



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

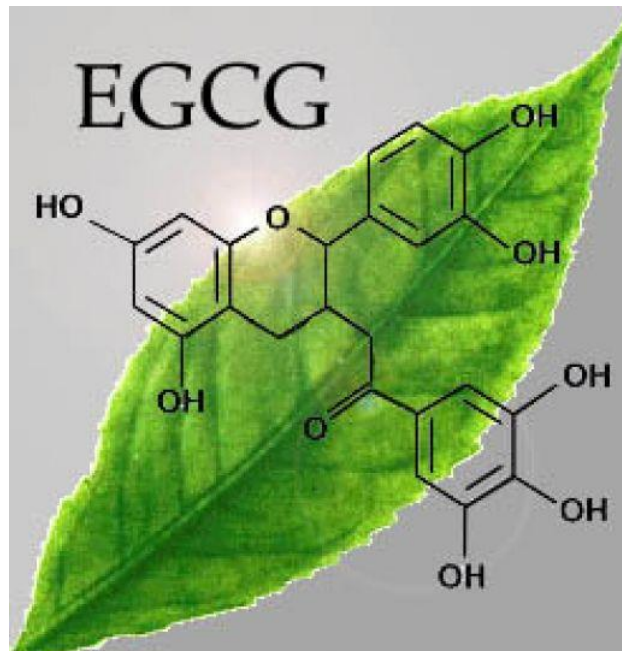
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης
Γεωργικών Προϊόντων

ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων

Μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία

«Επίδραση της ενσωμάτωσης της EGCG σε γαλακτώματα που
περιέχουν βακτηριακή κυτταρίνη»



Ευαγγελία Μ. Παπαδοπούλου



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφής του
Ανθρώπου**

Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων

Μεταπτυχιακή μελέτη

**«Επίδραση της ενσωμάτωσης της EGCG σε γαλακτώματα που
περιέχουν βακτηριακή κυτταρίνη»**

Ευαγγελία Μ. Παπαδοπούλου

Επιβλέπων : Ιωάννα Μαντάλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Τριμελής επιτροπή : Ιωάννα Μαντάλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α
Βασιλική Ευαγγελίου, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α
Νικολαος Στοφόρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ, 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκες το 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 κ. Ιωάννας Μαντάλα.

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

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Εύη Παξιμαδά για την βοήθεια και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις που με βοήθησαν να ολοκληρώσω την πειραματική έρευνα και την συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε μέσα στο εργαστήριο.

Επίσης να ευχαριστήσω την επίκουρο Καθηγήτρια Βασιλική Ευαγγελίου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και την αγάπη μου στον Γιώργο και τους φίλους μου για την αγάπη τους, την κατανόηση και την υποστήριξή τους που τα κάνει όλα δυνατά! Βέβαια το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου και τον αδερφό μου Κωνσταντίνο , των οποίων η αγάπη και η πίστη στις δυνατότητές μου αποτέλεσε αρωγός σε όλους τους στόχους και τα όνειρά μου.

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά να ερευνηθεί η επίδραση της ενσωμάτωσης της βακτηριακής κυτταρίνης (BC) στις φυσικές ιδιότητες των παραγόμενων γαλακτωμάτων. Επίσης σκοπός ήταν να εξεταστεί η ενσωμάτωση της γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης (EGGC/εστεροποιημένης EGCG) και η αντιοξειδωτική της ικανότητα σε γαλακτώματα ελαίου/νερού τα οποία περιέχουν BC και πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI). Για τον πρώτο σκοπό, παρασκευάστηκαν γαλακτώματα ελαίου/νερού που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις BC (0-1% κβ) και WPI (2-5% κβ), στα οποία μελετήθηκε το μέγεθος των λιποσφαιρίων, το φορτίο, η σταθερότητα καθώς και η ρεολογική τους συμπεριφορά. Κατά την εξέταση της κατανομής του μεγέθους των λιποσφαιρίων παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος τους παραμένει σταθερό στα 600nm και δεν επηρεάζεται από την προσθήκη της BC. Επίσης, ποσότητα 0.5% κβ BC είναι αρκετή για να επέλθει κορεσμός στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων. Στο pH των γαλακτωμάτων (pH=3,8) οι πρωτεΐνες που προσροφώνταν από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων ήταν θετικά φορτισμένες με αποτέλεσμα ακόμα και μετά την προσθήκη της αρνητικά φορτισμένης BC το φορτίο να παραμένει θετικό αλλά μικρότερο. Κατά την εξέταση της σταθερότητας κατά την αποθήκευση, παρατηρήθηκε ότι στην μεγαλύτερη συγκέντρωση της WPI (5% κβ), η WPI προσροφάται από την διεπιφάνεια ελαίου-νερού και η περίσσεια της παραμένει στην υδατική φάση δημιουργώντας σύμπλοκα με την περίσσεια της BC όταν η BC είναι 1% κβ. Τα σύμπλοκα προλαμβάνουν την συνένωση μεταξύ των λιποσφαιρίων, ενώ η υπόλοιπη BC απορροφάται από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων δημιουργώντας ένα δεύτερο προστατευτικό υμένιο γύρω τους. Το πιο σταθερό γαλάκτωμα είχε 5% κβ WPI και 1% κβ BC. Στην δεύτερη φάση του πειράματος εξετάστηκε η ενσωμάτωση της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1, 0.2, 0.5 mg/mL) στις δύο φάσεις του γαλακτώματος, ώστε να μελετηθεί το ποσοστό απόδοσής της και η αντιοξειδωτική της ικανότητα. Υπολογίστηκε ο δείκτης ενσωμάτωσης (Incorporation Efficiency %), τα αποτελέσματα του οποίου έδειξαν ότι τα υψηλότερα ποσοστά (95% και 90%) αντιστοιχούν στην μικρότερη συγκέντρωση (0,1% mg/mL) της εστεροποιημένης EGCG στην υδατική και λιπαρή φάση αντίστοιχα. Για την μέτρηση της οξείδωσης των γαλακτωμάτων, υπολογίστηκαν τα πρωτογενή (Μέθοδος συζυγών διενίων-CD) και τα δευτερογενή (μέθοδος p-Ανισιδίνης) προϊόντα οξείδωσης και βρέθηκε ότι η λιπόφιλη εστεροποιημένη EGCG (0,1mg/mL) στην λιπαρή φάση είχε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Λέξεις κλειδιά: Βακτηριακή κυτταρίνη (BC),EGCG,εστεροποιημένη EGCG, πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI), γαλάκτωμα, λιποσφαίρια, σταθερότητα, αντιοξειδωτικό

Abstract

The purpose of this study, was firstly to investigate the effect of the integration of bacterial cellulose (BC) to the physical properties of oil-in-water emulsions and secondly to investigate the encapsulation of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in oil-in-water emulsions and the antioxidant capacity that it has on these emulsions.

Initially o/w emulsions were prepared at pH=3,8 using whey protein isolated as an emulsifier (WPI) (2-5% wt) and bacterial cellulose (BC) as a stabilizer, in various concentrations (0-1% wt). Physical properties of the emulsions, such as droplet size, z-potential, stability during storage and rheological properties were investigated. Size distribution of the emulsions showed two distinct peaks: the first one reflected the oil droplet size (600nm), which remained the same for all the emulsions and the second one reflected the aggregated flocs of BC fibrils that remained in the aqueous phase. The oil droplet size was not affected by the addition of BC and also, an amount of 0,5% wt BC is sufficient to saturate the surface of the oil droplets. The protein that adsorbed in the surface of the oil droplets, bears a positive charge at pH=3.8. With the addition of BC in the emulsion, the BC fibrils adsorbed onto the surface of the positively charged WPI-coated oil droplets, mainly through electrostatic attractions and the ζ -potential values remain positive but decreased in value. During the examination of the storage stability of the emulsions, it was observed that the WPI with the greatest concentration (5% wt) was adsorbed by the oil-water interface and that the excess of WPI remained in the aqueous phase, forming complexes with the excess of BC (1% wt), which prevented the coalescence of the oil-droplets, while the rest of BC is adsorbed by the surface of the oil droplets forming a second protective film around the oil droplets. So The high BC concentration (1%) and high WPI concentration (5%) lead in stable emulsions, Subsequently, the incorporation of EGCG and lipophilised EGCG in various concentrations (0.1, 0.2, 0.5 mg/mL), in the aqueous and oil phase of the emulsion was investigated in order to examine the incorporation efficiency and the anti-oxidative activity of EGCG during storage. The results of the incorporation efficiency (%) demonstrated that the highest levels (95% and 90%) correspond to the lowest concentration (0,1 mg/mL) of the esterified EGCG in the aqueous and oil phase of the emulsion, respectively. For the examination of oxidation of emulsions, the primary (CD-method) and the secondary (p-Anisidine method) products of oxidation were estimated and found that lipophilic esterified EGCG (0,1 mg/mL) had the greater antioxidant capacity.

Key words: Bacterial cellulose (BC), whey protein isolated (WPI), emulsion, EGCG, lipophilised EGCG, droplet, stability, antioxidant

Περιεχόμενα

1.	Γαλακτώματα	8
1.1	Ορισμός γαλακτωμάτων και κατηγορίες	8
1.2	Βασικές αρχές παρασκευής γαλακτωμάτων	9
1.3	Μέθοδοι υψηλής ενέργειας	9
1.4	Συσκευές ομογενοποίησης	10
1.4.1	Ομογενοποιητής υψηλής διάτμησης (High speed mixer).....	10
1.4.2	Κολλοειδείς μύλοι.....	11
1.4.3	Ομογενοποιητές υπερήχων (Ultrasound Homogenizer).....	12
1.4.4	Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης με βαλβίδα (High-pressure valve homogenizers).....	14
2	Μηχανισμοί αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων	15
2.1	Συνένωση (Coalescence)	17
2.1.1	Μερική συνένωση (partial coalescence).....	18
2.2	Κροκίδωση (Flocculation)	18
2.2.1	Αυθόρμητη κροκίδωση	18
2.2.2	Κροκίδωση υπό εκκένωση (Depletion flocculation)	19
2.2.3	Κροκίδωση υπό γεφύρωση (Bridging-flocculation).....	20
2.3	Αποκορύφωση (creaming)	20
2.4	Ωρίμανση κατά Ostwald	21
2.5	Αναστροφή φάσης	21
3	Γαλακτωματοποιητές	22
3.1	Λειτουργία των γαλακτωματοποιητών	22
3.2	Πρωτεΐνες ως γαλακτωματοποιητές	23
3.2.1	Πρωτεΐνες ορού γάλακτος (Whey Protein, WP)	25
3.3	Γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους	27
4	Υδροκολοειδή.	28
4.1	Βακτηριακή κυτταρίνη (Bacterial cellulose)	29
5	Οξείδωση	31
5.1	Μηχανισμοί οξείδωσης	31
5.2	Σχηματισμός συζυγών υπεροξειδίων- Πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης	33
5.3	Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης	33
5.4	Μέθοδοι μέτρησης των προϊόντων της οξείδωσης	34
6	Αντιοξειδωτικά.....	35

6.1	Κατεχίνες	36
6.2	EGCG	37
6.2.1	Χημικές ιδιότητες της EGCG	37
6.2.2	Φυσικές ιδιότητες της EGCG	38
6.3	Εστεροποιημένη EGCG/ Λιπόφυλη EGCG	38
6.4	Ενθυλάκωση της EGCG	39
6.5	EGCG και οι πρωτεΐνες	39
7	Υλικά και μέθοδοι	42
7.1	Υλικά	42
7.2	Μέθοδοι	43
7.2.1	Παραγωγή της βακτηριακή κυτταρίνης (BC).....	43
7.2.2	Παρασκευή γαλακτωμάτων	44
7.2.3	Παρασκευή γαλακτωμάτων με προσθήκη EGCG	45
7.2.4	Μέθοδοι μέτρησης της οξείδωσης.....	47
7.2.5	Εκτίμηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων	48
7.2.6	Εκτίμηση του ζ-δυναμικού	49
7.2.7	Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση υπό ψύξη	51
7.2.8	Οπτικό μικροσκόπιο.....	52
7.2.9	Ρεολογικά χαρακτηριστικά.....	53
7.2.10	Απόδοση ενσωμάτωσης της EGCG (Incorporation Efficiency)	53
8	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – Αποτελέσματα.....	55
8.1	Η επίδραση της WPI και της BC στην κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων	55
8.2	Επίδραση της συγκέντρωσης της WPI και της BC στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση	60
8.3	Μέτρηση του ιξώδους και της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς.	63
8.4	Απόδοση της ενσωμάτωσης της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG.	65
8.4.1	Δημιουργία καμπύλης της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG.....	65
8.4.2	Απόδοση της ενσωμάτωσης (Incorporation Efficiency).....	66
8.5	Προσδιορισμός Προϊόντων Οξείδωσης	69
8.6	Συμπεράσματα	74
9	Βιβλιογραφία	76
10	Παράρτημα	88
10.1	Ενδεικτικά διαγράμματα οπισθοσκέδασης του φωτός (Back Scattering)	88
10.1.1	BC=1% wt.....	88

10.1.2	BC=0% wt.....	89
10.2	Εικόνες γαλακτωμάτων μετά το πέρας της αποθήκευσης	90
10.2.1	BC=1%.....	90
10.2.2	BC=0,5% wt.....	90
10.3	Εικόνες μικροσκοπίου	91
10.3.1	BC=0% wt.....	91
10.3.2	BC=0.5.....	91
10.3.3	BC=1% wt.....	92
11	ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ-ΕΙΚΟΝΩΝ-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	93
11.1.1	ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	93
11.1.2	ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	93
11.1.3	ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΩΝΩΝ	94

1. Γαλακτώματα

1.1 Ορισμός γαλακτωμάτων και κατηγορίες

Ως γαλάκτωμα ορίζεται ένα κολλοειδές σύστημα που αποτελείται από δύο μη αναμιγνυόμενα υγρά (συνήθως λάδι και νερό) με ένα από τα υγρά να διασπείρεται σε μικρά σφαιρικά λιποσφαίρια μέσα στο άλλο (Friberg et al., 2004; McClements, 2005). Στα περισσότερα τρόφιμα, το μέγεθος των λιποσφαιρίων (η διάμετρος) συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 100μm. (Dickinson and Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Friberg and Larrson, 1997). Το υγρό που βρίσκεται σε διασπορά σ' ένα γαλάκτωμα αναφέρεται ως ασυνεχή ή εσωτερική φάση ενώ το υγρό που τα περιβάλλει ως συνεχή φάση. Τα γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την σχετική κατανομή της υδατικής και της λιπαρής τους φάσης σε :

- Γαλακτώματα τύπου **ελαίου σε νερό (o/w)** όπου τα λιποσφαίρια διασπείρονται στην υδατική φάση. Παράδειγμα τέτοιων τροφίμων αποτελούν το γάλα, οι κρέμες, οι σάλτσες, η μαγιονέζα, τα ποτά, οι σούπες και τα dressings.
- Γαλακτώματα τύπου **νερό σε έλαιο (w/o)** όπου λιποσφαίρια νερού διασπείρονται στην λιπαρή φάση (συνεχή φάση). Παράδειγμα τέτοιων τροφίμων είναι το βούτυρο και η μαργαρίνη.
- **Διπλά γαλακτώματα** τα οποία είναι του τύπου έλαιο-σε νερό-σε έλαιο (w/o/w) και νερό-σε έλαιο-σε νερό (o/w/o), όπου λιποσφαίρια ή λιποσφαίρια νερού βρίσκονται σε διασπορά σε λιποσφαίρια νερού ή λιποσφαίρια αντίστοιχα, τα οποία βρίσκονται σε διασπορά στην λιπαρή φάση ή την υδατική.

Υπάρχουν διαφορετικές κατηγορίες γαλακτωμάτων οι οποίες διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθος των λιποσφαιρίων τους (Πίνακας 1)

Πίνακας 1: Σύγκριση των διαφορετικών τύπων γαλακτωμάτων που μπορούν να δημιουργηθούν από νερό, έλαιο και γαλακτωματοποιητές (McClements DJ, 2011).

Emulsion Type	Radius range	Stability	Appearance
Emulsion	100 nm -100 μm	Metastable	Turbid/opaque
Nanoemulsions	10-100 nm	Metastable	Clear/turbid
Microemulsions	2-50 nm	Stable	Clear

- Τα **συμβατικά γαλακτώματα** το μέγεθος των λιποσφαιρίων (μέση ακτίνα) των οποίων είναι μεταξύ 100nm και 100mm. Αυτά τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή λόγω της σχετικά μεγάλης διεπιφανειακής τάσης (θετική ελεύθερης ενέργειας) μεταξύ της λιπαρής και της υδατικής φάσης.
- Τα **νάνο-γαλάκτωμα** που μπορεί να θεωρηθεί ως αν συμβατικό γαλάκτωμα το οποίο περιέχει λιποσφαίρια μεταξύ 10 - 100 nm. Το μικρό μέγεθος των λιποσφαιρίων χαρίζει μεγαλύτερη σταθερότητα στα νάνο-γαλακτώματα στην εμφάνιση φαινομένων όπως ο διαχωρισμός και η συσσωμάτωση σε

σχέση με τα συμβατικά γαλακτώματα . (Tadros T. et al., 2004; . Wooster T.J. et al., 2008).

- Τα **μικρο-γαλακτώματα** είναι θερμοδυναμικά σταθερά συστήματα τα όποια περιέχουν σωματίδια τα οποία κυμαίνονται μεταξύ των 2 – 50 nm.

1.2 Βασικές αρχές παρασκευής γαλακτωμάτων

Για τον σχηματισμό ενός γαλακτώματος σημαντική επίδραση έχει η διεπιφάνεια, δηλαδή η επιφάνεια (A) που διαχωρίζει την υδατική φάση από την λιπαρή φάση. ☒ τασυστήματα ελαίου σε νερό, τα μη-πολικά μόρια του ελαίου δεν μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού, λόγω του υψηλού υδρόφοβου χαρακτήρα τους, με αποτέλεσμα τα δυο υγρά να μην μπορούν να αναμιχθούν. Αυτό οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων που είναι διασκορπισμένα στο νερό, με σκοπό να ελαττωθεί η επιφάνεια επαφής τους με το νερό, δηλαδή η διεπιφάνεια, δηλαδή ο αριθμός των ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων των δύο φάσεων. Αυτή η τάση μείωσης του μεγέθους των λιποσφαιρίων είναι το αποτέλεσμα της διεπιφανειακής τάσης, η τιμή της οποίας καθορίζεται από την έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των μοριακών δυνάμεων. Εκφράζει το απαραίτητο ποσό ενέργειας (ΔG) που πρέπει να προσφερθεί στο σύστημα του γαλακτώματος, ώστε να αυξηθεί το εμβαδό της διεπιφάνειας μεταξύ των δυο μη αναμίξιμων φάσεων και το σύστημα να επέλθει σε κατάσταση ισορροπίας.

Όσο δυσκολότερα αναμιγνύονται τα δυο υγρά τόσο πιο μεγάλη είναι η διεπιφανειακή τάση και άρα τόσο πιο μεγάλη είναι η απαιτούμενη ποσότητα ενέργεια για την επίτευξη της κατάστασης ισορροπίας. Η ενέργεια που απαιτείται ώστε να μειωθεί το μέγεθος των λιποσφαιρίων, αυξάνοντας έτσι το εμβαδό των διεπιφάνειας ανάμεσα στις δύο φάσεις, παρέχεται από την ομογενοποίηση του συστήματος με την χρήση κατάλληλων συσκευών, όπως οι ομογενοποιητές υπερήχων ή υψηλής πίεσης ή από το χημικό δυναμικό των συστατικών του. Η μείωση της απαιτούμενης ενέργειας επιτυγχάνετε με την προσθήκη στα γαλακτώματα κατάλληλων ουσιών, των γαλακτωματοποιητών, οι οποίοι μειώνουν την επιφανειακή τάση. Επίσης οι γαλακτωματοποιητές μειώνουν και την συσσωμάτωση των λιποσφαιρίων κατά την διάρκεια της γαλακτωματοποίησης.

1.3 Μέθοδοι υψηλής ενέργειας

Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούν έντονες μηχανικές δυνάμεις για να διαλύσουν τις μακροσκοπικές φάσεις ή να μειώσουν το μέγεθος των λιποσφαιρίων. Κατά κανόνα περιλαμβάνουν την χρήση μηχανικών συσκευών που είναι γνωστοί ως ομογενοποιητές, οι οποίοι μπορεί να χρησιμοποιούν ανάμιξη υπό υψηλή διάτμηση, ομογενοποιητές υψηλής πίεσης (High Pressure Homogenization), ομογενοποιητές υπερήχων (Ultrasonic emulsification)(McClements, 2005). Αντίθετα οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας βασίζονται στην αυθόρμητη δημιουργία γαλακτωμάτων κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες που έχουν ως αποτέλεσμα την

μεταβολή των διεπιφανειακών ιδιοτήτων των συστατικών του γαλακτώματος. (McClements and Li 2010). Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας απαιτούν μεγάλες ποσότητες ενέργειας και δεν είναι πάντα συμφέρουσες για την χρήση τους σε βιομηχανική παραγωγή. Για μεγάλες βιομηχανικές παραγωγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι χαμηλής ενέργειας όπως η αναστροφή φάσεων. Όμως το απαραίτητο ποσοστό ενέργειας μειώνεται με την χρήση των γαλακτωματοποιητών. Η χρήση της ομογενοποίηση με υψηλή πίεση (HPH) και μικρορευστοποίηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα ενώ οι υπέρηχοι χρησιμοποιείται κυρίως σε εργαστηριακή κλίμακα.

Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας είναι αποτελεσματικές στη μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων αλλά μπορεί να μην είναι κατάλληλη η χρήση τους σε ορισμένα ασταθή μόρια όπως οι πρωτεΐνες ή τα πεπτίδια. (Bilbao Sáinz et al. 2010)

1.4 Συσκευές ομογενοποίησης

Ένας αριθμός διαφορετικών συσκευών ομογενοποίησης έχει αναπτυχθεί κατά την πάροδο των χρόνων για την παραγωγή γαλακτωμάτων τροφίμων. Κάθε μια από τις συσκευές έχει τα δικά της μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα, και ένα εύρος υλικών για τα οποία είναι κατάλληλες. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου ομογενοποιητή εξαρτάται από το αν το γαλάκτωμα γίνεται σε ένα εργοστάσιο ή σε ένα εργαστήριο, τον διαθέσιμο εξοπλισμό, τον όγκο των υλικών που πρόκειται να ομογενοποιηθούν, την επιθυμητή απόδοση, την φύση των αρχικών υλικών, την επιθυμητή κατανομή μεγέθους των λιποσφαιρίων, τις απαιτούμενες φυσικοχημικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος και από το κόστος αγοράς και λειτουργίας του εξοπλισμού (Mc Clements, 2005). Οι πιο σημαντικοί τύποι ομογενοποιητών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων ή οι επιστήμονες στα ερευνητικά κέντρα παρουσιάζονται παρακάτω.

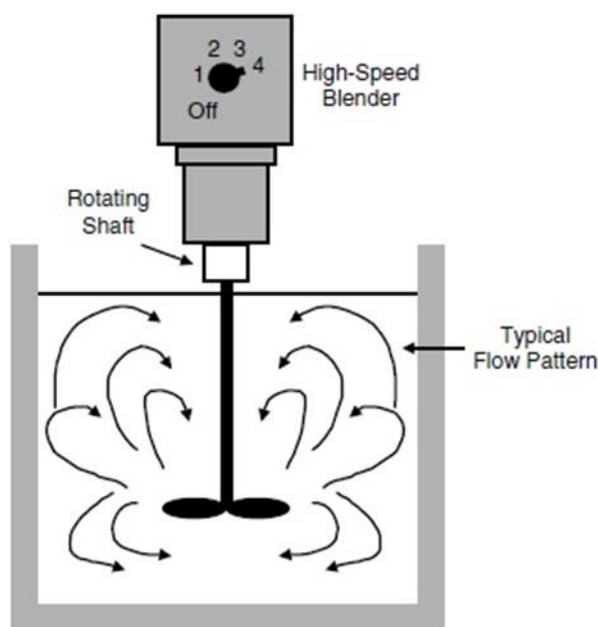
1.4.1 Ομογενοποιητής υψηλής διάτμησης (High speed mixer)

Οι αναμικτήρες υψηλής διάτμησης είναι η πιο διαδιδόμενη μέθοδος για την απευθείας ομογενοποίηση του ελαίου στην υδατική φάση, δηλαδή για γαλακτώματα ελαίου-νερό, στην βιομηχανία τροφίμων (Loncin and Merson, 1979; Brennan et al., 1981; Fellows, 2000). Στην μέθοδο κατά παρτίδες, το λάδι, το νερό και τα υπόλοιπα συστατικά που πρόκειται να ομογενοποιηθούν τοποθετούνται σε ένα κατάλληλο δοχείο που μπορεί να περιέχει μικρές ποσότητες της τάξης των cm^3 (για εργαστηριακή χρήση). Στη συνέχεια τα συστατικά αναδεύονται με μια κεφαλή ανάμειξης η οποία περιστρέφεται με αρκετά υψηλή ταχύτητα (έως 3600 r min^{-1}). Τα συστατικά του γαλακτώματος μπορούν αν προστεθούν στην αρχή της διαδικασίας ή μπορεί να προστίθενται διαδοχικά ώστε να επιτευχθεί βελτίωση της διασποράς και μείωση του χρόνου ομογενοποίησης.

Η ανάμιξη γενικά οδηγεί σε ελαφρά αύξηση της θερμοκρασίας του γαλακτώματος καθώς μερική από την μηχανική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω της διάχυσης του ιξώδους, για αυτό αν κάποιο από τα συστατικά είναι ευαίσθητό στην θερμότητα είναι απαραίτητος ο έλεγχος της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της ομογενοποίησης.

Οι αναμικτήρες υψηλής ταχύτητας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την παρασκευή γαλακτωμάτων με χαμηλό ή μέτριο ιξώδες.

Το μέγεθος των λιποσφαιρίων συνήθως μειώνεται όταν αυξάνεται η ταχύτητα περιστροφής της κεφαλής ή ο χρόνος ομογενοποίησης, μέχρι ένα σημείο το οποίο εξαρτάται από την φύση και την συγκέντρωση των συστατικών. Τυπικά το μέγεθος των λιποσφαιρίων (η διάμετρος) που παράγονται από έναν αναμικτήρα υψηλής ταχύτητας είναι μεταξύ 2 και 10 μm . Στη βιομηχανία των τροφίμων χρησιμοποιείται για την παρασκευή χονδροειδών γαλακτωμάτων τροφίμων και για την διασπορά και διάλυση συστατικών σε μορφή πούδρας.



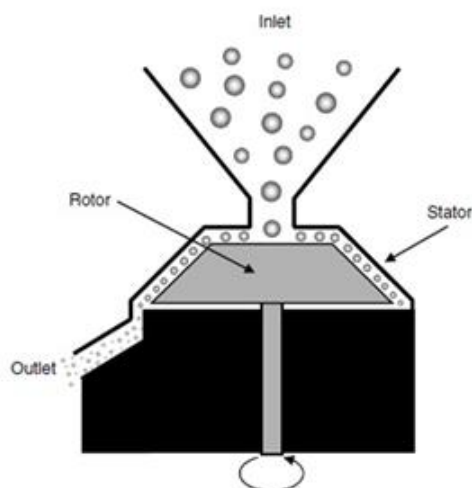
Εικόνα 1: Αναμικτήρες υψηλής ταχύτητας που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων για την ομογενοποίηση γαλακτωμάτων της μορφής λάδι σε νερό. (McClements, 2007).

1.4.2 Κολλοειδείς μύλοι

Οι κολλοειδείς μύλοι χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων για την ομογενοποίηση υγρών μέτριοι και υψηλού ιξώδους (Loncin and Merson, 1979; Walstra, 1983; Fellows, 1988; Schubert, 1997). Ένα μύλος κολλοειδών συνήθως περιέχει δύο δίσκους : έναν περιστρεφόμενο δίσκο (ρότορα) και έναν στατικό δίσκο. Τα υγρά που πρόκειται να ομογενοποιηθούν συνήθως τροφοδοτούνται στο κέντρο του μύλου σε μορφή χονδροειδούς γαλακτώματος (προ-γαλακτώματος), παρά σαν δύο ξεχωριστές φάσεις όπως σε λιπαρή και υδατική φάση, καθώς η συσκευή είναι πολύ πιο αποτελεσματική στη μείωση του μεγέθους των

λιποσφαιρίων σε ένα γαλάκτωμα που προϋπάρχει, σε ένα προ-γαλάκτωμα (δευτερογενής ομογενοποίηση) από την ομογενοποίηση δύο ξεχωριστών φάσεων (αρχική ομογενοποίηση).

Η ταχεία περιστροφή του ρότορα παράγει μια τάση διάτμησης στο διάκενο που προκαλεί τα μεγαλύτερα λιποσφαίρια να χωρίζονται σε μικρότερα και παράγει φυγόκεντρο δύναμη που αναγκάζει το υγρό να κινηθεί από το κέντρο προς την περιφέρεια των δίσκων όπου είτε συλλέγεται είτε διαπερνά μέσω ενός σωλήνα προς μια άλλη μονάδα λειτουργίας. Η ένταση των τάσεων διάτμησης μπορούν να τροποποιούνται μεταβάλλοντας το διάκενο μεταξύ του ρότορα και του στατικού δίσκου μπορεί να μεταβάλλεται από 50 έως 1000 μm , μεταβάλλοντας την ταχύτητα περιστροφής από 1000 έως 20,000 r min^{-1} ή χρησιμοποιώντας δίσκους που έχουν τραχεία επιφάνεια (Gopal, 1968; Schubert, 1997). Επίσης η διάσπαση των λιποσφαιρίων μπορεί να ενισχυθεί αυξάνοντας το χρονικό διάστημα που περνάει το γαλάκτωμα στο κολλοειδή μύλο, είτε περνώντας το γαλάκτωμα από τον μύλο μερικές φορές είτε μειώνοντας το ρυθμό ροής του γαλακτώματος στο μύλο. Οι τεχνολόγοι τροφίμων θα πρέπει να επιλέξουν την ταχύτητα περιστροφής, το πάχος του κενού, τον τύπο των δίσκων, την αποδοτικότητα που δίνει τον βέλτιστο συνδυασμό μεταξύ του μεγέθους των λιποσφαιρίων και του κόστους κατασκευής.



Εικόνα 2: Κολλοειδής μύλος, όπου απεικονίζεται ο ρότορας, ο στατικός δίσκος, η είσοδος και η έξοδος. (McClements, 2007).

Οι κολλοειδής μύλοι είναι καταλληλότεροι για την ομογενοποίηση υγρών μέτριου και υψηλού ιξώδους (όπως φυστικοβούτυρο, ψάρι, κρέας και πάστες) από τους υπερήχους. Οι κολλοειδείς μύλοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γαλακτωμάτων με διάμετρο λιποσφαιρίων από 1 έως 5 μm .

1.4.3 Ομογενοποιητές υπερήχων (Ultrasound Homogenizer)

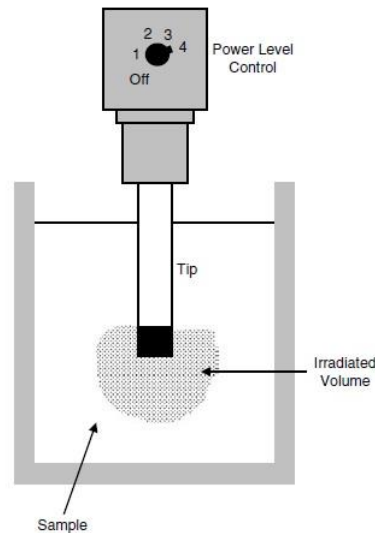
Οι ομογενοποιητές υπερήχων έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια για την παραγωγή γαλακτωμάτων (McCarthy, 1964; Gopal, 1968; Abismail et al., 1999; Canselier et al., 2002). Ο ομογενοποιητής υπερήχων χρησιμοποιεί υψηλής έντασης

κύματα υπερήχων που δημιουργούν έντονη διάτμηση εντός του υλικού και διαταράσσουν τα λιποσφαίρια λόγω σπηλαίωσης και τυρβώδους ροής.

Δύο είναι οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία για την παραγωγή υψηλής έντασης υπερήχων: οι πιεζοηλεκτρικοί μετατροπείς και οι τζετ γεννήτριες υγρού (Gopal, 1968; Canselier et al., 2002). Στα ερευνητικά κέντρα χρησιμοποιούνται ομογενοποιητές υπερήχων με πιεζοηλεκτρικούς μετατροπείς. Καθώς είναι ιδανικοί για την παρασκευή μικρών όγκων γαλακτωμάτων (από μερικά cm^3 σε αρκετά cm^3) το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για τα ερευνητικά εργαστήρια καθώς οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως ακριβές. Ένας ομογενοποιητής υπερήχων αποτελείται από έναν πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο ο οποίος περιέχεται μέσα σε ένα προστατευτικό μεταλλικό περίβλημα το οποίο είναι συνήθως κωνικό στο τέλος. Ένα υψηλής έντασης ηλεκτρικό κύμα εφαρμόζεται στον μετατροπέα, το οποίο προκαλεί ταχεία ταλάντωση στον πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο με αποτέλεσμα να δημιουργεί υπερηχητικό κύμα. Το υπερηχητικό κύμα κατευθύνεται προς το άκρο του μετατροπέα όπου ακτινοβολεί μέσα στα υγρά που τον περιβάλλουν και προκαλεί έντονη πίεση και τάσεις διάτμησης (κυρίως λόγω των αποτελεσμάτων της σπηλαίωσης) που προκαλούν στα υγρά να σπάσουν σε μικρότερα τμήματα και να αναμιχτούν με ένα άλλο.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η υπερηχητική ενέργεια εστιάζει σε ένα μικρό όγκο δείγματος το οποίο βρίσκεται γύρο από τον μετατροπέα. Επισημαίνεται ότι θα πρέπει να υπάρχει καλή ανάδευση στο δοχείο του δείγματος. Στα μικρά δοχεία αυτό είναι εύκολο καθώς επιτυγχάνεται από την ροή του υγρού που δημιουργείται από το ίδιο το υπερηχητικό πεδίο.

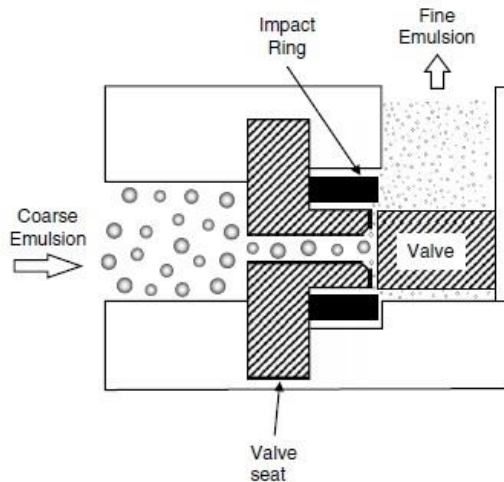
Για την δημιουργία ενός σταθερού δείγματος είναι απαραίτητη η έκθεση του στους υπερήχους για ένα διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από μερικά δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά. Η παρατεταμένη έκθεση ενός δείγματος στους υπερήχους μπορεί να προκαλέσει αισθητή θέρμανση, επομένως είναι συχνά απαραίτητο να εφαρμοστούν οι υπέρηχοι σε μια σειρά σύντομων εφαρμογών. Παραδοσιακά χρησιμοποιείται για την παραγωγή γαλακτωμάτων σε παρτίδες αλλά επίσης έχουν αναπτυχθεί για να χρησιμοποιούνται και για την παραγωγή γαλακτωμάτων σε συνεχή ροή (Canselier et al., 2002; Schubert et al., 2003). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η παρατεταμένη έκθεση ορισμένων συστατικών των τροφίμων σε υψηλής έντασης υπερήχων μπορεί να προκαλέσουν αποικοδόμηση, όπως για παράδειγμα την οξείδωση των λιπιδίων, τον αποπολυμερισμό των πολυσακχαριτών ή την μετουσίωση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 3 : Ομογενοποιητής υπερήχων με πιεζοηλεκτικό μετατροπέα, όπου απεικονίζεται το δείγμα, η περιοχή δράσης των υπερήχων και ο μετατροπέας (McClements, 2007)

1.4.4 Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης με βαλβίδα (High-pressure valve homogenizers)

Οι ομογενοποιητές υψηλής πίεσης είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος παραγωγής γαλακτωμάτων στην βιομηχανία τροφίμων (Lees and Pandolfe, 1986; Stang et al., 2001). Όπως και οι κολλοειδείς μύλοι, είναι πιο αποτελεσματικοί στο να μειώνουν το μέγεθος των λιποσφαιρίων σε ένα προ-γαλάκτωμα παρά κατά την διάρκεια της γαλακτωματοποίησης του αρχικού γαλακτώματος (Pandolfe, 1991, 1995). Ο ομογενοποιητής λειτουργεί σε πιέσεις 50-100 MPa. Στην κανονική διαδικασία τα υλικά περνάνε μέσα από το στενό άνοιγμα του ομογενοποιητή (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Διάταξη τυπικού ομογενοποιητή υψηλής πίεσης με βαλβίδα (McClements, 2007)

Η υψηλή πίεση δημιουργεί ισχυρές δυνάμεις διάσπασης όπως διάτμηση, σύγκρουση και σπηλαίωση. Οι έντονες τύρβες και η υδραυλική διάτμηση έχουν ως αποτέλεσμα την μετατροπή των μακρο-γαλακτωμάτων σε νανο-γαλακτώματα. Το

μέγεθος των λιποσφαιρίων εξαρτάται από τον ρυθμό των κύκλων, την πίεση και την θερμοκρασία του συστήματος, καθώς όσο περισσότεροι είναι οι κύκλοι και η πίεση, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος τους.

Επίσης το μέγεθος λιποσφαιρίων εξαρτάται και από την σύσταση του γαλακτώματος, τη φύση του γαλακτωματοποιητή, τα χαρακτηριστικά του (κινητική προσρόφησης, πτώση της διεπιφανειακή τάσης) και την φυσικοχημική κατάσταση των φάσεων του (ιξώδες και διεπιφανειακή τάση).

Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης μπορεί να γίνει σε υψηλές θερμοκρασίες άλλα και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Κύριο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος κατεργασίας (McClements, 2005).

2 Μηχανισμοί αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων

Ο όρος “σταθερότητα γαλακτώματος” αναφέρεται στην ικανότητα ενός γαλακτώματος να αντιστέκεται στις αλλαγές στις φυσικοχημικές του ιδιότητες κατά το πέρασμα του χρόνου (McClements, 2005). Ένα γαλάκτωμα μπορεί να καταστεί ασταθής από μια σειρά αλλαγών που μπορεί να οφείλονται σε φυσικές και χημικές διεργασίες. Αστάθεια λόγω μιας φυσικής διεργασίας οδηγεί σε μεταβολή της χωροταξικής κατανομής ή της δομικής οργάνωσης των μορίων. Ενώ η αστάθεια που προκαλείται από χημική διεργασία οδηγεί στη μεταβολή του είδους των μορίων που υπάρχουν στο γαλάκτωμα. Παραδείγματα φυσικής αστάθειας είναι η κροκίδωση, η κορυφωση, η συνένωση, μερική συνένωση, αναστροφή φάσεων και η ωρίμανση κατά Ostwald (Dickinson and Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Walstra, 1996a, 2003a). Ενώ η οξείδωση και η υδρόλυση είναι κοινά παραδείγματα χημικής αστάθειας (Fennema, 1996; McClements and Decker, 2000).

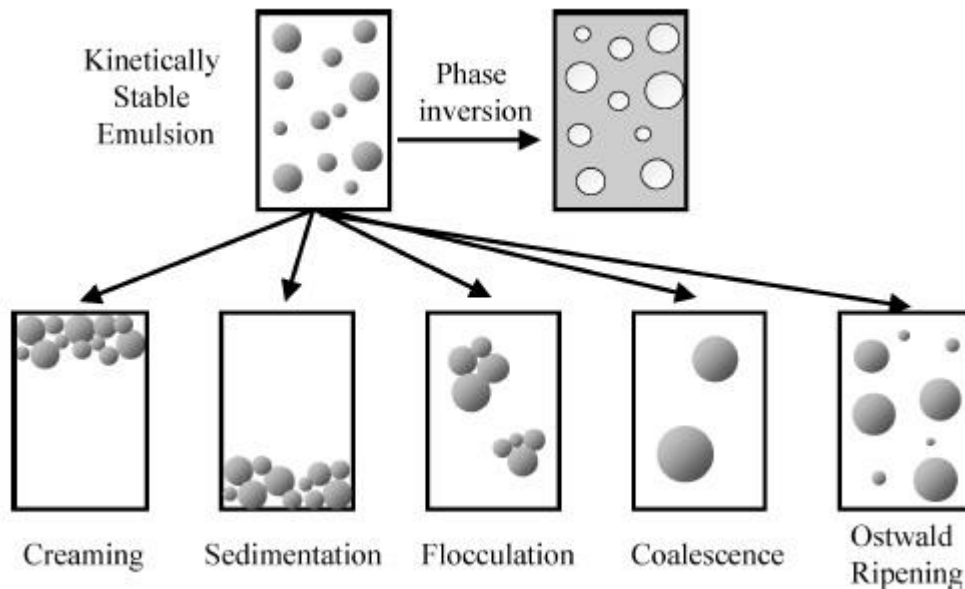
Ο ρυθμός με τον οποίο ένα γαλάκτωμα διασπάται και ο μηχανισμός με τον οποίο αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα, εξαρτάται από την σύνθεση και μικροδομή του, καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που εκτίθεται κατά την διάρκεια της ζωής του όπως οι μεταβολές της θερμοκρασίας και οι συνθήκες αποθήκευσης.

Κινητική και θερμοδυναμική αστάθεια

Όταν εξετάζουμε την «σταθερότητα» του γαλακτώματος είναι εξαιρετικά σημαντικό να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της θερμοδυναμικής σταθερότητας και της κινητικής σταθερότητας. (Dickinson, 1992). Η θερμοδυναμική μας προβλέπει αν μια δεδομένη διαδικασία θα συμβεί ή όχι, ενώ η κινητική μας λέει το ρυθμό με τον οποίο θα προχωρήσει αν τελικά συμβεί (Atkins, 1994). Όλα τα γαλακτώματα αποτελούν θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα και θα καταρρεύσουν κατά το πέρασμα του χρόνου. Για αυτό τον λόγο οι αλλαγές της κινητικής σταθερότητας είναι υπεύθυνες για την αλλαγή των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν ποικίλα γαλακτώματα. Για αυτό το λόγο οι επιστήμονες ενδιαφέρονται πιο πολύ για την κινητική σταθερότητα παρά για την θερμοδυναμική σταθερότητα.

Είναι πάντα σημαντικό να προσδιοριστεί με σαφήνεια ο κυρίαρχος φυσικός μηχανισμός αποσταθεροποίησης που ευθύνεται για την αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος ώστε να η πιο αποτελεσματική στρατηγική για την βελτίωση της σταθερότητας του γαλακτώματος (Εικόνα 5).

Ο βαρυτικός διαχωρισμός είναι η διαδικασία κατά την οποία τα λιποσφαίρια μετακινούνται προς την κορυφή του γαλακτώματος καθώς έχουν μικρότερη πυκνότητα από την συνεχή φάση, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **αποκορύφωση (creaming)** Αντιστρόφως εάν η πυκνότητα των λιποσφαιρίων της ασυνεχούς φάσης είναι μεγαλύτερη από αυτή της συνεχούς, τα λιποσφαίρια τείνουν να κινούνται προς τα κάτω, το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως **καθίζηση (sedimentation)**. (Dickinson and Stainsby, 1982; Hunter, 1989; Dickinson, 1992; Walstra, 1996a,b; Robins and Hibberd, 1998; Robins, 2000). Η **κροκίδωση (flocculation)** είναι η διαδικασία κατά την οποία δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια “κολλούν” μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα συσσωμάτωμα όπου κάθε αρχικό λιποσφαίριο διατηρεί την ατομική του ακεραιότητα. Η **συνένωση (coalescence)** είναι η διαδικασία κατά την οποία δύο ή περισσότερα συγχωνεύονται για να σχηματίσουν ένα μεγαλύτερο ένα ενιαίο μεγαλύτερο σωματίδιο. Η **μερική συνένωση** είναι η διαδικασία όπου δύο ή περισσότερα κρυσταλλικά σωματίδια συγχωνεύονται μαζί για να σχηματίσουν ένα ενιαίο συσσωμάτωμα ακανόνιστου σχήματος εξαιτίας της διείδυσης της εισόδου των στερεών κρυστάλλων του ενός λιποσφαιρίου στην περιοχή υγρού ενός άλλου λιποσφαιρίου. Η **ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald ripening)** είναι η διαδικασία κατά την οποία τα μεγαλύτερα λιποσφαίρια αυξάνουν σε βάρος των μικρότερων λιποσφαιρίων γεγονός το οποίο οφείλεται στην μεταφορά μάζας του υλικού της ασυνεχούς φάσης μέσω της συνεχούς φάσης. Η **αναστροφή φάσης (phase inversion)** είναι η διαδικασία με την οποία ένα γαλακτώμα της μορφής ελαίου/νερό αλλάζει και παίρνει την μορφή γαλακτώματος νερού/έλαιο ή και το αντίθετο. Οι μηχανισμοί αστάθειας είναι συχνά αλληλένδετοι καθώς μια αύξηση του μέσου μεγέθους των λιποσφαιρίων λόγω κροκίδωσης, συνένωσης ή σε ωρίμανσης κατά Ostwald μπορεί να οδηγήσει σε διαχωρισμό λόγω βαρύτητας (αποκορύφωση ή καθίζηση). Κατά συνέπεια ο μηχανισμός που οπτικά ευθύνεται για την εκδήλωση της αποσταθεροποίησης του γαλακτώματος μπορεί να μην είναι ο αυτός που αρχικά, έδωσε το εύνασμα για την αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος.



Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα των πιο συχνών μηχανισμών αποσταθεροποίησης που εμφανίζονται στα γαλακτώματα τροφίμων: αποκορύφωση, καθίζηση, κροκίδωση, συνένωση, ωρίμανση κατά Ostwald και αναστροφή φάσεων. (McClements DJ (2007) Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47:611–649.)

2.1 Συνένωση (Coalescence)

Συνένωση είναι η διαδικασία κατά την οποία δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια συγχωνεύονται μαζί για να σχηματίσουν ένα ενιαίο ή μεγαλύτερο λιποσφαίριο. Η συνένωση προκαλεί την αύξηση των λιποσφαιρίων με αποτέλεσμα να προκαλεί την κορύφωση ή την καθίζηση. Επιπλέον αυτό μπορεί να οδηγήσει και σε αλλαγή στην εμφάνιση του γαλακτώματος επειδή οι μεγαλύτερες σταγόνες συνήθως διασκορπίζουν το φως λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τις μικρές σταγόνες, έτσι σε ένα γαλάκτωμα που υπάρχει συνένωση το χρώμα είναι πιο έντονο (McClements, 2002b; McClements, 2005). Στα γαλακτώματα της μορφής ελαίου/νερό (o/w) η συνένωση οδηγεί στον σχηματισμό ενός στρώματος ελαιώδους σύστασης στο πάνω μέρος του γαλακτώματος (oiling off).

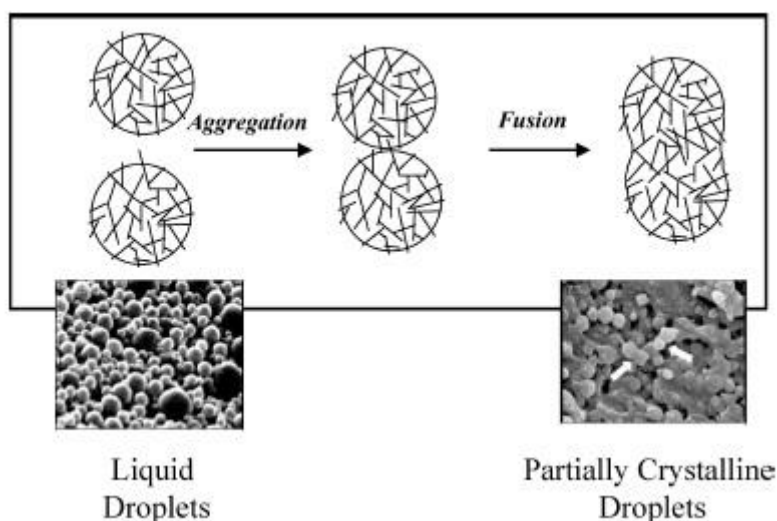
Στην βιομηχανία είναι πολύ σημαντικό να κατανοηθούν οι παράγοντες που συμβάλουν στον σχηματισμό της κορύφωσης, στην προσπάθεια τους να δημιουργήσουν προϊόντα με επιμηκυμένη διάρκεια ζωής.

Η συνένωση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω μιας ομογενούς ή ετερογενούς διαδικασίας (Deminiere et al., 1998). Στην ομοιογενή διαδικασία, το ποσοστό των λιποσφαιρίων που θα συνενωθούν είναι ανεξάρτητα από το μέγεθος των λιποσφαιρίων, έτσι ώστε όλα τα λιποσφαίρια να αναπτυχθούν μαζί, ώστε να οδηγήσουν σε μονοδιασπορά στην κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων. Στην μερική συνένωση το ποσοστό των λιποσφαιρίων εξαρτάται από το μέγεθος των λιποσφαιρίων, συνήθως αυξάνεται καθώς αυξάνεται το μέγεθος των λιποσφαιρίων. Κατά συνέπεια τα μεγαλύτερα λιποσφαίρια συνενώνονται πιο γρήγορα με τα

μικρότερα, δημιουργώντας μια πολυδιασπορά στην κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων και ενδεχόμενος σε oiling off. Στην πράξη η συνένωση εμφανίζεται σπάνια σε γαλακτώματα τροφίμων λόγω της σύγκρουσης των ελεύθερα κινούμενων λιποσφαιρίων. Η συνένωση εμφανίζεται αφού τα λιποσφαίρια έρθουν σε επαφή για παρατεταμένη χρονική περίοδο, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζονται δυνάμεις διάτμησης (van Aken & van Vliet, 2002).

2.1.1 Μερική συνένωση (partial coalescence)

Η μερική συνένωση συμβαίνει όταν δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια τα οποία μπορεί να περιέχουν κρυστάλλους στο εσωτερικό τους, σε γαλάκτωμα ο/w, έρχονται σε επαφή και σχηματίζουν ένα συσσωμάτωμα ακανόνιστου σχήματος. (εικόνα). Το συσσωμάτωμα διατηρεί εν μέρει το σχήμα των αρχικών λιποσφαιρίων από τα οποία προήλθε, καθώς η μηχανική δύναμη του κρυσταλλικού πλέγματος στο εσωτερικό των λιποσφαιρίων τα αποτρέπει από την πλήρη συνένωσή τους. (Boode, Bisperink & Walstra, 1991; Boode & Walstra, 1993a; Boode, Walstra & Degrootmostert, 1993b; Walstra, 2003). Η μερική συνένωση είναι ιδιαίτερα σημαντική στα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς τα λιποσφαίρια του γάλακτος παίρνουν εν μέρει κρυσταλλική μορφή σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. (Walstra, 2003). Έτσι αποτελεί απαραίτητη διαδικασία στην παραγωγή παγωτού, βουτύρου και μαργαρίνης. (Goff, 1997a; Goff, 1997b).



Εικόνα 6: Σχηματικό διάγραμμα και ηλεκτρονικές μικρογραφίες μερικής συνένωσης σε γαλάκτωμα ελαίου / νερό. (D. J. McClements, 2007). (McClements DJ (2007) Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47:611–649.)

2.2 Κροκίδωση (Flocculation)

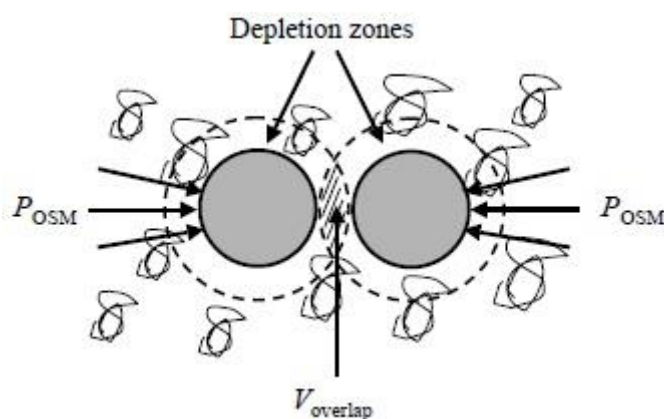
2.2.1 Αυθόρμητη κροκίδωση

Η αυθόρμητη κροκίδωση πραγματοποιείται όταν οι συγκρούσεις των μικκυλίων είναι στιγμιαίες και συγχρόνως ελαστικές και δεν γίνεται να ασκηθούν οι δυνάμεις συνοχής της ύλης από την οποία αποτελούνται για μακρύτερο χρονικό διάστημα. Αν όμως οι συγκρούσεις αυτές είναι τριπλές δηλαδή συγχρόνως μεταξύ τριών

μικκυλίων, τότε είναι δυνατό δύο από τα μικκύλια να χάσουν κινητική ενέργεια υπέρ του τρίτου μικκυλίου. Η ελάττωση της κινητικότητας των δύο μικκυλίων έχει ως συνέπεια την χρονική αύξηση της άσκησης των δυνάμεων συνοχής της ύλης και έχει ως αποτέλεσμα την συσσωμάτωσή τους σε ένα κόκκο. Αυτός ο μεγάλος κόκκος που σχηματίστηκε, δεν μπορεί να συγκρατήσει ιόντα, τα οποία δίνουν στα μικκύλια το φορτίο τους, επειδή ο κόκκος κινείται βραδύτερα, επιτρέπει την άσκηση των ηλεκτροστατικών έλξεων μεταξύ τους και των μικκυλίων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Γεγονότα τα οποία έχουν ως συνέπεια την αποφόρτισή του. Οι μεγάλοι κόκκοι που δημιουργούνται κινούνται με πολύ αργούς ρυθμούς, αυτοί καθώς συγκρούονται με τα μικκύλια προκαλούν επιβράδυνση της κίνησης των μικκυλίων, με αποτέλεσμα να εξελίσσεται με αργούς ρυθμούς η ολική κροκίδωση του συστήματος.

2.2.2 Κροκίδωση υπό εκκένωση (Depletion flocculation)

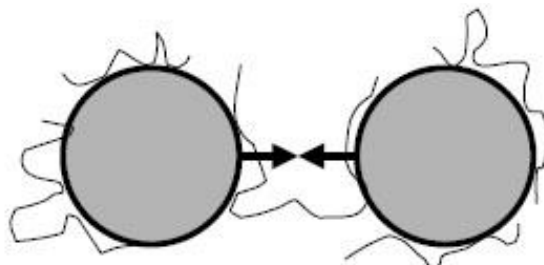
Στην περίπτωση όπου ο πολυσακχαρίτης δεν προσροφάται από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων του γαλακτώματος που έχουν επικαλυφθεί με πρωτεΐνη, τα κέντρα της μάζας των μορίων του πολυσακχαρίτη δεν μπορούν να πλησιάσουν την επιφάνεια των λιποσφαιρίων σε απόσταση κοντινότερη από την ακτίνα περιστροφής τους (r_g) (Εικόνα 7). Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη σε μια περιοχή γύρω από το λιποσφαίριο είναι χαμηλότερη από ότι στο υπόλοιπο διάλυμα. Αυτό το αποτέλεσμα της εξάντλησης δημιουργεί μια οσμωτική διαφορά πίεσης μεταξύ της depleted ζώνης και στο υπόλοιπο διάλυμα. Όταν δύο depleted ζώνες συμπίπτουν αυτή η διαφορά πίεσης προκαλεί μια ελκτική δύναμη μεταξύ των λιποσφαιρίων. Η οσμωτική πίεση και ο όγκος επικάλυψης αποτελούν παράγοντες που σχετίζονται αντίστοιχα με στην συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη και με την κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων και του πολυσακχαρίτη. Όταν η έλξη είναι αρκετά ισχυρή για να υπερβεί την εντροπία των λιποσφαιρίων, δηλαδή πάνω από μια ελάχιστη συγκέντρωση πολυσακχαρίτη, τα λιποσφαίρια κροκιδώνονται.



Εικόνα 7: Κροκίδωση υπό εκκένωση μεταξύ δυο λιποσφαιρίων όπου δεν έχει προσροφηθεί ο πολυσακχαρίτης. (McClements DJ, 2007)

2.2.3 Κροκίδωση υπό γεφύρωση (Bridging-flocculation)

Αν ένας πολυσακχαρίτης προσροφάται από τα λιποσφαίρια ή από τα στρώματα πρωτεϊνών που βρίσκονται γύρω από τα λιποσφαίρια, ο πολυσακχαρίτης μπορεί να προκαλέσει την διασύνδεση δύο ή περισσότερων λιποσφαιρίων του γαλακτώματος. Καθώς ο πολυσακχαρίτης δρα σαν γέφυρα μεταξύ των λιποσφαιρίων αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός ως bridging-flocculation. (Εικόνα 8)

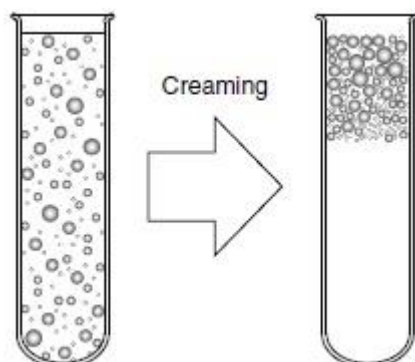


Εικόνα 8: Ο μηχανισμός bridging κροκίδωσης μεταξύ δύο λιποσφαιρίων σε γαλάκτωμα που έχουν προσροφηθεί πολυσακχαρίτες στην επιφάνειά τους (McClements DJ , 2007)

2.3 Αποκορύφωση (creaming)

Η αποκορύφωση και η κροκίδωση είναι οι κύριοι μηχανισμοί αποσταθεροποίησης που παρουσιάζονται σε ένα γαλάκτωμα. Η αποκορύφωση είναι ένα φαινόμενο που εμφανίζεται στα γαλακτώματα ελαίου/νερό καθώς τα λιποσφαίρια του γαλακτώματος έχουν μικρότερη πυκνότητα από αυτή της υδατικής φάσης και έτσι έχουν την τάση να κινούνται ανοδικά χωρίς να παρατηρείται κάποια μεταβολή στο μέγεθός τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανομοιογενή κατανομή τους στο γαλάκτωμα. Ωστόσο το φαινόμενο της αποκορύφωσης είναι αντιστρεπτό, με την έννοια ότι το γαλάκτωμα επανέρχεται στην του κατάσταση και τα λιποσφαίρια ανακατανέμονται ομοιόμορφα μέσω απλής ανακίνησης. Στα γαλακτώματα τύπου ο/w, στα αρχικά στάδια της αποκορύφωσης εμφανίζεται μια κάθετη διαβάθμιση στη συγκέντρωση των λιποσφαιρίων, ενώ σταδιακά διακρίνονται δύο διαφορετικές στιβάδες, η ανώτερη η οποία είναι εμπλουτισμένη με λιποσφαίρια (cream layer) και η κατώτερη η οποία έχει υδατική σύσταση (serum layer). Στα περισσότερα τρόφιμα που έχουν την μορφή γαλακτώματος αποτελούνται από λιποσφαίρια με ένα εύρος μεγεθών, τα οποία έρχονται στην επιφάνεια του γαλακτώματος με διαφορετική ταχύτητα. Η ταχύτητα αποκορύφωσης εξαρτάται κυρίως από την πολυδιασπορά του μεγέθους των λιποσφαιρίων και από τον βαθμό συσσωμάτωσης των λιποσφαιρίων. Ένα γαλάκτωμα που έχει υποστεί συσσωμάτωση είναι ευπαθές στην αποκορύφωση, καθώς τα συσσωματώματα των λιποσφαιρίων κινούνται ταχύτερα από τα μεμονωμένα λιποσφαίρια τα οποία συμπαρασύρονται από τα συσσωματώματα. Η αποκορύφωση ευνοεί την εμφάνιση φαινομένων συσσωμάτωσης λόγω των κοντινών αποστάσεων των λιποσφαιρίων στην λιπαρή στιβάδα.

Η αποκορύφωση σε ένα γαλάκτωμα ο/ω μπορεί να καθυστερήσει είτε με την μείωση της διαφοράς των πυκνοτήτων μεταξύ των δύο φάσεων, είτε με την μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων ή με την αύξηση του ιξώδους της συνεχούς φάσης.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της αποκορύφωσης των γαλακτωμάτων (McClements DJ, 2007)

2.4 Ωρίμανση κατά Ostwald

Η ωρίμανση κατά Ostwald είναι η διαδικασία κατά την οποία κατά την οποία μεγάλα λιποσφαίρια μεγαλώνουν σε βάρος μικρότερων, λόγω της μεταφοράς μάζας από ένα λιποσφαίριο σε άλλο μέσω της ασυνεχούς φάσης που παρεμβαίνει (Kabalnov, 2001; Kabalnov & Weers, 1996; Kabalnov, Gervits & Makarov, 1990).

Η ωρίμανση κατά Ostwald είναι αμελητέα στα περισσότερα τρόφιμα καθώς η διαλυτότητα των τριγλυκεριδίων στο νερό είναι τόσο μικρή που ο ρυθμός μεταφοράς μάζας είναι ασήμαντος. Παρ' όλα αυτά έχει σημασία για τα γαλακτώματα ελαίου/νερό που περιέχουν υδροδιαλυτά λιπίδια ή όταν η υδατική φάση περιέχει αλκοόλη (λικέρ κρέμας).

2.5 Αναστροφή φάσης

Η αναστροφή φάσης συνήθως προκαλείται από κάποια μεταβολή στη σύνθεση του γαλακτώματος ή του περιβάλλοντος όπως ο τύπος του γαλακτωματοποιητή, η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή, ο τύπος του διαλύτη, τα πρόσθετα, η θερμοκρασία και ο μηχανισμός ανάδευσης. (Brooks, Richmond & Zerfa, 1998; Kabalnov, 1998; McClements, 2005). Η φυσικοχημική φύση της αναστροφής φάσης είναι εξαιρετικά περίπλοκη, καθώς περιλαμβάνει πτυχές από τα φαινόμενα της κροκύδωσης και της συνένωσης (Dickinson, 1992; McClements, 2005).

Η αναστροφή φάσης είναι αρκετά σημαντική για την βιομηχανία τροφίμων καθώς χρησιμοποιείται για την κατασκευή αρκετών προϊόντων όπως το βούτυρο και η μαργαρίνη, όπου ένα γαλάκτωμα με τη μορφή ελαίου/νερό μετατρέπεται σε γαλάκτωμα της μορφής νερό/έλαιο (McClements, 2005; Walstra, 2003). Στα περισσότερα τρόφιμα-γαλακτώματα η αναστροφή φάσης είναι ανεπιθύμητη και θα

πρέπει να αποφεύγεται καθώς έχει αρνητικές επιπτώσεις στην εμφάνιση του προϊόντος, την υφή και την γεύση.

3 Γαλακτωματοποιητές

3.1 Λειτουργία των γαλακτωματοποιητών

Ως γαλακτωματοποιητής ορίζεται κάθε επιφανειοδραστική ουσία που έχει την ιδιότητα να μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ ελαίου-νερού και να προστατεύει το γαλάκτωμα από φαινόμενα αποσταθεροποίησης (Bos & van Vliet, 2001).

Οι γαλακτωματοποιητές μπορεί να είναι συνθετικοί μικρού μοριακού βάρους (μονογλυκερίδια) (Goldstein & Seetharaman, 2011), εστέρες σακχαρόζης (Tual, Bourles, Barey, Houdoux, Desprairies, & Courthaudon, 2006), πολυγλυκερικοί εστέρες (Su, Flanagan, Hemar, & Singh, 2006), φυσικοί μικρού μοριακού βάρους όπως η σόγια και η λεκιθίνη (Palacios & Wang, 2005) ή μεγάλου μοριακού βάρους όπως οι πρωτεΐνες (Damodaran, 2006).

Οι γαλακτωματοποιητές είναι αμφίφιλα μόρια, αποτελούνται δηλαδή από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα, έτσι δεν είναι απόλυτα διαλυτά ούτε στην λιπαρή αλλά ούτε και στην υδατική φάση. Το υδρόφοβο τμήμα του μορίου στρέφεται προς την λιπαρή φάση (μη πολικό περιβάλλον) και το υδρόφιλο προς την υδατική φάση (πολικό περιβάλλον). Ένας γαλακτωματοποιητής ανάλογα με τα πολικά και μη πολικά τμήματα του μορίου του μπορεί να είναι περισσότερο διαλυτός στην υδατική ή στην λιπαρή φάση αντίστοιχα. Υδρόφιλοι γαλακτωματοποιητές σχηματίζουν συνήθως γαλακτώματα ελαίου/νερό ενώ οι υδρόφοβοι γαλακτώματα νερού/έλαιο (D.J. McClements, 2005).

Οι γαλακτωματοποιητές είναι επιφανειοδραστικές ουσίες καθώς προσροφώνται στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού και μειώνουν την διεπιφανειακή τάση. Η διεπιφάνεια ελαίου-νερού μπορεί να θεωρηθεί ως μια επίπεδη επιφάνεια με απειροελάχιστο πάχος, ωστόσο η διεπιφανειακή περιοχή είναι αρκετά δυναμική (McClements, 2005). Συνοπτικά ένας αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

- Να προσροφάται στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού και να μειώνει γρήγορα τη διεπιφανειακή τάση ώστε να διευκολύνεται ο σχηματισμός του γαλακτώματος.
- Να σχηματίζει ένα σταθερό, συνεκτικό και ιξωδοελαστικό υμένιο γύρω από τα λιποσφαιρία ώστε να αποτρέπει ή να επιβραδύνει τα φαινόμενα της κροκίδωσης και της συνένωσης (D.J. McClements, 2005).

Η ανθεκτικότητα του υμενίου που σχηματίζει ο γαλακτωματοποιητής γύρω από τα λιποσφαιρία καθορίζει την σταθερότητα και την διάρκεια ζωής (shelf life) του γαλακτώματος καθώς εμποδίζει την συνένωση τους όταν αυτά συγκρούονται, λόγω της συνεχής κίνησης των λιποσφαιρίων υπό την επίδραση της βαρύτητας, της θερμικής ενέργειάς ή της μηχανικής δύναμης.

Οι γαλακτωματοποιητές κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες τα **μακρομόρια** (πρωτεΐνες) και τους γαλακτωματοποιητές **μικρού μοριακού βάρους** (surfactants). 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 δεν σχηματίζουν σταθερά διεπιφανειακά υμένια και χρησιμοποιούνται κυρίως για την μείωση της διεπιφανειακής τάσης, καθώς απορροφώνται ταχέως από την διεπιφάνεια ελαίου-νερού (McClements, 2005).

3.2 Πρωτεΐνες ως γαλακτωματοποιητές

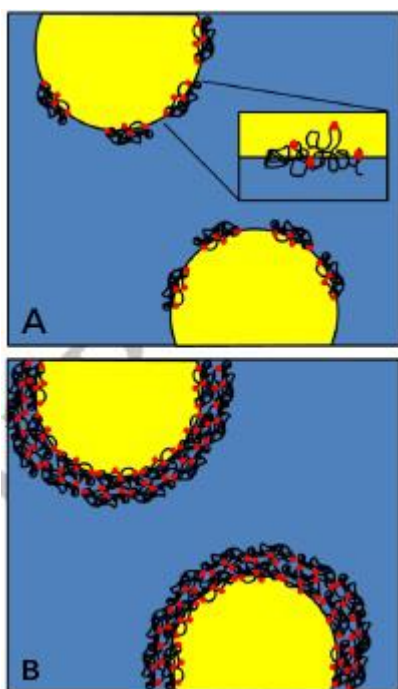
Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα αμφίφιλα βιομόρια τα οποία αποτελούνται επιμήκεις αλυσίδες αμινοξέων οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς. Κατά τον σχηματισμό ενός πολυπεπτιδίου, η αλυσίδα των αμινοξέων περιελίσσεται στο χώρο ώστε οι υδρόφοβες πλευρικές ομάδες να είναι προσανατολισμένες προς το εσωτερικό του μορίου και υδρόφιλες προς το εξωτερικό (Lam et al, 2013).

Οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αφορά την ικανότητα τους ως γαλακτωματοποιητές λόγω της αμφίφιλης φύσης τους αλλά και της ικανότητας τους να σχηματίζουν υμένια (Foegeding & Davis, 2011).

Οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων ως γαλακτωματοποιητές για την σταθεροποίηση γαλακτωμάτων ελαίου/νερό, καθώς διευκολύνουν την διαδικασία της γαλακτωματοποίησης, βελτιώνουν στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων και προσδίδουν τις επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες σε γαλακτώματα ελαίου/νερό (Phillips GO & Williams PA., 2001; Dickinson E., 2009; Dickinson E., 2009; McClements DJ., 2005).

Παρά το γεγονός ότι όλες οι πρωτεΐνες έχουν αμφίφιλη φύση, διαφοροποιούνται σημαντικά ως προς την επιφανειοδραστικότητά τους, έτσι εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό προσρόφησης. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην δευτεροταγή και τριτοταγή δομή τους και πιο συγκεκριμένα στην κατανομή και αναλογία των υδρόφοβων και υδρόφιλων ομάδων της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του μορίου (McClements DJ., 2005).

Κατά την παρουσία των πρωτεϊνών σε μια διεπιφάνεια ελαίου-νερού, η πολυπεπτιδική αλυσίδα ξεδιπλώνεται και τα υδρόφοβα τμήματά της διεισδύουν στην λιπαρή φάση, ενώ τα υδρόφιλά της παραμένουν στην υδατική φάση (Walstra, 2003) (Εικόνα 10 α). Παράλληλα τα μόρια της πρωτεΐνης που έχουν προσροφηθεί στην διεπιφάνεια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δεσμούς Van der Waals και με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σχηματίζοντας έτσι έναν προστατευτικό υμένα ο οποίος αυξάνει τις απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιποσφαιρίων, ώστε το γαλάκτωμα να παραμένει σταθερό. (Εικόνα 10 β). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός προσροφημένων υδρόφοβων περιοχών στην διεπιφάνεια τόσο πιο ισχυρή είναι η δέσμευση του πρωτεϊνικού μορίου την διεπιφάνεια και άρα και το υμένιο που σχηματίζεται.



Εικόνα 10: Αναπαράσταση σφαιρικής πρωτεΐνης που Α) επαναπροσανατολίζεται στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού και Β) σχηματίζει ιξωδοελαστικό υμένιο (τα κόκκινα σημεία αναπαριστούν τις υδρόφοβες περιοχές του μορίου) (Lam and Nickerson, 2013).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των γαλακτωματοποιητικών ικανοτήτων της. (Moure, Sineiro, Domínguez, & Parajó, 2006; Bueno, Pereira, Menegassi, Arêas, & Castro, 2009; Papalamprou, Doxastakis, & Kiosseoglou, 2010). Η παρουσία της πρωτεΐνης στην συνεχή φάση ενεργεί ώστε να αυξηθεί το ιξώδες του γαλακτώματος, μειώνοντας την κινητικότητα και την διάχυση των λιποσφαιρίων στο γαλάκτωμα. (Jafari, Beheshti, & Assadroor, 2012). Επίσης η διαλυτότητα της πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον σχηματισμό και την σταθερότητα του γαλακτώματος. Οι μηχανικές και ρεολογικές ιδιότητες του υμενίου που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες επηρεάζονται από το pH, την ιοντική ισχύ, την συγκέντρωση της πρωτεΐνης, την θερμοκρασία και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης (το φορτίο της επιφάνειας, υδροφοβικότητα) (McClements, 2005).

Επίσης οι πρωτεΐνες υπερτερούν σε σχέση με τους γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους καθώς σχηματίζουν υμένια με μεγαλύτερη ιξωδοελαστικότητα και σταθερότητα (Lam, 2013).

Οι πρωτεΐνες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ταχύτητα με την οποία προσροφώνται από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων κατά την διάρκεια της ομογενοποίησης, την συγκέντρωση που απαιτείται για την πλήρη κάλυψη των επιφανειών των λιποσφαιρίων αλλά και από την ικανότητά τους να προστατεύουν τα λιποσφαίρια από τα φαινόμενα αποσταθεροποίησης.

Οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ευρέως την παραγωγή τροφίμων τόσο για τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και την θρεπτική αξία που προσδίδουν στο

τρόφιμο αλλά και για τις λειτουργικές ιδιότητες τους όπως τη γαλακτωματοποίηση. Για να χρησιμοποιηθεί μια πρωτεΐνη στην παραγωγή τροφίμων θα πρέπει να πληροί κάποιες προϋποθέσεις να μην είναι τοξική, να είναι εύπεπτη, να βρίσκεται σε αφθονία, να έχει μεγάλη θρεπτική αξία και να φέρει τις κατάλληλες λειτουργικές ιδιότητες ανάλογα με το τρόφιμο.

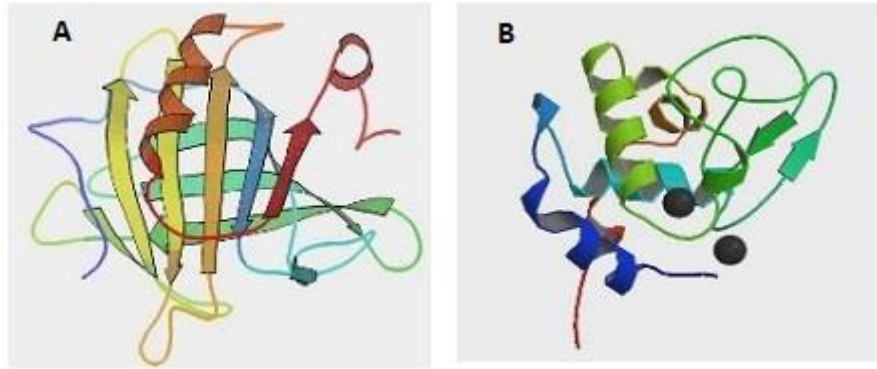
Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται κυρίως από την βιομηχανία τροφίμων ως γαλακτωματοποιητές περιλαμβάνουν: το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα ορού γάλακτος (Hu, McClements, & Decker, 2003; Ye & Singh, 2006; Li, Cheng, Wang, Zhao, Yin, & Saito, 2012), την καζεΐνη (Mulvihill & Murphy, 1991; Dalgleish, 1993; Hu et al., 2003), την σόγια (Hu et al., 2003; Palazolo, Sorgentini, & Wagner, 2005; Purro, Beaumal, Speroni, de Lamballerie, Añón, & Anton, 2011) και ο ορός της αλβουμίνης (Derkach et al., 2007). Από τις παραπάνω ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος λόγω της χρήσης τους σε ένα μεγάλο αριθμό προϊόντων όπως τα γαλακτώματα και προϊόντα αρτοποιίας. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος (Swaisgood, 1996).

3.2.1 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος (Whey Protein, WP)

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος (whey proteins) αποτελούν την δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πρωτεϊνών που περιέχονται στο γάλα και αποτελούν συστατικά των πρωτεϊνών που έχουν απομονωθεί από γάλα βοοειδών. Το κλάσμα του ορού γάλακτος περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που παραμένουν διαλυτές μετά την ισοηλεκτρική κατακρήμνιση των καζεϊνών σε pH= 4.6, οι οποίες καθιζάνουν και παραμένει το κλάσμα του ορού γάλακτος (McClements, 2005). Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος αποτελούν σημαντικά συστατικά των τροφίμων εξαιτίας των λειτουργικών και διατροφικών τους ιδιοτήτων. (Christiansen et al., 2004; Sarkar et al., 2009).

Διάφοροι τύποι σκόνης ορού γάλακτος είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο, από τις οποίες οι κυριότερες είναι το πρωτεϊνικό συμπύκνωμα ορού γάλακτος (Whey Protein concentrate, WPC) και το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα ορού γάλακτος (Whey Protein Isolated, WPI) το οποίο έχει πρωτεϊνικό περιεχόμενο μεγαλύτερο του 90% σε ξηρό βάρος (McClements, 2005).

Η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος είναι ένα πολύπλοκο μίγμα διαφορετικών μεμονωμένων πρωτεϊνών, από αυτές σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκονται οι σφαιρικές πρωτεΐνες β- λακτογλοβουλίνη (55%) (εικόνα 11.A) και α-λακταλβουμίνη (24%) (εικόνα 11.B) (Dickinson, 1997).



Εικόνα 11: Τρισδιάστατη δομή της β-λακτογλοβουλίνης (A) & της α-λακταλβουμίνης (B) (H. E. Swaisgood, 1996).

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

Το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα ορού γάλακτος (WPI) είναι μια επιφανειοδραστική σφαιρική πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να προσροφάται στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων με την μορφή στιβάδας.

Τα κύρια συστατικά της WPI (β- λακτογλοβουλίνη και α-λακταλβουμίνη) περιέχουν δισουλφυδικούς δεσμούς και λειτουργικές ομάδες θειόλης τα οποία μπορούν να σαρώσουν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστείλουν την οξείδωση των λιπιδίων. Επομένως τα γαλακτώματα που έχουν σταθεροποιηθεί με WPI μπορούν να ενεργούν ως αντιοξειδωτικό σύστημα., καθώς και η προσροφημένη WPI στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων αλλά και η μη-προσροφημένη που βρίσκεται στην υδατική φάση δρουν ως αντιοξειδωτικά καθώς δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες (C. Sun et al., 2013).

Οι ιδιότητες της WPI ως γαλακτωματοποιητή εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως το pH και την ιοντική ισχύ, τη δομή και το φορτίο της και τις ιδιότητες της διεπιφανειακής μεμβράνης που σχηματίζεται (πάχος, ελαστικότητα και ιξώδες) (McClements, 2005). Τα γαλακτώματα που σταθεροποιούνται με πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη θερμική επεξεργασία δεδομένου ότι οι σφαιρικές πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει μια οριακή τιμή και εκτεθούν στην επιφάνεια μη πολικές ή δισουλφυδικές ενώσεις.

Τα διεπιφανειακά υμένια που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος γύρω από τα λιποσφαίρια είναι σχετικά λεπτά (1-10nm) και ηλεκτρικά φορτισμένα (-80mV ή +80 mV). Το pH των γαλακτωμάτων επιδρά στο φορτίο και τις ηλεκτροστατικές επιδράσεις μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης. Σε τιμές pH μεγαλύτερες ή μικρότερες του ισοηλεκτρικού σημείου οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό ή θετικό φορτίο αντίστοιχα και έχουν αυξημένη διαλυτότητα. Το φορτίο των πρωτεϊνών κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο (IEP 5) είναι σχετικά χαμηλό έως

μηδενικό και τα γαλακτώματα που έχουν σταθεροποιηθεί με WPI είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην κροκίδωση καθώς οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των λιποσφαιρίων δεν είναι σε θέση να ξεπεράσουν τις ελκτικές αλληλεπίδρασης (δυνάμεις Van der Waals) (Demetriades et al., 1997a; D.J. McClements, 2005).

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων σαν γαλακτωματοποιητές σε μια ποικιλία προϊόντων όπως κατεψυγμένα επιδόρπια, παγωτά, αθλητικά συμπληρώματα, ενεργειακά ποτά, σάλτσες για σαλάτες και βρεφικές τροφές. Καθώς στα πλεονεκτήματα τους περιλαμβάνονται το χαμηλό τους ποσοστό σε λίπος, νάτριο και θερμίδες, η απουσία παθογόνων ή τοξικών ουσιών, η καλή γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα, η συμβατότητα με άλλα συστατικά, η εύκολη διαθεσιμότητά τους, ότι είναι προϊόντα φυσικής προέλευσης και η γλυκιά και αρωματική τους γεύση.

Όμως μελέτες έχουν αναφέρει ότι υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος μπορούν να προκύψουν από παρτίδα σε παρτίδα, γεγονός που έχει αποδοθεί στην παρουσία ανόργανων ακαθαρσιών και της μερικής μετουσίωσης των πρωτεϊνών κατά την διεργασία της απομόνωσης της πρωτεΐνης. (Corthaudon et al., 1991a–d; Dickinson, 1992, 2001; Dickinson and Iveson, 1993; Dalgleish, 1997a,b; Brun and Dalgleish, 1999).

3.3 Γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους

Οι γαλακτωματοποιητές μικρού μοριακού βάρους είναι επιφανειοδραστικές ουσίες με αμφίφιλο χαρακτήρα. Συγκεκριμένα είναι μικρά αμφίφιλα μόρια τα οποία φέρουν μια υδροφιλική ομάδα στο ένα άκρο «κεφαλή» και μια υδρόφοβη ομάδα στο άλλο άκρο «ουρά». Το υδρόφιλο τμήμα τους διαφοροποιείται και, ανάλογα με τη φύση του, 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 λειτουργικές ιδιότητες κάθε γαλακτωματοποιητή μικρού μοριακού βάρους καθορίζονται από την χημική τους δομή η οποία είναι χαρακτηριστική για τον καθένα. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η επιλογή του καταλληλότερου γαλακτωματοποιητή ανάλογα με την χρήση για την οποία προορίζεται. Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των γαλακτωματοποιητών χαμηλού μοριακού βάρους δεν εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα ούτε στο νερό ούτε στη φάση του ελαίου, εμφανίζουν βέλτιστη διαλυτότητα όταν βρίσκονται στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Η γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα οφείλεται όπως και την περίπτωση των πρωτεϊνών στην αμφιφιλική δομή τους. Παρόλα αυτά, όμως, ο μηχανισμός προσρόφησης των γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους στη διεπιφάνεια είναι διαφορετικός από αυτών των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση των γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους, οι υδρόφιλες και οι υδρόφοβες ομάδες βρίσκονται στα άκρα των μορίων σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε όλο το μόριο.

Οι γαλακτωματοποιητές μπορεί να είναι φυσικοί, ημι-συνθετικοί και συνθετικοί. Κατηγοριοποιούνται με κριτήριο διάφορα χαρακτηριστικά όπως η προέλευσή τους, η τιμή HLB, η παρουσία λειτουργικών ομάδων στο μόριο τους και ο ιονισμός. Οι γαλακτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους ως προς την σύσταση τους αλλά κατηγοριοποιούνται με βάση την κύρια δομική τους μονάδα σε (Hoefler, 2004):

- Λεκιθίνη και παράγωγα λεκιθίνης
- Μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και παράγωγά τους.
- Εστέρες μόνο- 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.

4 Υδροκολλοειδή.

Τα υδροκολλοειδή είναι ετεροπολυσακχαρίτες μεγάλου μοριακού βάρους με υδρόφιλο χαρακτήρα και κολλοειδής ιδιότητες. Παρουσία νερού σχηματίζουν αιωρήματα υψηλού ιξώδους (πηκτές) ή διαλύματα με χαμηλό σε ξηρή ουσία περιεχόμενο.

Ένας από τους βασικούς ρόλους των υδροκολλοειδών είναι η συμμετοχή τους στη δημιουργία και την σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, την πήξη και την δημιουργία πηκτών, τον 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 πολυμερή από την χημική και ενζυμική επεξεργασία αμύλου ή κυτταρίνης.

Η δομή των μορίων των υδροκολλοειδών μπορεί να είναι είτε γραμμική όπως στην περίπτωση τη 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, θειικές ομάδες ή καρβοξυλομάδες. Οι πλευρικές ομάδες των μορίων έχουν σημαντική επίδραση στις ιδιότητες των υδροκολλοειδών.

Οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται σε γαλακτώματα ελαίου/νερό ως σταθεροποιητές καθώς αυξάνουν το ιξώδες της υδατικής φάσης με αποτέλεσμα να καθυστερούν την αποκορύφωση. Οι πολυσακχαρίτες σε υψηλές συγκεντρώσεις δημιουργούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα το οποίο αναστέλλει την κίνηση των λιποσφαιρίων (McClements, 2000, Bouyer et al., 2011). Δηλαδή τα περισσότερα

υδροκολλοειδή μπορούν να σταθεροποιήσουν γαλακτώματα ελαίου/νερό, όμως λίγα είναι εκείνα που έχουν γαλακτωματοποιητική ικανότητα (Dickinson, 2009).

Η μικρή γαλακτωματοποιητική ικανότητα κάποιων βιοπολυμερών αποδίδεται στη χαμηλή διαλυτότητα και στο ότι δεν παρουσιάζουν αμφίφιλο χαρακτήρα (Dickinson, 2003).

Ωστόσο υπάρχουν μερικοί πολυσακχαρίτες που μπορούν να προσροφηθούν στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού, όπως τα παράγωγα της κυτταρίνης τα τροποποιημένα παράγωγα αμύλου. Εκτός από τους τροποποιημένους πολυσακχαρίτες στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται κόμμεα όπως το αραβικό κόμμι (Hoefler, 2004) που έχουν από την φύση τους γαλακτωματοποιητική ικανότητα. Το αραβικό κόμμι είναι ένα υδροκολλοειδές που μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στα τρόφιμα γιατί εκτός από την ικανότητα του να αυξάνει το ιξώδες της συνεχούς φάσης σε γαλακτώματα ελαίου/νερό μπορεί να προσροφηθεί στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού.

Επίσης οι γαλακτομαννάνες όπως η κόμμι γκουάρ, το κόμμι χαρουπιού και το κόμμι τριγωνέλλας είναι υδρόφιλα βιοπολυμερή που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητικοί παράγοντες είναι και αποτελεσματικοί γαλακτωματοποιητές. Συγκεκριμένα η κόμμι γκουάρ και η κόμμι χαρουπιού χρησιμοποιούνται στην παραγωγή προϊόντων χαμηλών λιπαρών όπως η μαγιονέζα light (Dickinson et al., 2009; Bortnowska et al., 2006).

4.1 Βακτηριακή κυτταρίνη (Bacterial cellulose)

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο πολυμερές που υπάρχει στη γη και είναι το κύριο συστατικό της φυτικής βιομάζας καθώς αποτελεί το κύριο δομικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Είναι ένα γραμμικό ομοιοπολυμερές β(1-4)-D-γλυκόζης που συνδέονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς.

Τα πιο κοινά παράγωγα κυτταρίνης που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων είναι η carbomethyl cellulose (CMC) και η hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα της CMC ως σταθεροποιητή (Arancibia, Bayarri, & Costell, 2013; Hayati, Man, Tan, & NorAini, 2011) αλλά και της HPMC (Camino & Pilosof, 2011; Camino, Sanchez, Patino, & Pilosof, 2011; Futamura & Kawaguchi, 2011; Schulz & Daniels, 2000; Wollenweber, Makievski, Miller, & Daniels, 2000)

Η βακτηριακή κυτταρίνη (BC) είναι ένα πολυμερές φιλικό προς το περιβάλλον που τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αποδέκτης μεγάλης προσοχής από τον κόσμο (Klemm et al., 2011). Η βακτηριακή κυτταρίνη λαμβάνεται από βακτηριακά είδη, όπως το βακτήριο *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. Αυτά έχουν την ικανότητα να συνθέτουν λεπτά υμένα κυτταρίνης, όταν τοποθετούνται σε ένα μέσο καλλιέργειας πλούσιο σε πολυσακχαρίτες. Η μεμβράνη που σχηματίζουν αποτελείται από δέσμες ινιδίων πλάτους 4 μm, οι οποίες αποτελούνται από νανο-ινίδια που έχουν μικρότερο πλάτος από 100 nm (Martinez-Sanz, Lopez-Rubio, & Lagaron, 2011; Okiyama, Motoki, & Yamanaka, 1992, 1993; Okiyama, Shirae, Kano, &

Yamanaka, 1992). Η BC έχει διακριτά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές πηγές κυτταρίνης όπως τα φυτά παρ' όλο που έχουν την ίδια χημική δομή.

Η BC έχει υψηλότερη καθαρότητα, υψηλότερη κρυσταλλικότητα, μικρότερη πυκνότητα, υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού, υψηλό βαθμό πολυμερισμού, υψηλότερη μηχανική αντοχή λόγω δικτύου με την δομή ιστού που συνθέτει, ισχυρή βιολογική προσαρμοστικότητα και δεν συνδέεται με λιγνίνη ή ημικυτταρίνες, όλα αυτά την κάνουν πιο πολύτιμη σε σχέση με την κυτταρίνη που προέρχεται από τα φυτά (Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000; Klemm, Heublein, Fink, & Bohn, 2005). Λόγω αυτών των ιδιοτήτων η βακτηριακή κυτταρίνη χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε διάφορους τομείς όπως στη βιοϊατρική (Fu, Zhang, & Yang, 2013; Meftahi et al., 2010), στη βιομηχανία χαρτιού (Chawla, Bajaj, Survase, & Singhal, 2009), στα καλλυντικά και σε πολλούς άλλους τομείς.

Στην βιομηχανία τροφίμων η BC έχει χρησιμοποιηθεί στις Φιλιππίνες για την δημιουργία ενός τοπικού επιδορπίου που ονομάζεται Nata de coco. Για την δημιουργία αυτού του γλυκού παχιά φύλλα κυτταρίνης (μορφή γέλης) που έχουν υποστεί ζύμωση με νερό καρύδας, τεμαχίζονται σε σχήμα κύβου και εμβαπτίζονται σε σιρόπι ζάχαρης (Iguchi, S., & A., 2000; Shi, Zhang, Phillips, & Yang, 2014).

Παρ' όλο που η BC δεν χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα έχει μεγάλες δυνατότητες ως συστατικό τροφίμων, καθώς μπορεί να χρησιμοποιείται για να μεταβάλλει το ιξώδες των τροφίμων ως πυκνωτικό, ως σταθεροποιητής ή σαν παράγοντας πήξης. Λόγω των ιδιοτήτων της η BC μπορεί να είναι ένα πολλά υποσχόμενο διογκωτικό συστατικό χαμηλών θερμίδων για την ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων σε διάφορες μορφές όπως σκόνες και gels (Shi, Zhang, Phillips, & Yang, 2014; Chau, Yang, Yu, & Yen, 2008; Lin, Chen, & Chen, 2011).

Σε πολλές περιπτώσεις τα βιοπολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιομηχανία τροφίμων αφού πρώτα έχουν υποστεί ξήρανση, καθώς θα ήταν πιο εύκολο για την αποθήκευση και την διακίνηση να υπήρχαν αποξηραμένα ινίδια βακτηριακή κυτταρίνης. (Agoda-Tandjawa et al., 2010). Παρόλα αυτά στην περίπτωση της βακτηριακής κυτταρίνης η εκ νέου διασπορά των αποξηραμένων ινών κυτταρίνης στο νερό δεν θα επιτρέψει την ανάκτηση των αρχικών ρεολογικών ιδιοτήτων του αρχικού διαλύματος. Επίσης θα είναι αδύνατη και η αρχική ικανότητα απορρόφησης του νερού από την κυτταρίνη (Agoda-Tandjawa et al., 2010; Lowys et al., 2001).

Επίσης ένας από τους λόγους που δεν υπάρχει συστηματική χρήση της BC στην βιομηχανία τροφίμων είναι η μικρή ικανότητά της να διασκορπίζεται στο νερό (Agoda-Tandjawa, et al., 2010; Lowys, et al., 2001). Για την βιομηχανία τροφίμων και τα πρόσθετα τροφίμων αποτελεί βασική προϋπόθεση η καλή διασκορπισή τους στο νερό, όμως τα εναιωρήματα της BC παρουσιάζουν έντονη συσσωμάτωση των σωματιδίων τους λόγω των δυνάμεων Van der Waals και των δεσμών υδρογόνου (Kuijk, et al., 2013). Τελευταία στη βιομηχανία τροφίμων έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογικές προσεγγίσεις με σκοπό την ενίσχυση των ιδιοτήτων των

κολλοειδών διαλυμάτων της κυτταρίνης (Koh et al., 2014; Rabetafika, Bchir, Aguedo, Raquot, & Blecker, 2014).

Σε πρόσφατες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η BC δρα ως σταθεροποιητής στα γαλακτώματα (Kalashnikova, Bizot, Cathala, & Capron, 2011; Paximada, Tsouko, Korsahelis, Koutinas, & Mandala, 2014). Ακόμα και χωρίς την προσθήκη κοινών γαλακτωματοποιητών, όπως οι πρωτεΐνες, τα γαλακτώματα παρέμειναν σταθερά, αλλά το μέγεθος των λιποσφαιρίων τους ήταν μεγάλο. Τα γαλακτώματα παρέμειναν σταθερά επειδή οι κροκιδώσεις που σχηματίζονται από τα ινίδια της BC προσροφώνται από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων και σχηματίζουν ένα ισχυρό δίκτυο που αποτρέπει την συνένωση των λιποσφαιρίων (Paximada, et al., 2014).

5 Οξείδωση

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια από τις σημαντικότερες αντιδράσεις που παίρνουν μέρος στα γαλακτώματα και μπορεί να προκαλέσει σημαντική υποβάθμιση στην ποιότητα του προϊόντος. Το λιπίδιο οξείδωσης είναι ένα όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια σύνθετη σειρά από χημικές μεταβολές που απορρέουν από την αντίδραση των λιπιδίων με το οξυγόνο (Nawar, 1996; Frankel, 1998; Akoh and Min, 2002).

Η οξείδωση μπορεί να επηρεάσει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του γαλακτώματος (γεύση και οσμή), αλλά και την διατροφική αξία των γαλακτωμάτων καθώς προκαλέσει απώλεια των ευεργετικών πολυακόρεστων λιπιδίων και τα προϊόντα της οξείδωσης μπορεί να είναι τοξικά (McClements and Decker, 2000).

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια χημική αντίδραση που γίνεται μεταξύ των ακόρεστων λιπαρών οξέων και του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και ολοκληρώνεται μέσω μιας αυτοκαταλυόμενης διαδικασίας. Ακολουθώντας μηχανισμός αλυσιδωτών αντιδράσεων μέσω ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά ασταθή μόρια τα οποία φέρουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και είναι δυνατόν να βρίσκονται σε οξειδωμένη ή σε ανοιγμένη μορφή. Οι οργανικές ελεύθερες ρίζες το ROOH σχηματίζονται από την αντίδραση ελευθέρων ριζών με κυτταρικά συστατικά όπως τα λιπίδια. Οι αλκο-(RO) και η υπεροξυ-(ROO) ρίζες σχηματίζονται παρουσία του οξυγόνου με προσθήκη ελευθέρων ριζών σε διπλούς δεσμούς ή με αφαίρεση υδρογόνου, αυτές συμμετέχουν στις αντιδράσεις λιπιδικής αυτοοξείδωσης.

Η διαδικασία της οξείδωσης μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια: το στάδιο έναρξης, το στάδιο της διάδοσης και το στάδιο του τερματισμού (Nawar, 1996; Frankel, 1998; Akoh and Min, 2002).

5.1 Μηχανισμοί οξείδωσης

Η διαδικασία της αυτοοξείδωσης των λιπαρών οξέων είναι ένα ιδιαίτερα περίπλοκο φαινόμενο και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ενδιάμεσων αντιδράσεων και παραγωγή ποικίλων προϊόντων. Για την κατανόηση αυτού του φαινομένου

χρησιμοποιούνται 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 συνήθεις συνθήκες αποθήκευσης, καθώς οξειδώνονται εύκολα προς σχηματισμό υπεροξειδίων. Για να αρχίσει η οξείδωση, είναι απαραίτητη η παρουσία ελεύθερων ριζών λιπαρών οξέων οι οποίες σχηματίζονται από την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από το μόριο των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Η απαιτούμενη ενέργεια για τον σκοπό αυτό, εξασφαλίζεται είτε από την υψηλή θερμοκρασία της αποθήκης, είτε από το φως, είτε από κάποια άλλη πηγή.

Στο πρώτο στάδιο της αυτοοξείδωσης, **την έναρξη**, σχηματίζεται μια ρίζα αλκυλίου ($R\cdot$) 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. Γενικά η έναρξη της αυτοοξείδωσης μπορεί να οφείλεται σε ελεύθερες ρίζες άγνωστης προέλευσης, ίχνη μετάλλων, επίδραση θέρμανσης ή ακτινοβολίας, οπότε αποσπάται το άτομο υδρογόνου από συγκεκριμένες θέσεις της αλυσίδας του λιπαρού οξέος.

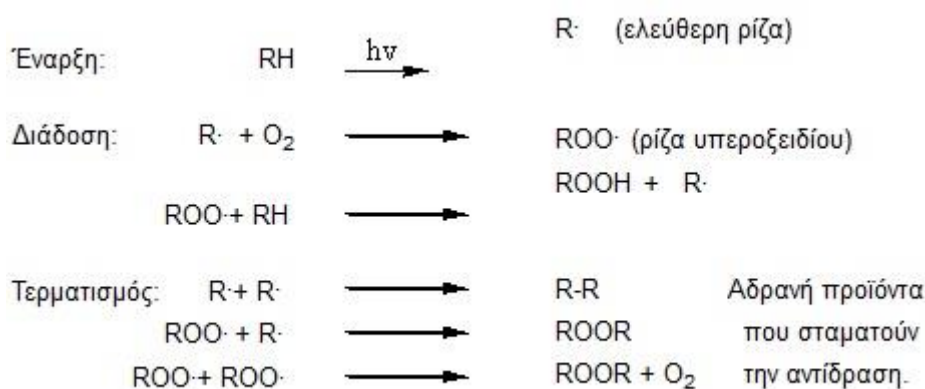
Στο επόμενο στάδιο, στο **στάδιο της διάδοσης**, η ρίζα του λιπαρού οξέος ($R\cdot$), που δημιουργήθηκε στο πρώτο στάδιο είναι ιδιαίτερα ασταθής και έτσι αντιδρά με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο για να σχηματίσει μια υπεροξειδική ρίζα ενός λιπαρού οξέος, $RO_2\cdot$. Αυτή η ρίζα και η άλλη από το πρώτο στάδιο, αντιδρούν με ένα λιπαρό οξύ και σχηματίζεται πάλι μια ελεύθερη ρίζα $R\cdot$ και ένα υδροξυπυροξείδιο, $ROOH$. Λόγω της σταθερότητας των υπεροξειδιακών ριζών και με βάση τις τιμές των σταθερών ρυθμών και με βάση τις τιμές των σταθερών του ρυθμού αντίδρασης, προκύπτει ότι το περιοριστικό στάδιο σε όλη την 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.

Σε θερμοκρασία δωματίου μια ρίζα μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό 100 μορίων υπεροξειδίου, πρώτου αρχίσουν οι αντιδράσεις τερματισμού του μηχανισμού της οξείδωσης (αντιδράσεις τερματισμού).

Στο στάδιο του τερματισμού η οξείδωση τερματίζεται, διότι τα προϊόντα τα οποία σχηματίζονται είναι αδρανή και έχουν χάσει πια τον χαρακτήρα των ελευθέρων ριζών που είναι για να προχωρήσει η οξείδωση. Παρουσία οξυγόνου όλες οι αλκυλικές ρίζες ($R\bullet$) μετατρέπονται σε υπεροξειδικές μέσω της ταχείας αντίδρασης 1. Το τέλος τη αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών συμβαίνει μέσω της αντίδρασης δύο υπεροξειδιακών ριζών (τελευταία αντίδραση). Οι πρώτες δύο αντιδράσεις του τερματισμού συμβαίνουν όταν το οξυγόνο βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Ο αυτόματος τερματισμός της οξείδωσης είναι δύσκολος, γιατί είναι απίθανο να αντιδράσουν μεταξύ τους όλες οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται και να δώσουν

αδρανή προϊόντα, όπως συμβαίνει στο τρίτο στάδιο. Είναι δυνατόν όμως να επιταχύνουμε τον τερματισμό, πριν προχωρήσει η οξείδωση προσθέτοντας αντιοξειδωτικά, δηλαδή ενώσεις οι οποίες αντιδρούν γρήγορα με τις ελεύθερες ρίζες και τις εξουδετερώνουν.



Εικόνα 12 : Σχηματικά τα στάδια του αυτοκαταλυτικού μηχανισμού της οξείδωσης.

5.2 Σχηματισμός συζυγών υπεροξειδίων- Πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης

Οι υπεροξειδικές ρίζες ($RO_2\cdot$) που σχηματίζονται στο στάδιο της έναρξης (αντίδραση 1) ή στο πρώτο στάδιο της διάδοσης της αυτοοξείδωσης (αντίδραση 2) αντιδρούν με αργό ρυθμό και αποσπούν επιλεκτικά ένα άτομο υδρογόνου από την ανθρακική αλυσίδα ενός λιπαρού οξέος προς σχηματισμό υδροϋπεροξειδίου, $ROOH$ (αντίδραση 3). Τα υπεροξειδία που σχηματίζονται από την αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος με το O_2 είναι στις θέσεις που υπάρχουν αρχικά οι διπλοί δεσμοί στο μόριο του λιπαρού οξέος. Το O_2 σχηματίζει συζυγή και μη συζυγή υπεροξειδία από την αντίδρασή του με την ελεύθερη ρίζα του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος. Η αντίδραση με το O_2 οδηγεί στο σχηματισμό μόνο συζυγών υπεροξειδίων (Belitz & Grotz, 1999). Τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης είναι άοσμα άγευστα, οπότε η ποιότητα των τροφίμων δεν επηρεάζεται από αυτά. Αυτά είναι ασταθής ενώσεις και διασπώνται εύκολα δίνοντας γένεση σε δευτερογενή προϊόντα.

5.3 Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης

Τα υπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών είναι τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, τα προϊόντα διάσπασης των υπεροξειδίων είναι οι αλδεΐδες και οι κετόνες οι οποίες αποτελούν τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης. Η οξείδωση των τροφίμων γίνεται αντιληπτή όταν σχηματίζονται τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης και κυρίως τα πτητικά τα οποία παρουσιάζουν άσχημη γεύση και οσμή ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις.

Η διάσπαση των υπεροξειδίων ξεκινά σχεδόν από την στιγμή που αυτά σχηματίζονται. Η διάσπαση γίνεται σχετικά εύκολα και υποβοηθάτε από τις υψηλές θερμοκρασίες. Στα πρώτα στάδια της αυτοοξείδωσης ο ρυθμός σχηματισμού τους

υπερβαίνει τον βαθμό διάσπασής τους, γεγονός που αντιστρέφεται στα επόμενα στάδια της οξείδωσης. Ο χρόνος που απαιτείται για την έναρξη του σχηματισμού των δευτερογενών προϊόντων είναι διαφορετικός ανάλογα με το έλαιο. Στην περίπτωση του ελαιολάδου η διάσπαση των υπεροξειδίων ξεκινά από την στιγμή της δημιουργίας τους (Guillen et al, 2002)

5.4 Μέθοδοι μέτρησης των προϊόντων της οξείδωσης

Οι μέθοδοι και οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν των βαθμό οξείδωσης των λιπαρών υλών μετρούν ποσοτικά τα πρωτογενή και δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης. Όπως αναφέρθηκε τα υπεροξείδια είναι τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης ενώ οι αλδεΐδες και οι κετόνες αποτελούν τα δευτερογενή προϊόντα. Οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των λιπών και των ελαίων που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της αποθήκευσης χρησιμοποιούνται ως δείκτες για να προσδιοριστεί ο βαθμός της οξείδωσης. Αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα, για τον προσδιορισμό των προϊόντων της αυτοοξείδωσης. Καμία μέθοδος δεν δίνει την δυνατότητα μέτρησης όλων των προϊόντων οξείδωσης απευθείας, δεν μπορούν να μετρήσουν σε όλα τα στάδια της οξείδωσης όπως δεν είναι όλες κατάλληλες για τον ίδιο τύπο τροφίμου. Κάθε μια από τις μεθόδους είναι επιλεκτική για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων προϊόντων. Η μέθοδος μέτρησης των υπεροξειδίων έχει το πλεονέκτημα ότι είναι γρήγορη δεν χρειάζεται πολυδάπανο εργαστηριακό εξοπλισμό και είναι σχετικά ακριβής. Παρουσιάζει όμως μόνο τα υπεροξείδια και όχι τα προϊόντα διάσπασής τους. Συνιστάται ο συνδυασμός των μεθόδων ώστε να υπάρχουν ποσοτικά αποτελέσματα για τα πρωτογενή και τα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης. Οι μέθοδοι προσδιορισμού των προϊόντων της οξείδωσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η μια κατηγορία αποτελείται από τις μεθόδους που μετρούν τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης και άλλη από τις μεθόδους που μετρούν τα δευτερογενή προϊόντα. (Moore & Roberts, 1998)

Πρωτογενή προϊόντα

UV φασματοσκόπια

Μέθοδος του Wheeler

Μέθοδος του Lea

Δευτερογενή προϊόντα

Αντίδραση KREIS

Θειοβαρβιτουρικού οξέος TBA test

Καρβονυλικών ενώσεων

Βαθμός p- Ανισιδίνης

6 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν ένα από τα πιο αποτελεσματικά μέσα για να μπορέσουμε να επιβραδύνουμε την οξείδωση των λιπιδίων στα τρόφιμα. Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν με μια ποικιλία διαφορετικών μεθόδων όπως ο έλεγχος των υποστρωμάτων που είναι κατάλληλος για οξείδωση (οξυγόνο και λιπαρά), ο έλεγχος των προ-οξειδωτικών (αντιδραστικά στελέχη του οξυγόνου και των οξειδωτικών μετάλλων) και την αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών (Frankel, 1998).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες βάση με τον μηχανισμό τον οποίο δρουν: πρωτογενή αντιοξειδωτικά και δευτερογενή αντιοξειδωτικά.

Τα πρωτογενή οξειδωτικά καθυστερούν την οξείδωση των λιπιδίων γιατί είναι ικανά να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι να επιβραδύνουν το στάδιο της έναρξης της οξείδωσης ή να διακόπτουν το στάδιο της διάδοσης (McClements and Decker, 2000). Η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από την χημική τους δομή, τις συνθήκες διαλυτότητάς τους (ιοντική ισχύς, θερμοκρασία και pH) και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος (λάδι, νερό ή διεπιφανειακή περιοχή). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα αντιοξειδωτικά που επιβραδύνουν την οξείδωση των λιπιδίων και είναι αποτελεσματικά σε έλαια μπορεί να μην είναι τόσο αποτελεσματικά σε γαλακτώματα λόγω της διαφορετικής θέσης του σε σχέση με τα λιπίδια (Frankel, 1998). Συνθετικά πρόσθετα τροφίμων (BHA, BHT, TBHQ) χρησιμοποιούνται ως αντιοξειδωτικά, ωστόσο η ζήτηση φυσικών αντιοξειδωτικών από τους καταναλωτές έχει οδηγήσει την βιομηχανία τροφίμων στην εύρεση και χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών όπως τοκοφερόλες, εκχυλίσματα φρούτων και φυτικά εκχυλίσματα (Frankel, 1996; McClements and Decker, 2000).

Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να επιβραδύνουν την οξείδωση των λιπιδίων μέσω ποικίλων μηχανισμών εκ των οποίων είναι οι χηλικές ενώσεις που σχηματίζουν με τα μέταλλα μεταπτώσεως, η αντικατάσταση του υδρογόνου σε πρωτογενή αντιοξειδωτικά, η σάρωση του οξυγόνου και η απενεργοποίηση των αντιδραστικών ειδών (Reische et al., 1998). Κανένας από αυτούς τους μηχανισμούς δεν περιλαμβάνει την μετατροπή των ελευθέρων ριζών σε πιο σταθερά προϊόντα. Για τα γαλακτώματα ο/w το πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά είναι αυτά που προκαλούν χηλικές ενώσεις στα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (chelate transition metal ions), καθώς η παρουσία μετάλλων μεταπτώσεως όπως ο χαλκός και ο σίδηρος στην υδατική φάση του γαλακτώματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την προαγωγή της οξείδωσης των λιπιδίων.

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι στα γαλακτώματα ο/w η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί να καθυστερήσει με επικάλυψη των λιποσφαιρίων ελαίου με μια σχετικά παχιά διεπιφανειακή μεμβράνη που είναι θετικά φορτισμένη έτσι ώστε να εμποδίσει να έρθουν σε επαφή τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης με τα λιπίδια στο εσωτερικό των λιποσφαιρίων (McClements and Decker, 2000).

6.1 Κατεχίνες

Οι κατεχίνες είναι μια ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών, οι οποίες βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στα φρούτα, στα λαχανικά και στα αφεψήματα. Οι κατεχίνες δεν είναι απαραίτητες για την ανθρώπινη διατροφή βοηθούν όμως στην προστασία από ποικίλες ασθένειες. Μερικές κύριες πηγές κατεχινών είναι τα σταφύλια, τα μήλα, το αχλάδι, τα κεράσια και το πράσινο τσάι (Kondo et al., 2002).

Οι κατεχίνες του περιέχονται στο πράσινο τσάι σε σχέση με το μαύρο τσάι είναι περισσότερες, καθώς η διαδικασία παραγωγής τους διαφέρει. Στην παραγωγή του μαύρου τσαγιού υπάρχει η διαδικασία της ζύμωσης κατά την διάρκεια της οποίας η οξείδωση της πολυφαινόλης που βρίσκεται στα φύλλα του τσαγιού καταλύει την οξείδωση της πλειοψηφίας των κατεχινών, μειώνοντας έτσι το ποσοστό των κατεχινών του μαύρου τσαγιού (Friedman, Levin, Choi, Lee, & Kozukue, 2009).

Οι κατεχίνες που περιέχονται στο πράσινο τσάι αναστέλλουν την καρκινογένεση του δέρματος, του πνεύμονα, του οισοφάγου, του στομάχου, του ήπατος, του κόλον, του λεπτού εντέρου, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη, του μαστού σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ζώα (Chung et al., 2000). Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού έχουν αντι-μικροβιακή, αντι-καρκινική, αντι-οξειδωτική, αντι-φλεγμονώδη και κατά των ιών δράση (Khan&Mukhtar, 2007; Lakenbrink, Lapczynski, Maiwald, & Engelhardt, 2000; Zaveri, 2006) Επιπλέον οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού έχουν και άλλες φαρμακευτικές ιδιότητες καθώς χρησιμοποιούνται κατά της υπέρτασης (Chan et al., 1999). Τα αποτελέσματα έρευνας που έγινε από τον Οργανισμό Τροφίμων της Αμερικής (FAO, 2008), έδειξαν ότι η κατανάλωση πράσινου τσαγιού αυξάνεται σημαντικά κάθε χρόνο λόγω των σημαντικών ωφελειών που προσφέρει στην υγεία των καταναλωτών.

Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού έχουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις άλλες πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού. Η πλειοψηφία των κατεχινών του πράσινου τσαγιού είναι : (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) (επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα), (-)-epicatechin gallate (ECG)(επικατεχίνη), (-)-epigallocatechin (EGC) (επικατεχίνη γαλλικού εστέρα) και η (-)-epicatechin (EC) (επικατεχίνη). Κάθε μια από τις παραπάνω έχει διαφορετικές ιδιότητες. Η EGCG είναι η πλέον άφθονη και πιο δραστική κατεχίνη και χρησιμοποιείται ως ποιοτικός δείκτης, (Lakenbrink et al., 2000; Wang & Helliwell, 2000; Wang, Zhou, & Jiang, 2008a).

Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού δρουν ως αντιοξειδωτικά καθώς δεσμεύουν και εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες είναι ικανές να προκαλέσουν κυτταρικές βλάβες οι οποίες οδηγούν σε καρκίνο, μετατρέποντας τις σε μη τοξικές άρα και ακίνδυνες για τον οργανισμό (Dreosti, 2000).

Πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η αντικαρκινική δράση των κατεχινών πιθανόν προέρχεται από την αντιοξειδωτική τους δράση και από την άμεση

δέσμευση των πολυφαινολών του πράσινου τσαγιού στις πρωτεΐνες (Wang et al., 2013).

6.2 EGCG

Η EGCG είναι μια πολύ γνωστή κατεχίνη η οποία αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς μεταβολίτες την *Camellia Sinensis L*, είναι το κύριο βιοενεργό συστατικά που συναντάμε στο πράσινο τσάι και είναι η επικρατέστερη ένωση από τις κατεχίνες του πράσινου τσαγιού (Pinto, 2013).

Η EGCG αποτελεί μια ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία καθώς έχει αποδειχτεί σε in vitro έρευνες η αποτελεσματική ικανότητας της στην σάρωση ελεύθερων ριζών και την χύλωση των μετάλλων (Zhu et al., 200; Xu, Yeung, Chang, Huang, & Chen, 2004).

Η EGCG έχει μεγάλη σημασία και για την ιατρική καθώς φαίνεται να είναι δραστική κατά των ιών και να παρέχει νευροπροστατευτική δράση (Cai et al., 2014; Zhong, Ma, & Shahidi, 2012).

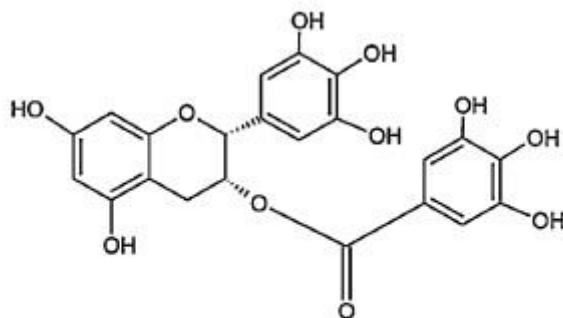
Η EGCG έχει ένα μεγάλο φάσμα πιθανών βιολογικών δραστηριοτήτων συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών (Manach et al., 2005; Henning et al., 2005), αντικαρκινικών (Du G.J. et al., 2013; Rathore K. et al., 2012; Zhong Y. et al., 2012), αντιφλεγμονωδών (Zhong Y., et al., 2012; Cavet M.E. et al., 2011; Tedeschi et al., 2002), αντιβακτηριδιακών και κατά των ιών δράσεων (Du G.J. et al., 2012; Gordon N.C. et al., 2010; Guida et al., 2007; Fanguiero J.F. et al., 2014).

Ένα μεγάλο φάσμα ερευνών δείχνει ότι η EGCG μπορεί να εφαρμοστεί στην θεραπεία και την πρόληψη ορισμένων μορφών καρκίνου όπως του καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου (Mittal et al., 2004; Arts I.C. et al., 2005; Sen T. Et al., 2009) και να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (Li M. et al., 2012)

6.2.1 Χημικές ιδιότητες της EGCG

Οι κατεχίνες αποτελούνται από δυο αρωματικούς δακτυλίους και διάφορες ομάδες υδροξυλίου βάση των οποίων κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες: τις κανονικές και τις εστεροποιημένες κατεχίνες. Η κατεχίνη, η γαλλοκατεχίνη, η επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη EGCG είναι μη-εστεροποιημένες.

Οι κατεχίνες έχουν ασταθή φύση όταν τις συναντάμε στην φύση και η κανονική δομή των κατεχινών είναι υψηλά ασταθής. Η EGCG οξειδώνεται εύκολα από τα ένζυμα, τα οξέα και την θερμότητα (Graham, 1992). Οι κατεχίνες είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα όπου το $pH < 4$ και η σταθερότητα σταδιακά μειώνεται καθώς το pH αυξάνεται από 4 στο 8 (Ananingsih et al., 2013; Zhu et al., 1997).



(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)

Εικόνα 13: Η δομή της EGCG (Pravin Vasantryo Gadkaria & Manohar Balaramana, 2014)

6.2.2 Φυσικές ιδιότητες της EGCG

Πίνακας 2: Φυσικά χαρακτηριστικά της EGCG (Pravin Vasantryo Gadkaria, Manohar Balaramana, 2014)

Χημικός τύπος	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	Ninomiya et al. (1997)
Μοριακό βάρος	458	Ninomiya et al. (1997)
Μέγιστη απορρόφηση (in nm)	273	Ninomiya et al. (1997)
Σημείο τήξης	224	Ninomiya et al. (1997)
Διαλυτότητα	Εξαρτάται Χρόνος/θερμοκρασία διαλύτη	Labbe et al. (2006) Hu et al. (2009)
Διαλύτες		
Νερό/αιθανόλη/μεθανόλη	Διαλυτή	Yamanishi (1995)
Χλωροφόρμιο	Αδιάλυτη	Yamanishi (1995)
Γεύση	Πικρή και στυφή	
Εμφάνιση	Άσπρη και ροζ.	

Ο παραπάνω πίνακας παρουσιάζει μερικές από τις κυριότερες φυσικές ιδιότητες της EGCG. Οι κατεχίνες είναι συνήθως άχρωμες κρυσταλλικές ουσίες και συνήθως έχουν πικρή και στυφή γεύση. Επίσης είναι εύκολα διαλυτές σε πολικούς διαλύτες όπως είναι το νερό και η μεθανολή. Η EGCG βρίσκεται στο πράσινο τσάι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τις υπόλοιπες κατεχίνες (Yamamoto,1997; Yang and Liu, 2013). Επίσης η απορρόφηση της EGCG είναι μέγιστη στο μήκος κύματος των 210-280 nm (Sharma et al., 2005).

6.3 Εστεροποιημένη EGCG/ Λιπόφιλη EGCG

Η EGCG όπως και τα περισσότερα φαινολικά αντιοξειδωτικά που συναντώνται στη φύση είναι διαλυτά στο νερό και σε πολικούς διαλύτες και ελάχιστα διαλυτά σε περισσότερο λιπόφιλα μέσα. Αυτό εμποδίζει την αποτελεσματική εφαρμογή της σε λιπόφιλα μέσα, όπως τα έλαια και τα γαλακτώματα. Επίσης η μικρή λιποφιλική

ικανότητα της EGCG είναι εν μέρη υπεύθυνη για την χαμηλή κυτταρική απορρόφηση *in vivo*.

Έτσι για να αυξηθούν οι εφαρμογές της EGCG σαν αντιοξειδωτικό ή σαν λειτουργικό συστατικό σε διάφορα συστήματα, αλλά και για να βελτιωθεί η κυτταρική της απορρόφηση και η έλξη της από τα λιποσφαίρια και τις μεμβράνες και άλλων ευαίσθητων περιοχών ως προς την οξείδωση *in vivo*, γίνεται τροποποίηση της δομής της με σκοπό να αποκτήσει λιπόφιλο χαρακτήρα. Η EGCG αποκτά λιπόφιλο χαρακτήρα μέσω της εστεροποίησης.

Τα παράγωγα της εστεροποιημένης EGCG έχουν ενισχυμένη λιποφιλική ικανότητα και αντιοξειδωτική δράση η οποία επιβεβαιώνεται από πληθώρα *in vitro* ερευνών. (Zhong, Ma, & Shahidi, 2011; Zhong & Shahidi, 2011; Zhong & Shahidi, 2012).

6.4 Ενθυλάκωση της EGCG

Οι πιο επιβλαβείς παράγοντες για τις κατεχίνες είναι το οξυγόνο και το φώς. Τεχνικές ενσωμάτωσης των κατεχινών στα τρόφιμα όπως η ενθυλάκωση χρησιμοποιούνται για να προστατέψουν τις κατεχίνες ώστε να καταφέρουν να επιβιώσουν στα επιβλαβή περιβάλλοντα που θα διασχίσουν μέχρι να απορροφηθούν από τα ανθρώπινα όργανα.

Η προστατευτική επικάλυψη και η ενθυλάκωση είναι σημαντική για την συντήρηση των κατεχινών. Με σκοπό την προστασία από το φώς και το οξυγόνο, δημιουργούνται φυσικές δομές από βιολογικές δομές : όπως τρόφιμα τα οποία μετατρέπονται σε νανο-γαλακτώματα (Leclercq et al., 2009). Το πιο συνηθισμένο υλικό επικάλυψης είναι οι πολυσακχαρίτες . Ένας από αυτούς είναι και η βακτηριακή κυτταρίνη. Σημαντικό είναι να αναπτυχθεί η διαδικασία της ενθυλάκωσης των κατεχινών καθώς αυξάνει την σταθερότητα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης.

Ο κύριος στόχος της ενθυλάκωσης της EGCG είναι η προστασίας της από τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως οι ανεπιθύμητες επιδράσεις του φωτός, της υγρασίας και του οξυγόνου. Η ενθυλάκωση συμβάλει στην αύξηση της διάρκειας ζωής της EGCG και στην αποφυγή της υποβάθμισής της (Fang Z. Et al., 2010).

Θα μπορούσε να είναι μια πολύ καλή εναλλακτική λύση για την προστασία της κατεχίνης από διεργασίες οξείδωσης και επιμερισμού και θα μπορούσε να συμβάλει στην διατήρηση της σταθερότητας της.

6.5 EGCG και οι πρωτεΐνες

Στα τρόφιμα υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των πρωτεϊνών κατά την διάρκεια της παραγωγής και της αποθήκευσης των τροφίμων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κατεχινών - πρωτεϊνών μπορούν να επηρεάσουν το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση των τροφίμων δίνοντας επιθυμητά ή ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Ωστόσο οι περισσότερες από τις μελέτες έχουν να κάνουν με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαινολικών ενώσεων και πρωτεϊνών (Li &

Hagerman, 2014; Nagy et al., 2012; Ye, Fan, Xu, & Liang, 2013), και γενικά λίγα είναι γνωστά σχετικά με τους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των πρωτεϊνών (Rawel & Rohn, 2010). Ο Wang και οι συνεργάτες του (Wang et al., 2014) σε έρευνά τους είχαν ασχοληθεί με τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ α-λακταλβουμίνης και EGCG. Γενικά δεν έχει γίνει συστηματική έρευνα για τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατεχινών του τσαγιού και των πρωτεϊνών του γάλακτος. Παρόλο που έχουν γίνει αρκετές έρευνες σχετικά με τον σχηματισμό μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών του γάλακτος και των κατεχινών του πράσινου τσαγιού (Yang, Liu, Xu, Yuan, & Gao, 2014; Zorilla, Liang, Remondetto, & Subirade, 2011), λίγα είναι γνωστά σχετικά με τις διαρθρωτικές και τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των μη-ομοιοπολικών και ομοιοπολικών σύμπλοκων που δημιουργούνται από τις κατεχίνες του πράσινου τσαγιού και τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Μια συστηματική έρευνα για την σύγκριση των ομοιοπολικών και μη-ομοιοπολικών σύμπλοκων που δημιουργούνται από τις κατεχίνες και τις πρωτεΐνες του γάλακτος μπορεί να προσφέρει μια καλύτερη εξήγηση για το πώς αυτά τα σύμπλοκα επηρεάζουν τις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών και πως αυτά σύμπλοκα μπορούν αξιοποιηθούν λειτουργικά στα τρόφιμα.

Η EGCG αντέχει σε υψηλά pH (Friedman & Jurgens, 2000) και έχει μεγαλύτερη τάση να σχηματίζει σύμπλοκα με πρωτεΐνες γάλακτος λόγω του μεγάλου της μοριακού βάρους (Ozdal, Carpanoglu, & Altay, 2013). Σε προηγούμενες έρευνες έχει αποδειχτεί ότι η α-λακταλβουμίνη και η β-λακτογλοβουλίνη όταν δημιουργούν σύμπλοκα να την EGCG μπορούν να σχηματίσουν διαλυτά παράγωγα. Άλλωστε η WPI κύρια συστατικά της οποίας είναι α-λακταλβουμίνη και η β-λακτογλοβουλίνη χρησιμοποιείται σαν γαλακτωματοποιητής σε γαλακτώματα ελαίου/νερό για την διακίνηση λιπόφιλων συστατικών (McClements, Decker, Park, & Weiss, 2009).

Ο Zorilla και οι συνεργάτες του σε έρευνα τους έδειξαν ότι σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της EGCG και της β-λακτογλοβουλίνης, γεγονός που μειώνει την αντιοξειδωτική δράση της EGCG (Zorilla, Liang, Remondetto, & Subirade, 2011). Επίσης γίνεται η υπόθεση ότι μπορεί να εμπλέκονται και άλλες δυνάμεις πέρα των δεσμών υδρογόνου όπως υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις οι οποίες έχουν αναφερθεί και στην έρευνα των Papadopoulou και των συνεργατών της. (Papadopoulou et al., 2005).

Όταν δημιουργείται σύμπλοκο πρωτεϊνών-κατεχίνης, οι κατεχίνες εξακολουθούν να έχουν την ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών, αφού αυτή η ένωση εξακολουθεί να αφήνει ελεύθερες ομάδες φαινολικού υδροξυλίου που έχουν αντιοξειδωτική δράση. Η EGCG έχει γειτονικές ομάδες υδροξυλίου με δυο αρωματικούς δακτυλίους και είναι πιθανόν, ότι ακόμη και αν οι ομάδες υδροξυλίου ενός εκ των δακτυλίων εμπλέκονται στην δέσμευσή με την αλβουμίνη, οι ομάδες υδροξυλίου στο δεύτερο δακτύλιο εξακολουθούν να είναι ελεύθερες και να

επιτρέπουν στο μόριο να δρα ως αντιοξειδωτικό. Έτσι το σύμπλοκο πρωτεϊνών-κατεχινών συνεχίζει να δρα ως αντιοξειδωτικό.

Στην περίπτωση όπου οι κατεχίνες σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με την πρωτεΐνη κατά την αποθήκευση και το γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεσμεύει την κατεχίνη συμβάλουν στην αντιοξειδωτική δράση των συστημάτων αυτών. Έτσι η EGCG μπορεί να δεσμεύουν μη αναστρέψιμα τις πρωτεΐνες κατά τη αποθήκευση και η επίδραση είναι να δρουν συνεργατικά για την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ένα γαλάκτωμα ο/ω όπου είναι παρόντες και οι δύο.

Ο Wei και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα γαλακτώματα ελαίου/νερού που περιείχαν ομοιοπολικά σύμπλοκα EGCG-πρωτεΐνης είχαν μεγαλύτερη διεπιφανειακή συσσώρευση της EGCG σε σχέση με αυτά που περιείχαν μη-ομοιοπολικά σύμπλοκα EGCG – πρωτεϊνών (Wei Z. et al., 2015). Η EGCG στα ομοιοπολικά σύμπλοκα συνδέεται με την πρωτεΐνη μέσω δυνατών αλληλεπιδράσεων και δεν μπορεί εύκολα να διασπείρεται στην υδατική φάση (ακόμα και μετά από φυγοκέντρηση). Έτσι αφού η διεπιφανειακή περιοχή των γαλακτωμάτων είναι μέγιστης σημασίας για την ανάπτυξη της οξείδωσης (von Staszewski, Ruiz-Henestrosa, & Pilosof, 2014) και τα αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά στα γαλακτώματα ελαίου/νερό όταν αυτά συσσωρεύονται στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού (Waraho, McClements, & Decker, 2011). Μπορεί να θεωρηθεί ότι τα ομοιοπολικά σύμπλοκα παρουσιάζουν και την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην σταθεροποίηση γαλακτωμάτων καθώς η EGCG των ομοιοπολικών συμπλόκων βρίσκεται στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού (Z. Wei et al, 2015).

7 Υλικά και μέθοδοι

7.1 Υλικά

- Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey Protein Isolated, WPI) Lacrodan DI-9224 (Arla Foods Ingredients, Ambs-Denmark).
- Έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο Άλις (Elais Unilever, Athens)
- Βακτηριακή κυτταρίνη (BC)
- Citric acid
- Sodium citrate
- Sodium Azide (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)
- Epigallocatechin gallate (EGCG) (TCI, >98% MW=458,38(Anh))
- Epigallocatechin gallate (EGCG) εστεροποιημένη
- Απιονισμένο νερό
- Πιπέττες Pasteur
- Σύριγγες μιας χρήσεως των 2,5mL
- Φίλτρα (0.22μm)
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες

Όργανα:

- Vortex (IKA, Vortex, Genius)
- Φασματοφωτόμετρο (Double-beam UV-Vis spectrophotometer, Jasco V-500)
- Φυγόκεντρος (ECONOSPIN, Sorval Instruments, France)
- Δυναμικός αναλυτής σκέδασης φωτός (Zetasizer Nano ZS, Malven Instruments, UK)
- Turbiscan MA 2000 (Formulation, Toulouse, France)
- Λουτρό υπερήχων (S 70, Elmasonic, Elma, Germany)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Kruss Optronik, Germany)
- Κάμερα μικροσκοπίου (SONY, Topica TP-1002DS)
- Ομογενοποιητής υπερήχων (Sonopuls 3200, Bandelin GmbH & Co, Germany)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotavapor R-3000, BUCHI, Switzerland)
- Ρεόμετρο (Discovery HR-3 Hybrid Rheometer, TA instruments, United States)
- Ομογενοποιητής υψηλής διάτμησης Ultraturax T25 (IKA Werke, Staufen, Germany)

Πίνακας 3: Σύσταση και ιδιότητες της WPI Lacrodan DI-9224 (Hoefler, 2004)

Χημικές προδιαγραφές		Περιεκτικότητα σε μέταλλα	Φυσικές προδιαγραφές	Ιδιότητες
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%	Φαινομενική πυκνότητα 0,4 g/cm ²	Σχεδιασμένο για διαλύματα ουδέτερου pH.
Λίπος	Μέγιστο 0,2%	Χλώριο (Cl) 0,05%	Χρώμα σκόνης Λευκό-υποκίτρινο	Δίνει διάφανα διαλύματα με χαμηλό ιξώδες
Τέφρα	Μέγιστο 4,5%	Κάλιο (Ka) 1,3%	Χρώμα διαλύματος 10 % διάφανο	Ουδέτερη γεύση
Υγρασία	Μέγιστο 6%	Ασβέστιο (Ca) 0.1%	Γεύση και άρωμα Ήπια	Χαμηλό περιεχόμενο σε λίπος
			Δείκτης διαλυτότητας 0,1mL	

7.2 Μέθοδοι

7.2.1 Παραγωγή της βακτηριακή κυτταρίνης (BC)

Οι βακτηριακές καλλιέργειες (*Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973) διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας ένα συνθετικό μέσο όπως περιγράφεται από τους Hestrin και Schramm (1954) το οποίο περιέχει μια πηγή άνθρακα (20 g/L), εκχύλισμα ζύμης (5 g/L), πεπτόνη (5 g/L), κιτρικό οξύ (1.15 g/L) και Na₂HPO₄ (2.7 g/L). Το εμβόλιο παρασκευάζεται με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στους 30°C και 100-120 rpm για δύο ημέρες, στο υγρό μέσο που περιγράφεται από τους Hestrin και Schramm. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε Erlenmeyer φιάλες των 250 mL, οι οποίες περιείχαν 50 mL συνθετικού μέσου και εμβολιάστηκαν με 10% v/v

inoculum volume. Όλες οι φιάλες επώαστηκαν στους 30°C για 15 ημέρες σε στατική στάση.

Μετά το πέρας της καλλιέργειας, η βακτηριακή κυτταρίνη απομακρύνθηκε από τις καλλιέργειες και έγινε έκπλυσή της με νερό βρύσης ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα. Στη συνέχεια υποβλήθηκε σε επεξεργασία με 2M NaOH ώστε να επέλθει εξάλειψη των βακτηριακών κυττάρων και ξεπλύθηκε επανειλημμένα με νερό βρύσης μέχρι το ότου τα αιωρήματα (διασπορές) της BC να αποκτήσουν ουδέτερο pH. Στην συνέχεια τα καθαρισμένα λεπτά υμένια της BC τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια, έγινε η ανάμειξή τους με απιονισμένο νερό για την παρασκευή ενός εναιωρήματος BC (4% wt συγκέντρωση) και στη συνέχεια έγινε η χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (13500 RPM, 20 min, Ultra Turrax T25, IKA, Germany) με σκοπό την περαιτέρω αποσάθρωση των σωματιδίων της BC. Στη συνέχεια το μείγμα ομογενοποιήθηκε περαιτέρω με την χρήση συσκευής υπερήχων (Sonopuls 3200, εξοπλισμένο με probe MS 73-492 διαμέτρου 13 mm, Bandelin GmbH & Co, Berlin, Germany) για 3 λεπτά, στην συχνότητα των 20 kHz με 30% πλάτος πίεσης. Τέλος προστέθηκε sodium azide 0,02%wt ως αντιβακτηριακός παράγοντας.

7.2.2 Παρασκευή γαλακτωμάτων

Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιήθηκε το υπερσυμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (Whey Protein Isolated, WPI). Σε ζυγό ακριβείας αφού μηδενίστηκε ζυγίστηκαν 11 g πρωτεΐνης σε ένα ποτήρι ζέσεως και στη συνέχεια προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα citric acid 0,1M μέχρι την χαραγή των 100 mL και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 90 min σε θερμοκρασία δωματίου και ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας προστέθηκε στο διάλυμα sodium azide 0.02% wt (3 σταγόνες). Το διάλυμα (11% WPI) φυλάσσεται στο ψυγείο και χρησιμοποιήθηκε μετά από 24 ώρες, έτσι ώστε να έχει ενυδατωθεί η πρωτεΐνη.

- Για την παρασκευή του citric acid 0,1 M προστέθηκε σε ένα γυάλινο δοκιμαστικό ογκομετρικό των 1000mL 21,01 g citric acid και μετά μέχρι την χαραγή απιονισμένο νερό και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 10min.

Ως σταθεροποιητής χρησιμοποιήθηκε η βακτηριακή κυτταρίνη. Κατά την παρασκευή της ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας και προσθέτουμε σε ένα δοκιμαστικό ογκομετρικό σωλήνα με αναλογία 1:1 βακτηριακή κυτταρίνη και ρυθμιστικό διάλυμα citrate 0.1M με pH=3.6 και ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας προστέθηκε sodium azide 0.02% wt (3 σταγόνες). Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύτηκε σε συσκευή ομογενοποίησης υψηλής πίεσης Ultraturrax T125 (IKA, Germany) με ταχύτητα 12.800 rpm μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Το μίγμα έχει ομογενοποιηθεί όταν είναι εφικτή η προσρόφηση του με πιπέτα τύπου Paster. Το μίγμα της βακτηριακής κυτταρίνης φυλάσσεται στο ψυγείο.

- Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος citrate (50 mM) προστέθηκε σε έναν γυάλινο ογκομετρικό των 1000mL: 370 mL buffer citric

acid 0,1M και 130 mL sodium citrate και προστίθεται μέχρι την χαραγή απιονισμένο νερό και ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος.

- Για την παρασκευή του sodium citrate 0,1 M ζυγίστηκαν 2,94 g σκόνης sodium citrate τα οποία διαλύθηκαν σε 100mL απιονισμένου νερού και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα σχεδόν για 10 min μέχρι να διαλυθεί η σκόνη.

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα προ-γαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w) των 20 g με μία αναλογία 5 : 95 o/w. Αρχικά τοποθετήθηκε σε ένα ποτήρι ζέσεως η κατάλληλη ποσότητα WPI, BC και ελαιολάδου ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση (διαφορετικές συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν). Τοποθετήθηκε σε ένα ποτήρι ζέσεως έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (5%) μέσα στο υδατικό διάλυμα, η αναλογία του οποίου ήταν 90% του συνολικού διαλύματος, το οποίο περιείχε βακτηριακή κυτταρίνη (BC) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1,0 και 0,5 wt) και πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2, 3 και 5% wt). Η γαλακτωματοποίηση έγινε με την χρήση συσκευής ομογενοποίησης υψηλής διάτμησης το Ultra Turaxx T25 (IKA, Germany) στα 12,600 rpm για 3 min. Τα γαλακτώματα είχαν pH 3.8.

Στη συνέχεια 15 mL του γαλακτώματος μεταφέρθηκαν σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως (κατάλληλο για την εφαρμογή) το οποίο τοποθετήθηκε σε ειδικό κάδο που περιείχε πάγο και κάλυπτε το ποτήρι ζέσεως σε στόχο να αποφευχθεί η υπερβολική θέρμανση του γαλακτώματος και να διατηρείται σταθερή θερμοκρασία στους 30°C. Ακολούθησε ομογενοποίηση με την χρήση της συσκευής υπερήχων που λειτουργούσε στην συχνότητα των 20 kHz και στο 60% του πλάτους πίεσης για 2 min. Στο τέλος της διαδικασίας καταγράφονταν

- η συνολική ενέργεια που δεχόταν το δείγμα κατά την υπερήχηση (kJ)
- η θερμοκρασία του γαλακτώματος (°C)
- το pH

Για το κάθε γαλάκτωμα πραγματοποιούνταν τρεις επαναλήψεις και παράχθηκε και ένας μάρτυρας (0% BC).

7.2.3 Παρασκευή γαλακτωμάτων με προσθήκη EGCG

Παρατηρήθηκε ότι το πιο σταθερό γαλάκτωμα είναι το γαλάκτωμα που έχει τις ακόλουθες συγκεντρώσεις 5% WPI, 1% BC και 5% OIL.

Η EGCG τροποποιήθηκε με χημικό τρόπο, μέσω της εστεροποίησης. Συγκεκριμένα, η EGCG αντέδρασε με το χλωρίδιο στεατικού λιπαρού οξέος μακριάς ανθρακικής αλυσίδας. Το χλωρίδιο προστέθηκε σε EGCG διαλυμένη σε οξικό αιθυλεστέρα, παρουσία πυριδίνης. Το μίγμα αναδεύτηκε για 3 ώρες στους 40°C. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε διήθηση και το διάλυμα που προέκυψε εκχυλίστηκε με νερό. Από την οργανική φάση που συλλέχτηκε απομακρύνθηκε ο διαλύτης. Τελικά παραλαμβάνεται η προκύπτουσα σκόνη και αποθηκεύεται στους -18°C. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης, μίγμα εστέρων, ταχτοποιήθηκε με LC-MS με ανιχνευτή UV-DAD.

Στη συνέχεια ακολούθησε ενθυλάκωση της **EGCG** και της **εστεροποιημένης EGCG** στην **λιπαρή φάση** του γαλακτώματος (5% wt),

- **EGCG και εστεροποιημένη EGCG στην λιπαρή φάση του γαλακτώματος (5% wt),**

Παρασκευάστηκαν γαλακτώματα ελαίου σε νερό των 30 g με μία αναλογία 5 : 95 ο/w.

Τοποθετήθηκε σε μία μικρή σφαιρική έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (1,5 g) προστέθηκε EGCG σε διαφορετική ποσότητα (0.003, 0.007 και 0.015 g) κάθε φορά ανάλογη με την απαιτούμενη συγκέντρωση (0.01, 0.02 και 0,05 %) αντίστοιχα και 1 mL αιθανόλη και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 2 min μέχρι να διαλυθεί η EGCG. Στη συνέχεια ακολούθησε απομάκρυνση της αιθανόλης από το δείγμα με την χρήση του περιστροφικού εξατμιστήρα (Rotary Evaporator). Αφαιρούμε το δείγμα (ελαιόλαδο και EGCG) από την σφαιρική και τα προσθέτουμε στο υδατικό διάλυμα το οποίο αποτελείται από 13,5 g WPI (11%) και 15 g BC. Η γαλακτωματοποίηση έγινε με την χρήση συσκευής ομογενοποίησης υψηλής διάτμησης το Ultra Turaxx T25 (IKA, Germany) στα 12,600 rpm για 3 min. Τα γαλακτώματα παρασκευαστήκαν σε εύρος pH 3.4-3.8.

Στη συνέχεια το γαλάκτωμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως (κατάλληλο για την εφαρμογή) το οποίο τοποθετήθηκε σε ειδικό κάδο που περιείχε πάγο και κάλυπτε το ποτήρι ζέσεως σε στόχο να αποφευχθεί η υπερβολική θέρμανση του γαλακτώματος και να διατηρείται σταθερή θερμοκρασία στους 30°C. Ακολούθησε ομογενοποίηση με την χρήση της συσκευής υπερήχων (Sonopuls 3200, equipped 13 mm diameter MS 73-492 probe, Bandelin GmbH & Co, Berlin, Germany) που λειτουργούσε στην συχνότητα των 20 kHz και στο 60% του πλάτους πίεσης για 2 min.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για την παρασκευή των γαλακτωμάτων που περιείχαν εστεροποιημένη EGCG. Στη συνέχεια ακολούθησε η παρασκευή των γαλακτωμάτων με την ενσωματωμένη EGCG και την εστεροποιημένη EGCG στην υδατική φάση.

Ενσωμάτωση της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG στην υδατική φάση του γαλακτώματος.

- **EGCG στην υδατική φάση του γαλακτώματος.**

Για την παρασκευή των γαλακτωμάτων και την ενσωμάτωση της EGCG τοποθετήθηκε στην υδατική φάση η κατάλληλη ποσότητα EGCG (0.003, 0.007 και 0.015 g) κάθε φορά ανάλογη με την απαιτούμενη συγκέντρωση (0.01, 0.02 και 0,05 %) αντίστοιχα και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 15 min μέχρι να διαλυθεί η EGCG. Στη συνέχεια προστέθηκε το ελαιόλαδο (1,5 g), η γαλακτωματοποίηση έγινε με την χρήση συσκευής ομογενοποίησης υψηλής πίεσης ή διάτμησης το Ultra Turaxx T25 (IKA, Germany) στα 12,600 rpm για 3 min και με την χρήση της συσκευής υπερήχων με τον ίδιο τρόπο που έχει αναφερθεί.

- **Εστεροποιημένη EGCG στην υδατική φάση του γαλακτώματος.**

Για την παρασκευή των γαλακτωμάτων και την ενσωμάτωση της EGCG τοποθετήθηκε στην υδατική φάση η κατάλληλη ποσότητα EGCG (0.003, 0.007 και 0.015 g) κάθε φορά ανάλογη με την απαιτούμενη συγκέντρωση (0.01, 0.02 και 0,05 %) αντίστοιχα και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 15 min. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 40 min ώστε να διαλυθεί η ποσότητα της εστεροποιημένης EGCG. Στη συνέχεια προστέθηκε το ελαιόλαδο (1,5 g) και ακολούθησε η ομογενοποίηση του μίγματος με την ίδια μέθοδος που έχει ήδη αναφερθεί.

Δύο διαφορετικές παρτίδες γαλακτωμάτων προετοιμάστηκαν με την κάθε μέθοδο που παρουσιάστηκε.

Στο τέλος της κάθε διαδικασίας παρασκευής των γαλακτωμάτων καταγράφονταν

- η συνολική ενέργεια που δεχόταν το δείγμα κατά την υπερήχηση (kJ)
- η θερμοκρασία του γαλακτώματος (°C)
- το pH

Συνολικά παρασκευάστηκαν δώδεκα γαλακτώματα.

7.2.4 Μέθοδοι μέτρησης της οξείδωσης

Για τον προσδιορισμό της οξείδωσης τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (25°C) για 5 εβδομάδες. Τα δείγματα ήταν σταθερά νάνο-γαλακτώματα κάθε ένα από τα οποία ήταν 20 g με σύνθεση 13,5 g WPI (Whey Protein Isolated) και 15 g BC (βακτηριακή κυτταρίνη) και 1,5 g ελαιόλαδο ή 5% WPI 1% BC και 5% ελαιόλαδο. Στα 4 διαφορετικά γαλακτώματα είχαμε διαφορετικές προσθήκες EGCG

- 0,1 M EGCG που ενθυλακώθηκε στην λιπαρή φάση.
- 0,1 M EGCG που ενσωματώθηκε στην υδατική φάση.
- 0,1 M EGCG εστεροποιημένη που ενσωματώθηκε στην υδατική φάση.
- 0,1 M EGCG εστεροποιημένη που ενθυλακώθηκε στην λιπαρή φάση.

Μέτρηση πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης – Προσδιορισμός συζυγών διενίων (Conjugated Dienes – CD)

Αρχικά, ποσότητα 0,15 mL μεταφέρονται σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 3,9 mL διαλύματος μεθανόλης : βουτανόλης (2:1,v/v). Στη συνέχεια ακολούθησε καλή ανάδευση των δειγμάτων σε Vortex για 1 min και φυγοκέντρωση τους στα 2.500 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο του κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε καινούργιο πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα. Επειδή ο γαλακτωματοποιητής που χρησιμοποιήθηκε είναι πρωτεϊνικός απαιτούνταν διήθηση με φίλτρα για να απομακρυνθεί η πρωτεΐνη η οποία προκαλεί θολερότητα στο δείγμα και θα μπορούσε να προκαλέσει παρεμβολές στην μέτρηση της απορρόφησης. Χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές σύριγγες των 2,5 mL και φιλτράκια (0,22μm). Το διήθημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των συζυγών διενίων. Στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 232 nm με φασματοφωτόμετρο

διπλής δέσμης για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία των 1,5 mL και χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα (blank) διάλυμα μεθανόλης : βουτανόλης (2:1, v/v). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα έγιναν 4 φορές.

Προσδιορισμός του αριθμού p- Ανισιδίνης –Μέτρηση δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης

Η μέθοδος του βαθμού p-ανισιδίνης χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης.

Ποσότητα 1mL από κάθε γαλάκτωμα τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό πλαστικό σωλήνα και αναμείχθηκε με 12,5 mL ισοοκτάνιο, για την ανάμειξη χρησιμοποιήθηκε το Vortex για 10 sec για 2 φορές για κάθε δείγμα και έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min. Στη συνέχεια 5 mL από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 350 nm (A_1) σε φασματοφωτόμετρο με την χρήση κυψελίδων χαλαζία των 1,5 mL και χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα (blank) καθαρό ισοοκτάνιο.

Στη συνέχεια ακόμα 5 mL από το υπερκείμενο του δείγματος τοποθετήθηκαν σε καινούργιο πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος ήταν καλυμμένος με αλουμινόχαρτο ή τυλιγμένος με μαύρη μονωτική ταινία καθώς αυτό το βήμα της διαδικασίας απαιτεί την απουσία φωτός και προστίθεται 1 mL διαλύματος p-Ανισιδίνης. Στη συνέχεια αναδεύουμε το διάλυμα με την χρήση Vortex για 10 sec για το κάθε δείγμα. Μετά από 10 min μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 350nm (A_2) σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης με την χρήση κυψελίδα χαλαζία των 1,5 mL και χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα (blank) διάλυμα ισοοκτανίου : ανισιδίνης (8 mL : 1,6 mL). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες σε όλη την διάρκεια του πειράματος ήταν κλειστοί για να μην εξατμίζεται το ισοοκτάνιο. Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα έγιναν 4 φορές.

Ο υπολογισμός του βαθμού ανισιδίνης (Anisidine Value, AV) υπολογίστηκε από την εξίσωση (AOCS CD 18-90,1998)

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

Όπου A_1 και A_2 οι απορροφήσεις των γαλακτωμάτων που μετρήθηκαν και m η ποσότητα του γαλακτώματος (g).

Το διάλυμα p-Ανισιδίνης παρασκευάστηκε με την τοποθέτηση 0,25 g p-Ανισιδίνης σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και την συμπλήρωσή της με καθαρό οξικό οξύ μέχρι την χαραγή. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για 5 min με μαγνητικό αναδευτήρα. Η ογκομετρική φιάλη είχε καλυφθεί με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκε απουσία φωτός.

7.2.5 Εκτίμηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων

Για την μέτρηση της κατανομής του μεγέθους των λιποσφαιρίων των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή σκέδαση φωτός (Malven Mastersizer

2000, Malven Instruments Ltd, UK). Οι δείκτες διάθλασης του νερού και του ελαιολάδου πήραν τις τιμές 1.330 και 1.467 αντίστοιχα και για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η θεωρία του Mie. Η κατανομή του μεγέθους εκφράστηκε με την μέση διάμετρο εκφρασμένη σε επιφάνεια (D_{32}) και με την μέση διάμετρο εκφρασμένη σε όγκο (D_{43}) και την μέση διάμετρο D_{50} .

Τουλάχιστον δύο μετρήσεις έγιναν για το κάθε γαλάκτωμα την ημέρα που είχε παρασκευαστεί.

Όταν όλα τα λιποσφαίρια σε ένα γαλάκτωμα έχουν το ίδιο μέγεθος τότε στο γαλάκτωμα έχουμε το φαινόμενο της “μονοδιασποράς”, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μόνο αριθμός για να εκφράσει το μέγεθος των λιποσφαιρίων και αυτός είναι είτε της διαμέτρου είτε της ακτίνας των λιποσφαιρίων. Στο μεγαλύτερο εύρος της βιβλιογραφίας το μέγεθος των λιποσφαιρίων εκφράζεται με τη διάμετρο των λιποσφαιρίων.

Στην πράξη τα γαλακτώματα των τροφίμων περιέχουν λιποσφαίρια που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα μεγεθών και επομένως εμφανίζουν το φαινόμενο της “πολυδιασποράς”. (McClements, 2007).

Ωστόσο συνηθίζεται η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων να παρουσιάζεται με την μορφή ιστογραμμάτων ή σε ένα πίνακα όπου διαχωρίζεται η κατανομή σε μια σειρά κατηγοριών ανάλογα με το μέγεθος όπου γίνεται η καταγραφή των λιποσφαιρίων ανάλογα με το μέγεθος (McClements, 2005; Walstra, 2003). Κατά την κατασκευή ή την ερμηνεία μιας κατανομής μεγέθους σωματιδίων (particle size distribution-PSD) είναι σημαντικό να δώσουμε προσοχή στον τρόπο που εκφράζεται η συγκέντρωση και το μέγεθος των σωματιδίων. Η συγκέντρωση των σωματιδίων συνήθως παρουσιάζεται είτε ως επί τις εκατό ποσοστό έντασης (volume%) είτε ως αριθμητικό ποσοστό (number%) των λιποσφαιρίων σε μια συγκεκριμένη κλάση μεγέθους.

7.2.6 Εκτίμηση του ζ-δυναμικού

Οι μετρήσεις για το ζ-δυναμικό έγιναν με την χρήση δυναμικού αναλυτή σκέδασης φωτός (Zetasizer Nano ZS, Malven Instruments, Worcestershire, UK) στους 25°C. Καθώς το ζ-δυναμικό σχετίζεται με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων, το ζ-δυναμικό υπολογίζεται με βάση την ταχύτητα που μετράται χρησιμοποιώντας την εξίσωση Smoluchowski. Τα γαλακτώματα αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό πριν από κάθε μέτρηση μέχρι (?) / τα γαλακτώματα αραιώθηκαν (1:1000) με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (της συνεχής φάσης) με σκοπό να να αποφευχθούν οι επιδράσεις της πολλαπλής σκέδασης και να διευκολυνθούν οι μετρήσεις. Οι μετρήσεις για κάθε γαλάκτωμα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

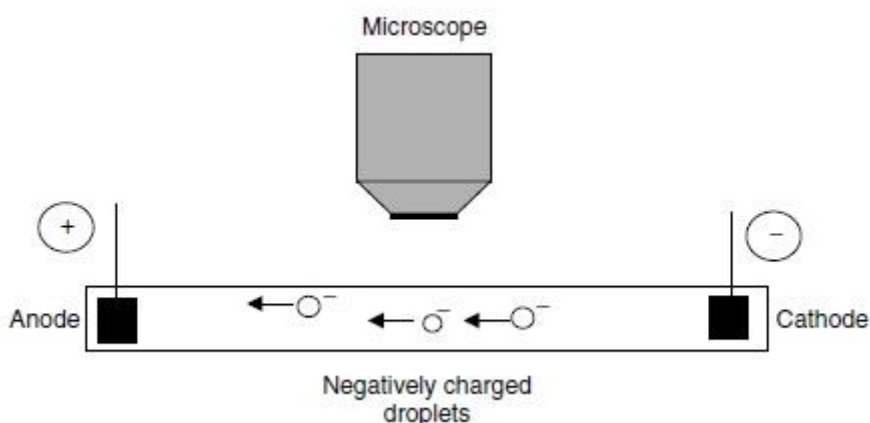
Τρόπος λειτουργίας

Στην τεχνική αυτή ένα δείγμα του γαλακτώματος που πρόκειται να αναλυθεί τοποθετείται σε μια κυψελίδα και ένα στατικό ηλεκτρικό πεδίο E εφαρμόζεται κατά μήκος αυτής μέσω ενός ζεύγους ηλεκτροδίων.

Αυτό προκαλεί οποιαδήποτε κάθε φορτισμένο λιποσφαίριο του γαλακτώματος να κινηθεί προς τον αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο (Hunter, 1986, 1993). Το πρόσημο του φορτίου των λιποσφαιρίων του γαλακτώματος προσδιορίζεται από την κατεύθυνση που θα κινούνται.

Όταν ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται κατά μήκος ενός γαλακτώματος τα λιποσφαίρια επιταχύνουν μέχρι να επιτύχουν μια σταθερή ταχύτητα (v), όπου η ηλεκτρική δύναμη έλξης εξισορροπείται από την δύναμη έλξης του ιξώδους που ασκείται από το περιβάλλον υγρό. Η ταχύτητα εξαρτάται από μέγεθος και το φορτίο των λιποσφαιρίων του γαλακτώματος και η μέτρησή της μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παρέχει πληροφορίες σχετικά με αυτές της παραμέτρους. . (McClements, 2007).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το μέγεθος του φορτίου των λιποσφαιρίων είναι σχετικά μικρό κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα το γαλάκτωμα να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην κροκίδωση καθώς οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των λιποσφαιρίων δεν είναι πλέον ισχυρές ώστε να ξεπεράσουν τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης Van Der Waals. Τέλος πρέπει να τονιστεί ότι πρέπει να υπάρχει ιδιαίτερη προσοχή όταν κάποιος χρησιμοποιεί της μετρήσεις ηλεκτροφόρησης των σωματιδίων για την εκτίμηση του ζ-δυναμικού των λιποσφαιρίων σε συμπυκνωμένο γαλάκτωμα. Η αραιώση του γαλακτώματος μπορεί να προκαλέσει μια σημαντική μεταβολή του ζ-δυναμικού των λιποσφαιρίων λόγω της αλλαγής του pH, της ιονικής δύναμης και της σύνθεσης του διαλύματος που περιβάλλει τα λιποσφαίρια. Για αυτό η αραιώση θα πρέπει να χρησιμοποιείται η συνεχής φάση του γαλακτώματος προκειμένου να μειωθούν οι αλλαγές στο φορτίο των λιποσφαιρίων (McClements, 2007).



Εικόνα14: Το παράδειγμα μιας κυψελίδας κινητικότητας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση του ζ δυναμικού των λιποσφαιρίων ενός γαλακτώματος. (McClements, 2007).

7.2.7 Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση υπό ψύξη

Η εκτίμηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C έγινε με την χρήση του αναλυτή κάθετης σάρωσης ή συσκευή πολλαπλής σκέδασης του φωτός Turbiscan MA,2000 (FormulAction, Toulouse, France). Τα δείγματα των γαλακτωμάτων (περίπου 6ml) μεταφέρθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και σφραγίστηκαν με πλαστικά καπάκια και τοποθετήθηκαν σε στατό και στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους 4°C σε ψυγείο (τον τύπο του ψυγείου). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν κάθε 24 ώρες για συνολικό χρόνο 20 ημερών.

Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων εκφράζεται ως ο δείκτης ορού ή δείκτης συναίρεσης (serum index, SI) ο οποίος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$SI\% = \frac{H_S}{H_E} * 100$$

Όπου H_s είναι το ύψος της στιβάδας ορού και H_e το συνολικό ύψος του γαλακτώματος εντός του γυάλινου σωλήνα. Όπου ένα χαμηλό ποσοστό SI αντιπροσωπεύει ένα σταθερό γαλάκτωμα.

Το ύψος του ορού H_s και το συνολικό ύψος του γαλακτώματος H_e υπολογίστηκαν με την χρήση ενός προγράμματος του TurbiSoft MA 2000 και των γραφημάτων Back Scattering.

Τρόπος λειτουργίας

Η συσκευή πολλαπλής σκέδασης του φωτός επιτρέπει τον οπτικό χαρακτηρισμό κάθε είδους αιωρήματα με τη βοήθεια μιας κινητής κεφαλής αναγνώρισης η οποία αποτελείται από μια δίοδο εκπομπής ακτινοβολίας στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου ($\lambda=850$ nm) και δύο σύγχρονους ανιχνευτές για την σκεδαζόμενη ακτινοβολία (backscattered) και την ακτινοβολία που διέρχεται μέσω του δείγματος (transmitted), με την βοήθεια λήψεων που γίνονται 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.

Η τοποθέτηση του δείγματος στο TURBISCAN γίνεται κάθε 24 ώρες και πρόγραμμα της συσκευής TURBISCAN επιτρέπει την λειτουργία σάρωσης (scanning mode) κατά την οποία η κεφαλή αναγνώρισης σαρώνει το δείγμα (κάθετα) και τα αποτελέσματα εμφανίζονται με την μορφή ιστογράμματος όπου παρουσιάζεται η σκεδαζόμενη και η διαχεόμενη ακτινοβολία συναρτήσει του ύψους του δείγματος. Όταν το δείγμα είναι θολό ή διαυγή αιώρημα τότε γίνεται χρήση των καμπυλών της διαχεόμενης ακτινοβολίας, ενώ αν το δείγμα είναι πυκνό χρησιμοποιούνται οι καμπύλες της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Όταν συγκεντρωθεί ο τελικός αριθμός των καμπυλών του δείγματος σένα γράφημα τότε προκύπτει το προφίλ σταθερότητας/αποσταθεροποίησης του δείγματος με την πάροδο του χρόνου.

Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σχετίζεται με τον αριθμό και το μέγεθος των λιποσφαιρίων των γαλακτωμάτων.

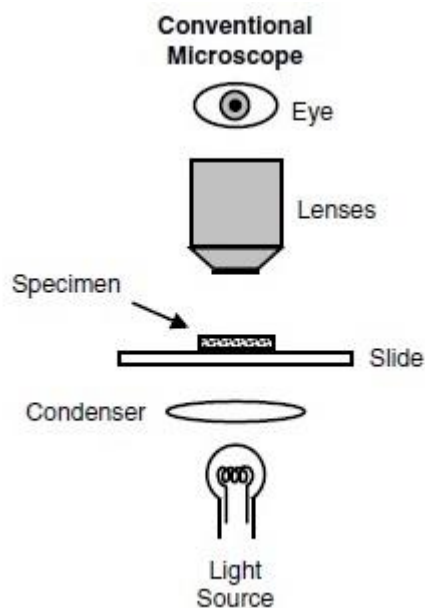
Στην φαινόμενο της αποκορύφωσης παρατηρείται αύξηση της ροής στο επάνω μέρος του δείγματος λόγω της αύξησης των σωματιδίων στο συγκεκριμένο σημείο και στο φαινόμενο της καθίζησης παρατηρείται αύξηση της ροής στον πυθμένα του δείγματος το οποίο υποδηλώνει αύξηση του αριθμού των λιποσφαιρίων στον πυθμένα. Η συσσωμάτωση και η κροκίδωση σαν φυσικοχημικά φαινόμενα διαφέρουν πάρα πολύ αλλά και τα δύο οδηγούν στην αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων. Η διακύμανση των σωματιδίων που προκαλείται από τα φαινόμενα της συνένωσης και της κροκίδωσης ανιχνεύονται εύκολα από το TURBISCAN, καθώς αυτά οδηγούν σε μια μείωση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε όλο το ύψος του δείγματος. Επίσης ένα γαλακτώμα μπορεί να παρουσιάσει παραπάνω από ένα φαινόμενο αστάθειας. Το Turbiscan μας επιτρέπει μια μακροσκοπική απεικόνιση της σταθερότητας των συμπυκνωμένων διασπορών καθιστώντας δυνατή την διάκριση διαφόρων μορφών αποσταθεροποίησης. Αν το προφίλ σκέδασης δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά μήκος του δείγματος με την πάροδο του χρόνου σημαίνει ότι δεν λαμβάνουν χώρα φαινόμενα αποσταθεροποίησης. (Προφίλ Σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (Back Scattering) περιέχονται στο παράρτημα)

7.2.8 Οπτικό μικροσκόπιο

Δείγματα από γαλακτώματα αμέσως μετά την παρασκευή τους τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες και παρατηρήθηκαν σε συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss, Axioscope, Germany) με τους φακούς μεγέθυνσης των x40 και x10. Στη συνέχεια λήφθηκαν αρκετές εικόνες από τυχαίες θέσεις του δείγματος έτσι ώστε να είναι αντιπροσωπευτικές για την συνολική εμφάνιση του δείγματος.

Παρόλο που το οπτικό μικροσκόπιο αναπτύχθηκε αιώνες πριν, εξακολουθεί να αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για την παρατήρηση τη μικροδομής των γαλακτωμάτων (Vaughan, 1979; Mikula, 1992; Hunter, 1986, 1993; Flint, 1994). Ένα οπτικό μικροσκόπιο περιέχει μια σειρά από φακούς οι οποίοι κατευθύνουν το φως μέσα από τα δείγματα και μεγεθύνουν την εικόνα που προκύπτει (εικόνα 11). Η ανάλυση ενός οπτικού μικροσκοπίου καθορίζεται από το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται και τον μηχανικό σχεδιασμό του μικροσκοπίου (Murphy, 2001).

Παρ' όλα αυτά, μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων σε γαλακτώματα τα οποία αποτελούνται από μεγαλύτερα λιποσφαίρια και συχνά χρησιμοποιείται για να γίνεται διάκριση μεταξύ συσσωμάτωσης και κροκίδωσης (Mikula, 1992), το οποίο ενίοτε είναι δύσκολο όταν γίνεται χρήση άλλων μεθόδων που βασίζονται είτε στην σκέδαση του φωτός, είτε στην φασματοσκοπία υπερήχων ή electrical pulse.



Εικόνα 15: Συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση της μικροδομής των γαλακτωμάτων ($d > 1 \mu\text{m}$) (McClements, 2007).

7.2.9 Ρεολογικά χαρακτηριστικά

Οι ρεολογικές μετρήσεις των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκαν με το ρεόμετρο ελεγχόμενης τάσης (Discovery HR-3, TA Instruments, New Castle, DE, USA) και με την χρήση γεωμετρίας ομόκεντρων κυλίνδρων. Το κενό ρυθμίστηκε στα 0,1 mm. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ με κυκλοφορία νερού από κυκλοφορητή σταθερής θερμοκρασίας. Για την επίτευξη θερμοδυναμικής ισορροπίας τοποθετήθηκε δείγμα 13,5 ml από το κάθε γαλάκτωμα στο ειδικό δοχείο μέτρησης και παρέμεινε ακίνητο για 5 min πριν αρχίσει η διαδικασία της ανάλυσης του δείγματος. Το φαινομενικό ιξώδες υπολογίστηκε σε σχέση με τον ρυθμό διάτμησης από $0,1 - 1000 \text{ s}^{-1}$. Η συνολική διάρκεια της μέτρησης ήταν 900s και για αυτήν την περίοδο δεν λαμβάνεται υπόψη η εξάτμιση του διαλύτη.

Οι μετρήσεις του ιξώδους έγιναν τρεις φορές για κάθε δείγμα και ολοκληρώθηκαν πριν δημιουργηθεί στο γαλάκτωμα κάποιο φαινόμενο αποσταθεροποίησης.

7.2.10 Απόδοση ενσωμάτωσης της EGCG (Incorporation Efficiency)

Η ποσότητα της κατεχίνης που εγκλωβίστηκε προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μεθόδους που περιγράφηκαν προηγουμένως από άλλους ερευνητές αλλά με μερική τροποποίηση (O'Regan & Mulvihill, 2010; Qi, Wang, & Zhu, 2011).

Η διαδικασία έχει διάρκεια 7 ημέρες από τις οποίες λήφθηκαν 5 μετρήσεις.

Αρχικά ποσότητα 3g από το γαλάκτωμα μεταφέρονται σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 3g ρυθμιστικού διαλύματος citrate 0,1M (pH=3.6). Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων με Vortex για 10sec και φυγοκέντρηση στα 4.000 rpm για 15 min. Το δείγμα έχει σχηματίσει 3 φάσεις οι οποίες είναι εμφανείς. Στη συνέχεια με την χρήση σύριγγας συλλέχτηκαν 2mL από την μεσαία στιβάδα και

μεταφέρθηκαν σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 6mL ρυθμιστικού διαλύματος citrate 0,1M. Ακολουθεί ανάμειξη του δείγματος με Vortex για 10sec και φυγοκέντρηση στα 4.000 rpm για 15 min. Στην συνέχεια με την χρήση καινούργιας σύριγγας συλλέχτηκαν 2mL από την μεσαία στιβάδα και μεταφέρθηκαν σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 6mL ρυθμιστικού διαλύματος citrate 0,1M και ακολούθησε ανάμειξη του δείγματος με Vortex (IKA Vortex, Genius 3) για 10sec και φυγοκέντρηση (Econospin, Sorvall Instrument) στα 4.000 rpm για 15 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση με φίλτρα (0,22 μ m) στο δείγμα, ώστε να απομακρυνθούν ίχνη ελαίου και πρωτεΐνης ώστε να έχει συλλεχτεί καθαρά υδατική φάση. Για την διήθηση χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές σύριγγες των 2,5mL και φίλτρα (0,22 μ m). Το διήθημα που προήλθε από το φιλτράρισμα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των φαιολικών (της EGCG). Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm σε φασματοφωτόμετρο με την χρήση κυψελίδων χαλαζία των 1,5mL και χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα (blank) ρυθμιστικό διάλυμα citrate 0,1M. Η παραπάνω διαδικασία έγινε τα γαλακτώματα που είχαν την σύνθεση 13,5g WPI (11%), 15g BC και 1,5g λάδι και προστέθηκαν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1, 0,2 και 0,5 mg/mL) EGCG και εστεροποιημένη EGCG στην υδατική αλλά και στην λιπαρή φάση. Άρα η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για συνολικά 12 γαλακτώματα και την επανάληψή τους.

8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – Αποτελέσματα.

8.1 Η επίδραση της WPI και της BC στην κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων

Όταν μια πρωτεΐνη (WPI) και ένας πολυσακχαρίτης (BC) αναμειγνύονται οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται πολύ από τις συγκεντρώσεις των πολυμερών στο μίγμα και το φορτίο τους, το οποίο είναι αποτέλεσμα εξωτερικών συνθηκών όπως είναι η ιοντική ισχύς και το pH του διαλύματος (Dickinson, 2011). Οι αλληλεπιδράσεις θα μπορούσαν να είναι διαχωριστικές αν τα πολυμερή απωθούνται μεταξύ τους λόγω ομοίων φορτίων ή ελκτικές αν θα είναι αντίθετα φορτισμένες. Τα παραπάνω μπορεί να οδηγήσουν σε διαχωρισμό ή συσχέτιση και σχηματισμό συμπλόκου το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διαχωρισμό φάσης ή σε σχηματισμό δικτύου (McClements, 2006).

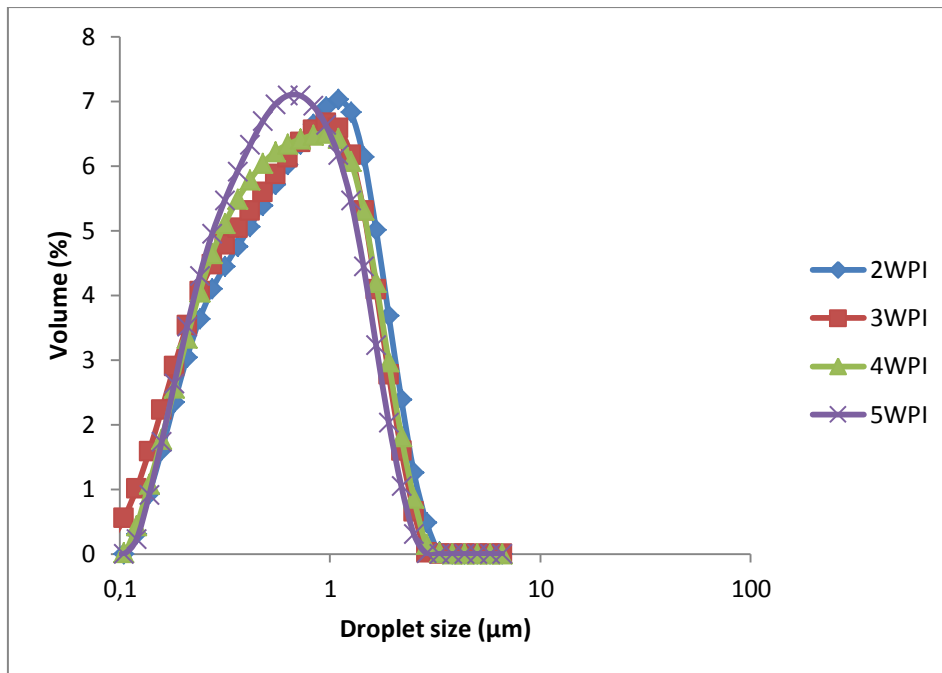
Το pH των γαλακτωμάτων είναι 3,8, το οποίο είναι μικρότερο από το ισοηλεκτρικό σημείο της WPI ($pI \sim 5.2$), παρέχοντας έτσι θετικό φορτίο στις πρωτεΐνες. Καθώς το ζ-δυναμικό κινείται από θετικό σε χαμηλότερο σημείο όταν αυξάνεται το pH, μηδενίζεται όταν το pH γίνει ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης και αρνητικό σε υψηλότερο pH (McClements, 2007) Στα γαλακτώματα το φορτίο των λιποσφαιρίων, που έχουν επικαλυφθεί με την WPI, μπορεί να μεταβληθεί από την προσρόφηση άλλων φορτισμένων ουσιών στην επιφάνειά του όπως πολυσακχαρίτες (BC) (McClements, 2007)

Η BC είναι αρνητικά φορτισμένη ανεξάρτητα από το pH, όπως και οι περισσότερες κυτταρίνες καθώς είναι πολυσακχαρίτες (Martinez-Sanz, et al., 2011).

Όταν προστίθεται αρνητικά φορτισμένη BC στα γαλακτώματα στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί ως γαλακτωματοποιητής η πρωτεΐνη (WPI), οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις θα οδηγήσουν σε σύνδεση των πρωτεϊνών με την BC. Όταν η BC είναι σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυτό οδηγεί στον σχηματισμό ενός δεύτερου στρώματος BC στην διεπιφάνεια των λιποσφαιρίων. Μόλις η επιφάνεια των λιποσφαιρίων κορεστεί, η περίσσεια της BC, στις υψηλές συγκεντρώσεις, θα παραμείνει στην υδατική φάση. Έτσι διαφορετικές συγκεντρώσεις της BC θα οδηγήσουν σε διαφορετικούς μηχανισμούς σταθεροποίησης.

Οι εκτιμήσεις για το μέγεθος των λιποσφαιρίων και για την πολυδιασπορά των λιποσφαιρίων για γαλακτώματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις BC και WPI μετρήθηκαν για να κατανοηθούν αυτοί οι μηχανισμοί.

Τα διαγράμματα (1A, 1B, 1Γ) παρουσιάζουν την κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων (volume averaged) των γαλακτωμάτων που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις BC (0% (A), 0,5% (B), 1% (Γ)) και WPI σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2%,3%,4%,5%).



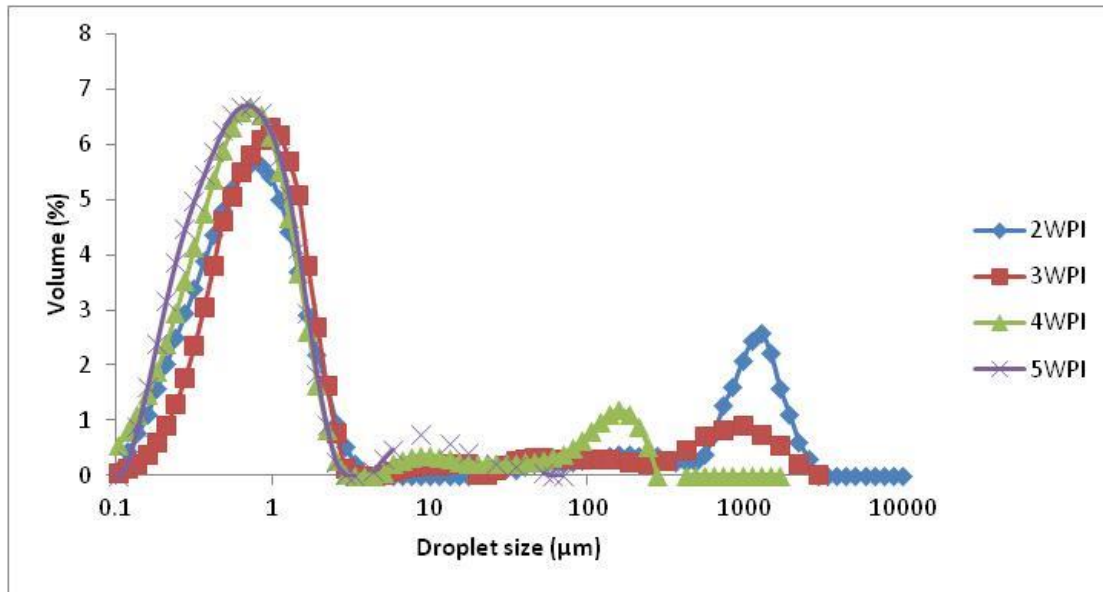
Διάγραμμα 1 A: Η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων για συγκέντρωση BC 0%

Στα γαλακτώματα όπου δεν υπήρχε προσθήκη της BC (Διάγραμμα 1A), η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων έχει μόνο μια κορυφή για όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της WPI (2,3,4 και 5%). Για όλες τις συγκεντρώσεις το μέσο μέγεθος των λιποσφαιρίων ήταν 600 nm. Μπορεί να ειπωθεί ότι WPI δεν επηρεάζει το μέγεθος των λιποσφαιρίων. Η μονοδιασπορά των λιποσφαιρίων μπορεί να επιβεβαιωθεί από το διάγραμμα (Διάγραμμα 1A) καθώς έχουμε μόνο μια κορυφή το οποίο αποτελεί δείγμα μονοδιασποράς (David J. McClements, 2005). Αυτό σημαίνει ότι ακόμα και η πιο χαμηλή συγκέντρωση της WPI (2%) είναι σε θέση να καλύψει την επιφάνεια των λιποσφαιρίων ενώ σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις, η περίσσεια της WPI παραμένει στην υδατική φάση.

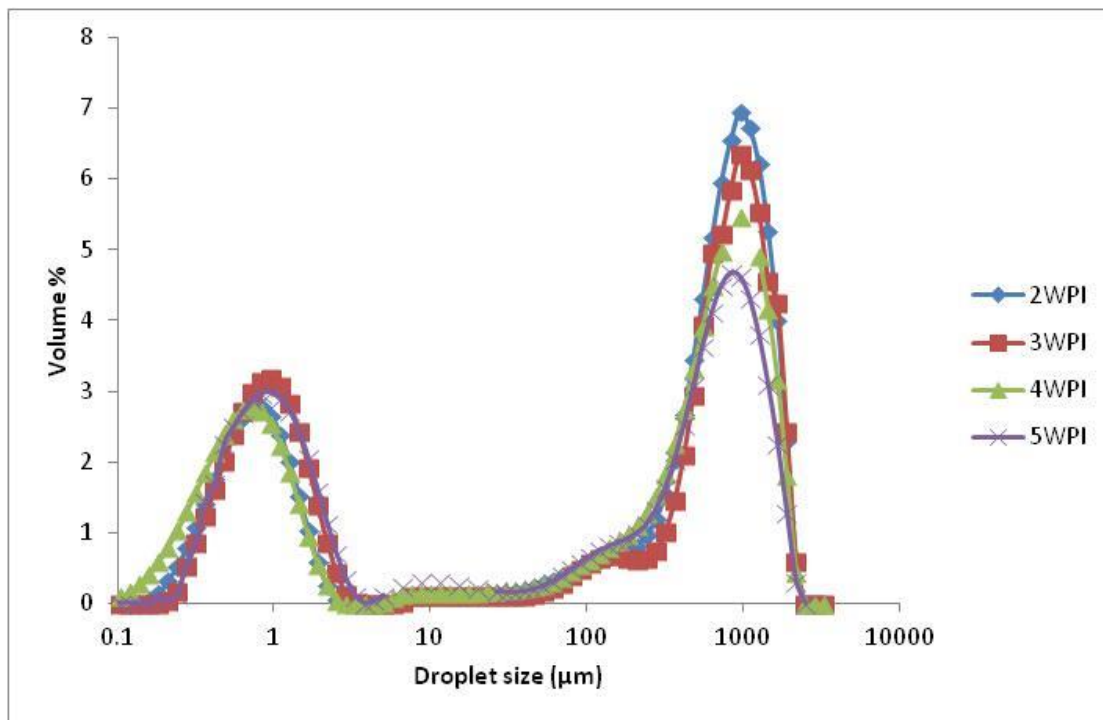
Με την προσθήκη της BC στα γαλακτώματα, μπορούν να διακριθούν δύο ορατές κορυφές στα διαγράμματα (Διάγραμμα 1B, 1Γ). Η πρώτη κορυφή αντιπροσωπεύει το μέγεθος των λιποσφαιρίων στα 600nm, όπως βρέθηκε και στα γαλακτώματα χωρίς την προσθήκη BC (Διάγραμμα 1A). Για όλες τις συγκεντρώσεις της BC (0,5% και 1%) μια δεύτερη κορυφή εμφανίζεται στα 1000 μm. Η δεύτερη κορυφή αποδεικνύει το φαινόμενο της πολυδιασποράς.

Γίνεται η υπόθεση ότι η δεύτερη κορυφή σχηματίζεται από τα συσσωματώματα των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης (BC) που παραμένουν στην υδατική φάση.

Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της BC στα γαλακτώματα (Διάγραμμα 1Γ), μεγαλώνει η δεύτερη κορυφή στα διαγράμματα κατανομής του μεγέθους των λιποσφαιρίων, γεγονός που αποδεικνύει ότι η BC είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση και την επικράτηση της δεύτερης κορυφής.



Διάγραμμα 1 Β: Η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων για συγκέντρωση BC 0,5%



Διάγραμμα 1 Γ: Η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων για συγκέντρωση BC 1%

Παρατηρώντας την κατανομή του μεγέθους του γαλακτώματος με την μικρότερη συγκέντρωση WPI (2%) στα διαγράμματα (1B,1Γ) παρατηρούμε ότι εμφανίζει τις μεγαλύτερες δευτερες-κορυφές σε σχέση με τις υπόλοιπες, ενώ αυξάνοντας την συγκέντρωση της WPI το μέγεθος της δεύτερης κορυφής μειώνεται.

Στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης 0,5% BC, η δεύτερη κορυφή κινείται σε μικρότερα μεγέθη, αποδεικνύοντας ότι τα συσσωματώματα της BC μειώθηκαν σε μέγεθος. Το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες έρευνες (Paximada et al., 2015; Oshima, Taguchi, Ohe, & Baba, 2011). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η BC

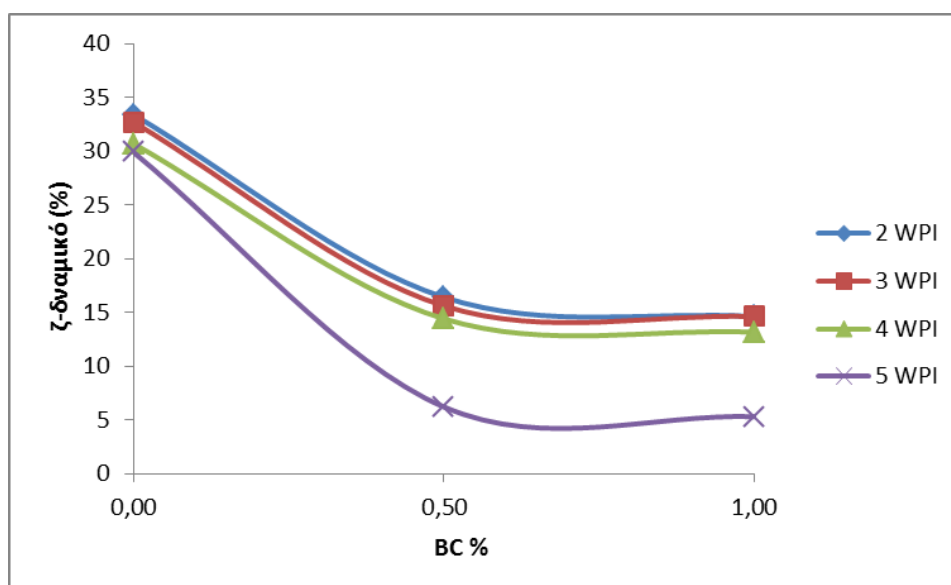
προσροφάτε από τα λιποσφαίρια που είναι επικαλυμμένα από την WPI (καθώς είναι αντίθετα φορτισμένα) και έτσι η BC μπορεί να βρίσκεται σε μικρή ποσότητα ή να απουσιάζει από την υδατική φάση όπου δημιουργούνται συσσωματώματα από τα ινίδια της.

Ο Oshima και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να αποτρέψουν τον σχηματισμό συσσωματωμάτων από την BC καθώς προσροφώνται από την επιφάνεια των ινών της BC καθώς η λεπτή δομή του δικτύου της BC είναι ικανή να συγκρατήσει μια μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών λόγω της μεγάλης έκτασης της επιφάνειας του (Oshima, et al., 2011; Ougiya, et al., 1998). Άρα μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών οδηγούν σε μικρότερο σχηματισμό συσσωματωμάτων από την BC.

Όταν η συγκέντρωση της WPI αυξάνεται από 2% σε 5% wt, το μέγεθος της δεύτερης κορυφής μειώνεται, αποδεικνύοντας ότι όντως σχηματίζονται λιγότερα συσσωματώματα των ινών της BC. Με την αύξηση της WPI δημιουργείται περίσσεια της WPI η οποία παραμένει στην υδατική φάση. Η παρουσία της WPI στην υδατική φάση του γαλακτώματος εμποδίζει την δημιουργία συσσωματωμάτων από τα ινίδια της BC, λόγω συμπλόκου που σχηματίζει η WPI με την BC, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ύψους της δεύτερης κορυφής.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν μπορεί να ειπωθεί ότι στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων επέρχεται κορεσμός με χαμηλά ποσοστά WPI (2%) και η περίσσεια της παραμένει στην υδατική φάση.

Για να διαμορφωθεί σαφέστερη εικόνα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της BC και της WPI και της θέσης της BC, μετρήθηκε στο ζ-δυναμικό των γαλακτωμάτων. Το ζ-δυναμικό αντιπροσωπεύει το φορτίο που φέρουν τα λιποσφαίρια των γαλακτωμάτων.



Διάγραμμα 2: Το ζ-δυναμικό των γαλακτωμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις BC

Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζεται το ζ-δυναμικό των γαλακτωμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BC. Όταν η BC απουσιάζει τα λιποσφαίρια των γαλακτωμάτων σταθεροποιούνται από την WPI και το συνολικό φορτίο των λιποσφαιρίων των γαλακτωμάτων είναι θετικό (29,90-33,40 mV) καθώς η WPI φέρει θετικό φορτίο σε $pH=3,8$.

Το ζ-δυναμικό συνήθως δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωση της WPI στο τελικό γαλάκτωμα, επιβεβαιώνοντας ότι ακόμα και η μικρότερη συγκέντρωση της WPI είναι επαρκής για να επέλθει κορεσμός στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων και η περίσσεια της WPI να παραμείνει στην υδατική φάση. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί από πολλούς ερευνητές (Camino, et al., 2012; Liu, et al., 2012; Long, et al., 2013, Paximada et al., 2015).

Όταν η αρνητικά φορτισμένη BC προστεθεί στα γαλακτώματα το ζ-δυναμικό παραμένει θετικό αλλά χαμηλότερο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε έχει εύρος μετρήσεων από 0,3 nm- 10 μm, γίνεται η υπόθεση ότι τα συσσωματώματα της BC δεν συμπεριλήφθησαν στα αποτελέσματα. Έτσι γίνεται η υπόθεση ότι μετρήθηκαν μόνο λιποσφαίρια.

Όταν οι συγκεντρώσεις του WPI είναι (2,3 και 4 %) η προσθήκη της BC οδηγεί σε πτώση του ζ-δυναμικού σε τιμές (16.40, 15.60 και 14.40 mV) αντίστοιχα ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της προστιθέμενης BC, ενώ για την περίπτωση όπου η συγκέντρωση της BC είναι 5% το ζ-δυναμικό έχει την μικρότερη τιμή καθώς η τιμή του είναι 6,20 mV. Η μείωση του φορτίου των λιποσφαιρίων υποδεικνύει την προσρόφηση των ινών της BC από την επιφάνεια των θετικά φορτισμένων λιποσφαιρίων που είναι επικαλυμμένα με WPI, λόγω της ηλεκτροστατικής έλξης.

Καθώς το φορτίο δεν μειώνεται ιδιαίτερα όταν η συγκέντρωση της BC αυξάνεται, μπορεί να επέλθει το συμπέρασμα ότι με την χαμηλότερη συγκέντρωση της BC (0,5% wt) μπορεί να επέλθει ο κορεσμός στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων που είναι επικαλυμμένα με WPI. Για την μεγάλη συγκέντρωση της BC (1% wt) τα ινίδια της BC που δεν προσροφήθηκαν παρέμειναν στην υδατική φάση του γαλακτώματος.

Παρατηρήθηκε ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της WPI οι τιμές του ζ-δυναμικού μειώνονται, με τις χαμηλότερες τιμές ζ-δυναμικού να αντιστοιχούν στην μεγαλύτερη συγκέντρωση WPI (5% wt). Αυτό υποδηλώνει είτε ότι υπάρχει περισσότερη BC γύρω από τα λιποσφαίρια ως δευτερεύον στρώμα λόγω της μεγαλύτερης κάλυψης της επιφάνειας των πρωτεϊνών ή ότι προσροφάται λιγότερη WPI στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων καθώς παραμένει στην υδατική φάση σαν σύμπλοκο με την BC. Δημιουργία πολλαπλών στρωμάτων γύρω από τα λιποσφαίρια με τη βοήθεια προσρόφησης έχει αποδειχθεί ότι συμβάλουν στην δημιουργία μικρότερων φορτίων γύρω από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων (Sun, et al., 2009; Tcholakova, Denkov, Sidzhakova, Ivanov, & Campbell, 2003).

Παρόμοια ευρήματα σχετικά με την ικανότητα των αρνητικά φορτισμένων πολυσακχαριτών που προσροφούνται πάνω σε θετικά φορτισμένα λιποσφαίρια υπό

την παρουσία πρωτεϊνών έχουν παρουσιαστεί και από πληθώρα ερευνητών στο παρελθόν (Camino, et al., 2011; Kaltsa, Paximada, Mandala, & Scholten, 2014; Sun, et al., 2007; Winuprasith & Suphantharika, 2013, 2015; Zinoviadou, Scholten, Moschakis, & Biliaderis, 2012, Paximada et al., 2015).

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω μπορεί να εξέλθει το συμπέρασμα ότι τα γαλακτώματα έχουν θετικό φορτίο το οποίο είναι ικανό να αποτρέψει την συσσωμάτωση. Αυτό αποδεικνύει ότι η δεύτερη κορυφή στα διαγράμματα 1B, 1Γ οφείλεται σε συσσωματώματα των ινιδίων της BC και όχι σε συσσωμάτωση λιποσφαιρίων. Για χαμηλές συγκεντρώσεις BC, ένα δεύτερο στρώμα BC σχηματίζεται γύρω από τα λιποσφαίρια, ενώ για περίσσεια BC και WPI σύμπλοκα σχηματίζονται στην υδατική φάση.

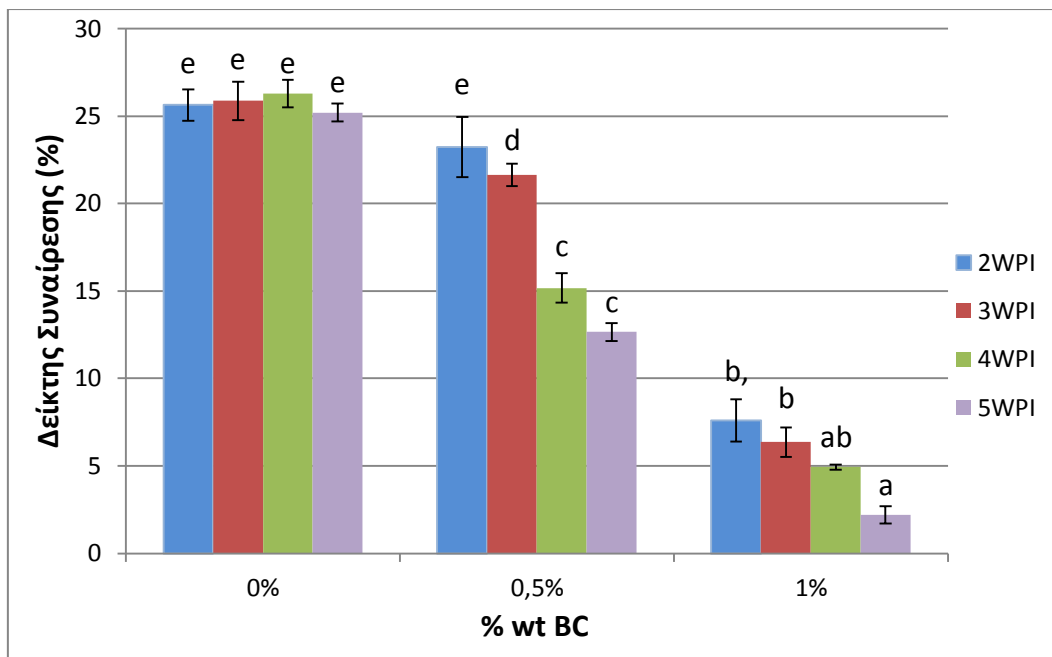
8.2 Επίδραση της συγκέντρωσης της WPI και της BC στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση

Ο όρος “σταθερότητα γαλακτώματος” αναφέρεται στην ικανότητα ενός γαλακτώματος να αντιστέκεται στις αλλαγές των ιδιοτήτων του κατά το πέρασμα του χρόνου. Ένα γαλάκτωμα μπορεί να καταστεί ασταθής από μια σειρά αλλαγών που μπορεί να οφείλονται σε φυσικές και χημικές διεργασίες. Αστάθεια λόγω μιας φυσικής διεργασίας οδηγεί σε μεταβολή της χωροταξικής κατανομής ή της δομικής οργάνωσης των μορίων. Παραδείγματα φυσικής αστάθειας είναι η κροκίδωση, η κορύφωση, η συνένωση, μερική συνένωση, αναστροφή φάσεων και η ωρίμανση κατά Ostwald (Dickinson and Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Walstra, 1996a, 2003a).

Γενικά, τα λιποσφαίρια σε ένα γαλάκτωμα ελαίου/νερό έχουν διαφορετική πυκνότητα από εκείνη του υγρού που τα περιβάλλει και μια καθαρά βαρυτική δύναμη δρα προς αυτά. (Dickinson and Stainsby, 1982; Hunter, 1989; Dickinson, 1992; Walstra, 1996a,b; Robins and Hibberd, 1998; Robins, 2000). Στα γαλακτώματα ελαίου σε νερό, η πυκνότητα των λιποσφαιρίων είναι μικρότερη από την υδατική φάση με αποτέλεσμα να δημιουργείται το φαινόμενο της αποκορύφωσης.

Ο ρυθμός με τον οποίο ένα γαλάκτωμα διασπάται και ο μηχανισμός με τον οποίο αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα, εξαρτάται από την σύνθεση και την μικροδομή του, καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθεται κατά την διάρκεια της ζωής του, όπως οι μεταβολές της θερμοκρασίας και οι συνθήκες αποθήκευσης

Η αξιολόγηση της σταθερότητας κατά την αποθήκευση των γαλακτωμάτων αποτελεί σημαντικό εργαλείο ώστε να γίνει κατανοητός ο τρόπος συμπεριφοράς των γαλακτωμάτων κατά την πάροδο του χρόνου. Για αυτό το λόγο καθορίστηκε ο δείκτης συναίρεσης (SI%) για τα γαλακτώματα μετά από 10 ημέρες αποθήκευσής τους στους 4°C.



Διάγραμμα 3 : Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση για 14 ημέρες

Σύμφωνα με τον νόμο του Stokes η αύξηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων εξαρτάται από το μέγεθος των λιποσφαιρίων, την διαφορά της πυκνότητας της συνεχής και διεσπαρμένης φάσης και το ιξώδες του γαλακτώματος.

Ο ρυθμός αποκορύφωσης ενός γαλακτώματος μειώνεται με την αύξηση του ιξώδους. Οι ερευνητές έχουν αναφέρει ότι σε μια συγκεκριμένη κρίσιμη τιμή ιξώδους του γαλακτώματος το φαινόμενο της αποκορύφωσης θα ήταν δυνατόν να επιβραδύνεται, καθώς τα λιποσφαίρια χάνουν την κινητικότητά τους και παραμένουν χωριστά το ένα από το άλλο (McClements, 2005).

Η χρήση σταθεροποιητών στο γαλάκτωμα όπως η BC, μπορούν να αυξήσουν την διάρκεια ζωής του γαλακτώματος, αυξάνοντας το ιξώδες

Χωρίς την προσθήκη της BC, τα γαλακτώματα έχουν υψηλό Serum Index ο οποίος κυμαίνεται από 26,28-24,2%. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με τα αποτελέσματα από το ζ-δυναμικό και της κατανομής του μεγέθους των λιποσφαιρίων, στα οποία δείχνει ότι κάθε προσθήκη της WPI μεγαλύτερη του 2% δεν έχει μεγάλη επίδραση στο γαλάκτωμα.

Η προσθήκη της BC στα γαλακτώματα έχει επίδραση στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων. Για την συγκέντρωση της BC 0,5% wt ο δείκτης αποσταθεροποίησης κυμαίνεται ακόμα σε υψηλές τιμές (23,2-12,65%). Αυτό είναι αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των λιποσφαιρίων του γαλακτώματος που έχει ως αποτέλεσμα την αποκορύφωση. Η συσσωμάτωση των λιποσφαιρίων οφείλεται στην κροκύδωση υπό γεφύρωση η οποία δημιουργείται από τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της BC και της WPI που καλύπτουν τα λιποσφαίρια του γαλακτώματος. Αυτό το φαινόμενο λαμβάνει χώρα όταν οι πολυσακχαρίτες προσροφώνται από την επιφάνεια του στρώματος της πρωτεΐνης η οποία περιβάλλει τα λιποσφαίρια και αλληλοσυνδέεται με δύο ή περισσότερα λιποσφαίρια (David J. McClements, 2005), γεγονός το οποίο

συμβαίνει συνήθως την περίπτωση όπου υπάρχει χαμηλή συγκέντρωση πολυσακχαριτών.

Στην περίπτωση όπου η προσθήκη της BC είναι 1% παρατηρήθηκε ότι οδηγεί σε σημαντική μείωση του δείκτη συναίρεσης, ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ (7-2%), υποδεικνύοντας αύξηση στην σταθερότητα του γαλακτώματος. Η αύξηση της σταθερότητας είναι αποτέλεσμα της αυξανόμενης προσρόφησης της BC από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων που οδηγεί στην πλήρη κάλυψη τους από την BC. Το επιπλέον στρώμα BC γύρω από τα λιποσφαίρια αποτρέπει τον σχηματισμό κροκυδώσεων υπό γεφύρωση.

Η αύξηση του ιξώδους της υδατικής φάσης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της BC. Η αυξημένη ποσότητα των ινών της BC μπορεί να δημιουργήσει ένα τρισδιάστατο ιξωδοελαστικό πλέγμα το οποίο εμποδίζει την συνένωση των λιποσφαιρίων (Kalashnikova, Bizot, Cathala, & Carron, 2011; Paximada, et al., 2014). Η αύξηση του ιξώδους της υδατικής φάσης συμβάλει στην σταθερότητα του γαλακτώματος.

Το πιο σταθερό είναι το γαλάκτωμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση WPI (5%) και BC (1%) καθώς είναι αυτό που έχει το μικρότερο δείκτη διαχωρισμού (Serum Index%= 2%). Η αυξημένη συγκέντρωση της WPI σε συνεργασία με την BC αυξάνει την σταθερότητα του γαλακτώματος. Η περίσσεια της WPI που δεν προσροφάται από τα λιποσφαίρια παραμένει στην υδατική φάση και δημιουργεί σύμπλοκα με την περίσσεια της BC, αυτά τα σύμπλοκα δημιουργούν ένα δίκτυο το οποίο προλαμβάνει την συνένωση μεταξύ των λιποσφαιρίων. Επίσης όπως αναφέρθηκε και στην κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων η WPI αποτρέπει την συσσωμάτωση των ινών της BC. Τα ξεχωριστά ινίδια της BC παρέχουν μεγαλύτερη προστασία στο γαλάκτωμα.

Επομένως η αυξημένη σταθερότητα των γαλακτωμάτων είναι αποτέλεσμα του πρόσθετου δικτύου BC που σχηματίστηκε στην υδατική φάση και του αυξημένου ιξώδους των γαλακτωμάτων

Τα αποτελέσματα του δείκτη συναίρεσης (SI%) συνάδουν με τις φωτογραφίες των αντιστοιχών γαλακτωμάτων που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο και τα διαγράμματα σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

Στο μικροσκόπιο παρατηρήθηκε ότι για τα γαλακτώματα με απουσία BC (0%) παρουσιάζουν τα φαινόμενα της κροκίδωσης και την συνένωσης (Εικόνα 3.1 βλ. Παράρτημα). Για την συγκέντρωση της BC 0,5% κβ το φαινόμενο της κροκίδωσης είναι λιγότερο εμφανή και για τα γαλακτώματα με 1% κβ BC τα φαινόμενα της κροκίδωσης και της συνένωσης έχουν επαλειφθεί πλήρως (Εικόνα 10.3).

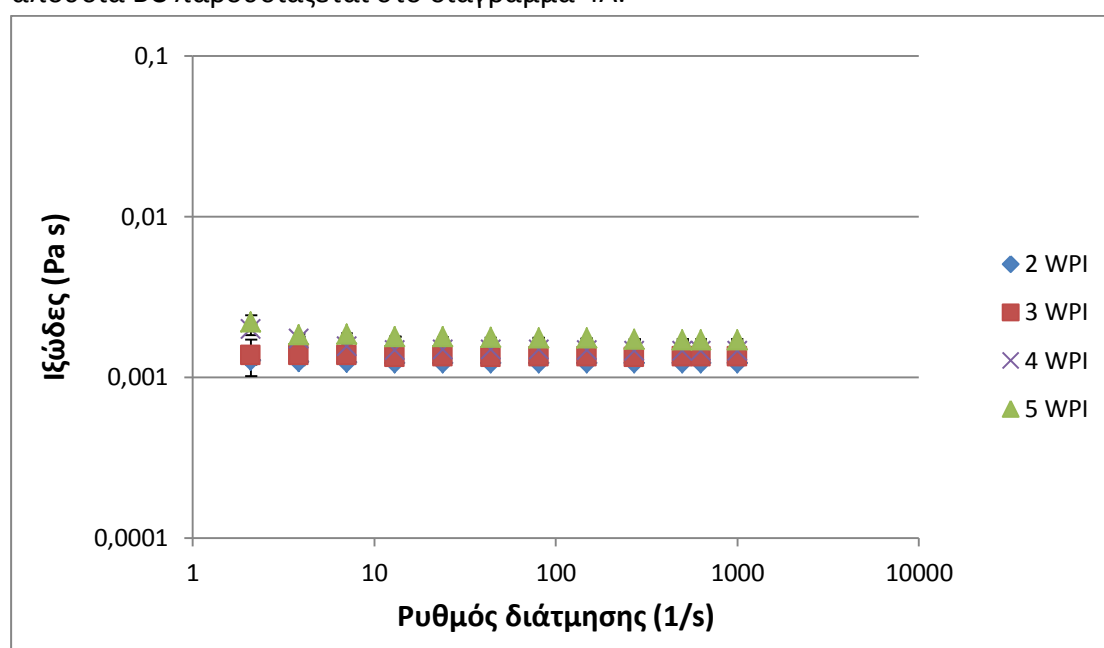
Στην απουσία της BC, το φαινόμενο της αποκορύφωση που είναι αποτέλεσμα της διαφοράς της πυκνότητας μεταξύ των λιποσφαιρίων και της υδατικής φάσης μπορεί να διακριθεί στις φωτογραφίες των γαλακτωμάτων (Παράρτημα 10.3). Επίσης ο διαχωρισμός φάσεων των γαλακτωμάτων είναι ορατός και από τα διαγράμματα Back Scattering της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (Παράρτημα 10.1).

Συμπερασματικά παρατηρήθηκε ότι στα γαλακτώματα όπου δεν υπήρχε προσθήκη BC η σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση ήταν ανεξάρτητη της συγκέντρωσης της WPI και ήταν παρόμοια για όλες τις περιπτώσεις. Η προσθήκη της BC μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων. Το πιο σταθερό γαλάκτωμα με το μικρότερο Serum Index (2%) είναι το γαλάκτωμα με την σύνθεση 1% BC και 5% WPI.

8.3 Μέτρηση του ιξώδους και της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς.

Ο πρωταρχικός ρόλος της χρήσης των σταθεροποιητών στα γαλακτώματα ο/w είναι η αύξηση του ιξώδους της υδατικής φάσης, η τροποποίηση της υφής και η μείωση του ρυθμού κορύφωσης (Williams & Phillips, 2003)

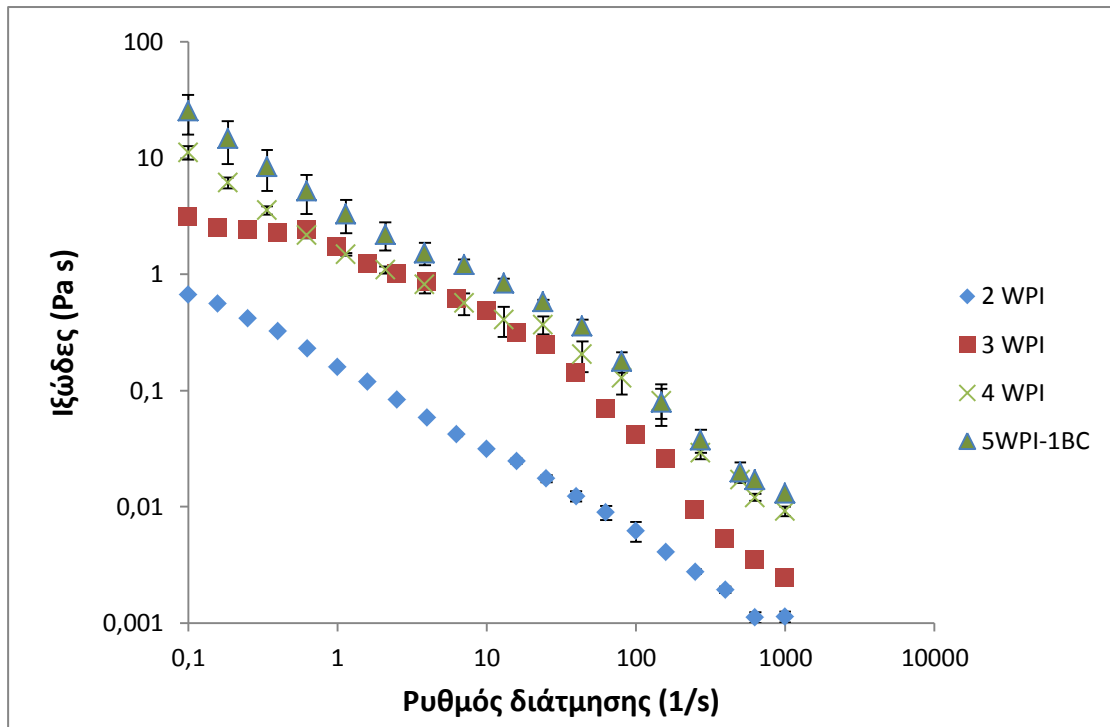
Το ιξώδες των γαλακτωμάτων συναρτήσε των διαφόρων συγκεντρώσεων της WPI απουσία BC παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4A.



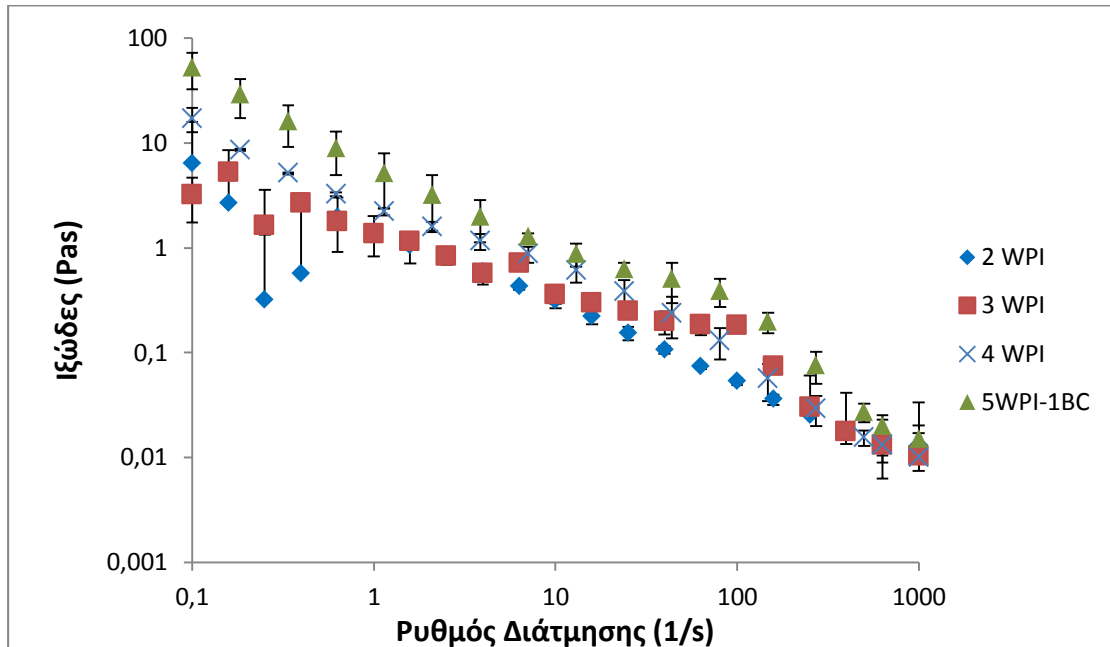
Διάγραμμα 4A: Οι καμπύλες του ιξώδους των γαλακτωμάτων με απουσία BC και με διαφορετικές συγκεντρώσεις WPI (2%, 3%,4%,5%).

Με την απουσία της BC όλα τα γαλακτώματα, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της WPI, συμπεριφέρονται ως Νευτώνεια καθώς το ιξώδες τους είναι ανεξάρτητο από την ταχύτητα διάτμησης. Η Νευτώνεια συμπεριφορά είναι τυπική για τα γαλακτώματα με μικρή περιεκτικότητα σε έλαιο και για γαλακτώματα όπου τα λιποσφαίρια δεν έχουν υποστεί συνένωση, καθώς έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Panaras, et al., 2011; Zinoviadou, et al., 2012). (Διάγραμμα 4A)

Για τα γαλακτώματα που περιέχουν BC, (Διάγραμμα 4B, 4Γ) το ιξώδες τους αυξάνεται σημαντικά από 0,002 Pas (0% BC) σε 100 Pas (1% BC). Τα γαλακτώματα παρουσιάζουν μια συμπεριφορά ψευδοπλαστικού, όπως και τα περισσότερα γαλακτώματα που περιέχουν πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. (Hayati, Y.B.C., C.P., & I, 2009; Mandala, Savvas, & Kostaropoulos, 2004; Perrechil & Cunha, 2012).



Διάγραμμα 4 Β: Οι καμπύλες του ιξώδους των γαλακτωμάτων με 0,5% wt BC και με διαφορετικές συγκεντρώσεις WPI (2.3.4 & 5%).



Διάγραμμα 4 Γ: Οι καμπύλες του ιξώδους των γαλακτωμάτων με 1% wt BC και με διαφορετικές συγκεντρώσεις WPI (2,3,4 & 5%).

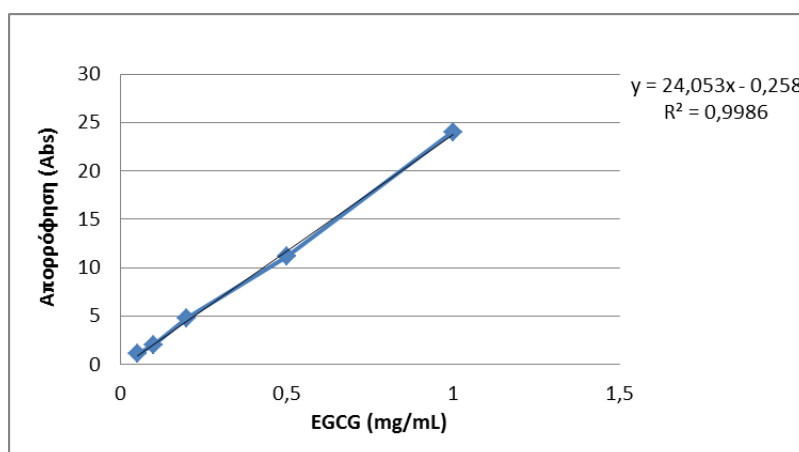
8.4 Απόδοση της ενσωμάτωσης της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG.

8.4.1 Δημιουργία καμπύλης της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG.

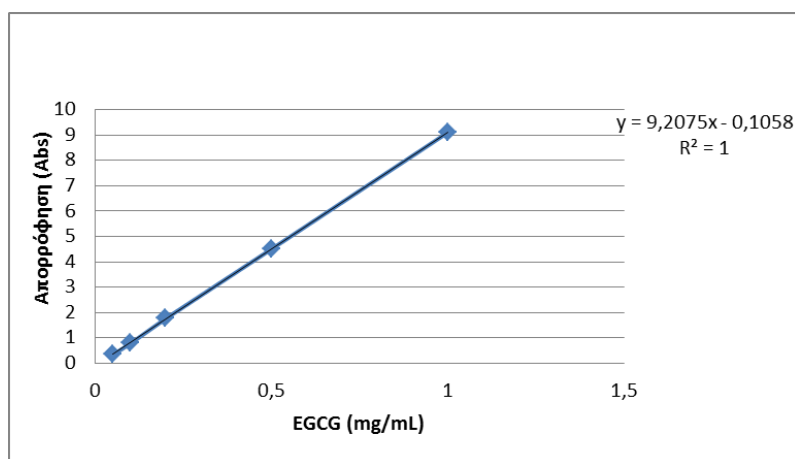
Αρχικά δημιουργήθηκαν 5 διαφορετικά γαλακτώματα των 20mL (13,5g WPI (11%), 15g BC και 1,5g λάδι) με 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις EGCG (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1 mg/mL) EGCG οι οποίες προστέθηκαν στην υδατική φάση και ακόμα 5 γαλακτώματα των 20mL (13,5g WPI (11%), 15g BC και 1,5g λάδι) με 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις εστεροποιημένης EGCG (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1 mg/mL) οι οποίες προστέθηκαν στην λιπαρή φάση.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία για κάθε δείγμα και μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 280nm με 2 δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

Τα αποτελέσματα από το κάθε δείγμα επεξεργάστηκαν στο excel και δημιουργήθηκαν οι καμπύλες από τις οποίες προήλθαν οι εξισώσεις της ευθείας για την EGCG και την εστεροποιημένη EGCG, όπου y =απορρόφηση (Abs) και x = EGCG (mg/mL).



Διάγραμμα 5α: Η καμπύλη της EGCG.



Διάγραμμα 5β : Η καμπύλη της εστεροποιημένης EGCG

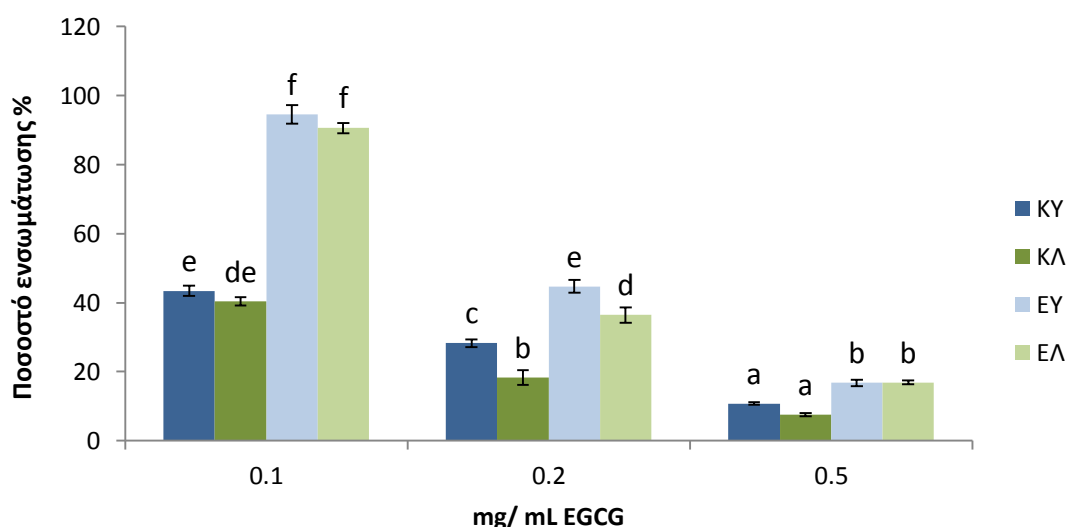
Incorporation Efficiency (%) υπολογίστηκε για την EGCG από την εξίσωση (α) και για την εστεροποιημένη EGCG από την εξίσωση (β)

$$IE (\%) = \frac{0.258 + Abs}{24.05} * 100 \quad (\alpha)$$

$$IE (\%) = \frac{0.105 + Abs}{9.207} * 100 \quad (\beta)$$

8.4.2 Απόδοση της ενσωμάτωσης (Incorporation Efficiency)

Υψηλό ποσοστό ενσωμάτωσης παρατηρήθηκε για την εστεροποιημένη EGCG και την EGCG στην μικρότερο ποσοστό συγκέντρωσης (0,1mg/mL) (Διάγραμμα 6). Το ποσοστό ενσωμάτωσης (IE%) για την εστεροποιημένη EGCG στην υδατική φάση ήταν 94,5%±1,2%, και για την εστεροποιημένη EGCG στην λιπαρή φάση ήταν 90,5%±1,5%. Για την EGCG το ποσοστό για την ενσωμάτωση στην υδατική φάση ήταν 43,4%±1,5%. και για την λιπαρή φάση ήταν 40,3%±2,7%. Τα χαμηλότερα ποσοστά ενσωμάτωσης και για τις δύο μορφές της EGCG παρατηρήθηκαν όταν προστέθηκε στα γαλακτώματα η υψηλότερη συγκέντρωση (0,5 mg/mL) EGCG/εστεροποιημένης EGCG. Καθώς το ποσοστό ενσωμάτωσης για την EGCG στην υδατική φάση και την λιπαρή φάση ήταν 10,8%±0,4%. και 7,6%±0,9% αντίστοιχα, ενώ για την εστεροποιημένη το ποσοστό ήταν ψηλότερο καθώς ήταν 16,79%±0,5% και 16,9%±0,6% για την υδατική και την λιπαρή φάση αντίστοιχα.



Διάγραμμα 6: Το ποσοστό απορρόφησης της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG με βάση της διαφορετικές συγκεντρώσεις της EGCG (KY= EGCG στην υδατική φάση, KA=EGCG στην λιπαρή φάση, EY= εστεροποιημένη EGCG στην υδατική φάση, EA= εστεροποιημένη EGCG στην λιπαρή φάση)

Παρατηρήθηκε ότι η εστεροποιημένη EGCG δίνει υψηλότερα ποσοστά ενσωμάτωσης σε σχέση με την EGCG. Η EGCG έχει υδρόφιλο χαρακτήρα σε αντίθεση με την εστεροποιημένη EGCG που έχει υδρόφοβο χαρακτήρα.

Για να περιγράψει την συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών στα γαλακτώματα ο Porter (1993) εξέφρασε το «παράδοξο των αντιοξειδωτικών» το οποίο υποστηρίζει

ότι στα έλαια τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά από τα λιπόφιλα, ενώ στα γαλακτώματα το τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά. Η αναφορά στο παράδοξο των αντιοξειδωτικών μπορεί να δικαιολογήσει το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης της εστεροποιημένης EGCG.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της EGCG/εστεροποιημένης EGCG μειώνεται το ποσοστό ενσωμάτωσης στο γαλάκτωμα. Παρατηρήθηκε ότι στην μικρότερη συγκέντρωση 0,1 mg/mL, αντιστοιχούν τα μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης και για τους δύο τύπους EGCG.

Στα γαλακτώματα ελαίου/νερό στα οποία ενσωματώθηκαν οι δύο τύποι της EGCG έχει χρησιμοποιηθεί ως γαλακτωματοποιητής ο υπερσυμπυκνωμένος ορός πρωτεΐνης (WPI) και ως σταθεροποιητής η βακτηριακή κυτταρίνη (BC). Ο συνδυασμός πρωτεΐνης και πολυσακχαριτών είναι μια τεχνική η οποία βασίζεται στην δημιουργία στιβάδα-σε-στιβάδα αντίθετα φορτισμένων επιφανειών λόγω των ηλεκτροστατικών έλξεων, όπου έχει ως αποτέλεσμα λιποσφαίρια επικαλυμμένα με πολλαπλή διεπιφανειακή μεμβράνη.

Η WPI ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιείται ευρέως σε γαλακτώματα του τύπου ελαίου-νερό με στόχο την διακίνηση λιπόφιλων ενώσεων (McClements, Decker, Park, & Weiss, 2009). Από έρευνες είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού, όπως η EGCG αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες (Salvi A., Carrupt P., Tillement J. & Testa B., 2001.; Arts M. J., Haenen G. R., Wilms L. C., Beetstra S. A., Heijnen C. G. & Voss, H. P., 2002).

Οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν έντονα με τις πολυφαινόλες μέσω δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Oda Y. Et al, 1998; Carvalho, Rónoas, Mateus, & De Freitas, 2006; Diniz et al., 2008; Hagerman, Rice, & Ritchard, 1998) και για αρκετά φαινορικά αντιοξειδωτικά έχει βρεθεί ότι συνδέονται με πρωτεΐνες γάλακτος (Wang W. & Goodman M., 1999). Η EGCG έχει μεγαλύτερη τάση να σχηματίζει σύμπλοκα με πρωτεΐνες γάλακτος λόγω του μεγάλου της μοριακού βάρους (OzdaI, Capanoglu, & Altay, 2013).

Οι πολυφαινόλες με τις πρωτεΐνες μπορούν αλληλεπιδρούν είτε αναστρέψιμα είτε ανεπανόρθωτα. Στις αναστρέψιμες αλληλεπιδράσεις εμπλέκονται μη-ομοιοπολικές δυνάμεις όπως δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις Van der Waals, υπάρχουν μελέτες που αφορούν τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κατεχινών του πράσινου τσαγιού και των πρωτεϊνών του γάλακτος (Yang, Liu, Xu, Yuan, & Gao, 2014; Zorilla, Liang, Remondetto, & Subirade, 2011), ενώ στις μη αναστρέψιμες σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των πολυφαινολών και των πρωτεϊνών ωστόσο λίγα είναι γνωστά για τις ομοιοπολικές αντιδράσεις μεταξύ τις EGCG και των πρωτεϊνών του γάλακτος. (Wang X. et al, 2014).

Έτσι γίνεται η υπόθεση ότι η EGCG μπορεί να αντιδράσει με την β-λακτογλοβουλίνη, ώστε αν η συγκέντρωση της EGCG ξεπεράσει το 0,1%, το έλαιο δεν μπορεί να καλύψει όλη την ποσότητα της EGCG με αποτέλεσμα ένα μέρος της EGCG να διαρρεύσει στην υδατική φάση και να αλληλεπιδράσουν με την β-λακτογλοβουλίνη.

Παρόμοια ευρήματα δόθηκαν και από την έρευνα των Almajano et al. (Almajano et al., 2007) όπου αν η συγκέντρωση της EGCG >1% δημιουργεί σύμπλοκα με την β-λακτογλοβουλίνη. Επίσης οι Charlton et al, 2002 (Charlton et al, 2002) έδειξαν ότι μια επαρκής επικάλυψη της επιφάνειας της πρωτεΐνης με μόρια πολυφαινόλης απαιτείται για να ωθήσει την συσσωμάτωση των μορίων της πρωτεΐνης που οδηγούν στην καθίζηση των συμπλοκών πολυφαινόλης-πρωτεΐνης.

Επιπλέον μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα των πολυσακχαριτών να συνδέονται με πολυφαινόλες και να προλαμβάνουν ή να μειώνουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πολυφαινολών (Le Bournellec & Renard, 2012; Luck et al., 1994; Ozawa, Lilley, & Haslam, 1987; Taira, Ono, & Matsumoto, 1997). Όμως η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη σχετικά με τον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των πολυφαινολών και του συμπλόκου πρωτεΐνης –πολυσακχαριτών. Γίνεται η υπόθεση ότι τα συσσωματώματα των πολυσακχαριτών και της πρωτεΐνης μπορούν να συνδεθούν με τις πολυφαινόλες και να αποτραπεί η καθίζηση της πρωτεΐνης (Thongkaew C., et al.,2014)

Επίσης παρ όλο που η EGCG είναι κυρίως διαλυτή στο νερό έχει υδρόφιλο χαρακτήρα η μικρή συγκέντρωση της EGCG (0,1 mg/mL) μπορεί να ενθυλακωθεί σε γαλακτώματα ελαίου/νερό.

Πληθώρα μελετών έχουν αναφερθεί στις παραμέτρους που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών-πολυφαινολών, όπως η αναλογία ανάμειξης πολυφαινολών και πρωτεΐνης (Erel-Unal & Sukhishvili, 2008; Poncet- Legrand et al., 2006) και ο τύπος και η συγκέντρωση των πολυφαινολών που προστέθηκαν στο γαλάκτωμα. (Baxter, Lilley, Haslam, &Williamson, 1997; Naczki, Grant, Zadernowski, & Barre, 2006; Poncet-Legrand et al., 2006),

Στην έρευνα των Ru Q. (2010) και των συνεργατών του παρατηρήθηκε ότι αν χρησιμοποιούνται γαλακτώματα της μορφής ελαίου/νερό είναι αδύνατο να γίνει άμεση ενθυλάκωση της EGCG χρησιμοποιώντας μόνο β- λακτογλοβουλίνη καθώς η EGCG θα προκαλέσει συσσωμάτωση των μορίων της β- λακτογλοβουλίνης, για αυτό γίνεται η χρήση ελαίου ώστε να προστατευτεί η EGCG.(Ru Q., Yu H. and Huang Q., 2010).

Τέλος μπορεί να γίνει υπόθεση για μια κριτική τιμή συγκέντρωσης της EGCG και της εστεροποιημένης EGCG στα 0,1mg/mL η οποία μπορεί να ενθυλακωθεί με επιτυχία σε ένα γαλάκτωμα ελαίου/νερό στο οποίο υπάρχει προσθήκη WPI. Σε αυτή την υπόθεση έχουν προχωρήσει και άλλοι ερευνητές (Zhong & Shahidi, 2011). Τα ευρήματα της έρευνας ενισχύουν την υπόθεση του «πολικού παράδοξου».

Συμπερασματικά οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης και των κατεχινών είναι περίπλοκο φαινόμενο και θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

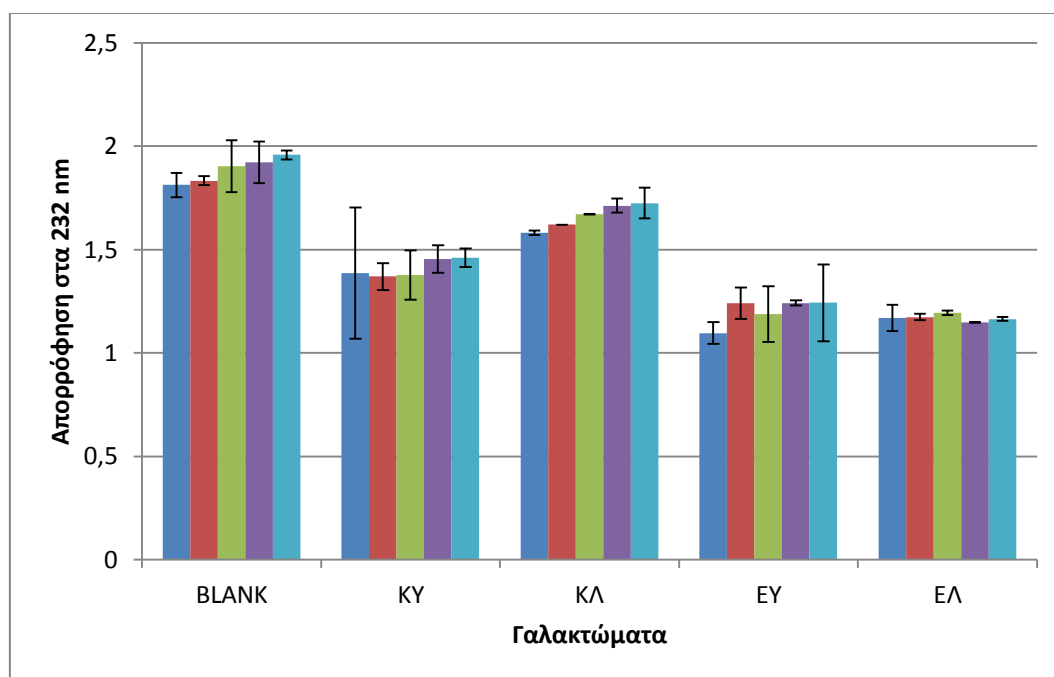
8.5 Προσδιορισμός Προϊόντων Οξειδωσης

Η EGCG θεωρείται η πιο σημαντική κατεχίνη καθώς έχει την μεγαλύτερη ικανότητα σάρωσης ελεύθερων ριζών και παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της καρκινογένεσης, έτσι η EGCG αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό

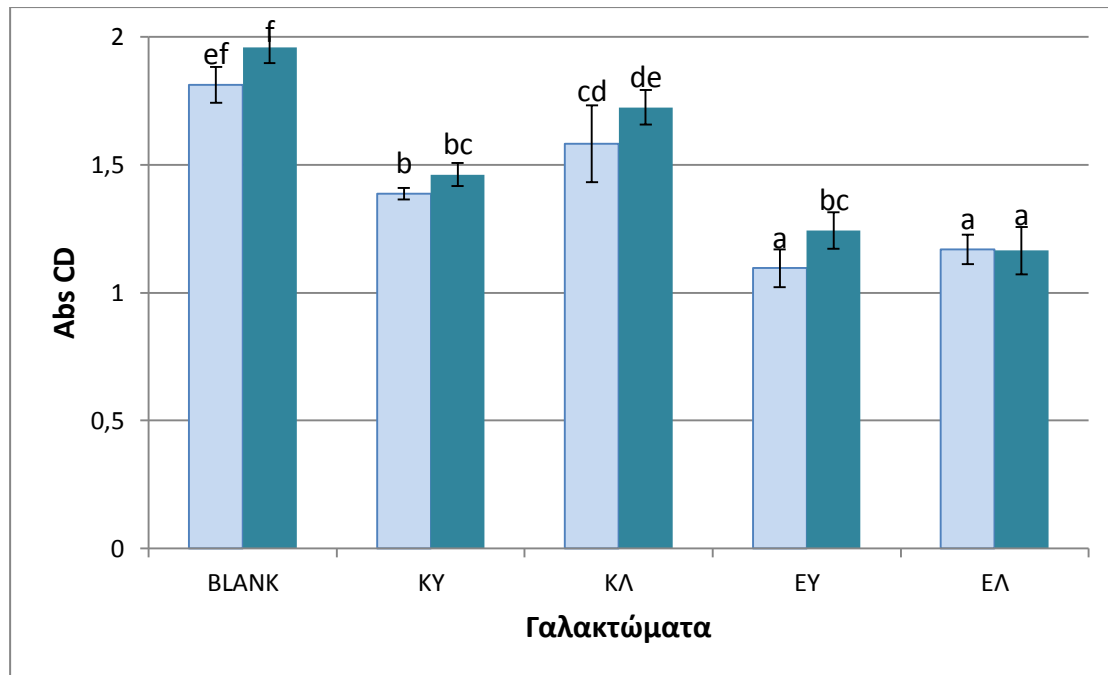
Οι ερευνητές έχουν ξεκαθαρίσει ότι τα αντιοξειδωτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της οξειδωτικής σταθερότητας των γαλακτωμάτων. Η EGCG οξειδώνεται εύκολα και για αυτό το λόγο πρέπει η ποσότητα της ελεύθερης EGCG σε ένα γαλάκτωμα να είναι η ελάχιστη (Shrigelman A. et al, 2011).

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων την θερμοκρασία την ύπαρξη φωτός, τα χαρακτηριστικά των λιποσφαιρίων, τις συνθήκες επεξεργασίας, τις συνθήκες αποθήκευσης και την παρουσία αντιοξειδωτικών (Kargar et al., 2011).

Στο διάγραμμα φαίνονται οι απορροφήσεις των συζυγών διενίων τα οποία αποτελούν τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης , μετά το πέρας 30 ημερών.



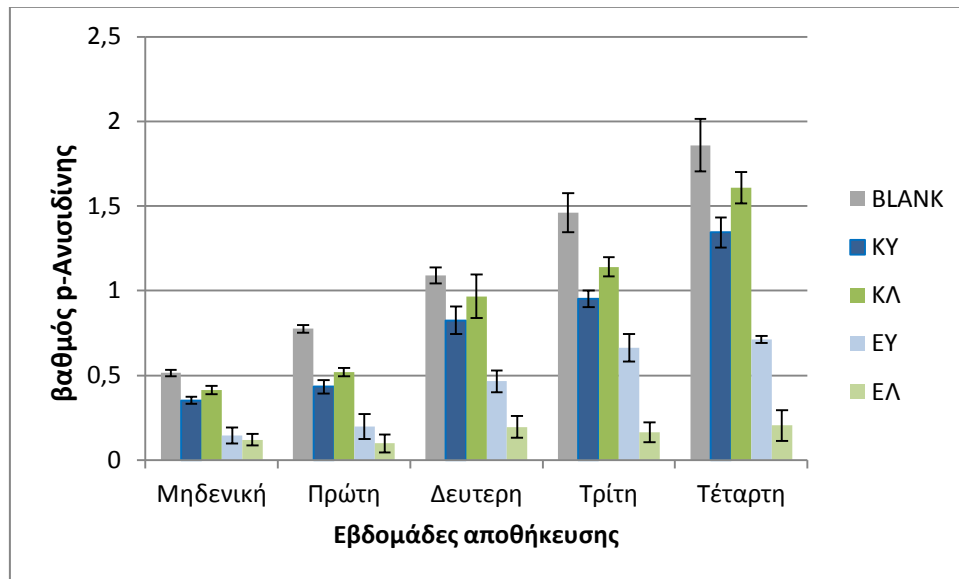
Διάγραμμα 7: Απορρόφηση των συζυγών διενίων των γαλακτωμάτων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης (■ φρέσκο, ■ 1^η εβδομάδα, ■ 2^η εβδομάδα, ■ 3^η εβδομάδα, ■ 4^η εβδομάδα).



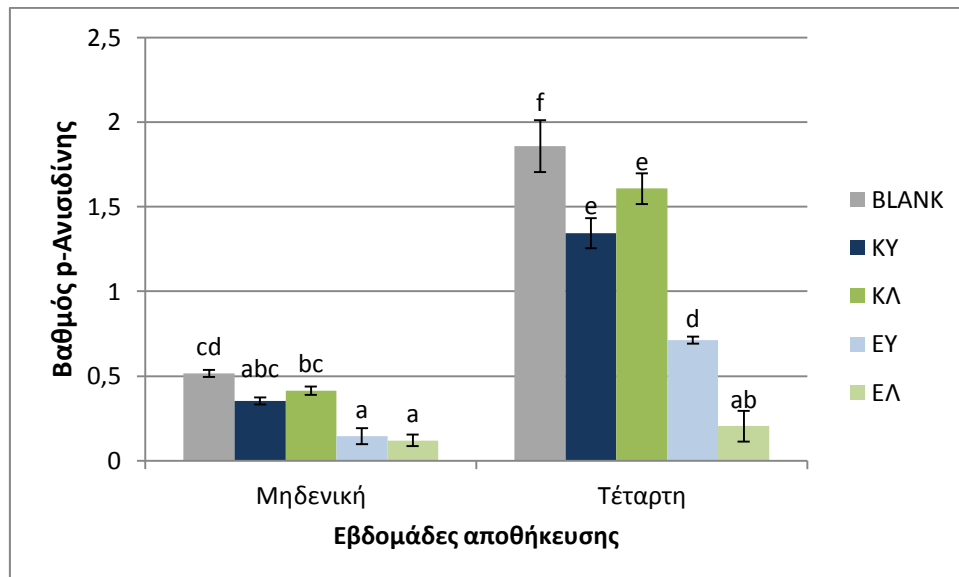
Διάγραμμα 8: Σύγκριση των απορροφήσεων των συζυγών διενίων των φρέσκων (ημέρα 0) και αποθηκευμένων (30^η ημέρα) των γαλακτωμάτων (■ φρέσκο, ■ 30^η ημέρα)

Η συγκέντρωση της EGCG που επιλέχτηκε για την προσθήκη στα γαλακτώματα είναι η 0,1 mg/mL, καθώς βάση του Incorporation Efficiency έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης. Έτσι προστέθηκε η συγκεκριμένη συγκέντρωση (0,1mg/mL) και των δύο τύπων EGCG στην λιπαρή και την υδατική φάση του γαλακτώματος. Το γαλάκτωμα της εστεροποιημένης EGCG η οποία ενθυλακώθηκε στην λιπαρή φάση παρουσιάζει την μικρότερη απορρόφηση (Διάγραμμα 7), με αρχική απορρόφηση (1,169) και μετά από 4 εβδομάδες η απορρόφηση παραμένει σταθερή (1,164). Το γαλάκτωμα της εστεροποιημένης EGCG η οποία ενσωματώθηκε στην υδατική φάση δίνει αρχικά τη μικρότερη απορρόφηση (1,09) και μετά από 4 εβδομάδες παραμένει σχεδόν σταθερή στα (1,24). Το γαλάκτωμα της EGCG που είχε ενθυλακωθεί στην λιπαρή φάση έχει την μεγαλύτερη αρχική απορρόφηση (1,58) και μετά από 4 εβδομάδες δίνει την μεγαλύτερη απορρόφηση (1,74). Είναι ορατό (διάγραμμα 3) ότι το γαλάκτωμα της EGCG στην λιπαρή φάση δίνει τις σχεδόν ίδιες απορροφήσεις με το γαλάκτωμα «μάρτυρα» (blank) το οποίο δεν περιέχει την κατεχίνη που δρα ως αντιοξειδωτικό, όποτε προκύπτει σαν συμπέρασμα ότι η ικανότητα της EGCG σαν αντιοξειδωτικό σχεδόν εξαλείφεται. Καθώς στο γαλάκτωμα blank η αντιοξειδωτική δράση προέρχεται μόνο από την παρουσία της πρωτεΐνης (WPI). Στην έρευνα των Arts M.J. et al (2002) παρατηρήθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του μίγματος των κατεχινών και της πρωτεΐνης είναι μικρότερο από το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κατεχινών και της πρωτεΐνης ξεχωριστά. (masking) Έτσι η ενθυλάκωση της EGCG στην λιπαρή φάση, μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του συνόλου του γαλακτώματος γεγονός το οποίο είναι ορατό και από

την ποσότητα της ανισιδίνης (Διάγραμμα 9) όπου πάλι οι τιμές μεταξύ μάρτυρα και της EGCG στην λιπαρή φάση είναι σχεδόν ίσες.



Διάγραμμα 9: Τιμές βαθμού απορρόφησης ανισιδίνης των γαλακτωμάτων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης για 4 εβδομάδες. (blank=πρότυπο δείγμα, KY= EGCG στην υδατική φάση, ΚΛ=EGCG στην λιπαρή φάση, ΕΥ= εστεροποιημένη EGCG στην υδατική φάση, ΕΛ= εστεροποιημένη EGCG στην λιπαρή φάση)



Διάγραμμα 10: Σύγκριση του βαθμού ανισιδίνης των φρέσκων (ημέρα 0) και αποθηκευμένων (30η ημέρα) των γαλακτωμάτων. . (blank=πρότυπο δείγμα, KY= EGCG στην υδατική φάση, ΚΛ=EGCG στην λιπαρή φάση, ΕΥ= εστεροποιημένη EGCG στην υδατική φάση, ΕΛ= εστεροποιημένη EGCG στην λιπαρή φάση)

Στο διάγραμμα 10 γίνεται η σύγκριση των ποσοτήτων αλδευδών μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης. Γίνεται αντιληπτό πως για όλα τα δείγματα υπάρχει αύξηση του βαθμού απορρόφησης των αλδευδών μετά το πέρας των 4 εβδομάδων.

Το γαλάκτωμα της εστεροποιημένης EGCG η οποία ενθυλακώθηκε στην λιπαρή φάση του γαλακτώματος παρουσιάζει τα μικρότερα ποσοστά (διάγραμμα 11) καθώς ξεκινούν με μικρότερη ποσότητα αλδευδών (0,12) και μετά από 4 εβδομάδες η ποσότητα είναι σχεδόν η ίδια (0,204).

Τον μεγαλύτερο βαθμό αλδευδών παρουσιάζει το γαλάκτωμα με την EGCG που έχει ενθυλακωθεί στην λιπαρή φάση, όπου η αρχική της ποσότητα είναι 0,414 και αυξάνεται στο 1,607 μετά από 4 εβδομάδες. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα γαλακτώματα με την εστεροποιημένη EGCG παρουσιάζουν τις μικρότερες, εκ των οποίων το γαλάκτωμα με την εστεροποιημένη EGCG που έχει ενθυλακωθεί στην λιπαρή φάση έχει τον μικρότερο βαθμό απορρόφησης καθ' όλη την διάρκεια της αποθήκευσης.

Το γεγονός ότι η εστεροποιημένη EGCG, η οποία έχει λιπόφιλη, έχει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στα γαλακτώματα ελαίου/νερό (με pH=3.6), μπορεί να εξηγηθεί με το «πολικό παράδοξο».

Όπως αναφέρθηκε από τους McClements and Decker (2000), επειδή η οξείδωση μπορεί να λάβει μέρος στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού του γαλακτώματος, η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι πολύ διαφορετική σε σχέση με την χρήση τους σε έλαια, ανάλογα με τα φαινόμενα που εμφανίζονται στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού του γαλακτώματος.

Σύμφωνα με το «πολικό παράδοξο» ή το «παράδοξο των αντιοξειδωτικών» στα έλαια τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά από τα λιπόφιλα, ενώ στα γαλακτώματα τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά (Porter 1993, Lante et al., 2013). Για αυτό το λόγο η εστεροποιημένη EGCG εμφανίζει την μικρότερη απορρόφηση διενίων και την μικρότερη ποσότητα ανισιδίνης.

Τα ίδια αποτελέσματα είχαν και οι Frankel et al. (Frankel et al., 1994) καθώς βρήκαν ότι τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά στα γαλακτώματα ελαίου-νερού σε σχέση με τα υδρόφιλα.

Σε πιο πρόσφατες μελέτες βρέθηκε ότι σύμφωνα με την υπόθεση του «πολικού παράδοξου» η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών επηρεάζεται από την πολικότητα του μίγματος αλλά και από την θέση τους στις διαφορετικές φάσεις του γαλακτώματος (υδατική και λιπαρή) (Sorensen et al., 2011). Γεγονός που συνάδει με τα αποτελέσματα καθώς παρατηρήθηκε ότι η εστεροποιημένη EGCG είχε διαφορετικές απορροφήσεις συζυγών διενίων και αλδευδών ανάλογα με την φάση του διαλύματος που είχε τοποθετηθεί. Τον μικρότερο βαθμό απορρόφησης συζυγών διενίων και αλδευδών των είχε όταν είχε ενθυλακωθεί στην λιπαρή φάση.

Τα αποτελέσματα της έρευνας των Zhong και Shahidi (2012) έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα της εστεροποιημένης EGCG σε σχέση με την EGCG σε γαλακτώματα ελαίου/ νερό, χρησιμοποιώντας διαφορετική μέθοδο μέτρησης της

οξειδωσης των λιπιδίων, οπότε τα αποτελέσματά τους ενισχύουν το «πολικό παράδοξο». Στα γαλακτώματα ελαίου/νερό η EGCG η οποία είναι υδρόφιλο αντιοξειδωτικό τείνει προς την υδατική φάση παρέχοντας λιγότερη προστασία στο έλαιο. Ενώ η λιπόφιλη εστεροποιημένη EGCG είναι πιο διαλυτή στην λιπαρή φάση ή προσανατολίζεται στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού λόγω της παρουσίας αμφότερων των υδρόφοβων αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων αλλά και των υδρόφιλων υδροξυλομάδων στα μόριά τους, αποδεικνύοντας έτσι την υψηλότερη αντιοξειδωτική της ικανότητα σε σχέση με την υδρόφιλη EGCG. Επίσης σύμφωνα με τον Soresen et al., (2011) η αντιοξειδωτική ικανότητα των υδρόφιλων ενώσεων όπως η EGCG στα γαλακτώματα μπορεί να βελτιωθεί αν προχωρήσουμε σε εστεροποίηση της EGCG. Πιο πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει τον λιπόφιλο χαρακτήρα της εστεροποιημένης EGCG και την ισχυρή αντιοξειδωτική της ικανότητα σε *in vitro* έρευνες. (Zhong, Ma, & Shahidi, 2011; Zhong & Shahidi, 2011).

Επίσης τα αποτελέσματα της έρευνας του Samotyja και των συναδέλφων του έδειξαν την υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα της EGCG σε γαλακτώματα ελαίου/νερό (Samotyja, Gramza, Małecka, & Korczak, 2004

Στο διάγραμμα είναι ορατό ότι το γαλάκτωμα μάρτυρας (blank) και το γαλάκτωμα με την EGCG στην λιπαρή φάση δίνουν σχεδόν την ίδια απορρόφηση. Το γαλάκτωμα «μάρτυρα» έχει θετικό φορτίο, σύμφωνα με έρευνες τα θετικά φορτισμένα λιποσφαιρία απωθούν ηλεκτροστατικά τον σίδηρο με αποτέλεσμα να μειώνουν βαθμό της οξειδωσης των λιπιδίων και να ενισχύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα που έχει η WPI. (McClements and Decker, 2006).

Σε πρόσφατες έρευνες το «πολικό παράδοξο» έχει αμφισβητηθεί από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι πιστεύουν ότι πιο πολύπλοκοι παράγοντες εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική συμπεριφορά των ενώσεων διαφορετικής πολικότητας (Shahidi & Zhong, 2011). Σύμφωνα με τους Shahidi & Zhong (2011) είναι δυνατόν το πολικό παράδοξο να ισχύει στις περιπτώσεις όπου το αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται να ανέρχεται σε μια κρίσιμη συγκέντρωση, έτσι ώστε τα φαινόμενα που παίρνουν μέρος στην διεπιφάνεια να κυριαρχούν της διαλυτότητας. Στην παρούσα έρευνα υπάρχει κρίσιμη συγκέντρωση (0,1 mg/mL) της EGCG.

Περαιτέρω έρευνα πρέπει να γίνει σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση της EGCG και των παραγώγων της σε διαφορετικά συστήματα, ώστε να γίνει πλήρης εξερεύνηση του δυναμικού της για την επιτυχημένη της εφαρμογή σε λειτουργικά τρόφιμα. Έτσι θα πρέπει να επανεξεταστούν οι συνθήκες καθώς είναι πολύ δύσκολο να γίνει πρόβλεψη της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσα στο γαλάκτωμα λόγω της πολύπλοκής της φύσης της. (Laguerre, Lecomte, Figueroa-Espinoza, & Barea, 2009; Shahidi & Zhong, 2011).

8.6 Συμπεράσματα

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά να ερευνηθεί η επίδραση της ενσωμάτωσης της βακτηριακής κυτταρίνης (BC) στις φυσικές ιδιότητες των παραγόμενων γαλακτωμάτων. Επίσης σκοπός ήταν να εξεταστεί η ενσωμάτωση της EGCG/εστεροποιημένης EGCG και η αντιοξειδωτική της ικανότητα σε γαλακτώματα ελαίου/νερό στα οποία είχε προστεθεί ως σταθεροποιητής η βακτηριακή κυτταρίνη (BC) και ο γαλακτωματοποιητής WPI.

Αρχικά εξετάστηκαν γαλακτώματα ελαίου-νερό που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης (BC) και πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPI), με σκοπό να εξεταστεί η ικανότητα της BC ως σταθεροποιητή και να βρεθεί η κατάλληλη αναλογία BC και WPI για την επίτευξη σταθερού γαλακτώματος.

Κατά την εξέταση των δεδομένων της κατανομής του μεγέθους των λιποσφαιρίων παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος των λιποσφαιρίων παραμένει σταθερό στα 600nm και δεν επηρεάζεται από την προσθήκη της BC.

Το pH των γαλακτωμάτων (pH=3,8) είχε ως αποτέλεσμα να αποκτήσουν θετικό φορτίο οι πρωτεΐνες που προσροφώνταν από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων και όταν προστίθεται η αρνητικά φορτισμένη BC το φορτίο παραμένει θετικό αλλά μικρότερο.

Κατά την εξέταση της σταθερότητας κατά την αποθήκευση παρατηρήθηκε ότι στην μεγαλύτερη συγκέντρωση της WPI (5%), η WPI έχει προσροφηθεί από την διεπιφάνεια ελαίου-νερού και η περίσσεια της WPI παραμένει στην υδατική φάση δημιουργώντας σύμπλοκα με την περίσσεια της BC όταν η BC (1% wt), τα οποία προλαμβάνουν την συνένωση, ενώ η υπόλοιπη BC έχει απορροφηθεί από την επιφάνεια των λιποσφαιρίων δημιουργώντας ένα δεύτερο υμένιο γύρω από τα λιποσφαίρια.

Στην συνέχεια έγινε η εξέταση της ενσωμάτωσης της EGCG στις δύο φάσεις του γαλακτώματος ώστε να μελετηθεί το ποσοστό απόδοσης της και η δράση της ως αντιοξειδωτικός παράγοντας κατά την διάρκεια της αποθήκευσης.

Κατά την εξέταση της απόδοσης ενσωμάτωσης και την εξέταση της οξείδωσης κατά την αποθήκευση της υδρόφιλης EGCG και της υδρόφοβης εστεροποιημένης EGCG σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1, 0.2, 0.5 mg/mL) στις δύο φάσεις του γαλακτώματος, η λιπόφιλη εστεροποιημένη EGCG (0,1mg/mL) στην λιπαρή φάση είχε την καλύτερη απόδοση ενσωμάτωσης και την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, επαληθεύοντας το «πολικό παράδοξο» βάση του οποίου στα γαλακτώματα ο/w είναι πιο αποτελεσματικά τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά.

Κατά κύριο λόγο η β-λακτογλοβουλίνη αλληλεπιδρά με την EGCG με δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις δημιουργώντας μη-ομοιοπολικά σύμπλοκα. Όμως υπάρχουν αμφιβολίες γύρω από την φύση των ομοιοπολικών ή μη-ομοιοπολικών συμπλόκων που σχηματίζουν η EGCG και οι πρωτεΐνες του γάλακτος και τον μηχανισμό βάση του οποίου επιδρούν στην αντιοξειδωτική ικανότητα των τελικών προϊόντων.

Χρειάζεται μελλοντική έρευνα για τα μη-ομοιοπολικά και ομοιοπολικά σύμπλοκα μεταξύ της EGCG και των πρωτεϊνών του γάλακτος, καθώς η αντιοξειδωτική ικανότητα της EGCG επηρεάζεται από αυτά τα σύμπλοκα μέσω πολύπλοκων μηχανισμών. Αλλά και έρευνα όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των ίδιων των συμπλόκων. Επίσης περαιτέρω έρευνα πρέπει να γίνει σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση της EGCG και των παραγώγων της σε διαφορετικά συστήματα, ώστε να γίνει πλήρης εξερεύνηση του δυναμικού της για την επιτυχημένη της εφαρμογή σε λειτουργικά τρόφιμα, καθώς είναι πολύ δύσκολο να γίνει πρόβλεψη της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσα στο γαλάκτωμα λόγω της πολύπλοκής της φύσης των γαλακτωμάτων και της EGCG.

9 Βιβλιογραφία

Abismail, A., Canselier, J.R., Wilhelm, A.M., Delmas, H., Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: Drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*

Ananingsih, V.K., Sharma, A., Zhou, W., 2013. Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection. *Food Res. Int.* 50, 469–479.

Arts, M. J.; Haenen, G. R.; Wilms, L. C.; Beetstra, S. A.; Heijnen, C. G.; Voss, H. P.; Bast, A. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 (5), 1184-1187.

Agoda-Tandjawa, G., Durand, S., Berot, S., Blassel, C., Gaillard, C., Garnier, C., et al. (2010). Rheological characterization of microfibrillated cellulose suspensions after freezing. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 677-686.

Aguilera, J.M., Stanley, D.W. (1990). *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*, Elsevier, Amsterdam

Alexander, M. and Dalgleish, D.G. (2006). Dynamic light scattering techniques and their applications in food science. *Food Biophysics*, 1:2–13. (dynamic light scattering).

Álvarez Cerimedo MS, Huck Iriart C, Candal RJ, Herrera ML (2010) Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium caseinate and trehalose. *Food Res Int* 43:1482–1493 (chapter 2)

Arancibia, C., Bayarri, S., & Costell, E. (2013). Comparing Carboxymethyl Cellulose and Starch as Thickeners in Oil/Water Emulsions. Implications on Rheological and Structural Properties. *Food Biophysics*, 8(2), 122-136.

Atkins, P.W. (1994). *Physical Chemistry*, 5th ed., Oxford University Press, Oxford, UK.

Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36(18), 5566-5577.

Becher, P., Ed., Marcel Dekker, New York, NY, Chap. 1.

Bilbao Sáinz C, Avena Bustillos RJ, Wood DF, Williams TG, Mchugh TH (2010) Nanoemulsions prepared by a low-energy emulsification method applied to edible films. *J Agric Food Chem* 58:11932–11938

Boode, K., Walstra, P. (1993a). Partial coalescence in oil-in-water emulsions. Part 1: Nature of the aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 81, 121.

Boode, K., Bispernick, C., Walstra, P. (1991). Destabilization of O/W emulsions containing fat crystals by temperature cycling. *Colloids and Surfaces*, 61, 55

Boode, K., Walstra, P., Degrootmostert, A.E.A. (1993). Partial coalescence in oil-in-water emulsions. Part 2: Influence of the properties of the fat. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 81, 139.

- Bos, M.A., van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91, 437.
- Bouyer E., Mekhloufi G., Le Potier I., du Fou de Kerdaniel T., Grossiord J-L., Rosilio V., Angely F., (2011). Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum Arabic, 354, 467-477
- Brennan, J.G., Butters, J.R., Cowell, N.D., Lilly, A.E.V. (1981). *Food Engineering Operations*. Applied Science Publishers, London, UK
- Brujic, J., Edwards, S.F., Grinev, D.V., Hopkinson, I., Brujic, D., Makse, H.A. (2003a). 3D bulk measurements of the force distribution in a compressed emulsion system. *Faraday Discussions*, 123, 207.
- Brujic, J., Edwards, S.F., Hopkinson, I., Makse, H.A. (2003b). Measuring the distribution of interdroplet forces in a compressed emulsion system. *Physica A*, 327, 201
- Brun, J.M., Dalgleish, D.G. (1999). Some effects of heat on the competitive adsorption of caseins and whey proteins in oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 9, 323
- Bueno, A. S., Pereira, C. M., Menegassi, B., Arêas, J. A. G., & Castro, I. A. (2009). Effect of extrusion on the emulsifying properties of soybean proteins and pectin mixtures modeled by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 90, 504-510.
- Carvalho, E., Póvoas, M. J., Mateus, N., & De Freitas, V. (2006). Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 891e 896.
- Camino, N. A., & Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1051-1062.
- Camino, N. A., Sanchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2012). Hydroxypropylmethylcellulose- β -lactoglobulin mixtures at the oil-water interface. Bulk, interfacial and emulsification behavior as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 464-474.
- Canselier, J.R., Delmas, H., Wilhelm, A.M., Abismail, A. (2002). Ultrasound emulsification—an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23, 333.
- Chan, P. T., Fong, W. P., Cheung, Y. L., Huang, Y., Ho, W. K. K., & Chen, Z. Y. (1999). Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters fed a high-fat diet. *The Journal of Nutrition*, 129, 1094–1101
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., et al. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1593–1601
- Chau, C.-F., Yang, P., Yu, C.-M., & Yen, G.-C. (2008). Investigation on the lipid-and cholesterol-lowering abilities of biocellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 2291e2295

- Christiansen, K.F., Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M.R., Egelandsdal, B., 2004. Hydrolysed whey proteins as emulsifiers and stabilisers in high-pressure processed dressings. *Food Hydrocolloids* 18 (5), 757–767.
- Chung, Y.S., Chung, J.Y., Yang, G.Y., Li, C., Meng, X., Lee, M.J., 2000. Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. *Biofactors* 13, 73–79.
- Corthaudon, J.-L., Dickinson, E., Dalgleish, D.G. (1991a). Competitive adsorption of b-casein and nonionic surfactants in oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 145, 390
- Corthaudon, J.-L., Dickinson, E., Matsumura, Y., Clark D.C. (1991b). Competitive adsorption of b-lactoglobulin and polyoxyethylene sorbitan monostearate 20 at the oil-water interface. *Colloids and Surfaces*, 56, 293.
- Dalgleish, D. G. (1993). The sizes and conformations of the proteins in adsorbed layers of individual caseins on lattices and in oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1, 1-8.
- Dalgleish, D.G. (1997a). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 1.
- Dalgleish, D.G. (1997b). Structure-function relationships of caseins, in *Food Proteins and Their Applications*, Damodaran, S., Paraf, A., Marcel Dekker, New York, NY, Chap. 7.
- Damodaran, S. (2006). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70, R54-R66.
- Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J. (1997a). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, 62, 342.
- Deminiere, B., Colin, A., Leal-Calderon, F., Bibette, J. (1998). Lifetime and destruction of concentrated emulsions undergoing coalescence, in *Modern Aspects of Emulsion Science*, Binks, B.P., Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, Chap. 8.
- Derkach, S. R., Levachev, S. M., Kukushkina, A. N., Novoselova, N. V., Kharlov, A. E., Matveenko, V. N. (2007). Viscoelasticity of concentrated emulsions stabilized by bovine serum albumin in the presence of a non-ionic surfactant. *Colloid Journal*, 69, 152-158.
- Dickinson E. (2009) Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilisers. *Food Hydrocoll* ;23:1473–82.
- Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 197.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dickinson, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: Overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80, 2607
- Dickinson E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.

Dickinson, E., Iveson, G. (1993). Adsorbed films of b-lactoglobulin + lecithin at the hydrocarbon water and triglyceride-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 6, 553.

Dickinson, E., Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*, Elsevier, London, UK.

Diniz, A., Escuder-Gilabert, L., Lopes, N. P., Villanueva-Camañas, R. M., Sagrado, S., & Medina-Hernández, M. J. (2008). Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(2), 625e632

Dreosti, I.E., 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition* 16, 692–694

Erel-Unal, I., & Sukhishvili, S. A. (2008). Hydrogen-bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol. *Macromolecules*, 41(11), 3962e3970

FAO (2008). Internationally coordinated action for the promotion of tea consumption. Committee on Commodity Problems—Intergovernmental Group on Tea, 18th Session. Hangzhou, China, 14–16 May 2008.

Fellows, P. (2000). *Food Processing Technology: Principles and Practice*, 2nd ed., Woodhead Publishers, Cambridge, UK

Fennema, O.R., Tannenbaum, S.R. (1996). Introduction to Food Chemistry, in *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York, NY, p. 1 Friberg, S.E., Larsson, K. (1997). *Food Emulsions*, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, NY.

Flint, O. (1994). *Food Microscopy: A Manual of Practical Methods, Using Optical Microscopy*, Springer Verlag, New York, NY.

Foegeding, E. A. & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25, 1853-1864.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., & German, J. B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1054–1059.

Friberg, S.E., Larsson, K., Sjoblom, J. (2004). *Food Emulsions*, 4th ed., Marcel Dekker, New York, NY

Friedman, M., Levin, C. E., Choi, S. H., Lee, S. U., & Kozukue, N. (2009). Changes in the composition of raw tea leaves from the Korean Yabukida plant during high temperature processing to pan-fried Kamairi-Cha green tea. *Journal of Food Science*, 74, C406–C412.

Friedman, M., & Jurgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2101e2110.

Fu, L., Zhang, J., & Yang, G. (2013). Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1432-1442.

Futamura, T., & Kawaguchi, M. (2012). Characterization of paraffin oil emulsions stabilized by hydroxypropyl methylcellulose. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1), 55-6

Goff, H.D. (1997b). Instability and partial coalescence in dairy emulsions. *Journal of Dairy Science*, 80, 2620.

Goff, H.D. (1997a). Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions. *Journal of Dairy Science*, 80, 2620.

Goldstein, A. & Seetharaman, K. (2011). Effect of a novel monoglyceride stabilized oil. in water emulsion shortening on cookie properties. *Food Research International*, 44, 1476-1481.

Gopal, E.S.R. (1968). Principles of Emulsion Formation, in *Emulsion Science*, Sherman, P., Ed., Academic Press, London, UK, Chap. 1.

Guillen M.D., Cabo N, (2003): Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine stability of edible oils, *Food Chemistry*, 77, 503-510.

Hagerman, A. E., Rice, M. E., & Ritchard, N. T. (1998). Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin16 (4/8) catechin (procyanidin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2590e 2595.

Hayati, Y.B.C., M., C.P., T., & I, N. (2009). Droplet characterization and stability of soybean oil/ palm kernel olein o/w emulsions with the presence of selected polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 23, 233-243.

Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J*, 58(2), 345-352.

Hoefler A, C, (2204): *Hydrocolloids*, United States, American Association of Cerial Chemists. 111p.

Hu, M., McClements, J., & Decker, E. A. (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1696-1700.

Huang, M.T., Xie, J.G., Wang, Z.Y., Ho, C.T., Lou, Y.R., Wang, C.X.,Hard, G.C., Conney, A.H., 1997. Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. *Cancer Res.* 57, 2623–2629.

Hunter, R.J. (1989). *Foundations of Colloid Science*, Vol. 2, Oxford University Press, Oxford, UK

Iguchi, S., Y., & A., B. (2000). Bacterial cellulose — A masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35, 261-270.

Jafari, S. M., Beheshti, P., & Assadpoor, E. (2012). Rheological behavior and stability of Dlimonene emulsions made by a novel hydrocolloid (Angum gum) compared with Arabic gum. *Journal of Food Engineering*, 109, 1-8.

- Kabalnov, A.S. (1998). Coalescence in emulsions, in *Modern Aspects of Emulsion Science*, Binks, B.P., Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK., Chap. 7.
- Kabalnov, A.S., Weers, J. (1996). Macroemulsion stability within the Winsor III region: Theory versus experiment. *Langmuir*, 12, 1931
- Kalab, M., Allan-Wojtas, P., Miller, S.S. (1995). Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 180.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., & Capron, I. (2011). New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. *Langmuir*, 27(12), 7471-7479.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, 519-533
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(22), 3358-3393.
- Koh, L. L. A., Chandrapala, J., Zisu, B., Martin, G. J. O., Kentish, S. E., & Ashokkumar,(2014). A comparison of the effectiveness of sonication, high shear mixing and homogenisation on improving the heat stability of whey protein solutions. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 556e566
- Kuijk, A., Koppert, R., Versluis, P., van Dalen, G., Remijn, C., Hazekamp, J., et al.(2013). Dispersions of attractive semiflexible fiberlike colloidal particles from bacterial cellulose microfibrils. *Langmuir*, 29(47), 14356e14360
- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., & Engelhardt, U. H. (2000). Flavonoids and other polyphenols in consumers brews of tea and other caffeinated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2848-2852.
- Lam Ricky S.H., Michael T. Nickerson (2013) Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach, *Food Chemistry*
- Lees, L.H., Pandolfe, W.D. (1986). Homogenizers, in *Encyclopedia of Food Engineering*, Hall, C.W.,
- Li, J.-L., Cheng, Y.-Q., Wang, P., Zhao, W.-T., Yin, L.-J., & Saito, M. (2012). A novel improvement in whey protein isolate emulsion stability: Generation of an enzymatic cross-linked beet pectin layer using horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids*, 26, 448-455
- Li, M., & Hagerman, A. E. (2014). Role of the flavan-3-ol and galloyl moieties in the interaction of (e)-epigallocatechin gallate with serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3768e3775.
- Li M., J.T. Liu, X.M. Pang, C.J. Han, J.J. Mao, Epigallocatechin-3-gallate inhibits angiotensin II and interleukin-6-induced C-reactive protein production in macrophages, *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 912-918.
- Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Li, R., & Li, Z. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource Technology*, 151C, 113e119

- Lowys, M.-P., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). Rheological characterization of cellulosic microfibril suspensions. Role of polymeric additives. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 25e32
- Loncin, M., Merson, R.L. (1979). *Food Engineering: Principles and Selected Applications*, Academic Press, New York, NY.
- Martinez-Sanz, M., Lopez-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2011). Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 228-236.
- Meftahi, R., K., A., R., M., S., E., Y. M., & M., T. (2010). The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose*, 17(1), 199-204.
- McCarthy, W.W. (1964). Ultrasonic emulsification. *Drug and Cosmetic Industry*, 94: 6, 821.
- McClements, D.J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 2011, 7, 2297–2316 | 2297
- McClements DJ, Li Y (2010) Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv Colloid Interface Sci* 159:213–228
- McClements DJ (2007) *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47:611–649. (pepper review)
- McClements, D.J., 2005. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, second ed. CRC Press, Boca Raton
- McClements, D.J. (2004). Role of hydrocolloids as emulsifiers in foods, in *Gums and Stabilizers in the Food Industry*, Vol. 12, Springer Verlag, New York NY.
- McClements, D.J. (2002b). Colloidal basis of emulsion color. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7, 451.
- McClements, D.J. (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173-177
- McClements, D.J., Decker, E.A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65, 1270.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 577e606.
- Mikula, R.J. (1992). Emulsion characterization. *Emulsions: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, Schramm, L.L., Ed., American Chemical Society, Washington, DC, Chap. 3.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39, 945-963.

- Mulvihill, D. M. & Murphy, P. C. (1991). Surface active and emulsifying properties of caseins/caseinates as influenced by state of aggregation. *International Dairy Journal*, 1,13-37
- Murphy, D.B. (2001). *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, 1st ed., Wiley-Liss, New York, NY.
- Naczka, M., Grant, S., Zadernowski, R., & Barre, E. (2006). Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chemistry*, 96(4), 640e647.
- Nagy, K., Courtet-Compondu, M., Williamson, G., Rezzi, S., Kussmann, M., & Rytz, A. (2012). Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food Chemistry*, 132(3), 1333e1339.
- Oda, Y.; Kinoshita, M.; Nakayama, K.; Kakehi, K. Evaluation of fluorescence polarization method for binding study in carbohydrate-lectin interaction. *Biol. Pharm. Bull.* 1998, 21 (11), 1215-1217.
- Okiyama, A., Motoki, M., & Yamanaka, S. (1992). Bacterial Cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 479-487.
- Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H., & Yamanaka, S. (1992). Bacterial Cellulose I. 2-stage fermentation process for cellulose production *Acetobacter Aceti*. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 471-477.
- O'Regan, J., & Mulvihill, D. M. (2010). Sodium caseinate–maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*, 43(1), 224-231.
- Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 11601e11608.
- Palacios, L. E. & Wang, T. (2005). Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *Journal of the American Oil Chemist Society*, 82, 571-578.
- Palazolo, G. G., Sorgentini, 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.
- Pandolfe, W.D. (1991). Homogenizers, in *Encyclopedia of Food Science and Technology*, John Wiley & Sons, New York, NY, p. 1413.
- Pandolfe, W.D. (1995). Effect of premix condition, surfactant concentration and oil level on the formation of oil-in-water emulsions by homogenization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 16, 633.
- Papadopoulou A, Green RJ, Frazier RA (2005) Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem* 53:158–163
- Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I., & Kiosseoglou, V. (2010). Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 90, 304-313.

Paximada, P., Tsouko, E., Kopsahelis, N., Koutinas, A. A., & Mandala, I. (2014). Bacterial Cellulose as stabilizer of o/w emulsions. *Food Hydrocolloids*(0).

Phillips GO, Williams PA. Introduction to food proteins. In: Phillips GO, Williams PA, editors. *Handbook of food proteins*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. p. 1–12. 2001

Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J. L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 687e697.

Puppo, M. C., Beaumal, V., Speroni, F., de Lamballerie, M., Añón, M. C., & Anton, M. (2011). β -conglycinin and glycinin soybean protein emulsions treated by combined temperaturehigh- pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 25, 389-397

Qi, X. L., Wang, L. S., & Zhu, J. B. (2011). Water-In-Oil-In-Water Double Emulsions: An Excellent Delivery System for Improving the Oral Bioavailability of Pidotimod in Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2203-2211.

Rabetafika, H. N., Bchir, B., Aguedo, M., Paquot, M., & Blecker, C. (2014). Effects of processing on the compositions and physicochemical properties of fibre concentrate from cooked fruit pomaces. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), 749e760.

Robins, M.M. (2000). Lipid emulsions. *Grasas Y Aceites*, 51, 26–34.

Robins, M.M., Hibberd, D.J. (1998). Emulsion flocculation and creaming, in *Modern Aspects of Emulsion Science*, Binks, B.P., Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, Chap. 4.

Ru Q., Yu H., Huang Q. (2010) : Encapsulation of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Using Oil-in-Water (O/W) Submicrometer Emulsions Stabilized by ι -Carrageenan and β -Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* , 58, 10373–10381

Salvi, A.; Carrupt, P.-A.; Tillement, J.-P.; Testa, B. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61 (10), 1237-1242.

Samotyja, U., Gramza, A., Małecka, M., & Korczak, J. (2004). The use of plant extracts in stabilization of triacylglycerols, III Euro Fed lipid congress: Fats and lipids in a changing world, Edinburgh, Scotland 2004

Sarkar, A., Goh, K.K.T., Singh, R.P., Singh, H., 2009. Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilised by b-lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids* 23 (6), 1563–1569.

Schubert, H., Ax, K. (2003). Engineering food emulsions, in *Texture in Foods, Volume 1: Semi-Solid Foods*, McKenna, B.M., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, Chap. 8.

Schubert, H. (1997). Advances in the mechanical production of food emulsions, in *Engineering and Food*, Jowitt, R., Ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, p. AA82.

Shpigelman A., Yifat Cohen, Yoav D. Livney*Thermally-induced β -lactoglobulineEGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study. *Food Hydrocolloids* 29 (2012) 57e67.

Stang, M., Schuchmann, H., Schubert, H. (2001). Emulsification in high-pressure homogenizers. *Engineering in the Life Sciences*, 1, 151.

Su, J., Flanagan, J., Hemar, Y., & Singh, H. (2006). Synergistic effects of polyglycerol ester of pollyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20, 261-268.

Swaigood, H.E. (1996). Characteristics of milk, in *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York, NY, Chap. 14.

Sun-Waterhouse, D., Wadhwa, S.S., 2013. Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: a review. *Food & Bioprocess Technology* 6 (3), 607–627.

Tadros, R. Izquierdo, J. Esquena and C. Solans, *Adv.(2004) Colloid Interface Sci.*, 108–109, 303–318.

Thongkaewa C., Monika Gibis a, Jörg Hinrichs b, Jochen Weiss.(2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate-pectin coacervates .*Food Hydrocolloids* 41 (2014) 103e112.

Tual, A., Bourles, E., Barey, P., Houdoux, A., Desprairies, M., Courthaudon, J.-L.(2006). Effect of surfactant sucrose ester on physical properties of dairy whipped emulsions in relation to those of O/W interfacial layers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 295, 495-503.

van Aken, G.A. (2002). Flow-induced coalescence in protein-stabilized highly concentrated emulsions. *Langmuir*, 18, 2549.

van der Linden, E., Sagis, L., Venema, P. (2003). Rheo-optics and food systems. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 349.

Vaughan, J.G. (1979). *Food Emulsions*, in *Food Microscopy*, Vaughan, J.G., Ed., Academic Press, London, UK.

Verly, A., Tarabukinova, E., Haudin, J.M., Peuvrel-Disdier, E., Navard, P. (2003). Application of rheo-optical tools to the analysis of food structure under shear, in *Proceedings of the Third International Symposium on Food Rheology and Structure*, Fischer, P., Marti, I., Windhab, E.J., Eds., Laboratory of Food Process Engineering, Zurich, Switzerland.

von Staszewski, M., Ruiz, A. L. T. G., & Pilosof, A. M. R. (2014). Green tea polyphenolseb - lactoglobulin nanocomplexes: interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil. *Food Hydrocolloids*, 35, 505e511.

Waraho, T., McClemnts, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(1), 3e13.

- Walstra, P. (1996a). Emulsion stability, in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 4, Becher, P., Ed., Marcel Dekker, New York, NY, Chap. 1.
- Walstra, P. (1996b). Disperse systems: Basic considerations, in *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York, NY, Chap. 3.
- Walstra, P. (2003a). *Physical Chemistry of Foods*, Marcel Dekker, New York, NY.
- Walstra, P. (2003b). Studying food colloids: Past, present and future, in *Food Colloids, Biopolymers and Materials*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
- Wang, H., Zhou, H., Yang, C.S., 2013. Cancer prevention with green tea polyphenols. In: *Cancer Chemoprevention and Treatment by Diet Therapy*. Springer, London, pp. 91–119.
- Wang, H., & Helliwell, K. (2000). Epimerization of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70, 337–344.
- Wang, R., Zhou, W., & Jiang, X. (2008a). Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2694–2701.
- Wang, X., Zhang, J., Lei, F., Liang, C., Yuan, F., & Gao, Y. (2014). Covalent complexation and functional evaluation of (e)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin. *Food Chemistry*, 150(17), 341e347
- Rawel, H. M., & Rohn, S. (2010). Nature of hydroxycinnamate-protein interactions. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 93e109
- Wollenweber, C., Makievski, A. V., Miller, R., & Daniels, R. (2000). Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172(1–3), 91–101.
- Wooster, M. Golding and P. Sanguansri, *Langmuir*, (2008) 24, 12758–12765.
- Yang, W., Liu, F., Xu, C., Yuan, F., & Gao, Y. (2014). Molecular interaction between (e)-epigallocatechin-3-gallate and bovine lactoferrin using multispectroscopic method and isothermal titration calorimetry. *Food Research International*, 64(1), 141e14
- Yamamoto, T., 1997. *Chemistry and Application of Green Tea*. CRC Press, Boca Raton
- Yang, J., Liu, R.H., 2013. The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 163–171.
- Ye, J., Fan, F., Xu, X., & Liang, Y. (2013). Interactions of black tea and green tea polyphenols with whole milk. *Food Research International*, 53(1), 449e455.
- Ye, A. & Singh, H. (2006). Heat stability of oil-in-water emulsions formed with intact or hydrolysed whey proteins: influence of polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 20, 269–276.
- Zaveri, N. T. (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer application. *Life Sciences*, 78, 2073–2080.

Zorilla, R., Liang, L., Remondetto, G., & Subirade, M. (2011). Interaction of epigallocatechin-3-gallate with b-lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. *Dairy Science & Technology*, 91(5), 629e644.

Zhang, Y., Phillips, G. O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539-545.

Zhong Ying, Shahidi Fereidoon (2012): Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives and their antioxidant potential in food and biological systems. *Food Chemistry* 131 (2012) 22–30.

Zhong Y., Y.Y.S. Chiou, M.H. Pan, C.T. Ho, F. Shahidi, Protective effects of epi-gallocatechin gallate (EGCG) derivatives on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in mice, *J. Funct. Foods* 4 (2012) 323–330.

Zhong Y., Y.S. Chiou, M.H. Pan, F. Shahidi, Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages, *Food Chem.* 134 (2012) 742–748.

Zhong, Y., & Shahidi, F. (2011). Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6526–6533

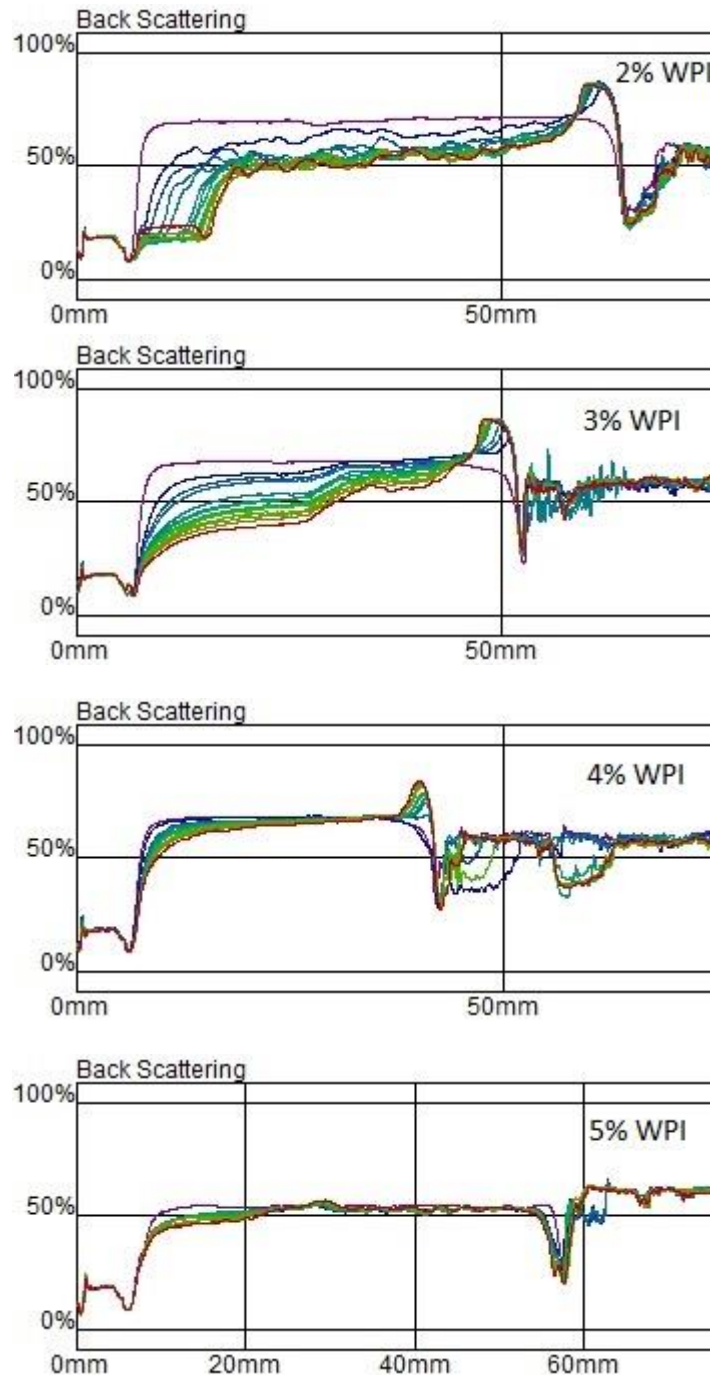
Zhong, Y., Ma, C.M., & Shahidi, F. (2011). Antioxidant and antiviral activities of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives. *Journal of Functional Foods*. In press.

Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., Chen, Z.-Y., 1997. Stability of green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4624–4628

10 Παράρτημα

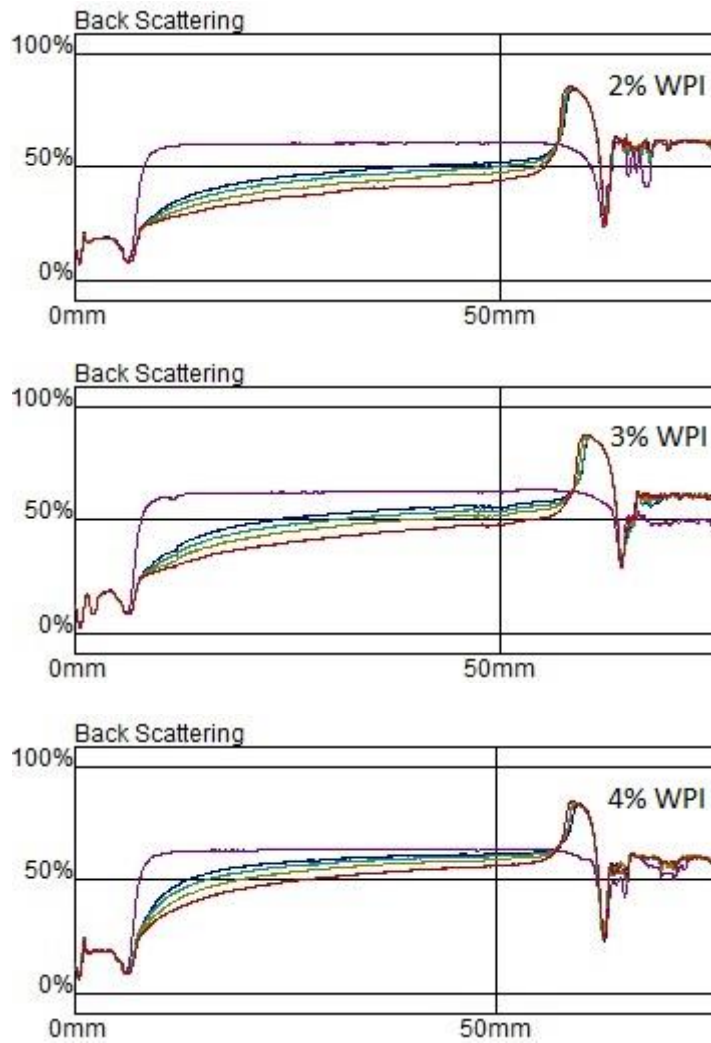
10.1 Ενδεικτικά διαγράμματα οπισθοσκέδασης του φωτός (Back Scattering)

10.1.1 BC=1% wt



Εικόνα 1.1 : Τα προφίλ οπισθοσκέδασης του φωτός από τις μετρήσεις των γαλακτωμάτων που περιέχουν 1% wt BC και διαφορετικές συγκεντρώσεις WPI (2,3,4 & 5). Παρατηρείται ότι γαλάκτωμα που παρουσιάζει το πιο σταθερό προφίλ back scattering είναι το γαλάκτωμα 1%BC 5%WPI.

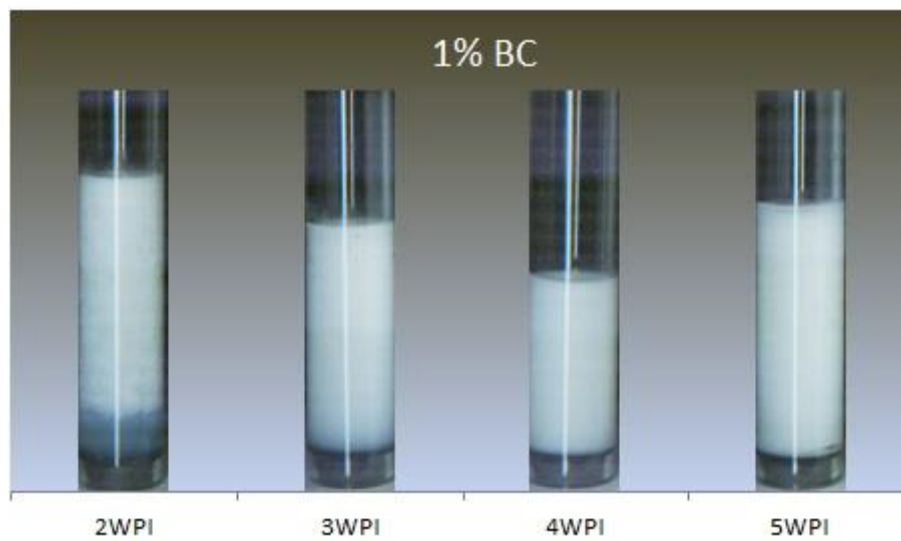
10.1.2 BC=0% wt



Εικόνα 1.2 : Τα προφίλ οπισθοσκέδασης του φωτός από τις μετρήσεις των γαλακτωμάτων που περιέχουν 0% wt BC και διαφορετικές συγκεντρώσεις WPI (2,3 & 4%). Παρατηρείται ότι τα γαλακτώματα παρουσιάζουν σχεδόν το ίδιο προφίλ back scattering, έχουν σχεδόν το ίδιο ποσοστό Serum Index.

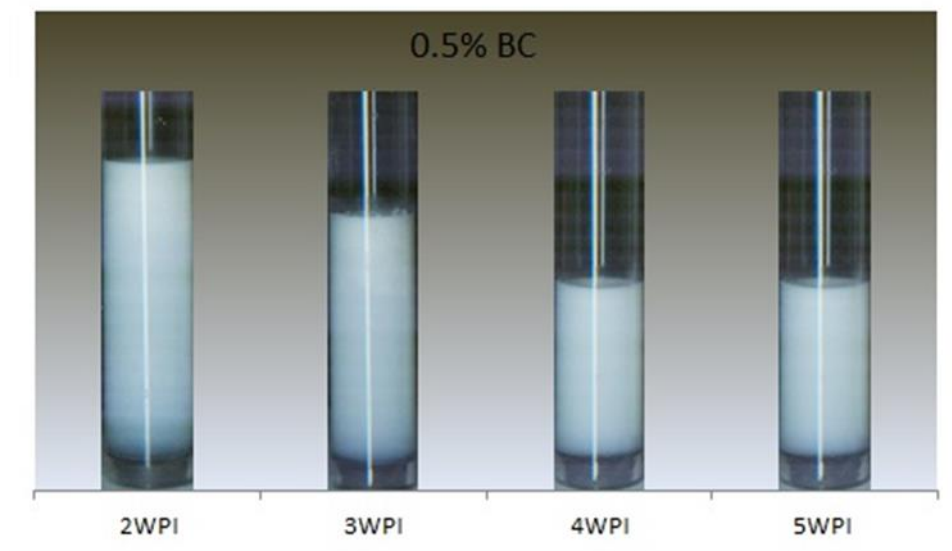
10.2 Εικόνες γαλακτωμάτων μετά το πέρας της αποθήκευσης

10.2.1 BC=1%



Εικόνα 2.1: Τα γαλακτώματα για διαφορετικές συγκεντρώσεις WPI (2,3,4 & 5%) για BC=1% wt., μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C.

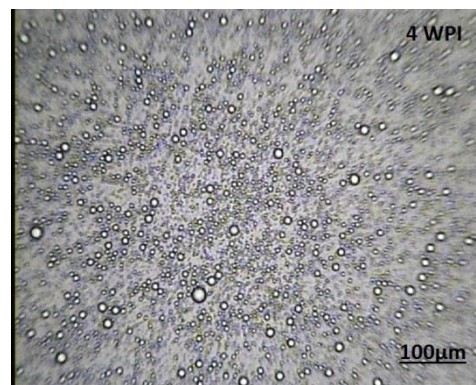
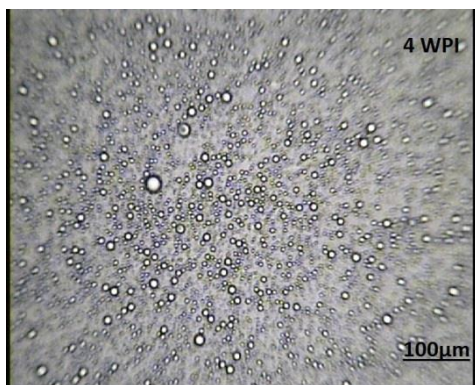
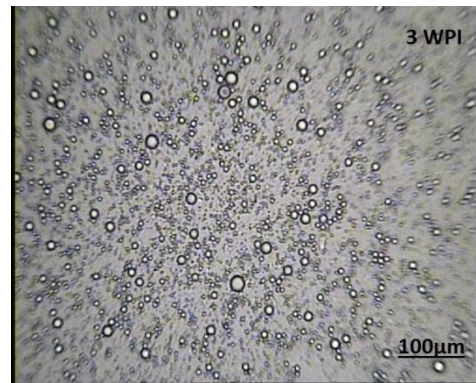
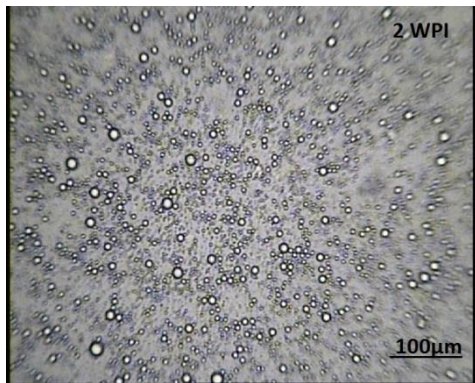
10.2.2 BC=0,5% wt



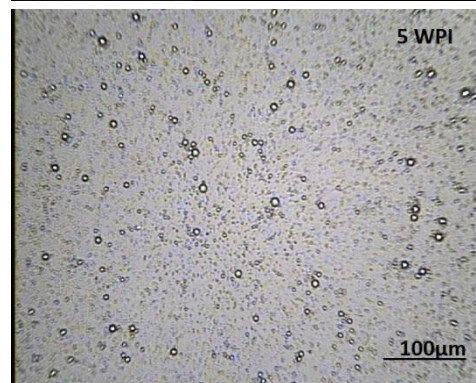
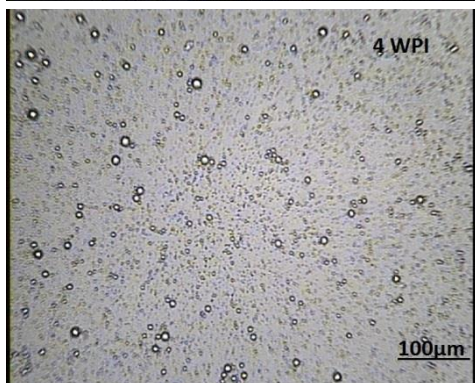
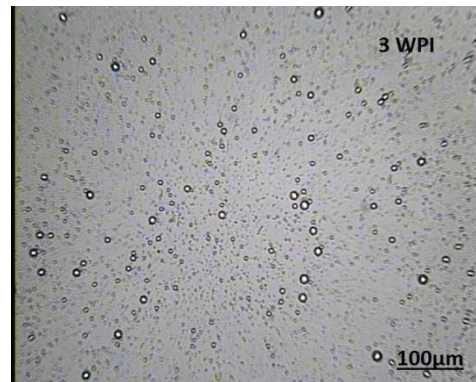
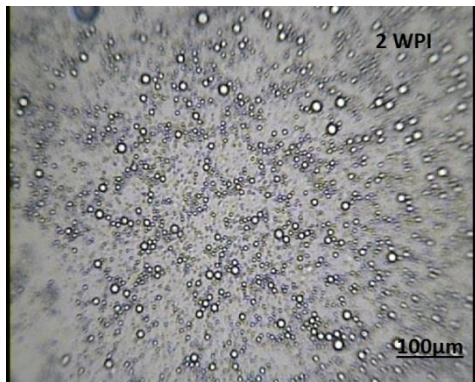
Εικόνα 2.1: Τα γαλακτώματα για διαφορετικές συγκεντρώσεις WPI (2,3,4 & 5%) για BC=0.5% wt, μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C

10.3 Εικόνες μικροσκοπίου

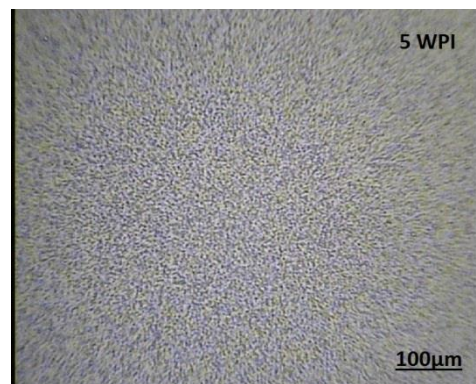
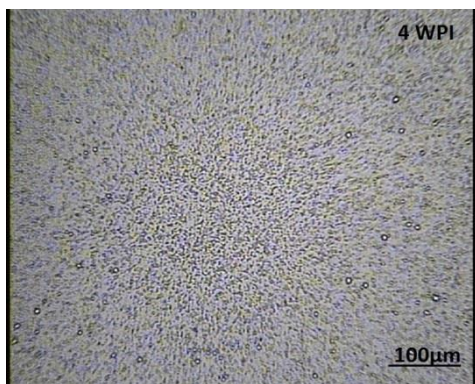
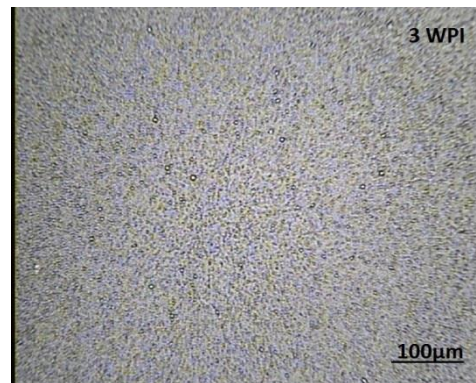
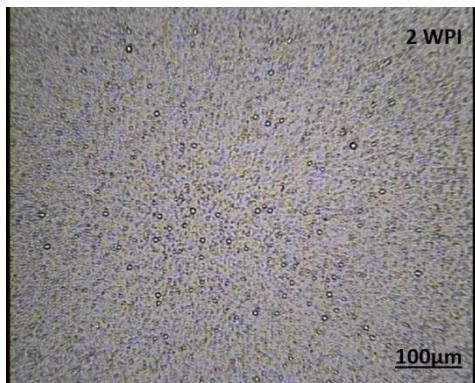
10.3.1 BC=0% wt



10.3.2 BC=0.5



10.3.3 BC=1% wt



11 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ-ΕΙΚΟΝΩΝ-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

11.1.1 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύγκριση των διαφορετικών τύπων γαλακτωμάτων	8
Πίνακας 2: Φυσικά χαρακτηριστικά της EGCGC	38
Πίνακας 3: Σύσταση και ιδιότητες της WPI	43

11.1.2 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 A: Η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων, BC =0%	56
Διάγραμμα 1 B: Η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων, BC =0,5%	57
Διάγραμμα 1 Γ: Η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιρίων, BC= 1%	56
Διάγραμμα 2: Το ζ-δυναμικό των γαλακτωμάτων	58
Διάγραμμα 3: Σταθερότητα των γαλακτωμάτων κατά την αποθήκευση	61
Διάγραμμα 4 A: Οι καμπύλες του ιξώδους των γαλακτωμάτων με BC=0% wt	63
Διάγραμμα 4 B: Οι καμπύλες του ιξώδους των γαλακτωμάτων με BC=0,5% wt	64
Διάγραμμα 4 Γ: Οι καμπύλες του ιξώδους των γαλακτωμάτων με BC=1% wt	64
Διάγραμμα 5 A : Η καμπύλη της EGCG	65
Διάγραμμα 5 B : Η καμπύλη της εστεροποιημένης EGCG	65
Διάγραμμα 6: Το ποσοστό απορρόφησης της EGCG/εστεροποιημένης EGCG	66
Διάγραμμα 7: Απορρόφηση των συζυγών διενίων των γαλακτωμάτων	69
Διάγραμμα 8: Σύγκριση των απορροφήσεων των συζυγών διενίων	70
Διάγραμμα 9: Τιμές βαθμού απορρόφησης ανισιδίνης των γαλακτωμάτων	71
Διάγραμμα 10: Σύγκριση του βαθμού απορρόφησης ανισιδίνης των γαλακτωμάτων	71

11.1.3 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΩΝΩΝ

Εικόνα 1: Αναμεικτères υψηλής ταχύτητας	11
Εικόνα 2: Κολλοειδής μύλος	12
Εικόνα 3 : Ομογενοποιητής υπερήχων.	14
Εικόνα 4: Ομογενοποιητή υψηλής πίεσης	14
Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα των μηχανισμών αποσταθεροποίησης	17
Εικόνα 6: Σχηματικό διάγραμμα μερικής συνένωσης	18
Εικόνα 7: Κροκίδωση υπό εκκένωση	19
Εικόνα 8: Κροκίδωση υπό γεφύρωση	20
Εικόνα 9: Αποκορύφωση γαλακτώματος	21
Εικόνα 10: Αναπαράσταση σφαιρικής πρωτεΐνης	24
Εικόνα 11: 3D-δομή της β-λακτογλοβουλίνης , α-λακταλβουμίνης	26
Εικόνα 12: Μηχανισμός οξείδωσης	33
Εικόνα 13: Η δομή της EGCG	38
Εικόνα14: Εκτίμηση ζ-δυναμικού	50
Εικόνα 15: Συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο	53

