10% ελαιόλαδο).



(α)



(β)

Διάγραμμα 2. Μεταβολή του ποσοστού σκεδαζόμενης ακτινοβολία (Backscattering, %) των α) μακρο-γαλακτωμάτων και β) των νανο-γαλακτωμάτων με συγκέντρωση 1% κόμμι τριγωνέλλας κατά την αποθήκευση (◆ μακρο 2.5%, ◇ νανο 2.5%, ▲ μακρο 5%, △ νανο 5%, ■ μακρο 10%, □ νανο 10%)

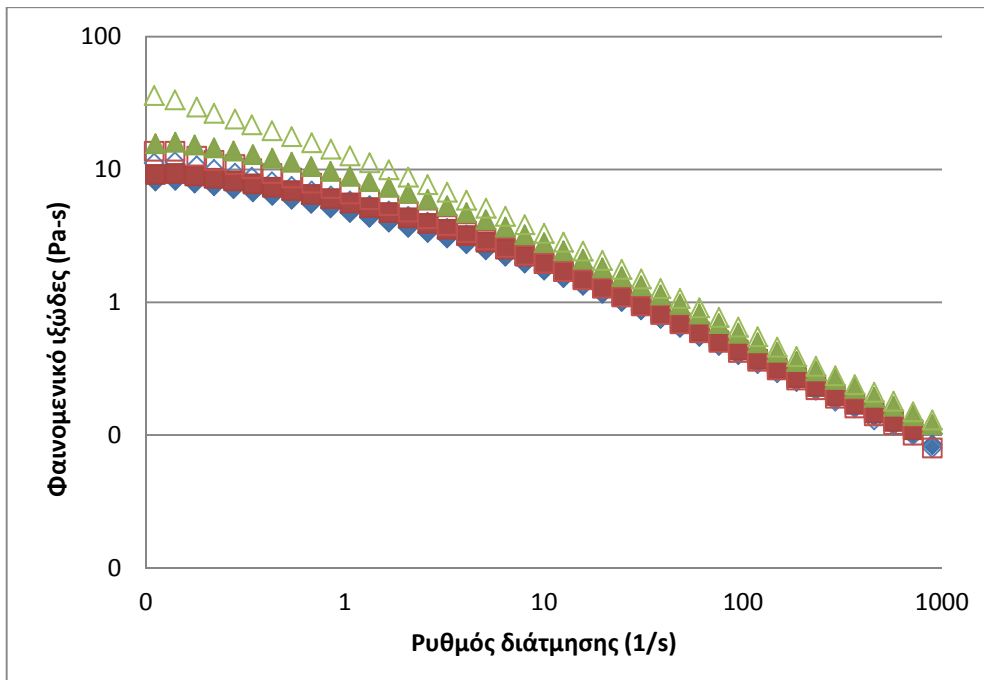
7.4 Μέτρηση του ιξώδους και της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς

Η σταθερότητα και η ρεολογία των κολλοειδών διασπορών επηρεάζεται πολύ έντονα τόσο από τον τύπο της επεξεργασίας (χρήση υπερήχων, θέρμανση, ομογενοποίηση υψηλής πίεσης κ.α.) όσο και από την συσσωμάτωση των σωματιδίων. Όσον αφορά την συσσωμάτωση των σωματιδίων, οι ιδιότητες μιας κολλοειδούς διασποράς εξαρτώνται από το κλάσμα όγκου των συσσωματωμένων σωματιδίων όπως επίσης

και από την χωρική κατανομή των σωματιδίων στο συσσωμάτωμα (Marcotte et al. 2001, Chanamai et al. 2000).

Η χρήση των υπερήχων έχει την δυνατότητα να προκαλέσει τον αποπολυμερισμό των πολυμερών και την μείωση του μοριακού τους βάρους. Αυτό συμβαίνει λόγω του φαινομένου της σπηλαιώσης όπου καταρρέουν τα τοιχώματα των μικροφουσαλίδων, και έχει ως συνέπεια να δημιουργούνται μεγάλες δυνάμεις διάτμησης στα μόρια των πολυμερών που βρίσκονται κοντά στις μικροφουσαλίδες (Konaganti and Mandras, 2009).

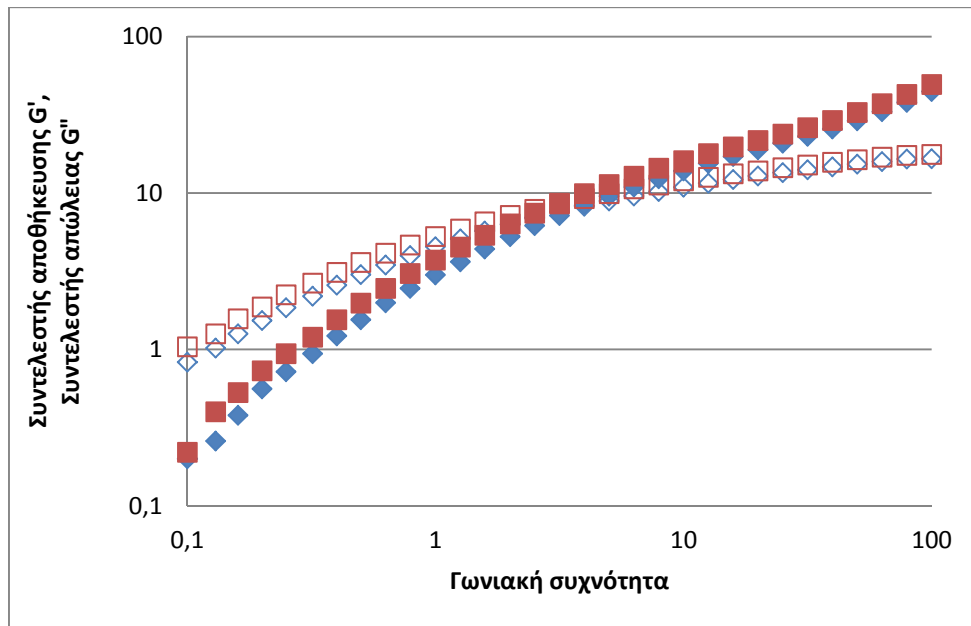
Κατά την χρήση των υπερήχων παρατηρείται μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων. Στο διάγραμμα 3 γίνεται σύγκριση των μακρο-γαλακτωμάτων με τα αντίστοιχα νανο-γαλακτώματα. Όπως παρατηρείται τα νανο-γαλακτώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές ιξώδες από τα αντίστοιχα μακρο-γαλακτώματα. Μεγαλύτερη τιμή ιξώδες παρουσιάζει το νανο-γαλάκτωμα με 10 % wt ελαιόλαδο και μικρότερη το μακρο-γαλάκτωμα με 2.5 % wt ελαιόλαδο. Αυτό συμβαίνει επειδή η μείωση στο μέγεθος των λιποσφαιρίων επιτρέπει την δημιουργία ενός ισχυρότερο δικτύου μεταξύ των λιποσφαιρίων λόγω της μικρότερης απόστασης τους. Αυτό παρατηρήθηκε και από τους Rozanska et al. (2013), οι οποίοι αναφέρουν ότι η παρατηρούμενη αυτή αύξηση στο ιξώδες είναι πιθανό να σχετίζεται με την δημιουργία ενός δικτύου των λιποσφαιρίων, κάτι που τα καθιστά να έχουν αντίσταση κατά το τέντωμα. Επίσης, μελέτησαν τα χαρακτηριστικά του ιξώδες σε γαλακτώματα ορυκτελαίων σε νερό σε συγκεντρώσεις από 20% έως 40%, σταθεροποιημένα με 5 τύπους υδροκολλοειδών. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή το ιξώδες εξαρτάται κυρίως από δύο παράγοντες, τα χαρακτηριστικά της συνεχούς φάσης και την δομή της διεσπαρμένης. Τα γαλακτώματα με κλάσμα όγκου ελαίου 40% είχαν μεγαλύτερο ιξώδες από αυτά με 20% γεγονός που περιγράφηκε με έναν υποθετικό μηχανισμό όπου η αύξηση στον αριθμό των λιποσφαιρίων επιφέρει τοπική αύξηση στην επίδραση διάτμησης.



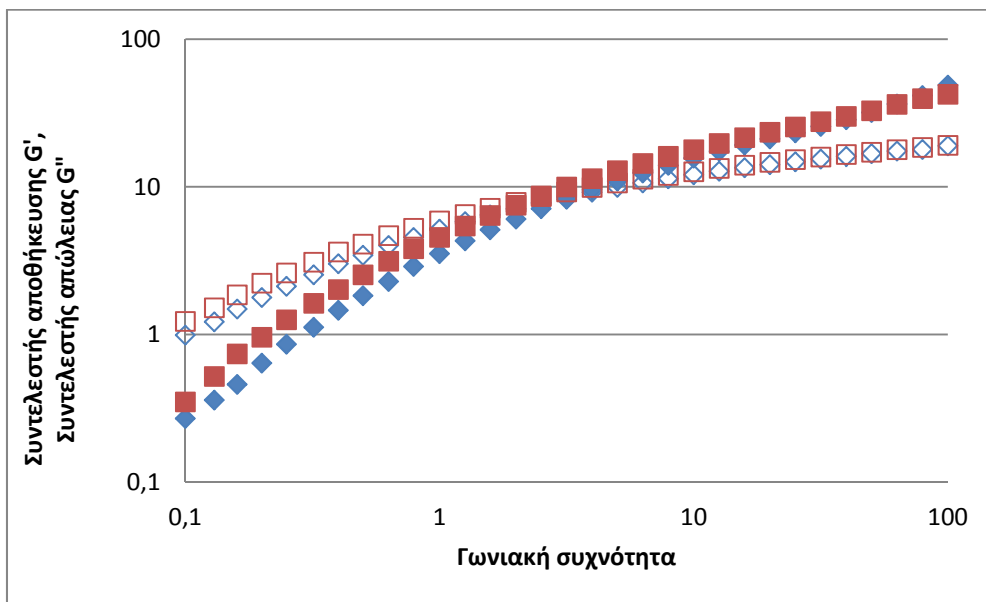
Διάγραμμα 3. Φαινομενικά ιξώδη των μακρο- και νανο-γαλακτωμάτων (◆ μακρο- 2.5%, ◊ νανο- 2.5%, ■ μακρο- 5%, □ νανο- 5%, ▲ μακρο- 10%, △ νανο 10%)

Σύμφωνα με τους Robins et al. (2002), όσο η συγκέντρωση ενός ελαίου σε ένα γαλάκτωμα αυξάνεται, τόσο αυτό αποκτά ελαστική συμπεριφορά στερεού. Στα διαγράμματα 4,5 και 6 γίνεται σύγκριση της ιξωδοελαστικότητας των δειγμάτων για τις τρεις συγκεντρώσεις ελαιόλαδου σε σχέση με την συχνότητα. Ο συντελεστής αποθήκευσης G' (storage modulus) είναι ένα χρήσιμο μέτρο κατά πόσο ένα υλικό είναι ελαστικό, ενώ ο συντελεστής απώλειας G'' (loss modulus) είναι ένα μέτρο του κατά πόσον ένα υλικό είναι ιξώδες. Επίσης σε κάθε διάγραμμα γίνεται σύγκριση των μακρο-γαλακτωμάτων με τα αντίστοιχα νανο-γαλακτώματα. Όσον αφορά το μακρο-γαλάκτωμα με 2.5 % wt ελαιόλαδο, παρατηρούμε ότι σε μικρές συχνότητες ο συντελεστής απώλειας είναι μεγαλύτερος από τον συντελεστή αποθήκευσης ενώ μετά από μια συγκεκριμένη συχνότητα περίπου στα 4 rad/s αυτοί οι δύο διασταυρώνονται και ο συντελεστής αποθήκευσης γίνεται μεγαλύτερος από τον συντελεστή απώλειας πράγμα που σημαίνει ότι το γαλάκτωμα αυτό χαρακτηρίζεται κυρίως από την στερεή συμπεριφορά. Για το νανο-γαλάκτωμα με 2.5 % wt ελαιόλαδο ομοίως παρατηρούμε ότι σε μικρές συχνότητες ισχύει $G'' > G'$ ενώ περίπου σε ίδια συχνότητα αυτοί οι συντελεστές διασταυρώνονται και το γαλάκτωμα χαρακτηρίζεται κυρίως από την στερεή συμπεριφορά δηλαδή είναι ελαστικό. Αν συγκρίνουμε τους συντελεστές των μακρο-γαλακτωμάτων με αυτούς των νανο-γαλακτωμάτων παρατηρούμε ότι στην περίπτωση των νανο-γαλακτωμάτων αυτοί παρουσιάζουν λίγο μεγαλύτερες τιμές ενώ

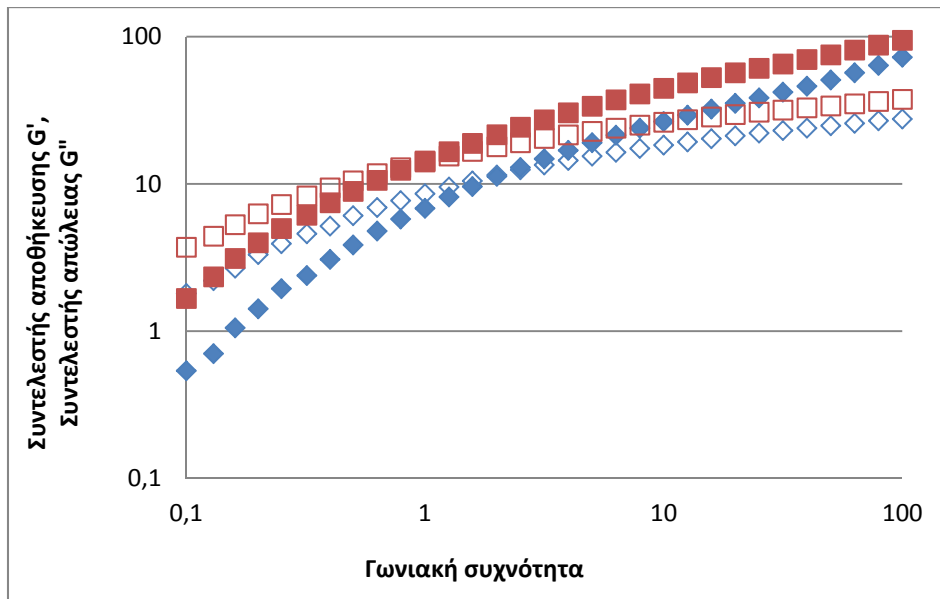
σε πολλά σημεία ταυτίζονται. Στο διάγραμμα 5 γίνεται η σύγκριση των συντελεστών αποθήκευσης και απώλειας για τα μακρο- και νανο-γαλακτώματα με 5 % wt ελαιόλαδο προς την συχνότητα, και εδώ παρατηρούμε ότι αρχικά σε μικρές συχνότητες ο συντελεστής απώλειας είναι μεγαλύτερος από τον συντελεστή αποθήκευσης για τα μακρο- και για τα νανο-γαλακτώματα, δηλαδή χαρακτηρίζεται κυρίως από την υγρή συμπεριφορά ενώ σε μια συχνότητα περίπου 5 rad/s αυτοί διασταυρώνονται και στην συνέχεια ισχύει ότι $G' > G''$, δηλαδή το γαλάκτωμα χαρακτηρίζεται ως ελαστικό (στερεό). Αν συγκρίνουμε τα μακρο-γαλακτώματα με τα νανο-γαλακτώματα βλέπουμε ότι οι συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας παρουσιάζουν λίγο μεγαλύτερες τιμές ενώ σε κάποια σημεία συμπίπτουν. Τέλος, στο διάγραμμα 6 γίνεται η σύγκριση των συντελεστών αποθήκευσης και απώλειας των μακρο- και νανο-γαλακτώματων με 10 % wt ελαιόλαδο σε σύγκριση με την συχνότητα. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε ότι αναφέρθηκε και πριν, δηλαδή ότι αρχικά ισχύει $G'' > G'$, και μετά από συγκεκριμένη συχνότητα οι συντελεστές διασταυρώνονται και το γαλάκτωμα χαρακτηρίζεται κυρίως από την ελαστική συμπεριφορά. Αυτό ισχύει και για τα μακρο- και για τα νανο-γαλακτώματα. Επίσης, οι συντελεστές των νανο-γαλακτωμάτων παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές από αυτούς των μακρο-γαλακτωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν από τους Ercelebi and Ibanoglu (2010) και από τους Moates et al. (2001) Στην πρώτη περίπτωση μελέτησαν την ρεολογική συμπεριφορά γαλακτωμάτων σταθεροποιημένα με κρόκο αυγού και κόμμι γκουάρ. Βρήκαν ότι σε μικρές συχνότητες ο συντελεστής απώλειας είναι μεγαλύτερος από τον συντελεστή αποθήκευσης κάτι όμως που αναστράφηκε μετά από χαρακτηριστική συχνότητα. Αυτοί εξηγούν ότι όταν το $G'' > G'$ σε μικρές συχνότητες, η ενέργεια που χρησιμοποιείται για την παραμόρφωση του υλικού, διαχέεται παχύρρευστα και η συμπεριφορά του δείγματος είναι υγρή. Στην δεύτερη περίπτωση όπου σταθεροποίησαν γαλακτώματα με υδροξυαιθυλοκυτταρίνη (HEC), βρέθηκε ότι σε μικρές συχνότητες ισχύει ότι $G'' > G'$, ενώ πάνω από μια χαρακτηριστική συχνότητα f_c , οι συντελεστές αντιστρέφονται και το γαλάκτωμα συμπεριφέρεται ως στερεό.



Διάγραμμα 4. Συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας των μακρο- και νανο-γαλακτωμάτων με 2.5% ελαιόλαδο (◆ G' μακρο-, ◇ G'' μακρο-, ■ G' νανο-, □ G'' νανο-)



Διάγραμμα 5. Συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας των μακρο- και νανο-γαλακτωμάτων με 5% ελαιόλαδο (◆ G' μακρο-, ◇ G'' μακρο-, ■ G' νανο-, □ G'' νανο-)



Διάγραμμα 6. Συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας των μακρο- και νανο-γαλακτωμάτων με 10% ελαιόλαδο (♦ G' μακρο-, ◇ G'' μακρο-, ■ G' νανο-, □ G'' νανο-)

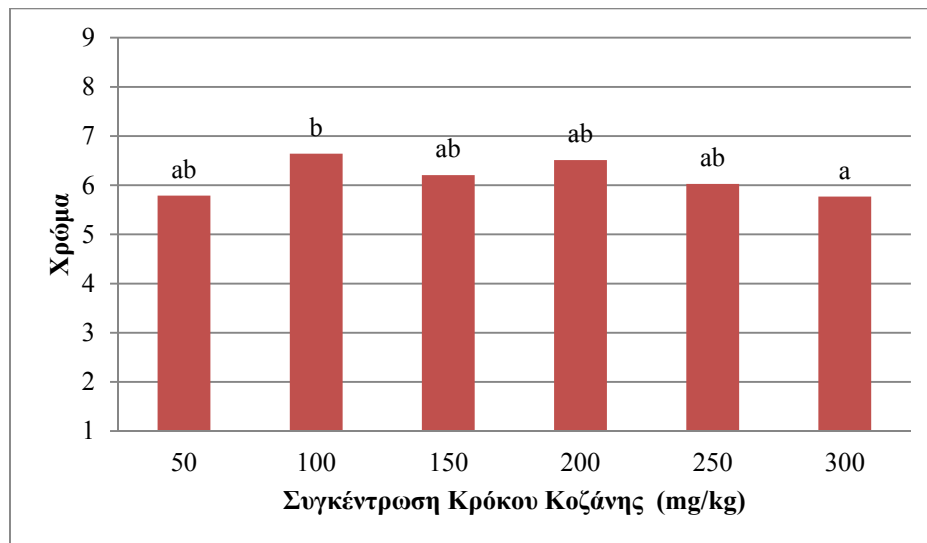
7.5 Οργανοληπτικός έλεγχος για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας κρόκου

Στον πίνακα 12 φαίνονται οι τιμές των παραγόντων L^* , a^* , b^* των γαλακτωμάτων με κρόκο. Ο παράγοντας L^* σχετίζεται με την φωτεινότητα και παίρνει τιμές από 0 (μαύρο) έως 100 (λευκό), ενώ οι παράγοντες a^* και b^* σχετίζονται με τα χρώματα. Θετικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κόκκινου, αρνητικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του πράσινου. Θετικές τιμές του b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κίτρινου, αρνητικές τιμές b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του μπλε. Όπως παρατηρούμε στους παράγοντες L^* και a^* υπάρχει μια μικρή μείωση και μια μικρή αύξηση στις τιμές αντίστοιχα, με την αύξηση της συγκέντρωσης του κρόκου, αλλά η μεταβολή αυτή δεν είναι σημαντική. Όπως αναφέρθηκε θετικές τιμές του παράγοντα b^* σχετίζονται με το κίτρινο χρώμα. Το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα του κρόκου αποδίδεται στις περιεχόμενες κροκίνες. Όπως ήταν αναμενόμενο η αύξηση της συγκέντρωσης του κρόκου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής b^* για το κίτρινο χρώμα. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του κρόκου από τα 50 στα 300 mg/kg η τιμή της παραμέτρου b^* αυξήθηκε από 41.08 σε 58.88.

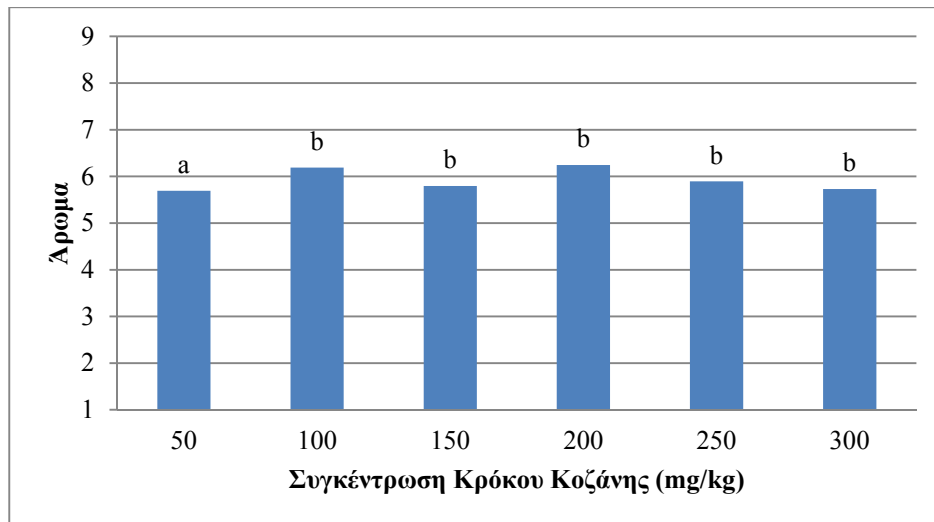
Πίνακας 12: Μετρήσεις του χρώματος του κρόκου με το χρωματόμετρο

Ποσότητα κρόκου (mg/kg)	L*	a*	b*
50	81.22 (\pm 0.097)	-10.35 (\pm 0.30)	41.08 (\pm 0.21)
100	81.45 (\pm 0.15)	-10.08 (\pm 0.01)	41.57 (\pm 0.04)
150	81.88 (\pm 0.11)	-10.86 (\pm 0.04)	47.86 (\pm 0.13)
200	81.19 (\pm 0.055)	-10.88 (\pm 0.04)	52.41 (\pm 0.05)
250	80.69 (\pm 0.09)	-10.73 (\pm 0.10)	56.52 (\pm 0.31)
300	79.77 (\pm 0.38)	-11.71 (\pm 0.14)	58.88 (\pm 0.25)

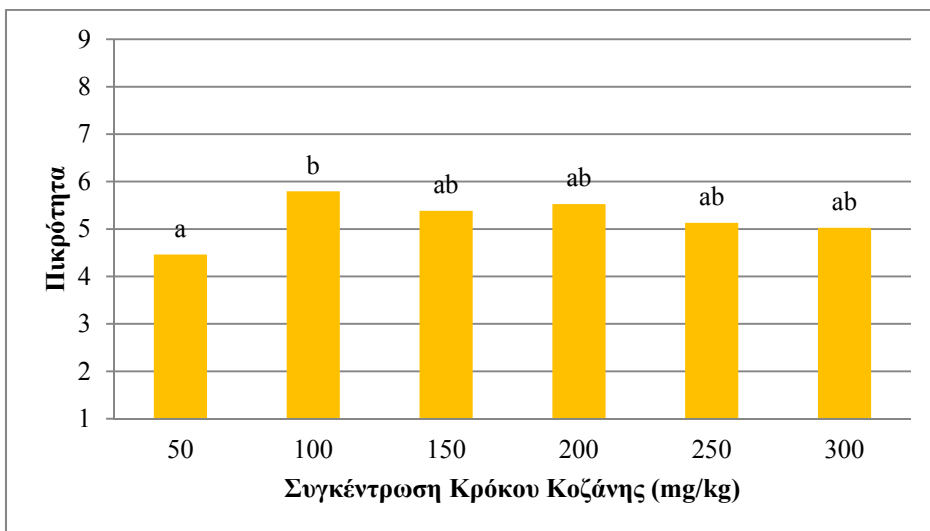
Στα διαγράμματα 7 έως 12 παρουσιάζονται βαθμολογίες της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων μαγιονέζας που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κρόκου για τα εξής χαρακτηριστικά: χρώμα, άρωμα, πικρότητα, γεύση, επίγευση και συνολική εντύπωση. Τα γράμματα που αναγράφονται στις μπάρες των διαγραμμάτων υποδηλώνουν την στατιστική διαφορά των δειγμάτων, δείγματα στα οποία αναγράφονται τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%).



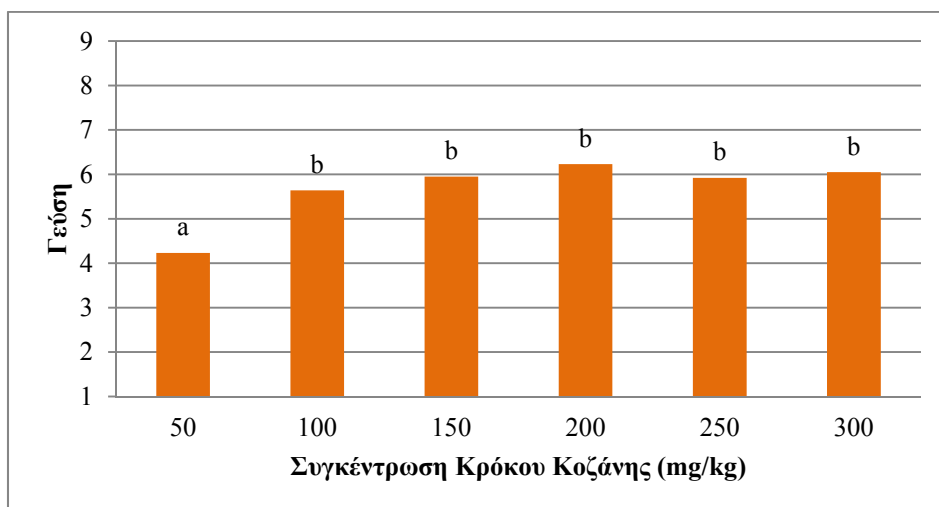
Διάγραμμα 7. Επίδραση της συγκέντρωσης κρόκου στη βαθμολογία του χρώματος των δειγμάτων



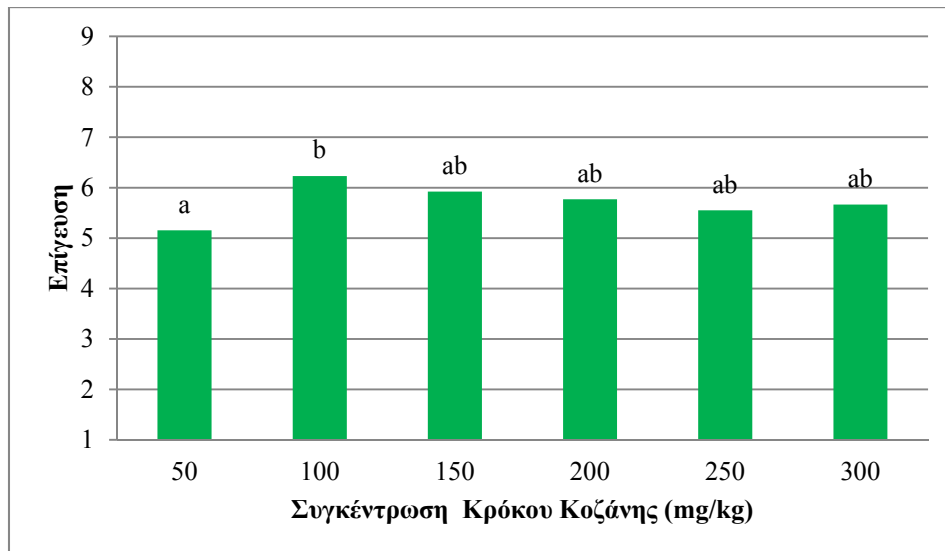
Διάγραμμα 8. Επίδραση της συγκέντρωσης κρόκου στη βαθμολογία του αρώματος των δειγμάτων



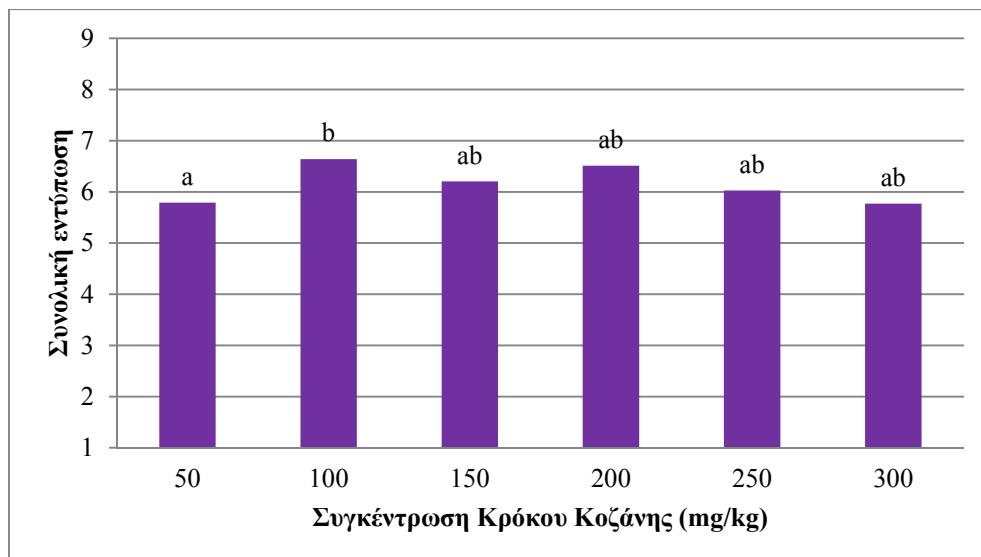
Διάγραμμα 9. Επίδραση της συγκέντρωσης κρόκου στη βαθμολογία της πικρότητας των δειγμάτων



Διάγραμμα 10. Επίδραση της συγκέντρωσης κρόκου στη βαθμολογία της γεύσης των δειγμάτων



Διάγραμμα 11. Επίδραση της συγκέντρωσης κρόκου στη βαθμολογία της επίγευσης των δειγμάτων



Διάγραμμα 12. Επίδραση της συγκέντρωσης κρόκου στη βαθμολογία της συνολικής εντύπωσης των δειγμάτων

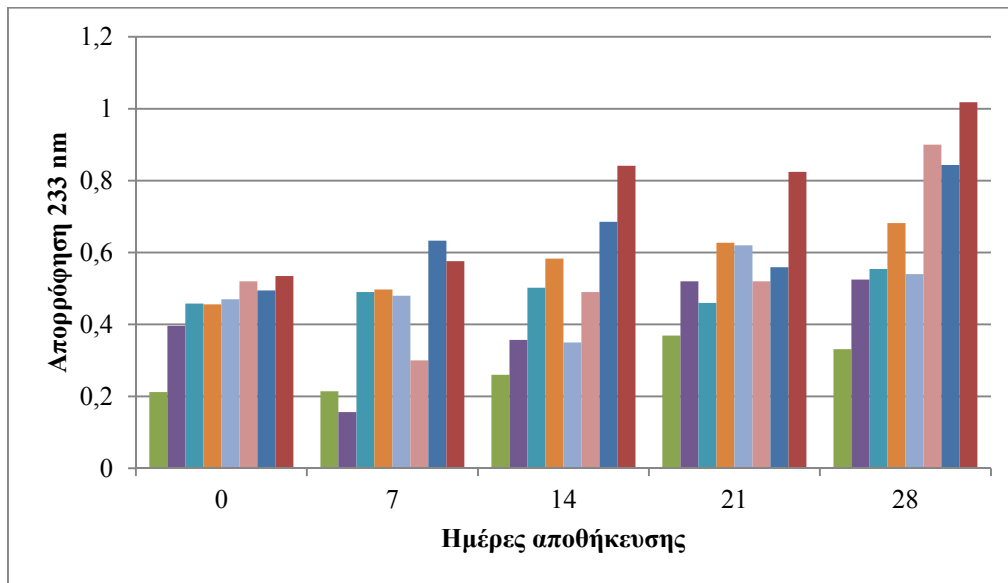
Στο διάγραμμα 7 σχετικά με το χρώμα παρατηρούμε ότι την μεγαλύτερη βαθμολογία έλαβε το δείγμα με 100 mg κρόκου (6.64) ενώ την μικρότερη αυτό με τα 300 mg (5.76). Επίσης τα δείγματα με 100 και 300 mg διαφέρουν στατιστικά και από τα υπόλοιπα ($p < 0.05$) και μεταξύ τους ως προς το χρώμα. Συμπεραίνουμε δε, ότι η προσθήκη μεγάλης ποσότητας κρόκου στα δείγματα επέδρασε αρνητικά στο χρώμα του προϊόντος. Αξίζει να αναφερθεί δε ότι πολλές φορές αναφέρθηκε από τους δοκιμαστές ότι υπήρξε σύγχυση σε ότι αφορά την εμφάνιση του προϊόντος λόγω του έντονου χρώματος, με την πλειονότητα των δοκιμαστών να αντιλαμβάνεται το προϊόν

ως μουστάρδα. Στο διάγραμμα 8 όσον αφορά το άρωμα, την μεγαλύτερη βαθμολογία έλαβε το δείγμα με 200 mg κρόκου (6.24) ενώ την μικρότερη αυτό με τα 50 mg (5.69). Επίσης ως προς το άρωμα μόνο το δείγμα με 50 mg διαφέρει στατιστικά από τα υπόλοιπα. Στο διάγραμμα 9 που αναφέρεται στην πικρότητα, την μεγαλύτερη βαθμολογία έλαβε το δείγμα με 100 mg κρόκου (5.79) ενώ την μικρότερη αυτό με τα 50mg (4.46). Επίσης τα δείγματα με 50 και 100 mg διαφέρουν στατιστικά και από τα υπόλοιπα και μεταξύ τους ως προς την πικρότητα. Στο διάγραμμα 10 όπου γίνεται η σύγκριση της γεύσης των δειγμάτων, την μεγαλύτερη βαθμολογία έλαβε το δείγμα με 200 mg κρόκου (6.23) ενώ την μικρότερη αυτό με τα 50 mg (4.23). Επίσης ως προς την γεύση μόνο το δείγμα με 50 mg διαφέρει στατιστικά από τα υπόλοιπα. Στο διάγραμμα 11 βλέπουμε σχετικά με την επίγευση ότι την μεγαλύτερη βαθμολογία έλαβε το δείγμα με 100 mg κρόκου (6.23) ενώ την μικρότερη αυτό με τα 50 mg (5.15). Επίσης τα δείγματα με 50 και 100 mg διαφέρουν στατιστικά και από τα υπόλοιπα και μεταξύ τους ως προς την επίγευση. Τέλος, στο διάγραμμα 12 όπου βαθμολογήθηκε η συνολική εντύπωση των δειγμάτων, η μεγαλύτερη βαθμολογία αποδόθηκε στο δείγμα με 100 mg κρόκου (6.64) ενώ η μικρότερη σε αυτό με τα 300 mg (5.76). Επίσης τα δείγματα με 50 και 100 mg διαφέρουν στατιστικά και από τα υπόλοιπα και μεταξύ τους ως προς την συνολική εντύπωση. Με βάση τα δεδομένα αυτά, στα γαλακτώματα έγινε προσθήκη κρόκου 100 mg/kg καθώς το δείγμα αυτό έλαβε την καλύτερη βαθμολογία στα περισσότερα χαρακτηριστικά (χρώμα, πικρότητα, επίγευση, συνολική εντύπωση) ενώ στα χαρακτηριστικά αυτά διαφέρει και στατιστικά από τα υπόλοιπα.

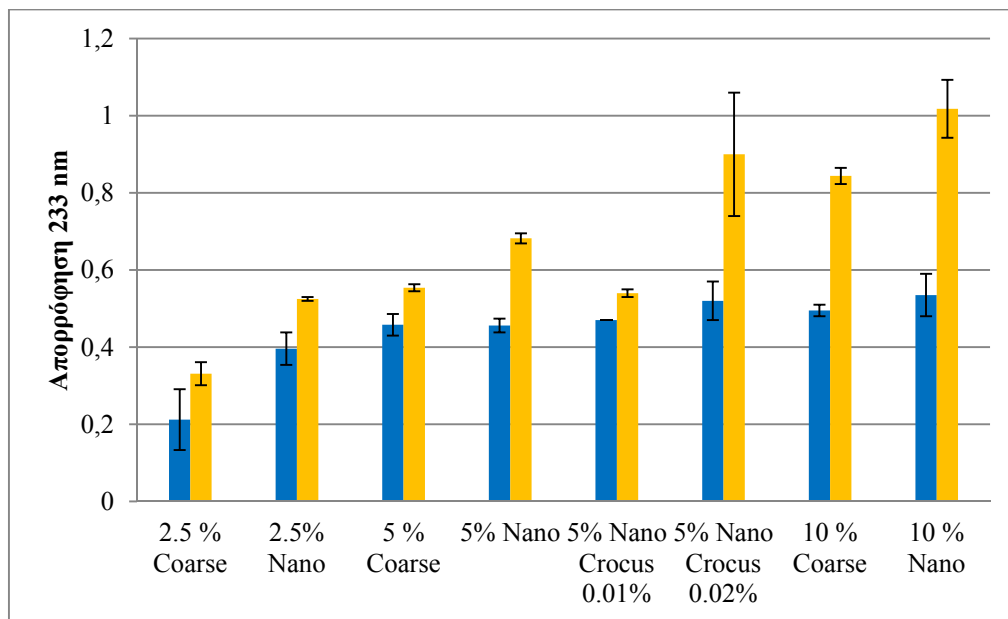
7.6 Προσδιορισμός προϊόντων οξείδωσης

Στις βιομηχανίες τροφίμων αποτελεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον ο εμπλουτισμός των προϊόντων τους με συστατικά ευεργετικά για τη υγεία. Όμως η προσθήκη αυτών των συστατικών στα τρόφιμα δεν είναι εύκολο έργο καθώς κάποια από αυτά μπορούν να υποστούν οξείδωση των λιπαρών οξέων τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τρόφιμα τα οποία είναι ασταθή και με αλλοιώσεις στην εμφάνιση, στο χρώμα, στη γεύση, στην υφή και στην διατηρησιμότητά τους. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό οξείδωσης των λιπαρών, συμπεριλαμβάνοντας, τη μοριακή δομή των λιπιδίων, τη θερμοκρασία, την ύπαρξη φωτός, τα χαρακτηριστικά των λιποσφαιρίων, οι συνθήκες επεξεργασίας και η παρουσία αντιοξειδωτικών (Kargar et al., 2011). Στο διάγραμμα 13 φαίνονται οι απορροφήσεις των συζυγών διενίων, τα

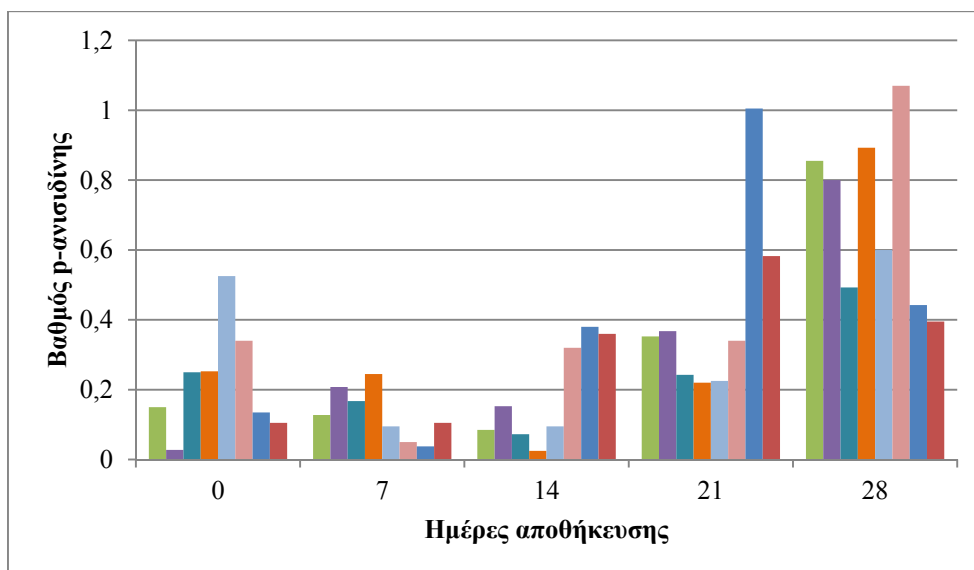
οποία αποτελούν πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης κατά την διάρκεια 28 ημερών αποθήκευσης.



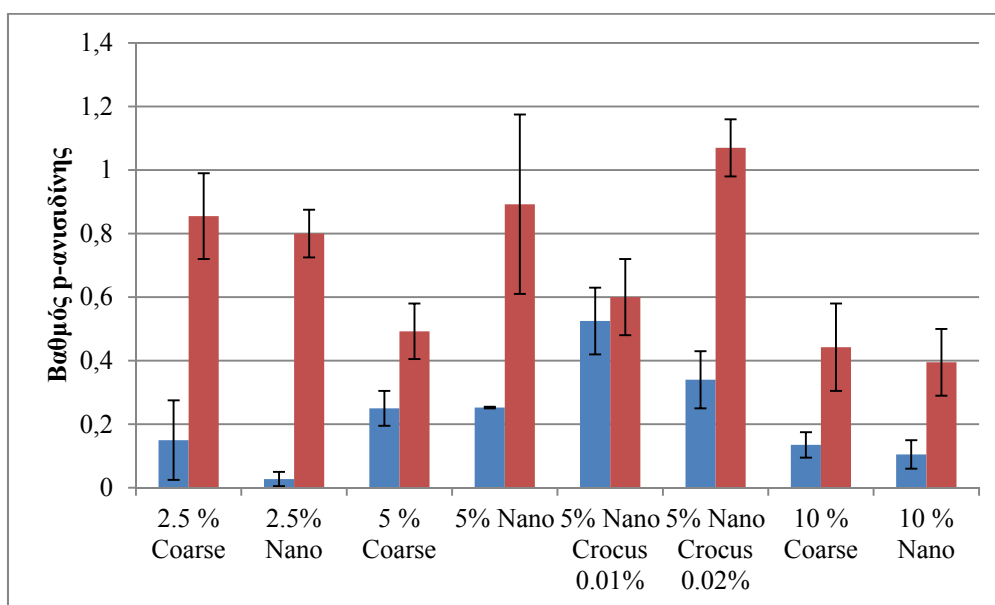
Διάγραμμα 13. Απορροφήσεις συζυγών διενίων των μάκρο- και νανο-γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (28 ημέρες, 25 °C, ■ 2.5% μακρο, ■ 2.5% νανο, ■ 5% μακρο, ■ 5% νανο, ■ 5% νανο κρόκος 0.01, ■ 5% νανο κρόκος 0.02, ■ 10% μακρο, ■ 10% νανο)



Διάγραμμα 14. Σύγκριση των απορροφήσεων των φρέσκων (ημέρα 0) και αποθηκευμένων (28^η ημέρα) των μάκρο- και νανο-γαλακτωμάτων. (■ ημέρα 0, ■ ημέρα 28)



Διάγραμμα 15. Τιμές βαθμού ανισιδίνης των μάκρο- και νανο-γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (28 ημέρες, 25 °C, ■ 2.5% μακρο, ■ 2.5% νανο, ■ 5% μακρο, ■ 5% νανο, ■ 5% νανο κρόκος 0.01, ■ 5% νανο κρόκος 0.02, ■ 10% μακρο, ■ 10% νανο)



Διάγραμμα 16. Σύγκριση του βαθμού ανισιδίνης των φρέσκων (ημέρα 0) και αποθηκευμένων (28^η ημέρα) των μάκρο- και νανο-γαλακτωμάτων. (■ ημέρα 0, ■ ημέρα 28)

Τα μακρο-γαλακτώματα με 2.5 % wt ελαιόλαδο ξεκινούν με την μικρότερη απορρόφηση (0.212) και μετά από 4 βδομάδες η απορρόφηση παραμένει χαμηλή (0.331). Τα νανο-γαλακτώματα με 10 % wt ελαιόλαδο έχουν τις μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης κατά την 1^η ημέρα (0.535) και παρατηρείται μεγάλη αύξηση μετά από 4 βδομάδες (1.018). Στα υπόλοιπα δείγματα οι απορροφήσεις κατά την 1^η βδομάδα παραμένουν σταθερές και κατά την 2^η βδομάδα παρατηρείται αύξηση. Όπως αναφέρθηκε πριν για την προσθήκη του κρόκου χρησιμοποιήθηκαν τα γαλακτώματα

με 5 % wt ελαιόλαδο. Λόγω των αντιοξειδωτικών κροκινών περιμέναμε ότι η οξείδωση σε αυτά τα δείγματα θα είναι μειωμένη συγκριτικά με αυτά χωρίς κρόκος, στα δείγματα με 0.01 % wt κρόκου αυτό επαληθεύεται (περίπου η ίδια οξείδωση), ενώ τα δείγματα με 0.02 % wt κρόκου παρουσιάζουν μεγαλύτερη οξείδωση. Το διάγραμμα 14 μπορεί να μας δώσει μια εικόνα για την εξέλιξη της οξείδωσης καθώς συγκρίνει τα δείγματα κατά την ημέρα παρασκευής και μετά από 28 μέρες αποθήκευσης. Βλέπουμε ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του ελαιολάδου αυξάνεται και η οξείδωση των δειγμάτων κάτι που δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί από την βιβλιογραφία., δηλαδή φαίνεται να σχετίζεται με τον όγκο του ελαιολάδου και όχι την επιφάνεια του. Επίσης, τα νανο-γαλακτώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη οξείδωση από τα μακρο-γαλακτώματα κάτι που οφείλεται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά την υπερήχηση.

Οι Abbas et al. (2013) αναφέρουν ότι η σπηλαιώση που παρατηρείται κατά την υπερήχηση, θεωρείται από τους κύριους παράγοντες που ευθύνονται για την οξείδωση της γεύσης και της σύστασης των λιπαρών οξέων ενώ επίσης επισημάνουν ότι το υλικό της κυλινδρικής κεφαλής, μπορεί να επάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Τα δείγματα με κρόκο κατά την μέρα παρασκευής παρουσιάζουν τις ίδιες τιμές οξείδωσης με τα αντίστοιχα νανο-γαλακτώματα. Όμως μετά τις 28 μέρες αποθήκευσης τα δείγματα με 0.02 % wt ποσότητα κρόκου παρουσιάζουν μεγαλύτερη οξείδωση από αυτά με 0.01 % wt ή καθόλου κρόκου (0.9 σε σύγκριση με 0.54 και 0.682), βέβαια όπως παρατηρούμε τα δείγματα με 0.02 % wt κρόκου παρουσιάζουν μεγάλη τυπική απόκλιση οπότε είναι δύσκολο να εξαχθούν συμπεράσματα. Στο διάγραμμα 15 γίνεται η σύγκριση των ποσοτήτων αλδευδών στα δείγματα μετά από 28 ημέρες αποθήκευσης. Εδώ παρατηρούμε ότι κατά την 1^η και την 2^η βδομάδα υπάρχει μια μείωση στην ποσότητα των αλδευδών ενώ κατά την 3^η βδομάδα παρατηρείται μια αύξηση η οποία την τελευταία βδομάδα είναι ραγδαία. Αν παρατηρήσουμε και το διάγραμμα 16 που συγκρίνει την 1^η με την 28^η ημέρα αποθήκευσης δεν παρατηρούμε περισσότερη οξείδωση στα νανο-γαλακτώματα ούτε φαίνεται να υπάρχει κάποια εξάρτηση με την συγκέντρωση ελαιολάδου. Αυτό που πρέπει να επισημανθεί είναι ότι το γαλακτώμα με 0.02% κρόκο παρουσιάζει την μεγαλύτερη ποσότητα αλδευδών μετά από 28 μέρες. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι η οξείδωση που παρατηρείται σε όλα τα δείγματα μετά από 28 μέρες είναι πολύ μικρή σε σχέση με τις τιμές που καταγράφονται στην βιβλιογραφία, 7 βαθμός ανισιδίνης σε γαλακτώματα με 5% wt έλαιο μετά από 7 μέρες αποθήκευσης (Kargar et al. 2011),

απορρόφηση συζυγών διενίων από 1.5 ως 3 μετά από 7 μέρες αποθήκευση (Jayasinghe et al. 2013) (Shanmugam and Ashokummar, 2014)

Επίσης είναι γνωστό ότι το ελαιόλαδο περιέχει από μόνο του αντιοξειδωτικά (Boskou et al., 2006). Σημαντική είναι και η συνεισφορά των πρωτεϊνών λόγω της ικανότητας τους να μειώνουν την οξείδωση των λιπαρών οξέων όταν βρίσκονται στη συνεχή φάση των γαλακτωμάτων λόγω του ότι εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες με της υδροθειομάδες τους (Kargar et al., 2011). Τέλος, ο κρόκος δεν είχε την αντιοξειδωτική δράση που αναμέναμε, μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτής γεύσης καθώς παρουσιάζει χαμηλές τιμές οξείδωσης,

Οι McClements and Decker (2000) αναφέρουν ότι στα γαλακτώματα η οξείδωση συμβαίνει στην διεπιφάνεια υδάτινης - διεσπαρμένης φάσης οπότε η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι πολύ διαφορετική από ότι σε απλά έλαιο ανάλογα με τις δυνάμεις που κυριαρχούν (Kioakas and Varzakas, 2014). Επίσης, για να γίνει η περιγραφή των αντιοξειδωτικών σε γαλακτώματα, πρέπει να αναφερθεί το παράδοξο των αντιοξειδωτικών το οποίο αναφέρει ότι σε ένα έλαιο είναι πιο αποτελεσματικά τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά από ότι τα λιπόφιλα, ενώ στα γαλακτώματα είναι πιο αποτελεσματικά τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (Lante and Friso, 2013).

7.7 Συμπεράσματα

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η να εξεταστεί η επίδραση της μείωσης του μεγέθους των λιποσφαιρίων στην κλίμακα των νανο-υπόμικρων στην φυσική και οξειδωτική σταθερότητα γαλακτωμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιολάδου, προκειμένου να σχεδιαστούν προϊόντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Επίσης με την προσθήκη του κρόκου εξετάστηκε η τροποποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών όπως επίσης και η δράση τους ως αντιοξειδωτικός παράγοντας κατά την διάρκεια της αποθήκευσης.

Συνοψίζοντας βλέπουμε ότι η χρήση των υπερήχων είχε την δυνατότητα να μειώσει το μέγεθος των λιποσφαιρίων στην κλίμακα των νανο-υπομικρών, η συγκέντρωση του ελαιολάδου επηρέασε το μέγεθος των λιποσφαιρίων καθώς μια αυξημένη συγκέντρωση είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους, ενώ τα νανο-γαλακτώματα με 2.5% wt ελαιόλαδο παρουσίασαν το μικρότερο μέγεθος λιποσφαιρίων (207.3 nm) και την μικρότερη πολυδιασπορά (0.219).

Κατά την εξέταση της σταθερότητας, τα γαλακτώματα με 0.5% και 0.75% συγκέντρωση κόμμεως τριγωνέλλας ήταν ασταθή κατά την διάρκεια της αποθήκευσης και διαχωρίστηκαν, τα γαλακτώματα με 1% συγκέντρωση διαλύματος κόμμεως τριγωνέλλας ήταν σταθερά κατά την διάρκεια της αποθήκευσης άσχετα από την συγκέντρωση του ελαιολάδου. Τα νανο-γαλακτώματα είχαν μεγαλύτερη σταθερότητα συγκριτικά με τα μακρο-γαλακτώματα καθώς παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και η μεταβολή κατά την διάρκεια της αποθήκευσης ήταν μικρή (<4%), ενώ τα πιο σταθερά ήταν τα νανο-γαλακτώματα με 5% ελαιολάδο καθώς παρουσίασαν μεταβολή κατά την διάρκεια 10 ημερών μόλις 1.02%.

Η επίδραση της επεξεργασίας με υπερήχους στο ιξώδες είχε ως αποτέλεσμα τα νανο-γαλακτώματα να παρουσιάσουν μεγαλύτερες τιμές ιξώδους, συντελεστή αποθήκευσης (G') και συνελεστή απώλειας (G'') σε όλες τις συγκεντρώσεις ελαιολάδου, λόγω της μείωσης του μεγέθους των λιποσφαιρίων. Τα νανο-γαλακτώματα με 10% ελαιολάδο παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές των μελετώμενων ιδιοτήτων και η διαφορά τους από τα νανο-γαλακτώματα ήταν πιο εμφανής σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο που έγινε για την εύρεση της καλύτερης συγκέντρωσης κρόκου, βρέθηκε ότι σε μια μεγάλη ποσότητα κρόκου το χρώμα των δειγμάτων έμοιαζε με αυτό της μουστάρδας, κανένα από τα δείγματα δεν παρουσίασε πικρότητα ενώ η συγκέντρωση των 100 mg/kg ήταν αυτή που είχε την καλύτερη βαθμολογία ως προς το χρώμα, την πικρότητα, την επίγευση, και την συνολική εντύπωση.

Τέλος, κατά την εξέταση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων και της αντιοξειδωτικής δράσης του κρόκου, η αύξηση της συγκέντρωσης του ελαιολάδου είχε ως αποτέλεσμα της αύξηση της οξειδωσης, τα νανο-γαλακτώματα παρουσίασαν μεγαλύτερη οξειδωση από τα αντίστοιχα μακρο-γαλακτώματα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης (από 20%-58%) πιθανόν λόγω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών κατά την επεξεργασία με υπερήχους. Η μέθοδος της p-ανισιδίνης δεν ήταν κατάλληλη να μας δώσει μια ξεκάθαρη εικόνα για τα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης, καθώς δεν έδειξε ούτε εξάρτηση από την συγκέντρωση του ελαιολάδου, από τον τύπο επεξεργασίας των γαλακτωμάτων και την παρουσιά ή μη κρόκου, ενώ ο κρόκος δεν είχε την αντιοξειδωτική δράση που αναμενόταν.

8. Βιβλιογραφία

Abbas S., Hayat K., Karangwa E., Bashari M., Xiaoming Zhang X., (2013): An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions, *Food Engineering Reviews*, 5:3, 139-157

Anton N., Vandamme TF., (2009): The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 377(1-2), 142–147

Belitz H. D., Grosch, W. (1999): *Lipids, Food Chemistry*, Berlin Heidelberg, Springer. 1070p

Chanamai R., Herrmann N., McClements D. J., (2000): Probing Floc Structure by Ultrasonic Spectroscopy, Viscometry, and Creaming Measurements, *Langmuir*, 16:14, 5884–5891

Choe E., Min, D. B., (2006): Mechanisms and factors of edible oil oxidation, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 169-186

Ercelebi A. E., Ibanoglu E., (2010): Effects of pectin and guar gum on creaming stability, microstructure and rheology of egg yolk plasma-stabilized emulsions, *European Food Research and Technology*, 231, 297–302

Guillen M. D., Cabo N., (2002): Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine stability of edible oils, *Food Chemistry*, 77, 503-510

Hoefer A. C., (2004): *Hydrocolloids*, United States, American Association of Cereal Chemists, 111p

Huck-Iriart C., Álvarez-Cerimedo M. S., Candal R. J., Herrera M. L., (2011): Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16, 412–420

International Standard ISO 3632-1:1993 (1993): *Saffron (Crocus Sativus L.) Part1, Specification*

- Jafari S. M., He Y., Bhesb Bhandari B., (2006): Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison, *International Journal of Food Properties*, 9:3,475-485
- Jafari S. M., He Y., Bhandari B. (2007): Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques, *Journal of Food Engineering*, 82, 478–488
- Jayasinghe C., Gotoh N., Wada S., (2014): Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions, *Food Chemistry*, 141, 3077–3084
- Kaci M., Meziani S., Arab-Tehrany E., Gillet G., Desjardins-Lavisse I., Desobry S., (2014): Emulsification by high frequency ultrasound using piezoelectric transducer: Formation and stability of emulsifier free emulsion, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21:3, May 1010-1017
- Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Tajmir-Riahi, H.A., Polissiou, M.G., (2007): Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: Stability and antioxidative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 970–977
- Kargar M., Spyropoulos F., Norton I. T., (2011): The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions *Journal of Colloid and Interface Science*, 357, 527–533
- Kiokias S., Varzakas T., (2014): Activity of flavonoids and b-carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions, *Food Chemistry*, 150, 280–286
- Konaganti V. K., Madras G., (2010): Ultrasonic degradation of poly(methyl methacrylate-co-alkyl acrylate) copolymers, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 403–408
- Lam R. S.H, Nickerson M. T., (2013): Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach, *Food Chemistry*, 141:2, 975-984

Maali A, Mosavian M. T. H., (2013): Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010), *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34:1, 92-105

Marcotte M., Taherian A.R., Ramaswamy H.S. (2001): Evaluation of rheological properties of selected salt enriched food hydrocolloids, *Journal of Food Engineering*. 48:2, 157-167

Mashmoul M., Azlan A., Khazaai H., Yusof B. N. M., Noor S. M., (2013): Saffron: A Natural Potent Antioxidant as a Promising Anti-Obesity Drug, *Antioxidants*, 2, 293-308

Mathur V., Mathur N. K., (2005): Fenugreek and other lesser known legume galactomannan–polysaccharides: Scope for developments, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64: 475-481

McClements D. J, Decker E. A. (2000): Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous foodsystems, *Journal of Food Science*, 65, 1270–1282

McClements D. J., (2005): *Food emulsions, Principles, Practice and Techniques*, 2nd edition, United States, CRC Press, 609p

Mei L., McClements D. J., Decker, E. A., (1999): Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:6, 2267–2273

Moates G. K, Watson A. D, Robins M. M., (2001): Creaming and oscillation rheology of weakly flocculated concentrated emulsions, *Physicochemical and Engineering Aspects*, 190, 167–178

Mollet, H., Grubenmann, A., (2007): *Emulsions–Properties and Production, Formulation Technology: Emulsions, Suspensions, Solid Forms*. Germany, Willey-VCH, 445p

Moore K., Roberts II L., (1998): Measurement of lipid peroxidation, *Free Radical Research*, 28, 659-671

Palazolo G. G., Sorgentinib D. A, Wagner J. R., (2005): Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates, *Food Hydrocolloids*, 19, 595–604

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists, (AOCS) (1998): p-Anisidine value, Method cd 18-90, Champaign, IL, AOCS Press

Robins M. M., Watson A.D., Wilde P. J., (2002): Emulsions creaming and rheology, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7, 419-425

Rózanska S., Broniarz-Press L., Rózanski J, Mitkowski P. T., Ochowiak M., Woziwodzki S., (2013), Extensional viscosity of o/w emulsion stabilized by polysaccharides measured on the opposed-nozzle device, *Food Hydrocolloids*, 32, 130-142

Shanmugam A., Ashokkumar M., (2014): Functional properties of ultrasonically generated flaxseed oil-dairy emulsions, *Ultrasonics Sonochemistry*, unpublished

Spernath L., Regev O., Levi-Kalisman, Y, Magdassi, S., (2009): Phase transitions in o/w lauryl acrylate emulsions during phase inversion, studied by light microscopy and cryo-TEM, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 332, 19–25

Srivastava R., Ahmed H., Dixit RK., (2010): *Crocus sativus* L: a comprehensive review. *Pharmacognosy Rev*, 4, 200-208

Zinoviadou K. G., Scholten E., Moschakis T., Biliaderis, C. G., (2012): Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes, *International Dairy Journal*, 26, 94-101

<http://www.iama.gr/ethno/crocus/trntls.html>