



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΜΠΑΜΙΕΣ  
ΚΑΙ ΣΑΛΕΠΙ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ  
ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

**ΧΑΡΧΑΡΗ ΗΛΕΚΤΡΑ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012**

Τίτλος: απομόνωση και χαρακτηρισμός υδατανθράκων από μπάμιες και σαλέπι με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.

Όνοματεπώνυμο: Χαρχαρή Ηλέκτρα

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Ημερομηνία.  
17/2/2012

Εισηγητής  
Γεωργιάδης Νικόλαος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γεωργιάδη και τον κύριο Ριζούλη που με βοήθησαν να τελειώσω την πτυχιακή μου.

Τίτλος: απομόνωση και χαρακτηρισμός υδατανθράκων από μπάμιες και σαλέπι με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.

Ονοματεπώνυμο: Χαρχαρή Ηλέκτρα

ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα

Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141

### Περίληψη

Τρία διαφορετικά εκχυλίσματα πολυσακχαριτών παραλήφθηκαν από σάρκα μπάμιας και σαλέπι. Οι πολυσακχαρίτες χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέσο μοριακό τους βάρος. Το εκχύλισμα HBSS από σαλέπι βρέθηκε να περιέχει ένα πληθυσμό από μόρια πιθανού μοριακού βάρους 600-700 kDa, ένα πληθυσμό ~50 kDa, και ένα ~12 kDa. Το εκχύλισμα CHSS περιέχει ένα πληθυσμό μοριακού βάρους ~50 kDa. Το εκχύλισμα DASS δεν περιείχε πολυσακχαρίτες.

Το εκχύλισμα HBSS από τη μπάμια βρέθηκε να περιλαμβάνει ένα πληθυσμό από μόρια πιθανού μοριακού βάρους 670 kDa, ένα πληθυσμό ~5 kDa και ένα 1 kDa. Το εκχύλισμα CHSS περιέχει ένα πληθυσμό μοριακού βάρους 50 kDa – 12 kDa. Το εκχύλισμα DASS περιέχει ένα πληθυσμό μοριακού βάρους 410 kDa – 80 kDa, ένα πληθυσμό 80 kDa – 12 kDa, ένα 12 kDa – 5 kDa και ένα 5 kDa – 1 kDa.

Στα εκχυλίσματα CHSS και DASS της μπάμιας και του σαλεπιού ανιχνεύτηκαν σωματίδια με μοριακό βάρος  $\leq 1$  kDa, τα οποία είναι πολύ μικρά για κολλοειδείς οντότητες με συνέπεια να μην είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός τους.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την χρωματογραφία και της μπάμιας και του σαλεπιού, συμφωνούν με αυτά από τη δυναμική σκέδαση του φωτός. Τέλος όλοι οι πληθυσμοί πολυσακχαριτών, όλων των εκχυλισμάτων, είχαν αρνητικό ζ-δυναμικό, το οποίο προφανώς συσχετίζεται με την ύπαρξη γαλακτουρονικού οξέος στους πολυσακχαρίτες.

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>3</b>
<b>2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....</b>	<b>4</b>
2.1. Η Μπάμια.....	4
2.2. Το Σαλέπι.....	5
2.3. Υδατάνθρακες.....	5
2.3.1. Μονοσακχαρίτες.....	6
2.3.2. Ολιγοζαχαρίτες.....	6
2.3.3. Πολυζαχαρίτες.....	6
2.3.3.1. Τέλεια γραμμικοί πολυσακχαρίτες.....	10
2.3.3.2. Διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες.....	10
2.3.3.3. Γραμμικά διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες.....	11
2.3.3.4. Πολυσακχαρίτες με καρβοξυλικές ομάδες.....	11
2.3.3.5. Πολυσακχαρίτες με ισχυρώς όξινες ομάδες.....	11
2.3.3.6. Τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες.....	11
2.3.3.7. Σχηματισμός παραγώγων με ουδέτερους ή όξινους υποκαταστάτες.....	11
2.4. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	
2.5. ζ-Δυναμικό.....	16
2.6. Δυναμική σκέδαση του φωτός.....	16
<b>3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>19</b>
<b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>20</b>
4.1. Πρώτη ύλη.....	20
4.2. Πορείας εργασίας.....	21
4.3. Υλικά και Μέθοδοι.....	22
4.3.1. Υλικά.....	22
4.3.2. Συσκευές.....	22
4.3.3. Μέθοδοι.....	22
4.3.3.1. Απολίπανση δειγμάτων.....	22
4.3.3.2. Αδιάλυτα σε αλκοόλη συστατικά (AIS).....	22
4.3.3.3. Διαδοχική εκχύλιση των αδιάλυτων σε αλκοόλη συστατικών (AIS).....	23
4.3.3.4. Μέθοδος χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC).....	23
<b>5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>24</b>
5.1 Πρότυπα διαλύματα.....	24
5.2 Χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων της μπάμιας.....	24
5.3 Χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων του σαλεπιού.....	27
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ.....</b>	<b>30</b>
<b>7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ .....</b>	<b>31</b>
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>32</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....</b>	<b>35</b>



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μπάμια είναι ο καρπός του φυτού *Ambelmoschus esculentus* του γένους *Malvaceae*. Είναι πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών με υψηλή περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λίπη (Rachimov & Chernenko, 2003) και σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Adelakun *et al.*, 2009). Το χαρακτηριστικό του καρπού είναι μία βλεννώδης υφή η οποία γίνεται έντονα αντιληπτή κατά το μαγείρεμα και τη θερμική επεξεργασία. Η υφή αυτή οφείλεται στην παρουσία σειράς πολυσακχαριτών, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη σύσταση και το φορτίο που φέρουν, το οποίο οφείλεται κυρίως στην παρουσία γαλακτουρονικού οξέος (Sengkhamrarn *et al.*, 2009a). Η κατανομή των πολυσακχαριτών ποικίλει στα διάφορα τμήματα (σάρκα, μίσχος, σπόροι) του καρπού (Ndjouenkeu *et al.*, 1997).

Το σαλέπι, είναι μία υπόλευκη σκόνη που παραλαμβάνεται με άλεση των ξηρών κονδύλων του φυτού *Orchis mascula* (Kaya & Tekin, 2001) γνωστού και ως Σερνικοβότανο και χρησιμοποιείται για την παρασκευή του ομώνυμου ποτού μετά από ανάμιξη σαλεπιού με αγελαδινό γάλα, ζάχαρη και βράσιμο. Ήταν γνωστό πολλούς αιώνες πριν στον Ελλαδικό, αλλά και στον ευρύτερο χώρο της ανατολικής Μεσογείου, για τις θρεπτικές του ιδιότητες (Ktistis & Georgakopoulos, 1991), ενώ προστίθεται σε ποτά, παγωτά και φάρμακα.

Η βασικότερη λειτουργική ιδιότητα των πολυσακχαριτών που περιέχονται στις μπάμιες ή φυτά όπως το σαλέπι, είναι η ιδιότητά τους να αυξάνουν το ιξώδες ή να προκαλούν την πήξη υδατικών διαλυμάτων (Dickinson, 1992). Κατά συνέπεια, υπάρχει ενδιαφέρον για την απομόνωση, το χαρακτηρισμό και τις δυνατότητες χρησιμοποίησης αυτού του ισχυρού φυσικού τροποποιητή ιξώδους/πηκτικού παράγοντα ως φυσικού πρόσθετου σε κρέμες, dressings, σάλτσες και άλλες εφαρμογές.

Η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στον χαρακτηρισμό με την βοήθεια χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (SEC), υδατανθράκων που απομονώθηκαν από μπάμιες και σαλέπι με την βοήθεια διαφορετικών μέσων εκχύλισης (θερμό οξικό νάτριο, θερμό διάλυμα EDTA και αραιό διάλυμα αλκάλειας).

## 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 2.1. Η Μπάμια

Η μπάμια (okra, gumbo, gombo) είναι ένα αγγειόσπερμο, ποώδες, ετήσιο φυτό, που ανήκει στο γένος *Hibiscus* και στην οικογένεια των *Malvaceae*. Προέρχεται από την Αφρική, αλλά καλλιεργείται και σε άλλες περιοχές όπως η Ασία, Μέση Ανατολή, Νότιο τμήμα των Η.Π.Α, Ελλάδα (Calisir et al., 2005 και Sengkhampan et al., 2010). Η επιστημονική ονομασία της είναι *Hibiscus esculentus* (L) Moench. Ο καρπός της μπάμιας χρησιμοποιείται ως λαχανικό, ενώ η βλέννη της ως πυκνωτικό μέσο σε σούπες και μαγειρεμένα φαγητά (BeMiller et al., 1993; Woolfe et al., 1977). Ακόμη, χρησιμοποιείται στην ιατρική ως διουρητικός παράγοντας καθώς και στην θεραπεία οδοντικών παθήσεων (Ndjouenkeu et al., 1996). Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι οι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες της μπάμιας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο του ασπραδιού του αυγού, ως υποκατάστατο λίπους σε μπισκότα σοκολάτας και σε κατεψυγμένα επιδόρπια σοκολάτας (Sengkhampan et al., 2010). Σχετικά πρόσφατη έρευνα των Agarwal et al., (2001), έδειξε ότι η βλέννη της μπάμιας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και στην επεξεργασία των λυμάτων αποχετεύσεων, καθώς βρέθηκε ότι είναι ένα πολύ αποτελεσματικό κροκιδωτικό μέσο που προκαλεί απομάκρυνση ~86 % των αιωρούμενων στερεών. Αυτές οι ιδιότητες θεωρείται ότι οφείλονται στην υψηλή περιεκτικότητα των καρπών τη μπάμιας σε πολυσακχαρίτες, που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υψηλού ιξώδους διαλύματος με βλεννώδη υφή, όταν οι καρποί της εκχυλίζονται με νερό.

Η σύνθεση των αδιάλυτων συστατικών σε αλκοόλη (AIS) της μπάμιας σε σάκχαρα παρουσιάζεται στον πίνακα 1 και αποτελούνται κυρίως από γλυκόζη (Glc) 44 %, γαλακτόζη (Gal) 17 % και γαλακτουρονικό οξύ (GalA) 16 %. Οι Deters et al., (2005), επιβεβαίωσαν τα ευρήματα των Lengsfeld et al., (2004), ότι οι πολυσακχαρίτες της μπάμιας συνίστανται από ραμνόζη, γαλακτόζη, γαλακτουρονικό οξύ, γλυκόζη και γλυκουρονικό οξύ. Ο Amin (1956) επίσης ανίχνευσε τα τρία πρώτα ζάχαρα και επιπρόσθετα την αραβινόζη. Οι Kelkar et al., (1962) μετά από υδρόλυση της βλέννης διαπίστωσαν την παρουσία γλυκόζης και γλυκοζαμίνης και προσδιόρισαν ποσοτικά έξι αμινοξέα. Οι Agarwal et al., (2001), αναφέρουν ότι το γαλακτουρονικό οξύ στους πολυσακχαρίτες της μπάμιας εμφανίζεται με L-διαμόρφωση. Η περιεκτικότητα των πολυσακχαριτών σε ακετύλια προσδιορίστηκε από τους Tomoda et al., (1980) σε 5.5 % (w/w), χωρίς να αναφέρεται όμως η ακριβής θέση των ακετυλομάδων μέσα στους πολυσακχαρίτες. Οι Lengsfeld et al., (2004), χρησιμοποιώντας χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, κατέληξαν ότι τα επιμέρους κλάσματα των πολυσακχαριτών που εκχυλίστηκαν με νερό, περιείχαν περισσότερη γαλακτουρονάνη σε σχέση με την ραμνογαλακτουρονάνη ως βασικό δομικό στοιχείο, ενώ οι διαδοχικές εκχυλίσεις του καρπού της μπάμιας έδειξαν ότι η μπάμια περιέχει διαφορετικούς τύπους πολυσακχαριτών όπως πηκτίνες, ξυλογλυκάνες, ξυλάνες και κυτταρίνες. Οι ρεολογικές ιδιότητες διαλυμάτων πολυσακχαριτών από μπάμιες έχουν μελετηθεί από τους Woolfe et al., (1977), Meister, et al., (1983) και Ndjouenkeu et al., (1996). Εκχυλίσματα πολυσακχαριτών με την χρησιμοποίηση θερμού οξικού νατρίου (HBSS) βρέθηκε να περιέχουν ραμνογαλακτουρονάνη I με υψηλό ποσοστό διακλάδωσης των μορίων, ενώ εκχυλίσματα θερμού EDTA (CHSS) βρέθηκε να περιέχουν πηκτίνη και μικρότερο ποσοστό ραμνογαλακτουρονάνης I (Sengkhampan, et al., 2009a). Ρεολογικές μετρήσεις υπό ταλάντωση (Oscillation) έχουν δείξει ότι



πυκνά διαλύματα HBSS είναι κυρίως ελαστικά, ενώ τα CHSS είναι ιξώδη (Sengkhampan *et al.*, 2010). Λόγω των ρεολογικών αυτών χαρακτηριστικών τους, οι πολυσακχαρίτες της μπάμιας παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην βιομηχανία τροφίμων ως πυκνωτικά μέσα, συστατικά που αυξάνουν το ιξώδες, ως ζελοποιητικοί παράγοντες ή συστατικά τροποποίησης της υφής σε προϊόντα όπως salad dressings, σάλτσες και υποκατάστατα μαγιονέζας.

Πίνακας 1: σύνθεση σε ζάχαρα των αδιάλυτων συστατικών σε αλκοόλη (AIS) της μπάμιας.

	Gal	Glc	GalA
AIS	17(10)	44(25)	16(14)
HBSS	34(3.2)	1(0.1)	35(4.0)
CHSS	17(0.6)	1(0)	63(3.0)
DASS	19(1.8)	4(0.4)	48(5.5)

Sengkhampan *et al.*, (2009b)

## 2.2. Το Σαλέπι

Η γνωστότερη χρησιμοποίηση του σαλεπιού είναι για την παρασκευή ενός ζεστού εύγεστου αρωματικού ροφήματος, καθώς και για την αύξηση του ιξώδους του παγωτού σε χώρες όπως η Τουρκία.

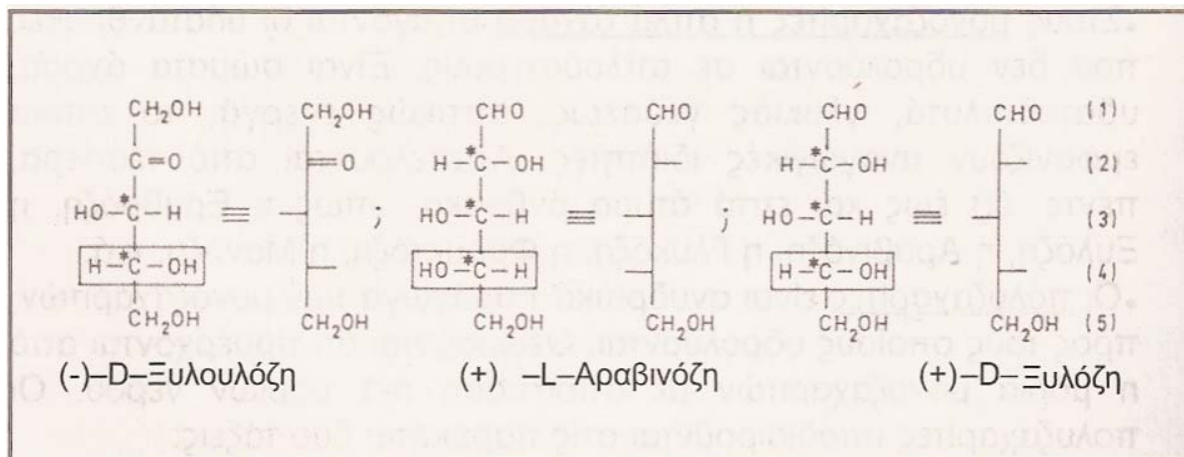
Η σύσταση του σαλεπιού περιλαμβάνει άμυλο 2-7 %, υγρασία 12 % και τέφρα 2.4 % (Kaya & Tekin, 2001). Το πιο ενδιαφέρον όμως συστατικό του σαλεπιού είναι η γλυκομαννάνη σε ποσοστό 16-55 %, η οποία δρά ως σταθεροποιητής και πυκνωτικό μέσο. Η γλυκομαννάνη αποτελεί τον κύριο πολυσακχαρίτη των εκχυλισμάτων του σαλεπιού και συνίσταται από μονάδες D-γλυκοπυρανόζης και D-μαννοπυρανόζης σε αναλογία 1:3.3 (Buchala, *et al.* 1974). Σε αντίθεση με άλλους σταθεροποιητές όπως το CMC, η καραγενάνη και το χαρουπάλευρο, των οποίων η επίδραση στις ρεολογικές ιδιότητες των τροφίμων έχει μελετηθεί επαρκώς, το σαλέπι δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα.

## 2.3. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες γενικά διακρίνονται σε (1) μονοσακχαρίτες οι οποίοι είναι πολυϋδροξυ-αλδεύδες (αλδόζες) ή κετόνες (κετόζες) με μια μη διακλαδισμένη αλυσίδα ανθρακατόμων (συνήθως 5-6) και (2) δι-, ολιγο- και πολυσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από δύο ή περισσότερους μονοσακχαρίτες που συνδέονται με Ο-γλυκοζιτικούς δεσμούς.

### 2.3.1. Μονοσακχαρίτες

Στους μονοσακχαρίτες υπάγονται οι υδατάνθρακες που δεν υδρολύονται σε απλούστερους. Είναι ουσίες άχρωμες, υδατοδιαλυτές, γλυκιάς γεύσης, οπτικώς ενεργές, με αναγωγικές ιδιότητες. Οι μονοσακχαρίτες είναι αλδεΐδες και κετόνες με ευθεία ανθρακική αλυσίδα, που φέρουν υδροξυλικές ομάδες σε όλα σχεδόν τα άλλα άτομα άνθρακα, εκτός από τις κετόνες που στη θέση 2 φέρουν καρβονύλιο. Ανάλογα με τον τύπο της καρβονυλο- ομάδας, οι μονοσακχαρίτες ταξινομούνται σε αλδόζες και κετόζες. Αποτελούνται από τέσσερα έως επτά άτομα άνθρακα όπως για παράδειγμα η ερυθρόζη, η ξυλόζη, η αραβινόζη, η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η μανόζη (σχήμα 1).



Σχήμα 1: παραδείγματα μονοσακχαριτών (Φουρτουνόπουλος, 2004)

### 2.3.2. Ολιγοζαχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες σχηματίζουν γλυκοζίτες. Όταν αυτό συμβαίνει μεταξύ της ομάδας της λακτόλης ενός μονοσακχαρίτη και οποιασδήποτε HO-ομάδας ενός δεύτερου μονοσακχαρίτη, παράγεται ένας δισακχαρίτης. Ενώσεις με μέχρι περίπου 10 μόρια μονοσακχαρίτη ονομάζονται ολιγοσακχαρίτες. Όταν δημιουργείται ένας γλυκοζιτικός δεσμός μόνο μεταξύ των ομάδων λακτόζης δύο μονοσακχαριτών, σχηματίζεται τότε ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης, και όταν μετέχουν μια ομάδα λακτόζης και μια αλκοολική HO-ομάδα, παράγεται αναγωγικός δισακχαρίτης. (Φουρτουνόπουλος, 2004).

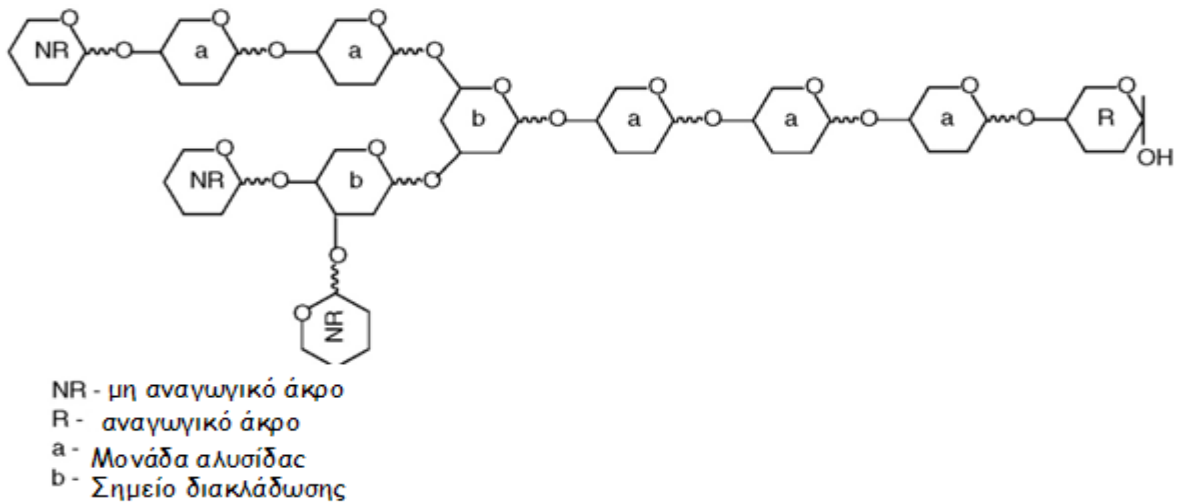
### 2.3.3. Πολυζαχαρίτες

Γλυκάνες είναι ο γενικός όρος που δίνεται στους πολυζαχαρίτες στους οποίους ένας μεγάλος αριθμός μονοζαχαριτών συνδέονται ο ένας με τον άλλο με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πολυζαχαρίτες μπορεί να είναι γραμμικά ή διακλαδισμένα μακρομόρια με εξαίρεση τους κυκλικούς πολυσακχαρίτες που είναι γνωστοί ως κυκλοαμυλόζες. Η αλυσίδα έχει καθορισμένο χαρακτήρα από το μη αναγωγικό άκρο σε ένα αναγωγικό άκρο (Σχήμα 2).

Ανάλογα με το είδος των μονομερών που παρουσιάζονται, οι πολυσακχαρίτες θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες.:

- Ομοπολυσακχαρίτες, αποτελούμενοι από μόνο ένα είδος μονοσακχαριτών

- Ετεροπολυσακχαρίτες, αποτελούμενοι από δύο ή περισσότερα είδη μονοσακχαριτών.



**Σχήμα 2:** Γενική δομή πολυσακχαριτών (Izydorczyk, 2005)

Οι ομοπολυσακχαρίτες χωρίζονται παραπέρα ανάλογα με τον (τους) τύπο (ους) των γλυκοζιτικών δεσμών που ενώνουν τις μονοσακχαριτικές μονάδες. Οι γλυκοζιτικοί δεσμοί μπορεί να έχουν είτε α- ή β- διαμόρφωση και διάφορες θέσεις όπως: α-1->2, α-1->3, ή β-1->2, β-1->3, β-1->4. Οι ομοιοπολυζαχαρίτες μπορούν να έχουν ομοιοπολικούς δεσμούς όσον αφορά την διαμόρφωση και/ή θέσεις των δεσμών. Οι ετεροπολυζαχαρίτες, εκτός από τα διάφορα είδη των μονοσακχαριτικών μονάδων, μπορούν να έχουν το ίδιο είδος πολύμορφων δεσμών σαν τους ομοιοπολυσακχαρίτες. Έτσι, οι ετεροπολυσακχαρίτες μπορούν να έχουν διαφορετικούς τύπους και ακολουθία μονοζαχαριτικών μονάδων όπως και διάφορους τύπους και ακολουθία γλυκοζιτικών δεσμών. Αυτό επιτρέπει μια σχεδόν ατελείωτη ποικιλομορφία στη δομή τους. Κάποιοι πολυσακχαρίτες, αποτελούνται μόνο από μονάδες σακχάρων και είναι γνωστοί ως ουδέτεροι πολυσακχαρίτες (αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη, κελουλόζη). Οι πολυσακχαρίτες που περιέχουν όξινα σάκχαρα στη δομή τους φέρουν αρνητικό φορτίο και ονομάζονται ανιονικοί πολυσακχαρίτες. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται συχνά για την κατηγοριοποίηση των πολυσακχαριτών βασίζεται στην προέλευσή τους (Izydorczyk, 2005).

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Ο βαθμός πολυμερισμού (DP), ο οποίος προσδιορίζεται από τον αριθμό των μονοσακχαριτών σε μια αλυσίδα, κυμαίνεται από εκατό μέχρι μερικές χιλιάδες. Ελάχιστοι πολυσακχαρίτες έχουν DP μικρότερο του 100. Οι πολυσακχαρίτες απαντώνται στη φύση και ως προϊόντα δράσης διάφορων βιοσυνθετικών ενζύμων και κατά συνέπεια, η σύνθεσή τους δεν γίνεται κάτω από αυστηρό και ακριβή γενετικό έλεγχο. Η πορεία βιοσύνθεσης για πολλούς πολυσακχαρίτες είναι γνωστή, αλλά ο μηχανισμός ελέγχου συγκεκριμένων βιοσυνθετικών γεγονότων, όπως η πυκνότητα και η κατανομή των διακλαδώσεων στις πολυσακχαριτικές αλυσίδες ή το μέγεθος των αλυσίδων, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένα (Izydorczyk, 2005).

Οι πολυσακχαρίτες είναι ευρέως διαδεδομένοι και άφθονοι στη φύση, εκπληρώνοντας ρόλους όπως:

- ❖ Σκελετικές ουσίες σχηματισμού δομής ( κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη στα φυτά, χιτίνη, βλεννοπολυζαχαρίτες στα ζώα.
- ❖ Αποθηκευτικές ουσίες αφομοίωσης (άμυλο, δεξτρίνες, ινουλίνη στα φυτά, γλυκογόνο στα ζώα)
- ❖ Ουσίες δέσμευσης νερού (άγαρ, πηκτίνη και άλατα αλγινικού οξέος στα φυτά, βλεννοπολυζαχαρίτες στα ζώα)

Πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται σε φυσική μορφή είτε τροποποιημένοι σε μεγάλη έκταση στη επεξεργασία τροφίμων (Πίνακας 2) ως πυκνωτικά ή πηκτωματογόνα μέσα (άμυλο, αλγινικά, πηκτίνη, κόμμι γκουάρ), σταθεροποιητές για γαλακτώματα και εναιωρήματα, για σχηματισμό υμενίων, ως ουσίες επικάλυψης για να προστατεύσουν τα ευαίσθητα τρόφιμα από ανεπιθύμητη μεταβολή και ως αδρανή υλικά πληρώσεως στη διατροφή (Andersson,2006). Οι χρήσεις των πολυσακχαριτών βασίζονται στις ιδιαίτερα μεταβλητές ιδιότητες τους και οι οποίες ποικίλουν από αδιάλυτες μορφές (κυτταρίνη) μέχρι εκείνες όπου εμφανίζουν καλή διογκωτική ικανότητα και διαλυτότητα σε ζεστό και κρύο νερό (άμυλο, κόμμι γκουάρ). Τα διαλύματα μπορεί να παρουσιάσουν χαμηλό ιξώδες ακόμη και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (αραβικό κόμμι), ή εξαιρετικά υψηλό ιξώδες ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (κόμμι γκουάρ). Ορισμένοι πολυσακχαρίτες, ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση, μπορεί να σχηματίσουν θερμοαναστρέψιμες πηκτές (αλγινικά, πηκτίνη) (Belitz et al., 2006).



Πίνακα: 2: παραδείγματα χρήσεων πολυσακχαριτών στα τρόφιμα (Belitz et al., 2006)

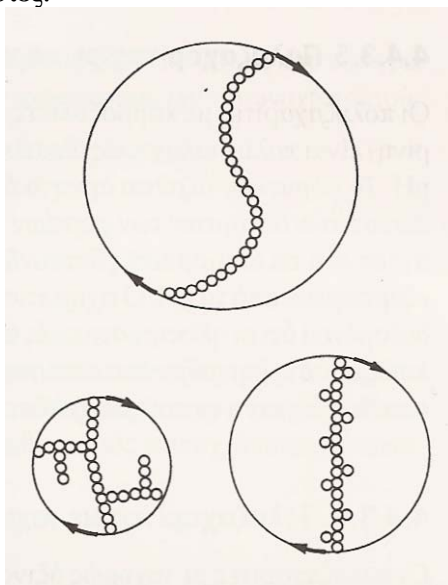
Πεδίο εφαρμογής/ τρόφιμο	Κατάλληλοι πολυσακχαρίτες
Σταθεροποίηση γαλακτωμάτων/ εναιωρημάτων σε συμπτυκνωμένο γάλα και σε σοκολατούχο γάλα	Καραγεννάνη, αλγινικά, πηκτίνη, Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη
Σταθεροποίηση γαλακτωμάτων σε προϊόν απομύησης γάλακτος στον καφέ, μαργαρίνες με χαμηλά λιπαρά	Καραγεννάνη
Προστασία παγωτού από την δημιουργία κρυστάλλων πάγου, από την πήξη, από τον διαχωρισμό φάσεων, βελτίωση της υφής (απαλή υφή)	Αλγινικά, καραγεννάνη, αгар, αραβικό κόμμι, τραγακανθινό κόμμι, κόμμι ξανθάνης, κόμμι γκουάρ, κόμμι αλεύρου σπόρων χαρουπιού, τροποποιημένα άμυλα, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, μεθυλοκυτταρίνη
Δέσμευση νερού, βελτίωση υφής, βελτίωση απόδοσης σε μαλακά τυριά, αλοιφόμενα τυριά, σκευάσματα τυριών	Αλγινικά, καραγεννάνη, αгар, τραγακανθινό κόμμι, κόμμι καράγια, κόμμι γκουάρ, κόμμι αλεύρου σπόρων χαρουπιού, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη
Αύξηση ιξώδους και ζελοποίηση γάλακτος σε πηκτές παρασκευασμένες με ή χωρίς θέρμανση, σε κρέμες για βελτίωση της υφής	Αλγινικά, καραγεννάνη, πηκτίνη, κόμμι γκουάρ, κόμμι αλεύρου σπόρων χαρουπιού, τροποποιημένα άμυλα, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη
Δέσμευση νερού, σταθεροποίηση γαλακτωμάτων σε κρεατοσκευάσματα (κορν μπιφ, λουκάνικα)	Αгар, κόμμι καράγια, κόμμι γκουάρ, κόμμι αλεύρου σπόρων χαρουπιού
Πηκτές προϊόντων κρέατος, ψαριών και λαχανικών	Αλγινικά, καραγεννάνη, αгар
Σταθεροποίηση και αύξηση του ιξώδους, παρεμπόδιση συναίρεσης, σταθερότητα κατάψυξης/ αποψύξης σε σούπες, αλοιφές (salad dressings), σάλτσες, μαγιονέζα, κέτσαπ, δημιουργία «σώματος» σε προϊόντα με χαμηλά λιπαρά και μικρή περιεκτικότητα σε άμυλο	Αλγινικά, τραγακανθινό κόμμι, κόμμι καράγια, κόμμι γκουάρ, κόμμι αλεύρου σπόρων χαρουπιού, αλγινική προπυλενογλυκόλη, τροποποιημένα άμυλα, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη
Σταθεροποίηση πρωτεϊνικού αφρού στο ζύθο, σε αναμιγμένη κρέμα, μφρέγκες, σε σοκολατούχα ζαχαρωτά (marshmallows)	Αλγινικά, καραγεννάνη, άгар, αραβικό κόμμι, κόμμι ξανθάνης, κόμμι καράγια
Παρεμπόδιση αναδιάταξης του αμύλου στο ψωμί και στα κέικς, δέσμευση νερού στην ζύμη	Αгар, καραγεννάνη, κόμμι γκουάρ, κόμμι αλεύρου σπόρων χαρουπιού, κόμμι ξανθάνης
Αύξηση του ιξώδους και ζελοποίηση πούλπας φρούτων (μαρμελάδες, ζελέδες, πούλπα φρούτων για παγωτό και γιαούρτη)	Αλγινικά, πηκτίνη
Ζελοποίηση ζαχαρωτών, ζελέ σε σχήματα καρπών, γλάσσο, ζελέδες επιδόρπια με βάση το νερό	Αλγινικά, καραγεννάνη, πηκτίνη, αгар, αραβικό κόμμι, τροποποιημένα άμυλα
Σταθεροποίηση αιωρήματος σε χυμούς φρούτων, πρόκληση δημιουργίας «σώματος» σε ποτά σε σκόνη	Αλγινικά, πηκτίνη, κόμμι ξανθάνης, κόμμι γκουάρ, αραβικό κόμμι, αλγινική προπυλενογλυκόλη, μεθυλοκυτταρίνη
Σταθεροποίηση γαλακτωμάτων κονιοποιημένων αρωμάτων, εγκλεισμό αρωματικών ενώσεων σε κάψουλες	Αραβικό κόμμι, κόμμι ξανθάνης, κόμμι γκάπτι

### 2.3.3.1. Τέλεια γραμμικοί πολυσακχαρίτες

Ενώσεις με μία *απλή* ουδέτερη δομική μονάδα μονοσακχαρίτη και με *έναν* τύπο δεσμού (όπως στη κυτταρίνη ή την αμυλόζη), ονομάζονται τέλεια γραμμικοί πολυσακχαρίτες. Είναι συνήθως αδιάλυτοι στο νερό και μπορούν να διαλυτοποιηθούν μόνο υπό έντονες συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία, με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου με *άλκαλι* ή άλλα κατάλληλα αντιδραστήρια). Μπορεί να κατακρημνιστούν δε, εύκολα από διαλύματα (αναδιάταξη του αμύλου). Οι μεγάλες διαφορές στις ιδιότητες μεταξύ των πολυσακχαριτών οφείλονται σε αλλαγές στη δομική τους μονάδα, τον τύπο του δεσμού ή το μοριακό τους βάρος (Belitz et al., 2006).

### 2.3.3.2. Διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες

Οι διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες (αμυλοπηκτίνη, γλυκογόνο) είναι περισσότερο διαλυτοί στο νερό από τα τελειώς γραμμικά αντίστοιχα τους, καθώς η αλληλεπίδραση αλυσίδας –αλυσίδας είναι λιγότερο έντονη και υπάρχει επιδιάλυτωση των μορίων σε μεγαλύτερη έκταση. Τα διαλύματα των διακλαδισμένων πολυσακχαριτών, μόλις ξηραθούν, επανευδατώνονται εύκολα. Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα γραμμικά τους με το ίδιο μοριακό βάρος και την ίδια συγκέντρωση, τα διαλύματα των διακλαδισμένων πολυσακχαριτών έχουν χαμηλότερο ιξώδες. Θεωρείται ότι το ιξώδες απεικονίζει τον *λειτουργικό όγκο* (effective volume) του μακρομορίου. Ο *λειτουργικός ή υδροδυναμικός όγκος* είναι ο όγκος μιας σφαίρας με διάμετρο που καθορίζεται από την πιο επιμήκη γραμμική έκταση του μορίου. Αυτοί οι όγκοι είναι γενικά μεγαλύτεροι για τα γραμμικά απ' ό τι για τα διακλαδισμένα μόρια (Σχήμα 3). Η τάση των διακλαδισμένων πολυσακχαριτών να κατακρημνίζονται είναι χαμηλή. Σχηματίζουν έναν κολλώδη πολτό στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, που πιθανώς οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις των πλευρικών αλυσίδων (εισχώρηση, περιπλοκή). Κατά συνέπεια, οι διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες είναι κατάλληλοι ως συγκολλητικές ουσίες.



Σχήμα 3: σχηματική απεικόνιση των «λειτουργικών όγκων» του γραμμικού, διακλαδισμένου και γραμμικά διακλαδισμένου τύπων πολυσακχαριτών (Belitz et al., 2006)

### **2.3.3.3. Γραμμικά διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες**

Οι γραμμικά διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες, δηλαδή πολυμερή σώματα με μεγάλη κεντρική αλυσίδα και με πολλές μικρές πλευρικές αλυσίδες, έχουν ιδιότητες που είναι συνδυασμός εκείνων των τέλεια γραμμικών και εκείνων των διακλαδισμένων μορίων. Η μακριά κεντρική αλυσίδα είναι υπεύθυνη για το υψηλό ιξώδες του διαλύματος. Η παρουσία πολυάριθμων μικρών πλευρικών αλυσίδων όμως αποδυναμώνει πολύ τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων, επηρεάζοντας την διαλυτότητα και το ρυθμό επανυδάτωσης των μορίων, καθώς και την σταθερότητα ακόμη και των ιδιαίτερα πυκνών διαλυμάτων (Belitz et al., 2006).

### **2.3.3.4. Πολυσακχαρίτες με καρβοξυλικές ομάδες**

Οι πολυσακχαρίτες που περιέχουν καρβοξυλικές ομάδες (πηκτίνη, αλγινικά, καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη) είναι πολύ διαλυτοί ως αλκαλικά άλατα ουδέτερο ή αλκαλικό pH. Τα μόρια εμφανίζονται αρνητικά φορτισμένα λόγω των καρβοξυλικών ανιόντων και λόγω των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των φορτίων τους, τα μόρια είναι σχετικά επιμήκη και αντιστέκονται σε διαμοριακές διασυνδέσεις. Το ιξώδες του διαλύματος είναι υψηλό και εξαρτάται από το pH. Ο σχηματισμός πηκτής ή η κατακρήμνιση συμβαίνει σε pH=3 δεδομένου ότι οι ηλεκτρικές απώσεις παύουν. Επιπλέον, οι αδιάστατες καρβοξυλικές ομάδες συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου. Εντούτοις, ένα δισθενές κατιόν απαιτείται για να επιτευχθεί ζελοποίηση σε ουδέτερο διάλυμα (Belitz et al., 2006).

### **2.3.3.5. Πολυσακχαρίτες με ισχυρώς όξινα ομάδες.**

Οι πολυσακχαρίτες με ισχυρώς όξινα μόρια, παρόντα ως εστέρες κατά μήκος των πολυμερικών αλυσίδων, είναι επίσης πολύ διαλυτοί στο νερό και σχηματίζουν πολύ ιξώδη διαλύματα. Αντίθετα από τους πολυσακχαρίτες που περιέχουν καρβοξυλικές ομάδες, τα διαλύματα αυτά, σε ισχυρώς όξινα μέσα είναι σταθερά (Belitz et al., 2006).

### **2.3.3.6. Τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες**

Η τροποποίηση των πολυσακχαριτών, ακόμη και σε έναν χαμηλό βαθμό υποκατάστασης, επιφέρει ουσιαστικές αλλαγές στις ιδιότητες τους (Belitz et al., 2006).

### **2.3.3.7. Σχηματισμός παραγώγων με ουδέτερους ή όξινους υποκαταστάτες**

Η διαλυτότητα στο νερό, το ιξώδες και η σταθερότητα των διαλυμάτων αυξάνονται με την ύπαρξη ουδέτερων υποκαταστατών στις αλυσίδες των γραμμικών πολυσακχαριτών. Μεγαλύτερος βαθμός υποκατάστασης αυξάνει την υδροφοβικότητα των μορίων και με αυτόν τον τρόπο, αυξάνει τη διαλυτότητά τους στους οργανικούς διαλύτες. Επίσης η σύνδεση όξινων ομάδων σε έναν πολυσακχαρίτη



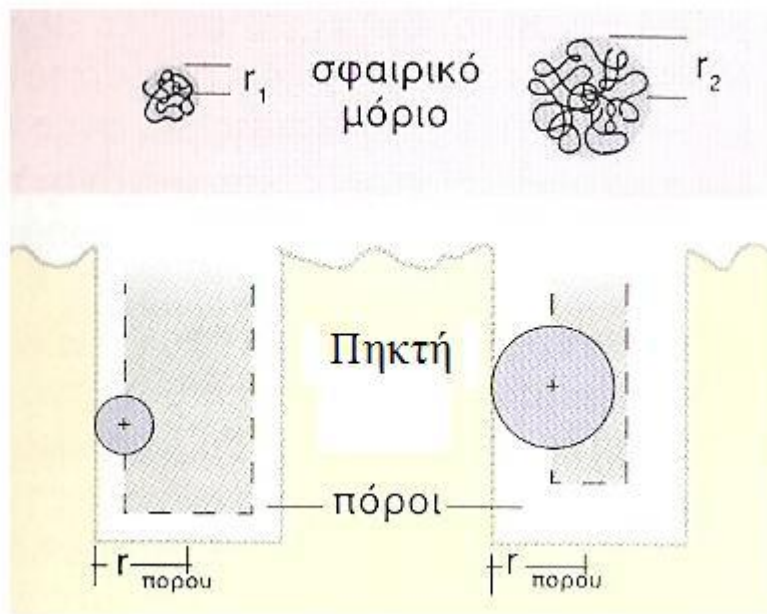
(καρβοξυμεθυλικές, θειϊκές ή φωσφορικές ομάδες) οδηγεί σε αυξημένη διαλυτότητα και ιζώδες (Belitz et al., 2006).

## 2.4. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size-exclusion chromatography), είναι μία τεχνική ιδιαίτερα εφαρμόσιμη μεταξύ άλλων για τον γρήγορο προσδιορισμό του μοριακού βάρους (MB), ή της κατανομής των MB μεγαλοπολυμερών και φυσικών προϊόντων, όπως για παράδειγμα για την ανάλυση συνθετικών και φυσικών πολυσακχαριτών (Gaborieau et al., 2008). Οι μέθοδοι αποκλεισμού μεγεθών υποδιαιρούνται σε χρωματογραφία διήθησης με πηκτή (*gel filtration*) και χρωματογραφία διέλευσης μέσω πηκτής (*gel permeation*). Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιεί υδατικούς διαλύτες και υδρόφιλα υλικά πλήρωσης της στήλης, ενώ η άλλη βασίζεται σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες και υδρόφοβα υλικά πλήρωσης της στήλης. Οι δύο μέθοδοι είναι συμπληρωματικές, αφού η μία εφαρμόζεται σε υδατοδιαλυτά δείγματα και η άλλη σε ουσίες διαλυτές σε λιγότερο πολικούς οργανικούς διαλύτες.

Τα υλικά πλήρωσης της στήλης, για την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελούνται από μικρά (~ 10 μm) σωματίδια πυριτίας ή πολυμερούς, που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων, μέσα από τους οποίους μπορούν να διαχέονται τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων (Σχήμα 4). Όσο βρίσκονται στους πόρους, τα μόρια είναι πρακτικώς παγιδευμένα και απομακρύνονται με το ρεύμα ροής της κινητής φάσης. Ο μέσος χρόνος παραμονής στους πόρους εξαρτάται από το πραγματικό των μορίων του αναλύτη. Μόρια, τα οποία είναι μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης, αποβάλλονται και δεν υφίστανται καμιά κατακράτηση. Τα μόρια αυτά εκλούνται πρώτα από την στήλη. Μόρια με διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους μπορούν να διεισδύουν ή να διαπεράσουν στο λαβυρινθώδες περιβάλλον τους και έτσι παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλούνται τελευταία από την στήλη. Μεταξύ αυτών των δύο περιπτώσεων υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από την διάμετρό τους. Η ομάδα των μορίων αυτών υφίσταται κλασμάτωση, η οποία σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων και εν μέρει με το σχήμα τους. Στην τεχνική αυτή δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και στατικής φάσης, ενώ υπάρχει ένα ανώτατο όριο χρόνου κατακράτησης, επειδή καμία ουσία δεν παραμένει περισσότερο από αυτές, που διαπερνούν πλήρως τους πόρους της στατικής φάσης (Schwedt, 1996).





Σχήμα 4: Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (Schwedt, 1996)

Ο συνολικός όγκος μιας στήλης με υλικό πλήρωσης πορώδες πολυμερές ή πυριτία δίνεται από την σχέση:

$$V_t = V_g + V_i + V_0 \quad (1)$$

Όπου:

$V_g$  ο όγκος που καταλαμβάνει το στερεό υλικό της πηκτής,

$V_i$  ο όγκος του διαλύτη που κατακρατείται μέσα στους πόρους της και

$V_0$  ο ελεύθερος όγκος γύρω και μεταξύ των σωματιδίων της πηκτής

Υποθέτοντας ότι δεν υπάρχει ανάμιξη ή διάχυση, το  $V_0$  παριστάνει επίσης τον θεωρητικό όγκο του διαλύτη, που απαιτείται για μεταφορά μέσω της στήλης όλων των μεγάλων μορίων των συστατικών του δείγματος, που δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους της πηκτής. Ωστόσο στην πραγματικότητα πραγματοποιείται σε κάποιο βαθμό και ανάμιξη και διάχυση, με αποτέλεσμα τα μη κατακρατούμενα συστατικά να εμφανιστούν στην έξοδο της στήλης σε μια Γκαουσιανή (Gaussian) ζώνη κατανομής με μέγιστο συγκέντρωσης σε όγκο εκλούσματος ίσο με  $V_0$ . Για τα συστατικά μικρού μεγέθους, που εισέρχονται ελεύθερα στους πόρους της πηκτής, τα μέγιστα των κορυφών στο άκρο της στήλης θα εμφανιστούν σε όγκο του υγρού εκλούσματος ίσο με  $(V_i + V_0)$ . Γενικά τα  $V_g, V_i$  και  $V_0$  βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους και έτσι, με την στήλη πηκτής πραγματοποιείται διαχωρισμός των μεγάλων μορίων ενός δείγματος από τα πολύ μικρά με ένα ελάχιστο όγκο του υγρού έκλουσης.

Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους είναι ικανά να μεταφέρουν ένα κλάσμα  $K$  του διαλύτη, που κατακρατείται στους πόρους. Ο όγκος εκλούσματος  $V_e$  των κατακρατούμενων μορίων είναι:

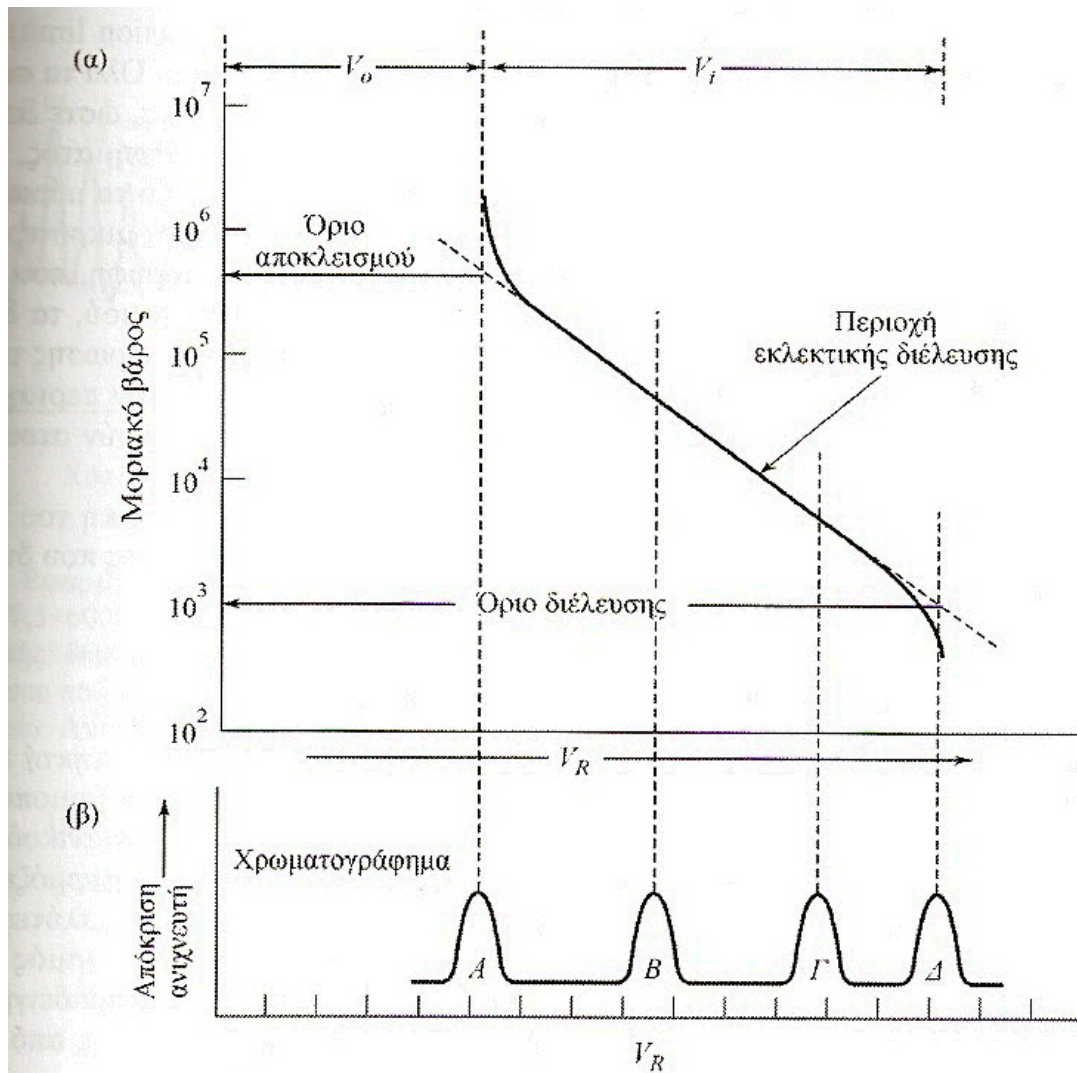
$$V_e = V_0 + KV_i \quad (2)$$

Η εξίσωση (2) εφαρμόζεται για κάθε διαλυμένη στο δείγμα ουσία, που βρίσκεται στην στήλη. Για πάρα πολύ μεγάλα μόρια, που δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους της πηκτής, θα είναι  $K = 0$  και επομένως  $V_e = V_0$ , ενώ για μόρια που μπορούν να εισέλθουν ανεμπόδιστα,  $K = 1$  και  $V_e = (V_0 + V_i)$ . Για την παραγωγή της εξίσωσης (2), υποτίθεται ότι δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση, όπως προσρόφιση των μορίων του δείγματος πάνω στην επιφάνεια των υλικών πλήρωσης. Όταν υπάρχει προσρόφιση αυξάνει η ποσότητα της διαλυμένης ουσίας, που ακινητοποιείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης. Για τα μικρά μόρια το  $K$  γίνεται μεγαλύτερο της μονάδας.

Η εξίσωση (2) μετασχηματίζεται στην:

$$K = (V_e - V_0) / V_i = C_S / C_M \quad (3)$$

Όπου  $K$  είναι ο συντελεστής κατανομής της διαλυμένης ουσίας. Οι τιμές του  $K$  κυμαίνονται από μηδέν, για ολικώς αποκλειόμενα μεγάλα μόρια, μέχρι την μονάδα για τα μικρά μόρια. Ο συντελεστής αυτός είναι χρήσιμη παράμετρος για την σύγκριση πειραματικών δεδομένων με διαφορετικά υλικά πλήρωσης στήλης. Η χρήσιμη περιοχή μοριακών βαρών για υλικά πλήρωσης στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών περιγράφεται εύκολα με μια καμπύλη βαθμονόμησης, όπως αυτή φαίνεται στο επάνω μέρος του Σχήματος 5 (Douglas et al 2005).



Σχήμα 5: (α) Καμπύλη βαθμονόμησης στήλης χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών, (β) Χρωματογράφημα που δείχνει την κορυφή Α, που οφείλεται σε όλες τις ενώσεις με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από τα όρια αποκλεισμού, τις κορυφές Β και Γ, που οφείλονται στις ενώσεις εντός περιοχής εκλεκτικής διέλευσης και τη Δ που οφείλεται σε όλες τις ενώσεις, που τα μόρια τους είναι μικρότερα από τα όρια διέλευσης (Douglas et al 2005).

Εδώ δίνεται διαγραμματικά η σχέση μοριακού βάρους του αναλύτη (το οποίο εξαρτάται άμεσα από το μέγεθος των μορίων του) σε συνάρτηση με τον όγκο κατακράτησης  $V_g$  που υπολογίζεται από το γινόμενο του χρόνου κατακράτησης και της ταχύτητας ροής. Το *όριο αποκλεισμού (exclusion limit)* καθορίζει το MB ενός σωματιδίου, μετά το οποίο δεν υπάρχει καμία κατακράτηση. Όλα τα σωματίδια, που έχουν μεγαλύτερο MB από το όριο αποκλεισμού, είναι τόσο μεγάλα, ώστε δεν μπορούν να κατακρατηθούν και εμφανίζονται όλα μαζί σε μια κορυφή Α του χρωματογραφήματος που δείχνεται στο Σχήμα 5. Το *όριο διέλευσης* είναι το MB, κάτω από το οποίο τα μόρια του αναλύτη μπορούν να εισχωρήσουν εντελώς στους πόρους. Όλα τα μόρια με MB μικρότερο από το όριο διέλευσης, είναι τόσο μικρά, ώστε εκλύονται όλα αργότερα και δίνουν μια κορυφή που συμβολίζεται με Α. Όσο το MB γίνεται όλο και μικρότερο από το όριο αποκλεισμού, τα διαλυτά μόρια παραμένουν κατά μέσο όρο περισσότερο χρόνο στους πόρους των σωματιδίων πλήρωσης της στήλης και έτσι κινούνται προοδευτικά πιο αργά. Κλασμάτωση

πραγματοποιείται μόνο στην περιοχή εκλεκτικής διέλευσης, όπου και εμφανίζονται κορυφές στο χρωματογράφημα, που αντιστοιχούν στους αναλύτες **B** και **Γ** (Σχήμα 5) (Douglas et al 2005).

## 2.5. ζ- Δυναμικό

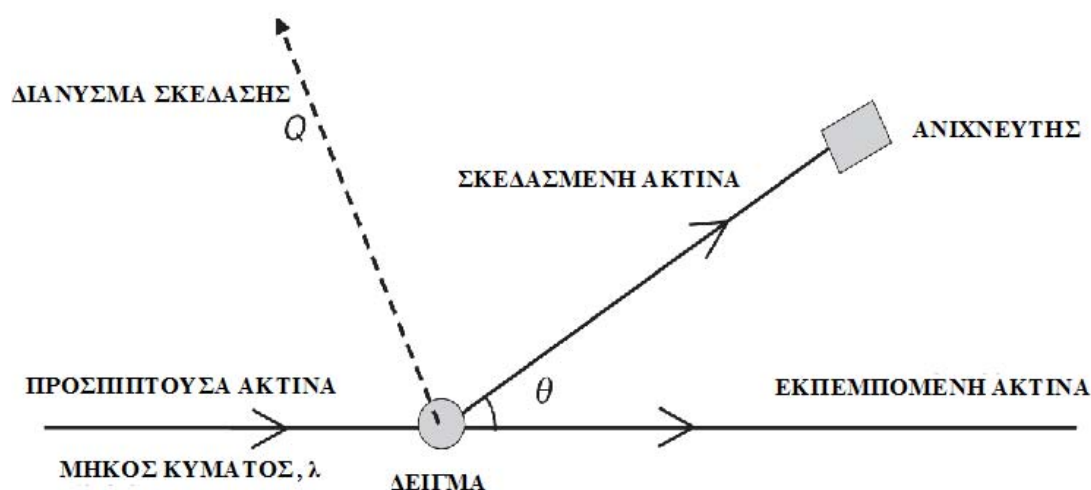
Από πρακτική άποψης στα κολλοειδή, σημασία έχει το δυναμικό  $\psi$  που έχει το σωματίδιο που κινείται σε ρευστό. Το δυναμικό αυτό σχετίζεται επιπλέον με τη διατμητική ροή του ρευστού, εφαπτομενικά στο σωματίδιο και ονομάζεται ζ-δυναμικό (zeta potential). Το ζ-δυναμικό χρησιμοποιείται κατά κόρον (παρά το δύσκολο ορισμό του) καθώς η πειραματική του μέτρηση είναι σχετικά εύκολη (μέτρηση της κινητικότητας σε ηλεκτρικό πεδίο) (Ριτζούλης Χ. 2011).

## 2.6. Δυναμική σκέδαση του φωτός

Η αρχή της σκέδασης του φωτός είναι απλή. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6 μια μονοχρωματική ακτίνα προσπίπτει στο δείγμα.

Η ένταση της σκεδασμένης ακτινοβολίας μετράται ως συνάρτηση της γωνίας σκέδασης, την οποία ονομάζουμε  $\theta$ , άλλα εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει και άλλος τρόπος έκφρασης. Παρόλα αυτά η σημαντική μεταβλητή είναι το διάνυσμα σκέδασης,  $Q$ , του οποίου το μέγεθος είναι συσχετισμένο με τη γωνία σκέδασης και του μήκους κύματος:

$$Q = \frac{4\pi \sin \theta / 2}{\lambda}$$



Σχήμα 6: σχηματική αναπαράσταση της σκέδασης του φωτός.

Η σκέδαση φωτός έχει χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες για τον προσδιορισμό των μεγεθών των σωματιδίων. Η ένταση της διάχυση του

φωτός από το εναιώρημα των «μικρών» σωματιδίων (π.χ. διάμετρος των σωματιδίων << μήκος κύματος) καθορίζεται από:

$$I(Q) = k c M (1 + \cos^2 \theta)$$

Όπου:

c: η συγκέντρωση,

M: η μοριακή μάζα των σωματιδίων,

k: μια συλλογή σταθερών,

$1 + \cos^2 \theta$ : ο παράγοντας πόλωσης.

Ο συντελεστής πόλωσης είναι αποτέλεσμα της φύσης της διαδικασίας της σκέδασης και συνήθως αντικαθιστάται από μια πειραματική τιμή. Περιέχει πολύ λίγες πληροφορίες για το δείγμα. Το ενδιαφέρον άλλα και περίεργο είναι ότι ο παράγοντας  $k$  περιέχει την αντίστροφη τέταρτη δύναμη του μήκους κύματος του φωτός που σημαίνει ότι μικρά μήκη κύματος σκεδάζονται πολύ περισσότερο απ' ό,τι τα μεγάλα.

Για σωματίδια μεγέθους μικρότερα από 0,01 μm χρησιμοποιείται η δυναμική σκέδαση του φωτός. Η δυναμική σκέδαση του φωτός βασίζεται στο γεγονός ότι τα διεσπαρμένα σωματίδια κινούνται με διάχυση. Όταν ένα σωματίδιο διαχέεται από ένα φωτόνιο του φωτός, υπάρχει μία μικρή ανταλλαγή ενέργειας ανάμεσα στο φωτόνιο και το σωματίδιο. Το σωματίδιο μπορεί να χάσει ή να αποκτήσει ενέργεια από το φωτόνιο και η ενέργεια του φωτονίου μετατοπίζεται αναλόγως. Είναι η ίδια διαδικασία (μετατόπιση συχνότητας, φαινόμενο Doppler), που χρησιμοποιείται στα ραντάρ, «παγίδες», που μετράνε την ταχύτητα. Η συχνότητα του ραντάρ αλλάζει λόγω της αντανάκλασης από το κινούμενο όχημα.

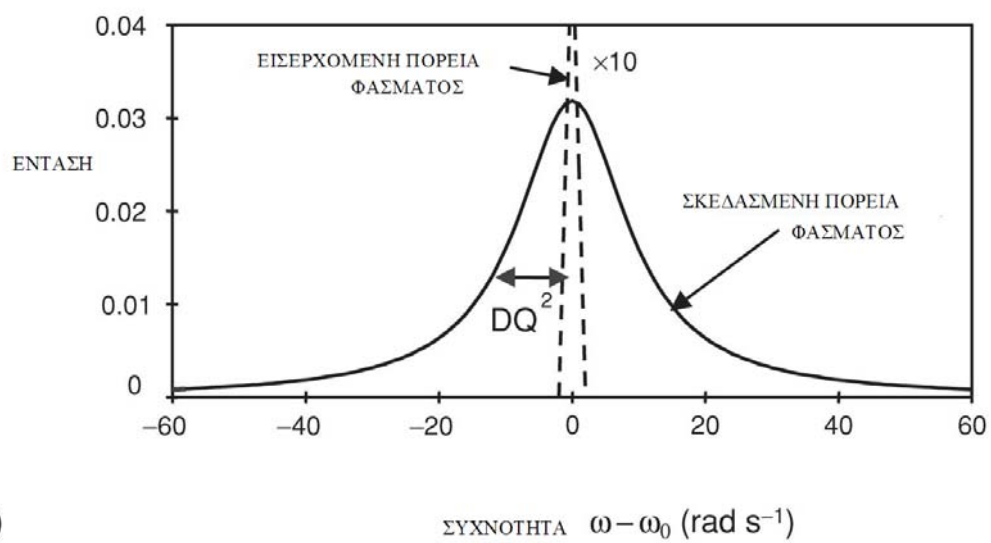
Η μέτρηση του φάσματος της σκέδασης του φωτός γίνεται με την τεχνική φασμασκοπίας συσχέτισης φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS). Εάν το εισερχόμενο φάσμα είναι μονοχρωματική ακτίνα με συχνότητα  $\omega_0$ , τότε το φάσμα από ένα κolloειδές, έχει γενικά ένα λορεντζιανό (Lorentzian) σχήμα και το πλάτος της καμπύλης προσδιορίζεται από το συντελεστή διάχυσης του σωματιδίου,  $D$ , πολλαπλασιασμένο με το  $Q^2$  όπως φαίνεται στο σχήμα 7.

$$I(\omega) \propto \frac{DQ^2}{(\omega - \omega_0)^2 + DQ^2}$$

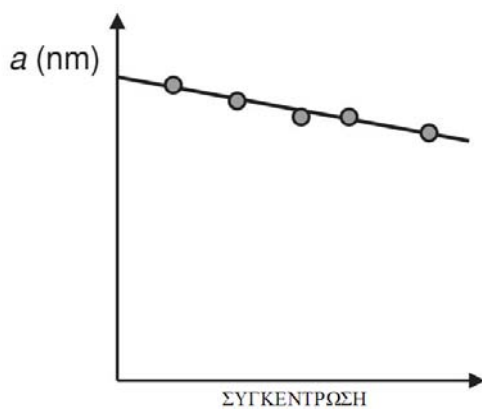
Η υδροδυναμική ακτίνα,  $a$ , μπορεί να υπολογιστεί από το συντελεστή διάχυσης χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes–Einstein, υπό τον όρο ότι το ιξώδες του διαλύτη,  $\eta$ , είναι γνωστό:

$$a = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

αφού ο συντελεστής διάχυσης επηρεάζεται από το σωματίδιο – αλληλεπιδράσεις σωματιδίων, όπως και από την ταχύτητα διεύθυνσης, είναι απαραίτητο να αναχθεί η υδροδυναμική ακτίνα σε μηδενική συγκέντρωση.



(a)



(b)

Σχήμα 7: (α) απορροφημένο και διεσπαρμένο φάσμα για τη δυναμική σκέδαση του φωτός, (β) αναγωγή υδροδυναμικής ακτίνας σε μηδενικό φορτίο. (Cosgrove et al. 2005).

### **3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

Ο χαρακτηρισμός των πολυσακχαριτών της μπάμιας και του σαλεπιού, ως προς το μέσο μοριακό τους βάρος και το ζ-δυναμικό, οι οποίοι παραλήφθηκαν με τρία διαφορετικά μέσα εκχύλισης και να γίνει η απομόνωση τους.

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

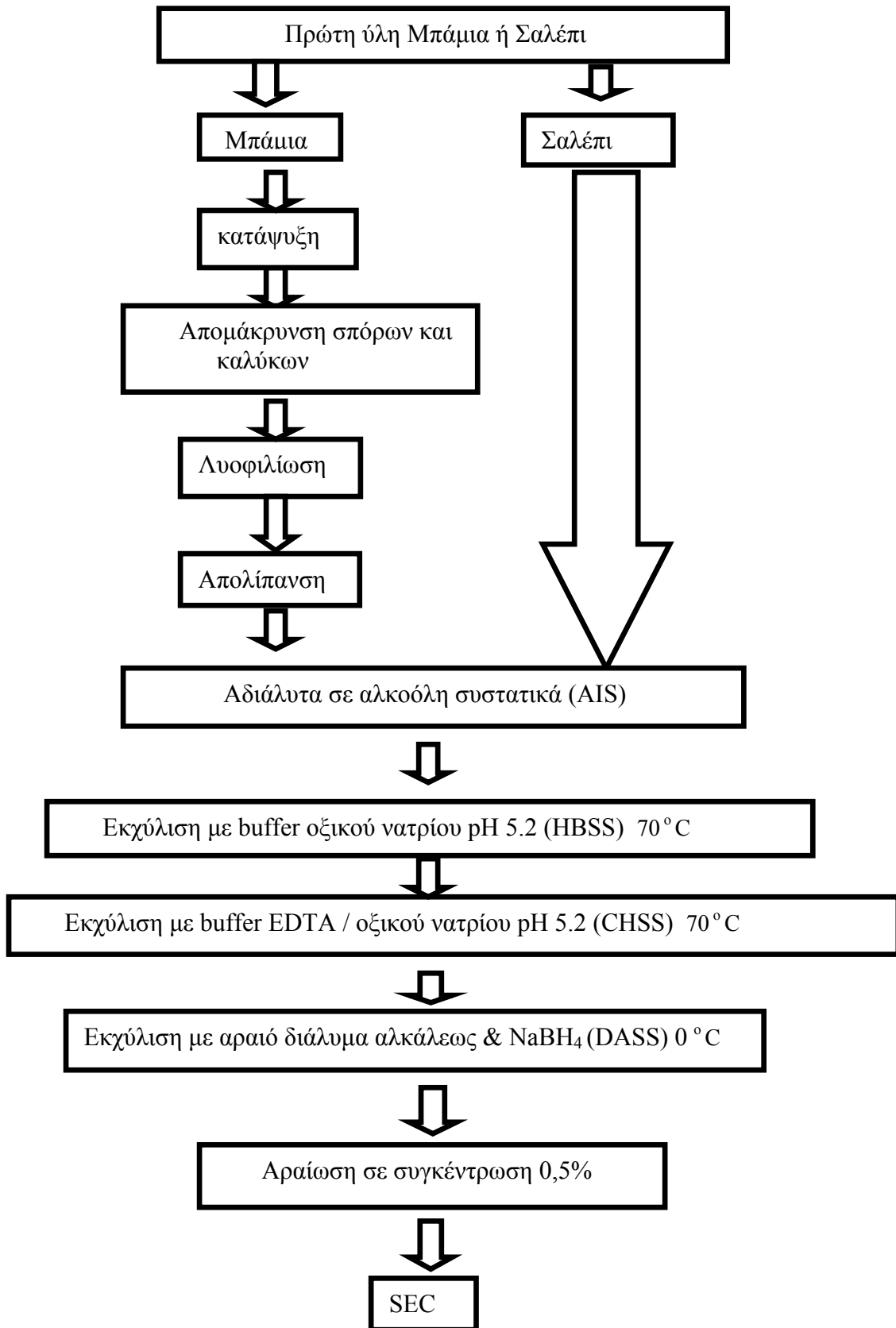
### 4.1. Πρώτη ύλη

Το αποξηραμένο και λεπτοαλεσμένο σαλέπι ήταν δωρεά της εταιρίας «Σαλέπι Όλυμπος» (Νικολαΐδης, Θεσσαλονίκη), ενώ οι μπάμιες ήταν προέλευσης Μελίκης Ημαθίας και η προμήθειά τους έγινε από την τοπική αγορά. Μετά την παραλαβή τους, οι μπάμιες συσκευάστηκαν σε πλαστικές σακούλες και καταψύχθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Μετά την απόψυξη κάθε παρτίδας, απομακρύνθηκαν οι μίσχοι και οι σπόροι από την σάρκα, η οποία στην συνέχεια λυοφιλοποιήθηκε στους  $-15^{\circ}\text{C}$  για 24 h στον λυοφιλοποιητή του Βιομηχανικού Εργαστηρίου (Christ A-4, Osterode, Germany).



## 4.2. Πορείας εργασίας

Η πορεία εργασίας που ακολουθήθηκε δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 8: Πορεία εργασίας

## 4.3. Υλικά και Μέθοδοι

### 4.3.1. Υλικά

Το νατραζίδιο (S 8032) ήταν της Sigma (St Louis, MO) και τα πρότυπα διαλύματα πολυσακχαριτών της Fluka Bio Chemika (1364636 54207088 Switzerland), με MB 1000, 5000, 12.000, 80.000, 150.000, 270.000, 410.000, 670.000). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο.

### 4.3.2 Συσκευές

Η διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPSEC) που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από σύστημα απαέρωσης (SCM 1000, Thermo Separation Products, San Jose, CA), μία αντλία (Spectra System P 2000, Thermo Separation Products, San Jose, CA), ακολουθούμενη από προστήλη GPC/SEC PL-Aquagel-OH 50 (8 mm) (Varian Inc, Palo Alto, CA), δύο στήλες GPC/SEC PL-Aquagel-OH 300 (7.5 mm) (Varian Inc, Palo Alto, CA) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης ERC 7515 (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη). Το λογισμικό EZChrom ήταν της Scientific Software Inc, (Pleasanton, CA). Τα κλάσματα (fractions) που αντιστοιχούσαν σε κάθε κορυφή συλλεγόταν με την βοήθεια συλλέκτη (Foxy Jr, Isco Inc, Lincoln, NE) που ήταν συνδεδεμένος με την χρωματογραφική διάταξη.

Το μέγεθος των σωματιδίων και το ζ-δυναμικό προσδιορίστηκαν με την συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern, Worcestershire, United Kingdom). Το μοντέλο αυτό είναι εξοπλισμένο με ένα λέιζερ μήκους κύματος 633nm και ανιχνευτή με θέση γωνίας 173° για την μέτρηση της μη επεμβατικής διάχυσης με κινούμενα οπτικά (τεχνολογία NIBS). Το πλεονέκτημα της εν λόγω διάταξης (173°) είναι ότι, σε αντίθεση με τις διατάξεις που μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός στις 90°, η πολλαπλή σκέδαση είναι ελάχιστη και κατά συνέπεια μπορούν να μετρηθούν πυκνά (μη-αραιωμένα) δείγματα. Ο δείκτης διάθλασης 1,46 χρησιμοποιήθηκε για τη διεσπαρμένη φάση, θεωρώντας ότι οι διαλυμένοι πολυσακχαρίτες είναι ενυδατωμένα συστήματα. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του ζ-δυναμικού.

### 4.3.3 Μέθοδοι

#### 4.3.3.1 Απολίπανση δειγμάτων

Η απολίπανση της λυοφιλοποιημένης σάρκας της μπάμιας γινόταν σε αυτόματη συσκευή Soxhlet (Velp Scientifica, Mod 148, Μιλάνο, Ιταλία) με πετρελαϊκό αιθέρα (σ.ζ. 40°–65°C), ενώ τα δείγματα του σαλεπιού χρησιμοποιήθηκαν χωρίς απολίπανση.

#### 4.3.3.2 Αδιάλυτα σε αλκοόλη συστατικά (AIS)

Τα απολιπασμένα δείγματα (20 g) εκχυλίζονταν με αιθυλική αλκοόλη 70% (κ.ο) στους 40 °C για 1 h (2 φορές × 300 mL). Μετά την διήθηση σε χωνί Buchner, ακολουθούσε έκπλυση του στερεού υπολείμματος με ακετόνη (2 φορές × 150 mL)

και ξήρανσή του στον αέρα για 24 h (Alcohol-Insoluble Solids). Τα δείγματα παρέμεναν συσκευασμένα υπό κενό μέχρι την παραπέρα ανάλυσή τους.

#### 4.3.3.3 Διαδοχική εκχύλιση των αδιάλυτων σε αλκοόλη συστατικών (AIS)

Η παραλαβή των πολυσακχαριτών από τα AIS γινόταν σύμφωνα με την μέθοδο των Vierhuis *et al.* (2000), όπως αυτή τροποποιήθηκε για τις μπάμιες από τους Sengkhampan *et al.*, (2009b). Συγκεκριμένα, 20 g λυοφιλοποιημένων και απολιπασμένων AIS δειγμάτων σάρκας, εκχυλίζονταν κάθε φορά διαδοχικά με την βοήθεια 600 mL από τα παρακάτω αντιδραστήρια: (α) ρυθμιστικό διάλυμα Οξικού Νατρίου 0.05 M, pH 5.2 (τρεις φορές) στους 70 °C για 30 min (**Hot Buffer Soluble Solids, HBSS**), (β) διάλυμα EDTA 0.05 M και Οξικού Νατρίου 0.05 M σε Οξαλικό Νάτριο 0.05 M, pH 5.2 (τρεις φορές) στους 70 °C για 30 min (**Chelating Agent Soluble Solids, CHSS**) και (γ) διάλυμα Υδροξειδίου του Νατρίου 0.05 M και Βοροϋδριδίου του Νατρίου (NaBH<sub>4</sub>) 20 mM (δύο φορές) στους 0° C για 30 min (**Diluted Alkali Soluble Solids, DASS**). Μετά από κάθε εκχύλιση, το διαλυτοποιημένο πολυμερές (πολυσακχαρίτες) διαχωριζόταν από το αδιάλυτο υπόλειμμα με φυγοκέντρηση (5000g X 25 min) και στη συνέχεια λυοφιλοποιούνταν.

#### 4.3.3.4. Μέθοδος χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC)

Από τα λυοφιλοποιημένα δείγματα κάθε κλάσματος (HBSS, CHSS, DASS) παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0.5% β/β (30 mL) με απιονισμένο νερό στο οποίο είχε προστεθεί νατραζίδιο 25 mmole. Ποσότητα δείγματος (2,5 mg mL<sup>-1</sup>) εκλούστηκε με υπερκαθαρό νερό που περιείχε 0.02% νατραζίδιο με ροή 1mL min<sup>-1</sup>. Μετά την πρώτη έκλουση του κάθε δείγματος από τα HBSS, CHSS και DASS από το χρωματογράφο σημειωνόταν οι χρόνοι εμφάνισης της κάθε κορυφής - πολυσακχαρίτη και έπειτα γινόταν η ρύθμιση του συλλέκτη κλασμάτων στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα ώστε να συλλέγει σε ξεχωριστά δοχεία τη κάθε κορυφή με ροή 0,01ml/min. Για την παραλαβή επαρκούς ποσότητας από κάθε πολυσακχαρίτη, το κάθε δείγμα εκλουζόταν από το χρωματογράφο (5-6 φορές). Τα κλάσματα τα οποία συλλέχτηκαν από το κλασματικό συλλέκτη λυοφιλοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του ζ-δυναμικού και της υδροδυναμικής ακτίνας. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1 Πρότυπα διαλύματα

Τα μοριακά βάρη των επιμέρους συστατικών των κλασμάτων υπολογίσθηκαν με βάση το χρόνο έκλουσης γραμμικών δεξτρινών γνωστού μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα μοριακού βάρους 1, 5, 12, 80, 150, 270, 410 και 670 kDa. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α.

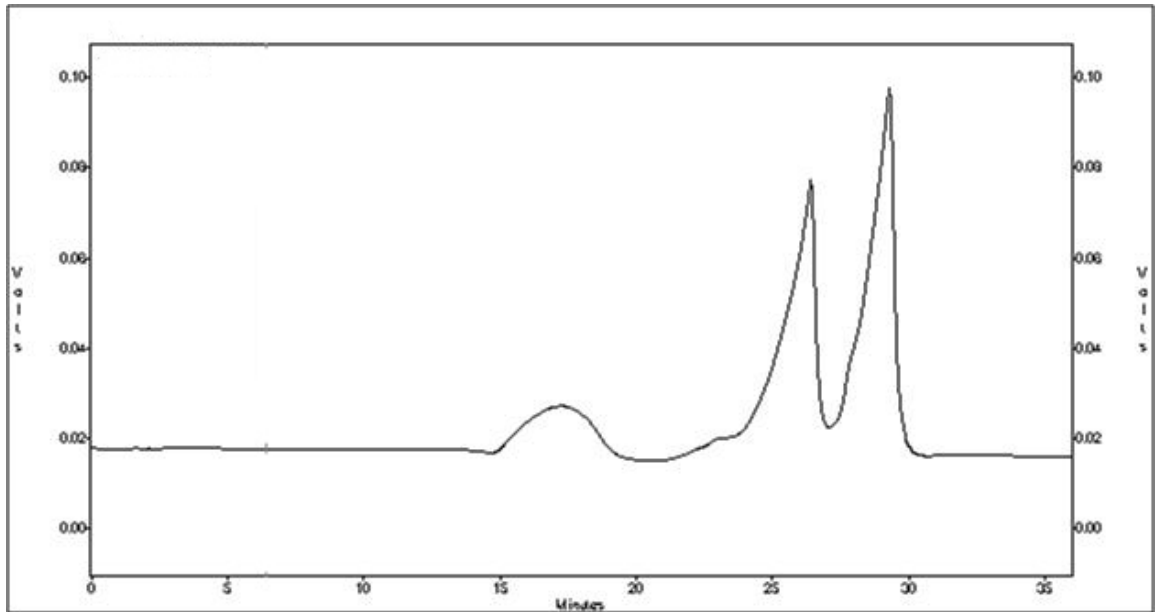
### 5.2. Χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων της μπάμιας

Τα εκχυλίσματα HBSS παρουσιάζουν τρεις κορυφές (σχήμα 9). Οι κορυφές από την πρώτη προς την τελευταία, ανταποκρίνονται σε χρόνους ισοδύναμους με τους χρόνους έκλουσης γραμμικής δεξτράνης με μοριακό βάρος 670 kDa, ~5 kDa και 1 kDa αντίστοιχα, με ζ-δυναμικό  $-16 \pm 0,53$  mV και  $-11.3 \pm 1.18$  mV αντίστοιχα (ως μικρομόρια, δεν μπορεί να ορισθεί ζ-δυναμικό στις οντότητες που απαρτίζουν την κορυφή του 1 kDa). Οι Georgiadis et al. (2011) σε παρόμοιο εκχύλισμα ανίχνευσαν πέντε κορυφές που αντιστοιχούσαν σε πληθυσμούς πολυμερών με μοριακό βάρος  $>1.4$  MDa, ~50 kDa, ~10 kDa, ~5 kDa και ~1 kDa.

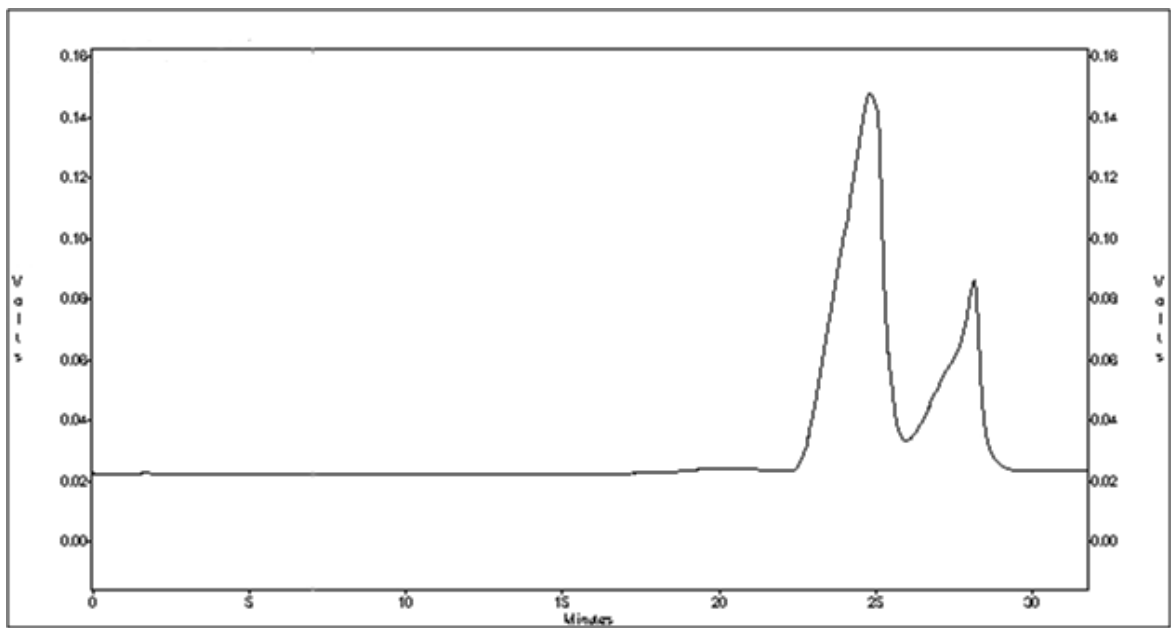
Τα εκχυλίσματα CHSS παρουσιάζουν δύο κορυφές (σχήμα 10). Ο χρόνος έκλουσης της πρώτης κορυφής ανταποκρίνεται σε δεξτράνη εύρους 50 kDa – 12 kDa και ζ-δυναμικό  $-21.9 \pm 1,09$  mV, ενώ η δεύτερη ανταποκρίνεται σε δεξτράνη 1 kDa. Οι Georgiadis et al. (2011) ανίχνευσαν τρεις κορυφές με ~60 kDa, ~12 kDa και 1 kDa.

Το εκχύλισμα DASS απέδωσε 5 κορυφές (σχήμα 11), εκ των οποίων η πρώτη ανταποκρίνεται στο χρόνο έκλουσης δεξτράνης με μοριακό βάρος εύρους 410 kDa – 80 kDa και ζ-δυναμικό  $-5.43 \pm 0.98$  mV, η δεύτερη κορυφή ανταποκρίνεται σε δεξτράνη με μοριακό βάρος εύρους 80 kDa – 12 kDa και ζ-δυναμικό  $-12.2 \pm 1.33$  mV, η τρίτη κορυφή σε δεξτράνη με μοριακό βάρος εύρους 12 kDa – 5 kDa και ζ-δυναμικό  $-0.384 \pm 0.47$  mV, η τέταρτη κορυφή σε μοριακό βάρος εύρους 5 kDa – 1 kDa και ζ-δυναμικό  $-17.2 \pm 1.56$  mV και τέλος η πέμπτη κορυφή σε μοριακό βάρος 1 kDa.

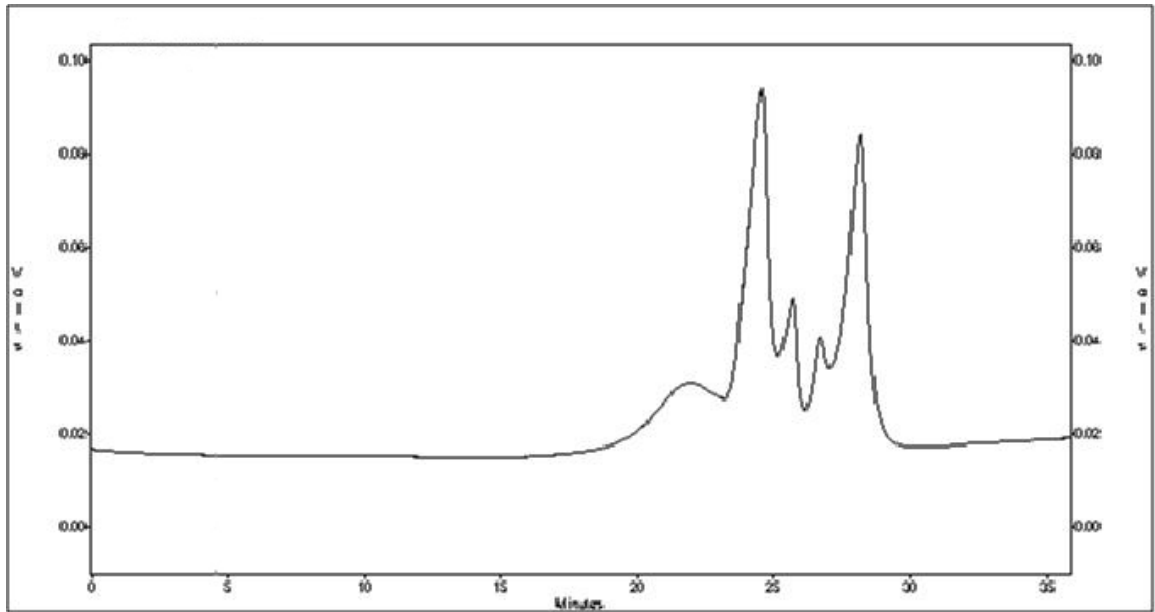
Στο σχήμα 12 παρουσιάζεται η κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας των συστατικών του HBSS, CHSS και DASS, όπως λήφθηκε με αραιώση και εξετάστηκε με τη χρήση δυναμικής σκέδασης του φωτός. Το εκχύλισμα HBSS αποτελείται από τρεις διακριτούς πληθυσμούς σωματιδίων, ~1000 nm, ~20 nm και ~3nm. Το εκχύλισμα CHSS αποτελείται από δύο διακριτούς πληθυσμούς: ~100nm και ~10nm, ενώ το εκχύλισμα DASS από 2 διακριτούς πληθυσμούς: ~110nm και ~20nm.



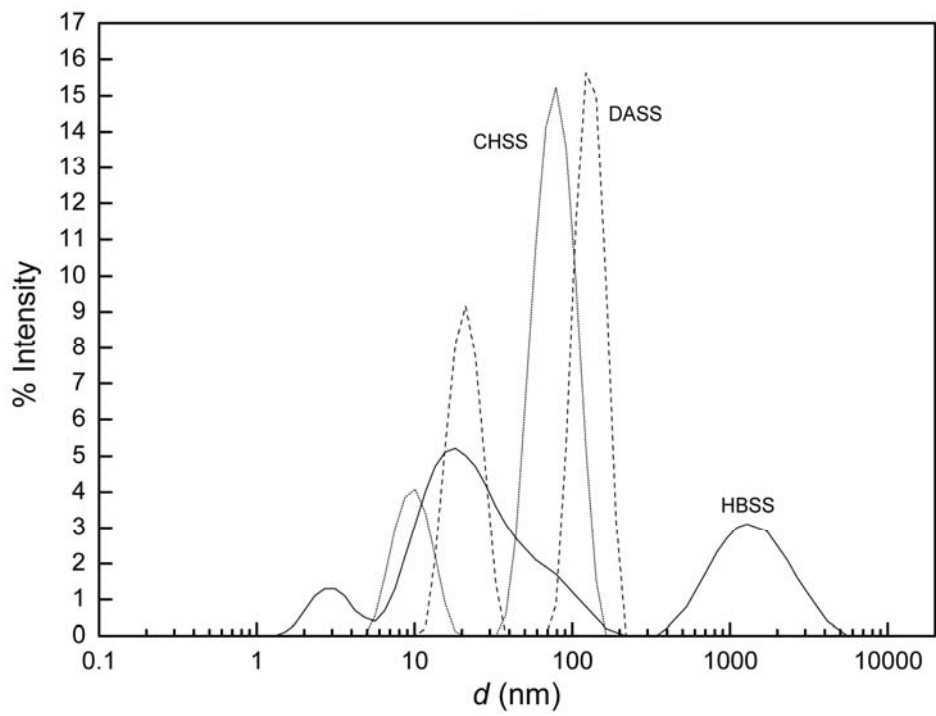
Σχήμα 9: χρωματογράφημα HBSS εκχυλίσματος μπάμιας



Σχήμα 10: χρωματογράφημα CHSS εκχυλίσματος μπάμιας.



Σχήμα 11: χρωματογράφημα DASS εκχυλίσματος μπάμιας.



Σχήμα 12: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων των εκχυλισμάτων HBSS CHSS και DASS μπάμιας.

### 5.3. Χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων του σαλεπιού

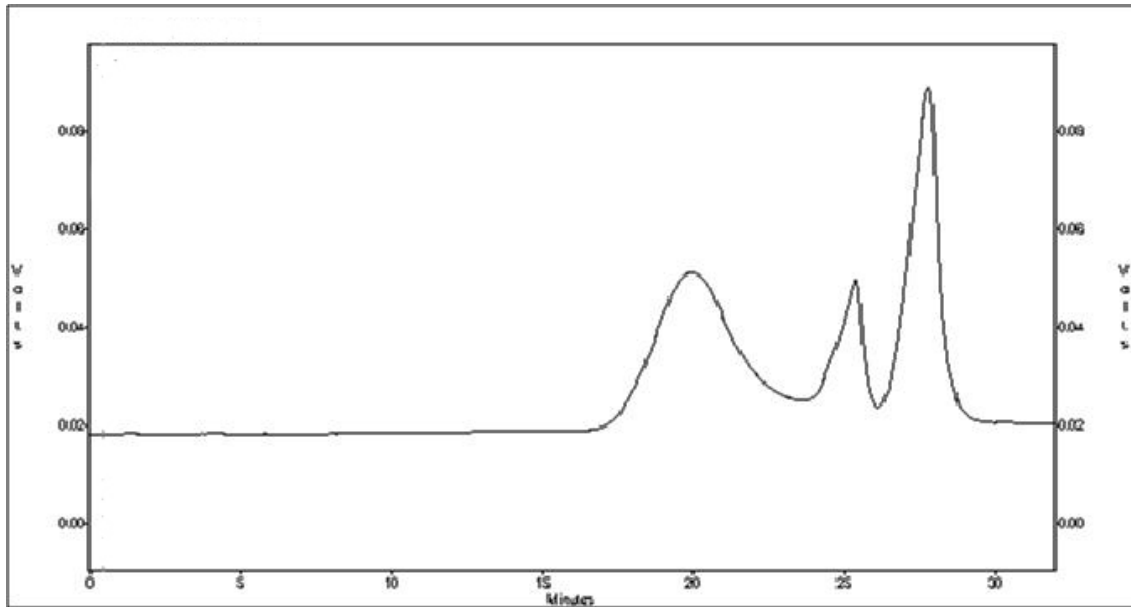
Τα εκχυλίσματα HBSS εμφανίζουν 3 κορυφές (σχήμα 13) που σύμφωνα με την σειρά έκλουσής τους αντιστοιχούν σε χρόνους γραμμικής δεξτράνης με μοριακά βάρη εύρους 600 kDa- 700 kDa, ~50 kDa, 12 kDa και ζ-δυναμικό  $-17,84 \pm 0,47$  mV,  $-11,16 \pm 1,08$  mV και  $-6,63 \pm 2,00$  mV αντίστοιχα.

Τα εκχυλίσματα CHSS εκλούνται σε 2 κορυφές (σχήμα 14) από τις οποίες η πρώτη ήταν πεπλατισμένη και προφανώς ανταποκρίνεται σε μακρομόρια ευρείας κατανομής μοριακού βάρους. Οι χρόνοι έκλουσης αντιστοιχούν σε δεξτράνη με μοριακό βάρος  $> 50$  kDa και 1 kDa. Το ζ-δυναμικό της πρώτης κορυφής ήταν  $-12,87 \pm 1,82$  mV, ενώ η δεύτερη κορυφή είναι πολύ μικρή για κolloειδή οντότητα με συνέπεια να μην είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός του. Το εκχύλισμα DASS δεν απέδωσε κορυφές σημαντικές πάνω από 1kDa (Σχήμα 15).

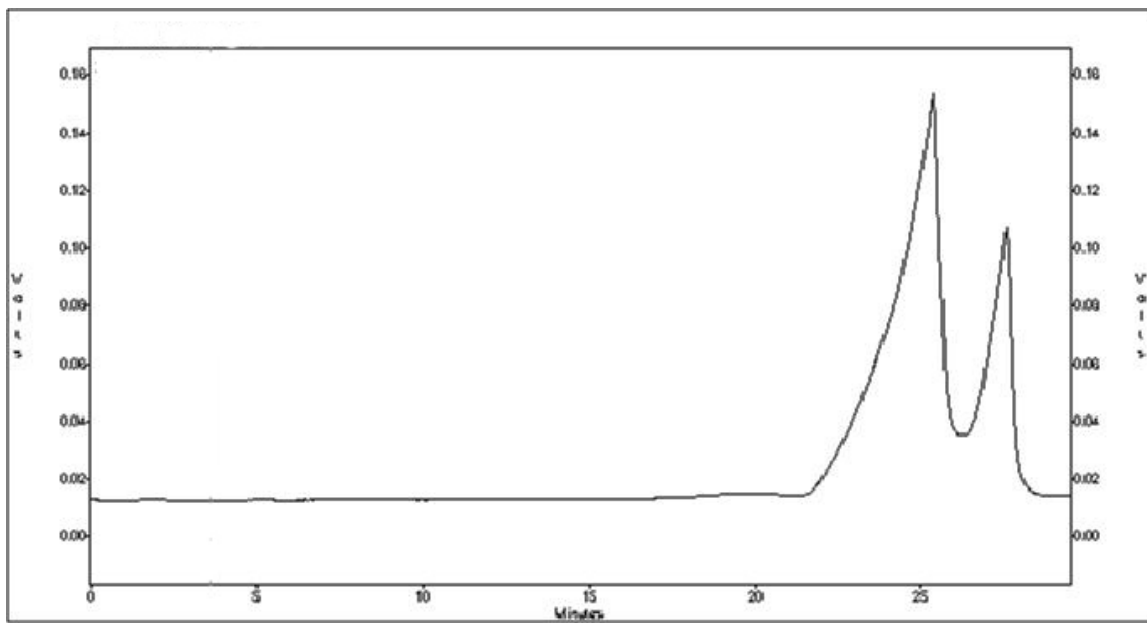
Στο σχήμα 14 παρουσιάζεται η κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας των συστατικών του HBSS και CHSS, όπως λήφθηκε με αραίωση και εξετάστηκε μέσω της δυναμικής σκέδασης του φωτός. Το HBSS εκχύλισμα έδειξε ότι αποτελείται από τρεις διακριτούς πληθυσμούς σωματιδίων, με μέγιστα στα ~500 nm, ~70 nm και ~20 nm, ενώ το εκχύλισμα CHSS έδειξε ότι αποτελείται από ένα μόνο, ευρύ πληθυσμό με διάμεσο στα ~140 nm. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την HPSEC στον ατομικό χαρακτηρισμό του πληθυσμού των πολυσακχαριτών.

Θα μπορούσε να συσχετιστεί ο πληθυσμός των σωματιδίων των ~500 nm με αυτόν που αντιστοιχεί στο ονομαστικό μοριακό βάρος των 600 kDa – 700 kDa (ζ-δυναμικό  $-17,84 \pm 0,47$  mV), ο πληθυσμός των σωματιδίων των 70nm με αυτό των 50 kDa (ζ-δυναμικό  $-11,16 \pm 1,08$  mV) και αυτός των σωματιδίων των 20nm με το πληθυσμό των 12 kD (ζ-δυναμικό  $-6,63 \pm 2,00$  mV). Το αρνητικό ζ-δυναμικό πρέπει να αποδοθεί στην παρουσία ιονισμένων μονάδων γαλακτουρονικού οξέος. Είναι γνωστό, κατά τους Sengkhampan *et al.*, (2009b) ότι οι πολυσακχαρίτες την μπάμιας είναι πλούσιοι σε αυτόν τον ανιονικό μονοσακχαρίτη (πίνακας 1).

Τα αποτελέσματα για το εκχύλισμα CHSS με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (σχήμα 14) που παρουσιάζουν μια κατανομή μοριακού βάρους στα 50 kDa (ζ-δυναμικό  $-12,87 \pm 1,82$  mV), θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την κορυφή της ευρείας κορυφής στα 140 nm, όπως παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα της σκέδασης του φωτός (σχήμα 16, διακεκομμένες γραμμές).

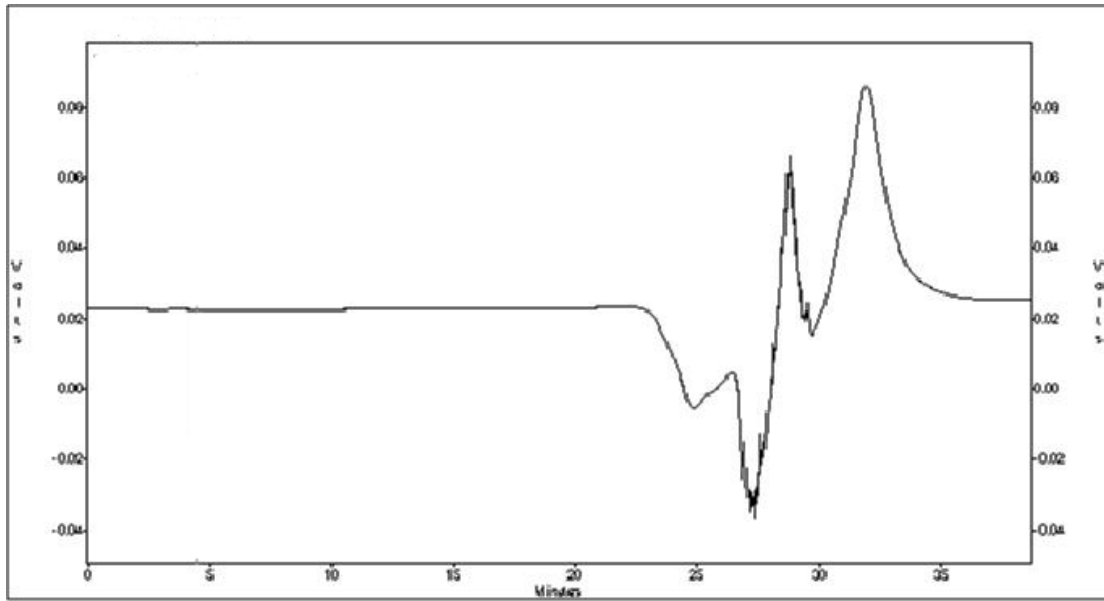


Σχήμα 13: χρωματογράφημα HBSS εκχυλίσματος σαλεπιού.

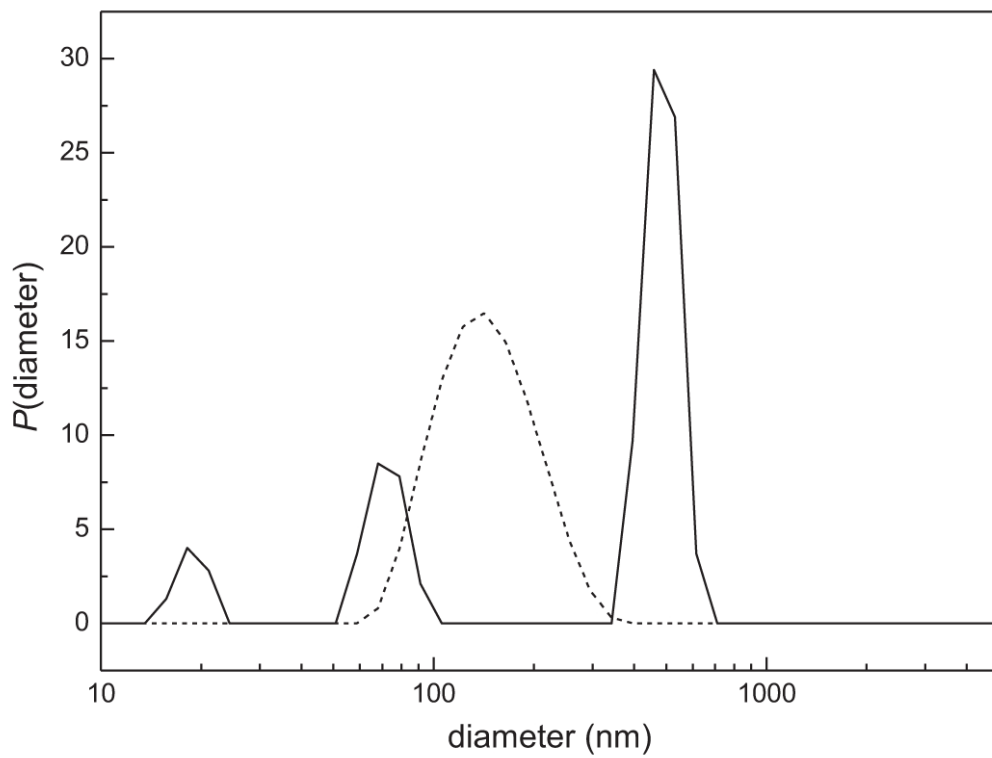


Σχήμα 14: χρωματογράφημα εκχυλίσματος CHSS σαλεπιού.





Σχήμα 15: χρωματογράφημα εκχυλίσματος DASS σαλεπιού.



Σχήμα 16: κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας των συστατικών του HBSS και CHSS σαλεπιού

## 6.ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ

Οι διαφορές στη σύνθεση των τριών εκχυλισμάτων της μπάμιας θα μπορούσαν να συνοψιστούν ως εξής: το εκχύλισμα HBSS περιλαμβάνει ένα πληθυσμό από μόρια πιθανού μοριακού βάρους 670 kDa, ένα πληθυσμό ~5 kDa και ένα 1 kDa. Το εκχύλισμα CHSS περιέχει ένα πληθυσμό μοριακού βάρους 50 kDa – 12 kDa. Το εκχύλισμα DASS περιέχει ένα πληθυσμό μοριακού βάρους 410 kDa – 80 kDa, ένα πληθυσμό 80 kDa – 12 kDa , ένα 12 kDa – 5 kDa και ένα 5 kDa – 1 kDa. Τα παραπάνω συμφωνούν με τα αποτελέσματά από τη σκέδαση του φωτός. Όλοι οι πληθυσμοί πολυσακχαριτών είχαν αρνητικό ζ-δυναμικό, το οποίο προφανώς σχετίζεται με την ύπαρξη γαλακτουρονικού οξέος στους πολυσακχαρίτες.

Οι διαφορές στη σύνθεση των τριών εκχυλισμάτων του σαλεπιού θα μπορούσαν να συνοψιστούν ως εξής: Το εκχύλισμα HBSS περιλαμβάνει ένα πληθυσμό από μόρια πιθανού μοριακού βάρους 600-700 kDa, ένα πληθυσμό ~50 kDa, και ένα ~12 kDa. Το εκχύλισμα CHSS περιέχει ένα πληθυσμό μοριακού βάρους ~50kDa. Το εκχύλισμα DASS δεν περιείχε πολυσακχαρίτες. Όπως στην μπάμια έτσι και στο σαλέπι τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά από τη σκέδαση του φωτός. Επίσης το ζ-δυναμικό του σαλεπιού ήταν και αυτό αρνητικό αφού στους πολυσακχαρίτες περιέχεται γαλακτουρονικό οξύ.

## 7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

- Μελέτη των ρεολογικών ιδιοτήτων των κλασμάτων των πολυσακχαριτών από την μπάμια.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενογλώσση

- ✚ Adalakun O.E., Oyelade O.J., Ade-Omowaye B.I.O., Adeyemi I.A., Van de Venter M. (2009). Chemical composition and the antioxidative properties of Nigerian Okra Seed (*Abelmoschus esculentus* Moench) Flour: *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 1123–1126.
- ✚ Agarwal M., Srinivasan R. and Mishra A., (2001). Study on Flocculation Efficiency of Okra Gum in Sewage Waste Water. *Macromol. Mater. Eng*, **286**, 560-563.
- ✚ Amin E. S., (1956). The mucilages of *Hibiscus esculentus* (okra or bamia fellahi) and *Corchorus olerius*(mulukhia). *Journal of Chemical Society*, 828-832.
- ✚ Anderssov R., Westerlund E., and Åman P (2006). Carbohydrates in Food in: Cell-Wall Polysaccharides: *Structural, Chemical, and Analytical Aspects*, R. Anderssov, E. Westerlund, and P. Åman (Eds), 2nd edition, Taylor & Francis Group, LLC, New York, , pp 146-150.
- ✚ BeMiller J.N., Whistler R.L. and Barbalowm D.G., (1993). Industrial Gums, Polysaccharides and their derivatives., R.L. Whistler and J.N. BeMiller (Eds). San Diego, CA: Academic Press. pp 235–255.
- ✚ Buchala, A. J., Franz, J., & Meier, H. (1974). A glucomannan from the tubers of *Orchis morio*. *Phytochemistry*, **13**, 163-166.
- ✚ Calisir S., Ozcan M., Haciseferogullari H. and Yildiz M. U., (2005). A study on Some Physico-chemical Properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta* L.) Seeds. *J. Food Engineering*, **68**, 73-78.
- ✚ Cosgrove T. (2005). Scattering and Reflection Techniques in: *Colloid Science*, R. Richardson (Eds), 1rst edition, Blackwell Publishing, Bristol, pp 223 – 224
- ✚ Deters A.M., Lengsfeld C. and Hensel A., (2005). *J.Ethnopham*, **102**, 391-399.
- ✚ Dickinson E., (1992). An Introduction to Food Colloids. Dickinson, E., (Ed). Oxford University Press, Oxford.
- ✚ Gaborieau M., Julien N., Maud S., Charleux B., Vairon J.P., Gilbert R. G., Castignolles P., (2008). Separation of complex branched polymers by size-exclusion chromatography probed with multiple detection. *Journal of Chromatography A*, **1190**, 215-223.
- ✚ Georgiadis, N., Ritzoulis, C., Sioura, G., Kornezou, P., Vasiliadou, C., & Tsiopstias, C. (2011). Contribution of okra extracts to the stability and rheology of oil-in water emulsions. *Food Hydrocolloids*, **25**, 991-999.
- ✚ Izydorczyk M. (2005). Food carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications. in: *Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates*, M. Izydorczyk (Ed), Taylor & Francis, New York, pp 51-60.
- ✚ Kaya, S., & Tekin, A. R. (2001). The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering*, **47**, 59-62.
- ✚ Kelkar G. M., Ingle, T. R. and Bhide, B.V.J., (1962). Mucilages from okra. *J. Indian Chem. Soc.*, **39**, 557–558.

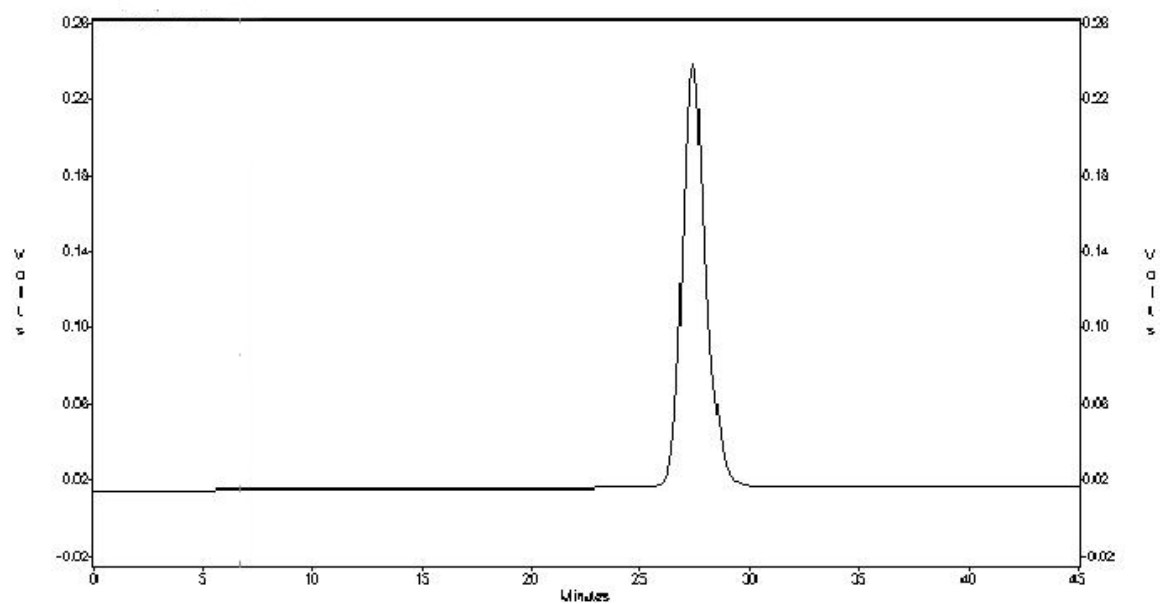
- ✚ Ktistis, G. & Georgakopoulos, PP (1991). Rheology of salep mucilages. *Pharmazie*, **46**, 55 - 56.
- ✚ Lengsfeld C., Titgemeyer F., Faller G. and Hensel A., (2004). *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1495-1503.
- ✚ Meister J.J., Anderle K. and Merriman G., (1983). Rheology of aqueous solutions of okra mucilage F, *Journal of Rheology*, **27**, 37–46.
- ✚ Ndjouenkeu R., Goycoolea F.M., Morrissa E.R. and Akingbala J.O., (1996). Rheology of okra (*Hibiscus esculentus* L.) and dika nut (*Irvingia gabonensis*) polysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, **29**, 263–269.
- ✚ Ndjouenkeu R., Akingbala J.O. and Oguntimein G.B., (1997). Emulsifying properties of three African food hydrocolloids: okra (*Hibiscus esculentus*), dika nut (*Irvingia gabonensis*), and khan (*Belschmiedia* sp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, **51**, 245–255.
- ✚ Rachimov D.A, Chernenko T.V. (2003). Lipid–carbohydrate composition of *Hibiscus esculentus*. *Chemistry of Natural Compounds*, **39**, 246–248.
- ✚ Sengkhampan N., Bakx E.J., Verhoef R., Schols H.A., Sajjaanantakul T. and Voragen A.G.J., (2009a). Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups. *Carbohydrate Research*, **344**, 1842–1851.
- ✚ Sengkhampan N., Verhoef R., Schols H. A., Sajjaanantakul T. and Voragen A. G. J., (2009b). Characterization of Cell Wall Polysaccharides from Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Carbohydrate Research*, **344**, 1824-1832.
- ✚ Sengkhampan N., Sagis L. M. C., De Vries R., Schols H. A., Sajjaanantakul T. and Voragen A. G. J., (2010). Physicochemical Properties of Pectins from Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Food Hydrocolloids*, **24**, 35-41.
- ✚ Tomoda M., Shimada K., Saito Y. and Sugi M., (1980). Plant Mucilages XXVI. Isolation and Structural Features of a Mucilage, Okra Mucilage F, From the Immature Fruits of *Abelmoschus Esculentus*, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(10), 2933-2940.
- ✚ Woolfe M. L., Chaplin M. F. and Otchere G., (1977). Studies on the Mucilages Extracted from Okra Fruits (*Hibiscus esculentus* L.) and Baobab Leaves (*Adansonia digitata* L.) *J. Sci. Fd Agric.*, **28**, 519-529.

### Ελληνική

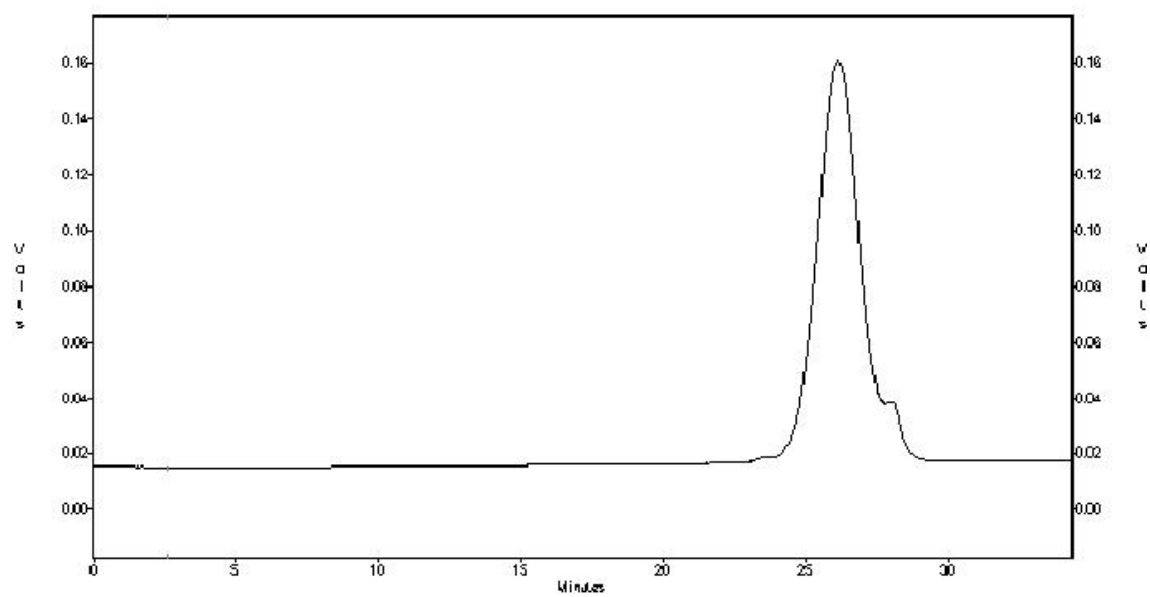
- ✚ Belitz H.D., Grosch W., & Schieberle P. (2006). Υδατάνθρακες, In: *Χημεία Τροφίμων*, (Εκδότες H.D. Belitz, W. Grosch, & P. Schieberle), 3<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, pp 423-561.
- ✚ Douglas A. S., Holler F. J., Nieman T. A., (2005). Μέθοδοι διαχωρισμού, in: *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 5<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκης, Αθήνα, pp 882 – 884.
- ✚ Schwedt, G. (1996). Μέθοδοι διαχωρισμού, In: *Εγχειρίδιο των Φυσικών και Χημικών Μεθόδων Ανάλυσης*, (Εκδότης G. Schwedt), Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιανός, Αθήνα, pp. 162-183.

- ✚ Φουρτουνόπουλος Δ. (2004). Υδατάνθρακες, in: *Οργανική χημεία*, 1η Έκδοση, Τμήμα Εκδόσεων Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης, pp 190.
- ✚ Ριτζούλης Χ. (2011). Γαλακτώματα και αφορί in: *Φυσικοχημεία τροφίμων*, 1η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Αθήνα, pp 134.

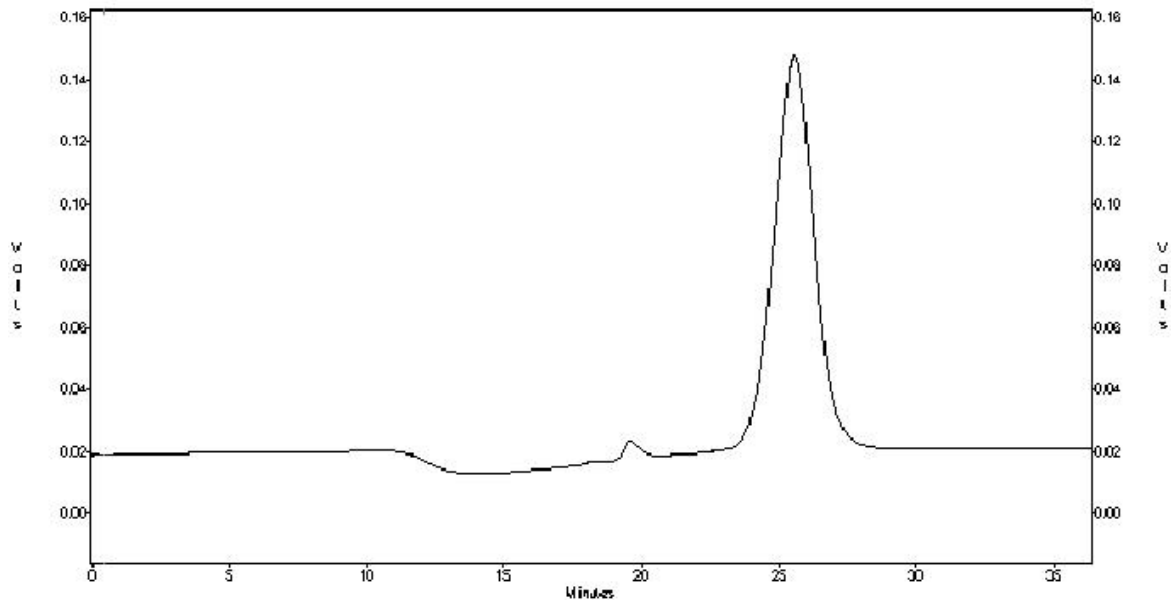
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α



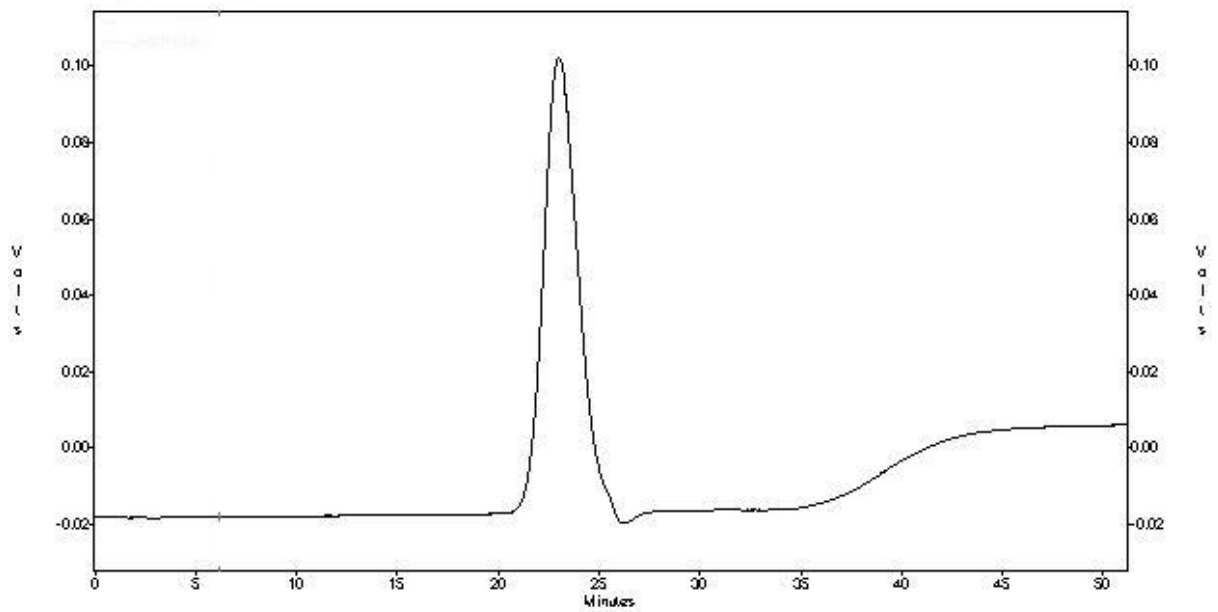
Σχήμα 17: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 1 kDa



Σχήμα 18: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 5 kDa

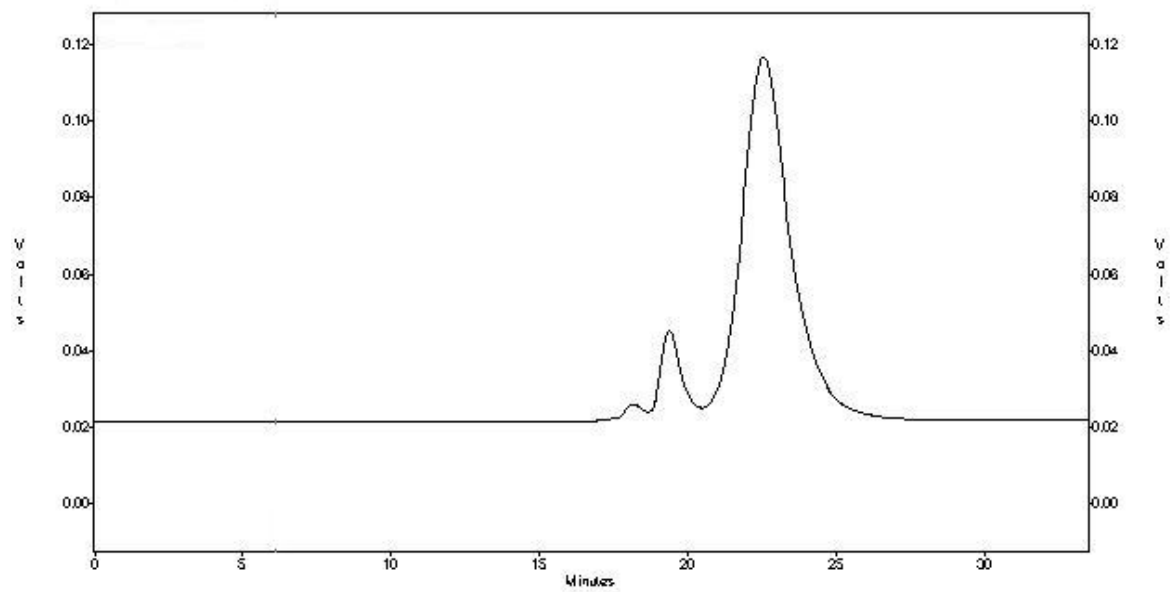


Σχήμα 19: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 12 kDa

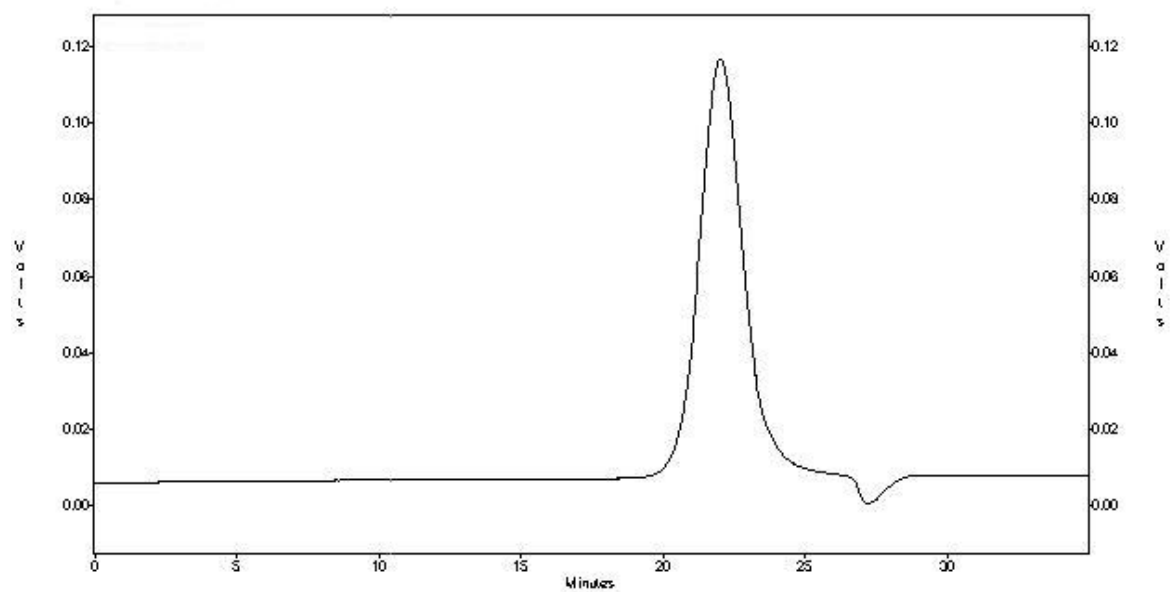


Σχήμα 20: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 80 kDa

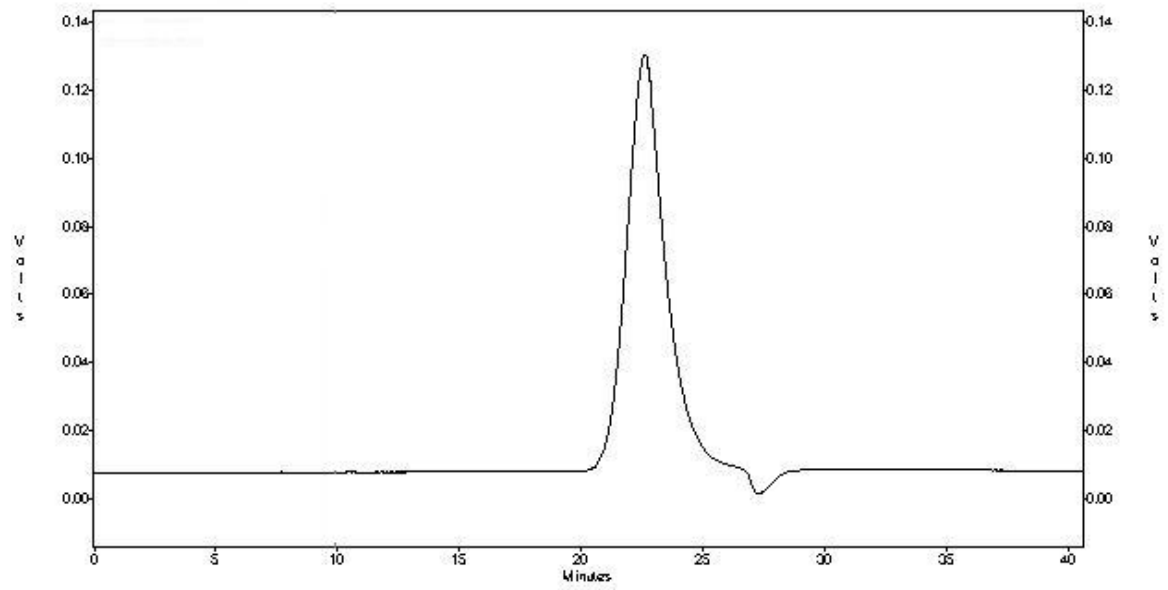




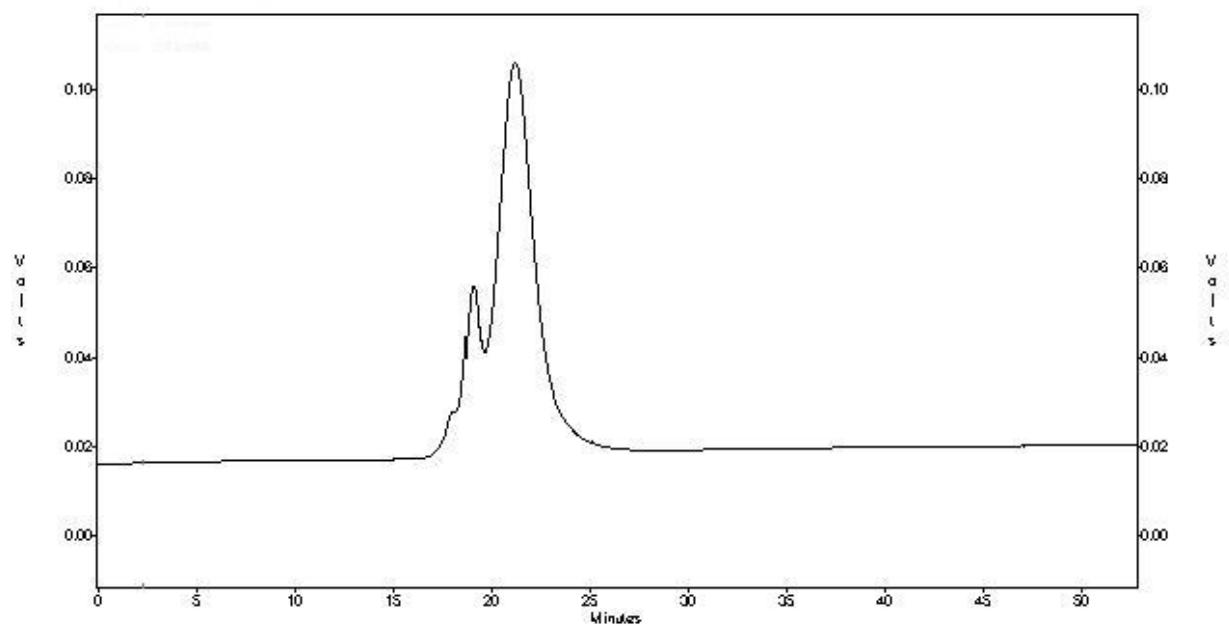
Σχήμα 21: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 150 kDa



Σχήμα 22: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 270 kDa



Σχήμα 23: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 410 kDa



Σχήμα 24: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μοριακού βάρους 670 kDa

