



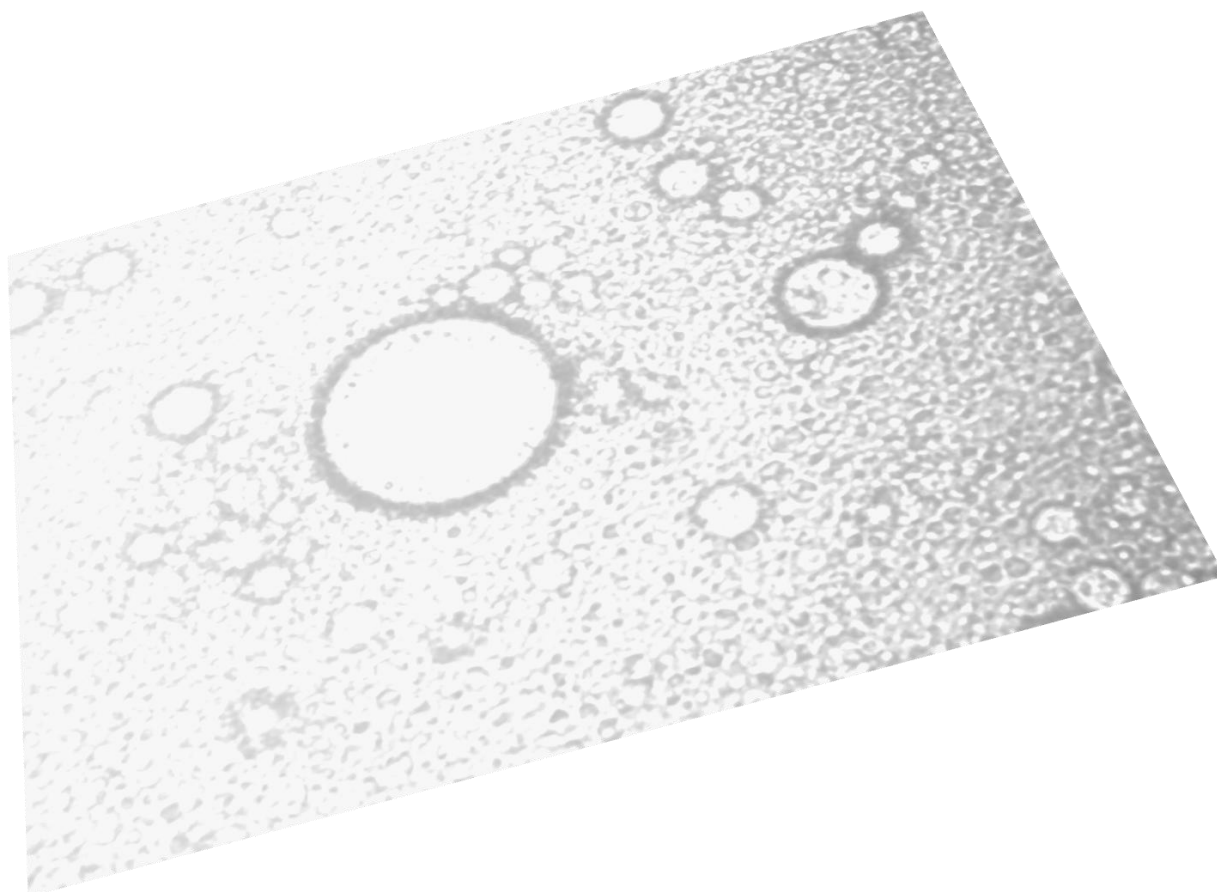
ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ

Νέοι γαλακτωματοποιητές από εσωτερικές αντιδράσεις Maillard  
υδροκολλοειδών μπάμιας



Χαριτίδης Θεόφιλος  
Τεμενούγκα Βαρβάρα

Νέοι γαλακτωματοποιητές από εσωτερικές αντιδράσεις Maillard  
υδροκολλοειδών μπάμιας

Novel emulsifiers as products from internal Maillard reactions in okra  
hydrocolloid mucilage

ΤΕΜΕΝΟΥΓΚΑ ΒΑΡΒΑΡΑ  
ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ ΘΕΟΦΙΛΟΣ

Η υποβολή της πτυχιακής εργασίας αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την  
απονομή του πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ  
Θεσσαλονίκης.

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης,  
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη, Τ.Θ. 141.

Ημερομηνία: Μάιος 2014

Εισηγητής:  
Ριζούλης Χρήστος

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε μία προσπάθεια παρασκευής νέων γαλακτωματοποιητών, από εγγενή συστατικά μπάμιας μέσω των αντιδράσεων Maillard. Έγινε εξαγωγή των υδροκολλοειδών με απιονισμένο νερό, λυοφιλίωση του εκχυλίσματος και θερμική επεξεργασία αυτού σε διαφορετικά πρωτόκολλα (60°C για 6 και 24 ώρες, 100°C για 6 ώρες), ένα δείγμα κρατήθηκε ως μάρτυρας. Ακολούθησε ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων με φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC). Αμέσως μετά τα δείγματα ενυδατώθηκαν και γαλακτωματοποιήθηκαν με δεκαεξάνιο σαν ελαιούχα φάση με  $\phi=0,13$ . Οι πληροφορίες για τα φυσικά χαρακτηριστικά των γαλακτωμάτων και το φορτίο των σωματιδίων δόθηκαν από μετρήσεις Mastersizer, οπτικής μικροσκοπίας, ηλεκτοφόρησης (SDS-PAGE) και ζ-δυναμικού. Θεωρήθηκε σκόπιμη η σύγκριση του νέου γαλακτωματοποιητή με έναν πιο συμβατικό, γι' αυτό μετά τα πρώτα αποτελέσματα δημιουργήθηκαν δύο νέα δείγματα που εμπλουτίστηκαν με διαφορετικές αναλογίες εκχυλίσματος-BSA (Bovine serum albumin) και θερμάνθηκαν στους 100°C για 6 ώρες όπου παρατηρήθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος, συμπερασματικά αναφέρεται πως το δείγμα των 100°C για 6 ώρες, παράγει γαλακτώματα ικανοποιητικής σταθερότητας σε βάθος χρόνου. ο περεταίρω εμπλουτισμός του δεν επιφέρει αύξηση της γαλακτωματοποιητικής του ικανότητας.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	3
1.1 Μπάμια.....	3
1.2 Αντιδράσεις Maillard.....	4
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	5
2.1 Συστήματα Διασποράς.....	5
2.2 Γαλακτώματα.....	5
2.3 Αποσταθεροποίηση γαλακτωμάτων.....	5
2.3.1. Βαρυτικός διαχωρισμός.....	6
2.3.2. Συσσωμάτωση-Κροκίδωση.....	6
2.3.3. Αντιστροφή φάσεων.....	7
2.3.4. Συγχώνευση.....	7
2.3.5. Ωρίμανση κατά Ostwald.....	7
2.4. Επιφανειοδραστικές ουσίες.....	7
2.4.1. Αμφίφιλες.....	7
2.4.2. Πολυμερή.....	8
3. Υλικά και μέθοδοι.....	8
3.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).....	8
3.2. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC).....	8
3.3. Περίθλαση ακτινών λέιζερ.....	9
3.4. Ηλεκτροφόρηση.....	9
3.4. Ζ-δυναμικό.....	9
3.5. Υλικά.....	9
3.6. Παρασκευή Δειγμάτων.....	10
3.6.1. Εξαγωγή υδροκολλοειδών.....	10
3.6.2. Δημιουργία προϊόντων σύζευξης.....	10
3.6.3. Μετρήσεις πριν την γαλακτωματοποίηση.....	10
3.6.4. Παρασκευή γαλακτωμάτων.....	10
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	12
4.1. 1 <sup>ο</sup> στάδιο πειραματικής διαδικασίας.....	12
4.1.1. Μελέτη φασμάτων υπερύθρου.....	13
4.1.2. Μελέτη χρωματογραφαφημάτων αποκλεισμού μεγέθους.....	17
4.1.3. Μελέτη κατανομής μεγέθους σταγονιδίων.....	17
4.2. 2 <sup>ο</sup> στάδιο πειραματικής διαδικασίας.....	22
4.2.1. Μελέτη χρωματογραφαφημάτων αποκλεισμού μεγέθους.....	22
4.2.2. Μελέτη φασμάτων υπερύθρου.....	24
4.2.3. Μελέτη κατανομής μεγέθους σταγονιδίων.....	25
4.2.4. Μελέτη επιφανειακού φορτίου και μεγέθους σωματιδίων.....	27
4.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση.....	27
4.2.4.2. Ζ-δυναμικό.....	28
5. Συμπεράσματα.....	29
6. Βιβλιογραφία.....	30

## **1. Εισαγωγή**

Τα τελευταία χρόνια παρατηρούμε με ενδιαφέρον πως η επιστήμη και φυσικά ο άνθρωπος κινούνται προς την αντικατάσταση των τεχνιτών και χημικών μέσων διαβίωσης και επιβίωσης με φυσικούς πόρους. Φυσικά δε μπορούσε να μείνει έξω από αυτό η επιστήμη των τροφίμων.

Όλο και περισσότερες έρευνες και μελέτες γίνονται προκειμένου να επιτευχθεί η αντικατάσταση των τεχνιτών και χημικών πρόσθετων των τροφίμων με φυσικά πρόσθετα που παράγονται από στοιχεία των ίδιων των τροφίμων. Η επιστήμη εκμεταλλεύεται τις αυτούσιες ιδιότητες τους με σκοπό τη δημιουργία τροφίμων “φιλικότερων” προς τον άνθρωπο.

Τα προϊόντα σύζευξης μεταξύ πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών που προέρχονται από αντιδράσεις Maillard έχουν προταθεί από πολλούς ερευνητές ως πιθανοί γαλακτωματοποιητές (i.e. Dickinson & Galazka, 1991, Dickinson & Semenova, 1992, Mishra, S., Mann, B., Joshi V.K., 2001, Diftis & Kiosseoglou, 2003, Dunlap & Côté, 2005, Einhorn-Stoll, Ulbrich, Sever & Kunzek, 2005, Akhtar & Dinckinson, 2007, Zhang, Wu, Lan, & Yang, 2014).

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η δημιουργία ενός φυσικού γαλακτωματοποιητή παραγόμενου αποκλειστικά από εγγενή συστατικά του ίδιου τροφίμου μέσω αντιδράσεων Maillard.

### **1.1 Μπάμια**

Η μπάμια, γνωστή με το επιστημονικό όνομα *Abelmoschus esculentus moench*, είναι ένα εγγενές φυτό της Αφρικής. Εισήχθη στην Βραζιλία με το δουλεμπόριο και από εκεί εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο (Sengkhamparn et al 2010). Καλλιεργείται σε κράτη που ανήκουν στην τροπική και υποτροπική ζώνη, παραδείγματος χάριν στη νότια Αμερική, Ινδία, Ελλάδα, Τουρκία, Αίγυπτος, Μέση και Άπω Ανατολή, καθώς και δυτική και κεντρική Αφρική.

Χρησιμοποιείται ολόκληρη ή τμηματικά για πολλούς σκοπούς και σε διάφορες επιστήμες. Στην παραδοσιακή ιατρική έχει χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών και οδοντικών παθήσεων εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε πολυσακχαρίτες. Η ποιο γνωστή και ευρεία χρήση τους όμως είναι ως πυκνωτικός παράγοντας σε σούπες, σάλτσες και κρέμες (Sengkhamparn et al. 2009).

Η πηκτίνη της μπάμιας λαμβάνεται από εκχύλιση της με νερό και αποτελείται από πηκτινικές ραμνογαλακτουρονάνες | στη δομή των οποίων ομάδες ακετυλίου και κατάλοιπα άλφα γαλακτόζης είναι υποκατεστημένα στα υπολείμματα ραμνόζης εντός της “ραχοκοκαλιάς”. (Sengkhamparn et al., 2010).

Ο λοβός της μπάμιας έχει αποδειχθεί πως περιέχει υψηλή περιεκτικότητα πολυσακχαριτών με αποτέλεσμα να παραλαμβάνουμε από την εκχύλιση της ένα παχύρευστο γλοιώδες διάλυμα. Ο πολυσακχαρίτης της μπάμιας βρέθηκε ότι αποτελείται από γαλακτόζη, ραμνόζη, γαλακτουρονικό οξύ και γλυκορουνικό οξύ. (Sengkhamparn et al., 2009).

## **1.2 Αντιδράσεις Maillard**

Ο όρος αντιδράσεις Maillard ή μή ενζυμικό αμάυρισμα συνδέεται άμεσα με αντιδράσεις μεταξύ αμινών και καρβονυλικών συστατικών, κυρίως αναγόντων σακχάρων. Δημιουργούνται πιο εύκολα σε υψηλές θερμοκρασίες , χαμηλή ενεργότητα νερού και κατά την μακροχρόνια αποθήκευση.

Τέτοιες αντιδράσεις είναι υπεύθυνες για παραγωγή χρωστικών, πτητικών ενώσεων , ενώσεων με μεταλλαξιογόνες ιδιότητες και ενώσεων που μπορούν να προκαλέσουν διασύνδεση πρωτεΐνων.

Γενικά, οι πρωτοταγής αμίνες είναι σημαντικότερες από τις δευτεροταγής διότι η συγκέντρωσή τους στα τρόφιμα είναι υψηλότερη με εξαίρεση τα προϊόντα βύνης και καλαμποκιού (Finot et al. 1990).

## **2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση**

### **2.1 Συστήματα Διασποράς**

Ως σύστημα διασποράς συνήθως ορίζεται ένα σύστημα από διακριτά σωματίδια σε μια συνεχή φάση. Όταν τα σωματίδια είναι αέρια, τότε πρόκειται για αφρό, με υγρά σωματίδια έχουμε γαλάκτωμα και με στερεά εναιώρημα.

Ένα κολλοειδές συνήθως ορίζεται ως σύστημα διασποράς που περιέχει σωματίδια τα οποία είναι σχετικά μεγάλα, αλλά παρόλα αυτά πολύ μικρά για να είναι ορατά με γυμνό μάτι. Αυτό συνεπάγεται εύρος μεγεθών σωματιδίων από περίπου 10nm έως 1mm (Damodaran et al. 2008).

### **2.2 Γαλακτώματα**

Ως γαλάκτωμα ορίζεται ένα υγρό που αποτελείται από δύο μη αναμίξιμες φάσεις (συνήθως έλαιο και νερό), με το ένα από τα δύο υγρά να είναι διεσπαρμένο σε μικρά σταγονίδια μέσα στο άλλο. Τα γαλακτώματα κατηγοριοποιούνται σε δύο τύπους: *i)* Όταν το σύστημα αποτελείται από σταγονίδια νερού διεσπαρμένα σε ελαιώδη φάση καλείται γαλάκτωμα “νερού σε έλαιο” (ν/λ), παράδειγμα αυτού του τύπου η μαργαρίνη, και *ii)* όταν το σύστημα αποτελείται από σταγονίδια ελαίου διεσπαρμένα σε υδάτινη φάση καλείται γαλάκτωμα “ελαίου σε νερό” (λ/ν) αντίστοιχα, παράδειγμα αυτού η μαγιονέζα. Στα περισσότερα τρόφιμα η διάμετρος των σταγονιδίων κυμαίνεται μεταξύ 0,1 με 100μm (McClements 1999).

### **2.3 Αποσταθεροποίηση γαλακτωμάτων**

Τα γαλακτώματα αποτελούν ένα πολυδιάστατο αντικείμενο μελέτης που εσωκλείει και προϋποθέτει την άψογη συνεργασία της χημείας, της φυσικής και της μηχανικής.

Μόλις η ομογενοποίηση σταματήσει τα γαλακτώματα υφίστανται ταχύ διαχωρισμό. Αυτό συμβαίνει διότι η επαφή των μορίων ελαίου και νερού είναι ενεργειακά δυσμενής, μεγάλο ποσό ενέργειας παγιδεύεται ως επιπλέον ενέργεια στη διεπιφάνεια και εκδηλώνεται ως υψηλή διεπιφανειακή τάση (McClements 1999, Ριτζούλης 2011). Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως τα γαλακτώματα είναι κινητικά και θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα.

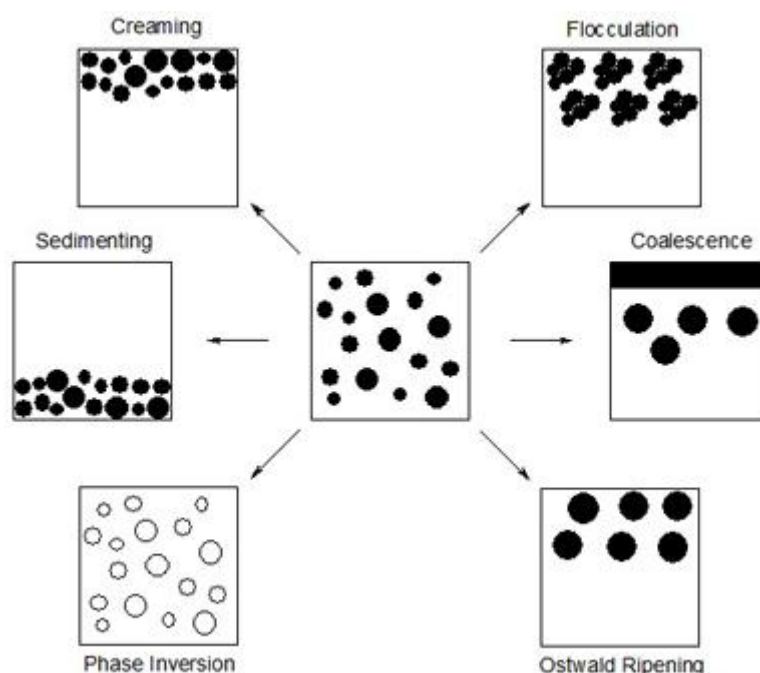
Οι μηχανισμοί που οδηγούν το γαλάκτωμα να χάσει την κολλοειδή ιδιότητα του και να κατάληξη εν τέλει σε ένα μακροσκοπικά ετερογενές μίγμα εντάσσονται σε πέντε κατηγορίες, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

### **2.3.1. Βαρυτικός διαχωρισμός**

Λαμβάνει χώρα όταν μεταξύ των δύο φάσεων του κολλοειδούς υπάρχει διαφορά πυκνότητας. Η φάση με την μικρότερη πυκνότητα καταλήγει στην επάνω στοιβάδα. Στην τεχνολογία των γαλακτωμάτων αυτό καλείται *αποκορύφωση* (creaming). Οι βαρυτικοί διαχωρισμοί δεν καταστρέφουν το γαλάκτωμα ή οποιοδήποτε άλλο κολλοειδές. Όσο μικρότερα σταγονίδια έχει το γαλάκτωμα τόσο δυσκολότερα υφίσταται αποκορύφωση. Επίσης όσο μεγαλύτερη διαφορά πυκνότητας έχουν οι φάσεις τόσο γρηγορότερα επέρχεται ο διαχωρισμός (McClements 1999).

### **2.3.2. Συσσωμάτωση-Κροκίδωση**

Και στις δύο περιπτώσεις τα σταγονίδια υφίστανται συσσωμάτωση. Η κροκίδωση (flocculation) συμβαίνει όταν δύο ή περισσότερα σταγονίδια ενώνονται και σχηματίζουν συσσωμάτωση, στην οποία τα σταγονίδια αυτά διατηρούν την ατομική τους ακεραιότητα. Στη συσσωμάτωση (aggregation) όμως δύο ή περισσότερα σταγονίδια συγχωνεύονται προς σχηματισμό ενός μεγαλύτερου σταγονιδίου (McClements 1999). Για κάθε κολλοειδές ορίζεται μία συγκέντρωση διεσπαρμένων σταγονιδίων κάτω από την οποία έχουμε ένα σταθεροποιημένο γαλάκτωμα και πάνω από την οποία επέρχεται η κροκίδωση. Όταν έχουμε έντονη κίνηση μεταξύ των σωματιδίων η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ χαμηλή και η κροκίδωση χαρακτηρίζεται μη αντιστρέψιμη (Ριτζούλης 2011).



Σχήμα 1. απεικόνιση μηχανισμών αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων.



### **2.3.3. Αντιστροφή φάσεων**

Κατά την αντιστροφή φάσεων (phase inversion) η συνεχής φάση μετατρέπεται σε διεσπαρμένη και η διεσπαρμένη σε συνεχής αντίστοιχα. Για να επέλθει η αντιστροφή των φάσεων θα πρέπει το γαλάκτωμα να έχει παρόμοια συγκέντρωση ελαίου και νερού. Δεν μπορεί να αποδοθεί σε μία αιτία αυτή η μετατροπή του γαλακτώματος, μπορεί να οφείλεται σε απότομη αλλαγή των φυσικών ιδιοτήτων αυτού, του ιξώδους για παράδειγμα ή της αγωγιμότητας, σε συνάρτηση πάντα με το κλάσμα όγκου της αρχικά διεσπαρμένης φάσης. Ουσιαστικά έχουμε μαζική συγχώνευση των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης και μετατροπής της σε συνεχή καθώς και την απομόνωση και παγίδευση των σταγονιδίων της συνεχής φάσης και τελικά της μετατροπής τους σε διεσπαρμένη (Ριτζούλης 2011).

### **2.3.4. Συγχώνευση**

Με την συγχώνευση (coalescence) έχουμε συσσωμάτωση των σταγονιδίων προς μεγαλύτερα κατόπιν διάσπασης του διεπιφανειακού υμενίου, δεδομένης απουσίας τασιενεργού παράγοντα. Είναι μη αντιστρεπτός διαχωρισμός και οδηγεί στην πλήρη κατάρρευση του γαλακτώματος (McClements 1999).

### **2.3.5. Ωρίμανση κατά Ostwald**

Πρόκειται για ένα φαινόμενο κατά το οποίο ο αριθμός των σταγονιδίων μειώνεται αριθμητικά, καθώς το μέσο μέγεθος αυξάνει, χωρίς όμως να υφίσταται συγχώνευση αυτών. Ουσιαστικά τα σταγονίδια που απαρτίζουν τη διεσπαρμένη φάση μεταφέρονται στη συνεχή φάση, μέσα στην οποία διαχέονται έως ότου επαναδιαλυτοποιηθούν σε άλλα σταγονίδια (Ριτζούλης 2011).

## **2.4. Επιφανειοδραστικές ουσίες**

### **2.4.1. Αμφίφιλες**

Το υδροφοβικό κομμάτι ενός αμφίφιλου μορίου είναι συνήθως μια αλειφατική αλυσίδα, ενώ υπάρχει μεγάλη ποικιλία από υδρόφιλα κομμάτια. Οι περισσότερες αμφίφιλες ουσίες δεν είναι πολύ διαλυτές στο νερό ή στο λάδι και θα υποστούν την μικρότερη απωστική αλληλεπίδραση από τους δυο αυτούς διαλύτες, εφόσον θα βρίσκονται μερικώς σε υδρόφιλο και μερικώς σε υδρόφοβο περιβάλλον (Damodaran et al. 2008).

## **2.4.2. Πολυμερή**

Πολλά συνθετικά πολυμερή, όπως και συμπολυμερή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιφανειοδραστικές ουσίες, όπου μέρη των τμημάτων τους είναι υδροφοβικά και άλλα υδρόφιλα. Υπάρχουν όμως και μερικά φυσικά πολυμερή που προσρροφούνται με τον ίδιο τρόπο. Οι περισσότεροι επιφανειοδραστικοί πολυσακχαρίτες περιέχουν μία πρωτεϊνική χαρακτηριστική ομάδα η οποία είναι υπεύθυνη για αυτό τους το χαρακτηριστικό (Damodaran et al. 2008).

## **3. Υλικά και μέθοδοι**

### **3.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR, *fourier transformation infra-red*)**

Στην υπέρυθρη φασματοσκοπία, η υπέρυθρη ακτινοβολία εισέρχεται μέσα από το δείγμα όπου μέρος της απορροφάτε ενώ το υπόλοιπο εκπέμπεται. Το φάσμα που προκύπτει αντιστοιχεί στις συχνότητες των δονήσεων μεταξύ των δεσμών των ατόμων που απαρτίζουν το υλικό. Κάθε υλικό είναι ένας μοναδικός συνδυασμός ατόμων, έτσι δεν υπάρχουν δύο ενώσεις που παράγουν ακριβώς το ίδιο υπέρυθρο φάσμα. Ως εκ τούτου, η φασματοσκοπία υπέρυθρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποιοτική ανάλυση κάθε είδους υλικού. Επίσης, το μέγεθος των κορυφών του φάσματος αποτελεί μια άμεση ένδειξη της ποσότητας του κάθε συστατικού.

### **3.2. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC, *size exclusion chromatography*)**

Πρόκειται για μία τεχνική διαχωρισμού βάση του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτά διέρχονται μέσα από μία στήλη που περιέχει ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων, το οποίο αποτελείται συνήθως από σωματίδια πυριτίας ή πολυμερούς. Τα μόρια εκλούνται από την στήλη βάση του μεγέθους τους. Μεγαλύτερα από τους πόρους μόρια εκλούνται κατευθείαν από την στήλη, ενώ τα πολύ μικρότερα παγιδεύονται για αρκετά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα λόγω του ότι διεισδύουν στο λαβυρινθώδες περιβάλλον των πόρων. Στα μόρια ενδιαμέσου μεγέθους ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους εξαρτάται από την διάμετρό τους. Δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ κινητής και σταθερής φάσης (Skoog et al, 2005).

### **3.3. Περίθλαση ακτινών λέιζερ**

Για την μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων το Mastersizer χρησιμοποιεί την τεχνική της περίθλασης λέιζερ. Αυτό επιτυγχάνεται με την μέτρηση της έντασης του φωτός που σκεδάζεται καθώς μια δέσμη λέιζερ περνά μέσα από ένα σύστημα διασποράς.

### **3.4. Ηλεκτροφόρηση**

Η ηλεκτροφόρηση είναι τεχνική διαχωρισμού η οποία βασίζεται στη ταχύτητα όδευσης των φορτισμένων σωματιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα, κατά μήκος του οποίου έχει εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο. Μικρή ποσότητα δείγματος εισάγεται στο ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχεται σε στενό σωλήνα ή σε επίπεδο πορώδες υλικό στήριξης (π.χ. χαρτί ή γέλη). Εφαρμόζεται υψηλή τάση μέσω του ζεύγους ηλεκτροδίων, που βρίσκονται στα άκρα. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος φορτίου/μεγέθους τόσο ταχύτερα μετακινείται ένα ιόν στο ηλεκτρικό πεδίο (Skoog et al 2005).

### **3.5. Ζ-δυναμικό**

Ως ζ-δυναμικό σε ένα σύστημα διασποράς ορίζεται το φορτίο που υπάρχει ανάμεσα στην διεπιφάνεια ενός σταγονιδίου και τον κύριο όγκο του. Το δυναμικό αυτό μετριέται σε MilliVolt με την βοήθεια της ηλεκτροφοριστικής σκέδασης φωτός. Η μετατόπιση συχνότητας σε μια προσπίπτουσα ακτίνα λέιζερ εξαρτάται από την κινητικότητα των διεσπαρμένων σωματιδίων, όπου στην περίπτωση της ηλεκτοφοριστικής σκέδασης φωτός επιτυγχάνεται με εφαρμογή ταλαντευόμενου ηλεκτρικού πεδίου.

### **3.5. Υλικά**

- Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν λοβοί ώριμης μπάμιας (5-9 cm), οι οποίοι καλλιεργήθηκαν στη Μελική Ημαθίας από τοπικούς παραγωγούς. Αμέσως μετά την παραλαβή υπέστησαν άμεση κατάψυξη.
- Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά υπερκάθαρο νερό.
- Η ρύθμιση του pH των δειγμάτων έγινε με διάλυμα HCL ή NaOH 0,1M.
- Ως συντηρητικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα νιτραζιδίου 0,1%
- Η γαλακτωματοποίηση έγινε με δεκαεξάνιο ως ελαιώδης φάση.
- Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δεξτράνης (1kDa- 1.4MDa).
- BSA (Bovine Serum Albumin, fraction V)

### **3.6. Παρασκευή Δειγμάτων**

#### **3.6.1. Εξαγωγή υδροκολλοειδών**

Σε 3000 ml απιονισμένο νερό θερμοκρασίας  $70\pm 1^{\circ}\text{C}$  και pH 5,2, ρυθμισμένο με 0,1M HCL, προστέθηκαν 150 g κατεψυγμένα δείγματα μπάμιας πολτοποιημένα, και παρέμειναν υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα, για 30 λεπτά. Κατόπιν το μίγμα διηθήθηκε, καταψύχθηκε και στη συνέχεια λυοφιλιώθηκε.

#### **3.6.2. Δημιουργία προϊόντων σύζευξης**

Σε έξι τρυβλία τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος, εκ των οποίων το ένα κρατήθηκε ως μάρτυρας και δεν υπέστη θερμική επεξεργασία, τρία θερμάνθηκαν στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 6 και 24 ώρες και στους  $100^{\circ}\text{C}$  για 6 ώρες, ενώ τα υπόλοιπα δύο εμπλουτίστηκαν με αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA, Bovine Serum Albumin, fraction V) σε αναλογίες 1:1 και 3:1 (λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος:BSA). Η επιλογή των συνθηκών θερμικής επεξεργασίας των τελευταίων έγινε βάση των αποτελεσμάτων των προηγούμενων μετρήσεων.

#### **3.6.3. Μετρήσεις πριν την γαλακτωματοποίηση**

Ποσότητα δειγμάτων από κάθε τρυβλίο παραλήφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για μετρήσεις φασματοσκοπίας υπερύθρων προκειμένου να επιτευχθεί ποιοτική ανάλυση στα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα.

Στη συνέχεια ζυγιστικέ εκ νέου ποσότητα λυοφυλιωποιημένων δειγμάτων, τα οποία ενυδατώθηκαν με υπερκάρθρο νερό έως ότου η συγκέντρωσή τους φτάσει το 1% w/v. Στη συνέχεια αφέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση, σε μαγνητικό αναδευτήρα, για 12 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο Thermo Scientific sorvall evolution RC με κεφαλή SA-300 για 5 λεπτά στις 12000 rpm. Κατόπιν, συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό μέρος του οποίου εξετάστηκε χρωματογραφικά ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή γαλακτωμάτων.

#### **3.6.4. Παρασκευή γαλακτωμάτων**

Τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν ήταν τύπου λαδιού σε νερό (o/w) με κλάσμα ελαιώδης φάσης  $\phi=0,13$  n-δεκαεξάνιο. Για πυκνότητα νερού 1 g/ml και δεκαεξανίου 0,776 g/ml ζυγίστηκαν, σε αναλυτικό ζυγό, οι ποσότητες του κάθε δείγματος όπως αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ποσότητες των επιμέρους συστατικών των γαλακτωμάτων.

	Υδατική φάση (g)	Ελαιούχα φάση (g)	Μίγμα (g)
Μάρτυρας	27,4977	3,1894	30,6871
60°C για 6 ώρες	27,8583	3,2282	31,0865
60°C για 24 ώρες	28,5984	3,3135	31,9119
100°C για 6 ώρες	26,9270	3,1195	30,0465
μπάμια-BSA 1-1	35,0104	4,0584	39,0604
μπάμια-BSA 3-1	37,6867	4,3688	42,0555

Ακολούθησε ομογενοποίηση με ομογενοποιητή υπερήχων UP100H της Hielscher για 45 δευτερόλεπτα.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων έγινε αμέσως μετά την γαλακτωματοποίηση και ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε Mastersizer της Malvern.

Στην συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis ή SDS-PAGE) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του Laemli (1970). Βάση αυτής της μεθόδου, 100 mg λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος μπάμιας αναμίχθηκε με 1 ml διπλά συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος σε σωλήνα Eppendorf. Στην συνέχεια θερμάνθηκε στους 85°C για 5 λεπτά σε υδρόλουτρο, προκειμένου να διαλυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες. Αυτό στη συνέχεια στροβιλιστικέ για διάρκεια 30s σε συσκευή Vortex Genie. Μετά από αυτήν την κατεργασία, κάθε δείγμα ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, έπειτα 25 µL από το κάθε δείγμα φορτώθηκε σε φρεάτια προκατασκευασμένου πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με γραμμική βαθμίδωση 4-15%. Η SDS-PAGE διεξήχθη υπό συνεχή ένταση 45 mA για μια διάρκεια 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ανακτηθέντα πήγματα χρωματίστηκαν όλη τη νύχτα με χρήση 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 σε 50% (v/v) μεθανόλη - 15% (v/v) οξικού οξέος σε απιονισμένο νερό (Merill & Washart, 1998). Ο αποχρωματισμός του gel επιτεύχθηκε με έκπλυση αρκετές φορές χρησιμοποιώντας 10% (v/v) μεθανόλη – 5% (v/v) οξικό οξύ με απιονισμένο νερό, ώστε να ληφθεί ένα διαυγές φόντο (Karayannakidis, 2007). Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους πραγματοποιήθηκε με ειδικό λογισμικό VisionWorksLS Image Acquisition and Analysis SMFtware (UVP, Inc., Upland, CA), με βάση τα μοριακά βάρη προτύπων πρωτεϊνών (10-250 kDa).

Τέλος εξετάστηκε τα επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων με τη βοήθεια του ζ-δυναμικού. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του ζ-δυναμικού αραιώθηκαν μέχρι 0,1% v/v γαλακτώματος σε υπερκάρθρο νερό.

## **4. Αποτελέσματα – Συζήτηση**

### **4.1. 1<sup>ο</sup> στάδιο πειραματικής διαδικασίας**

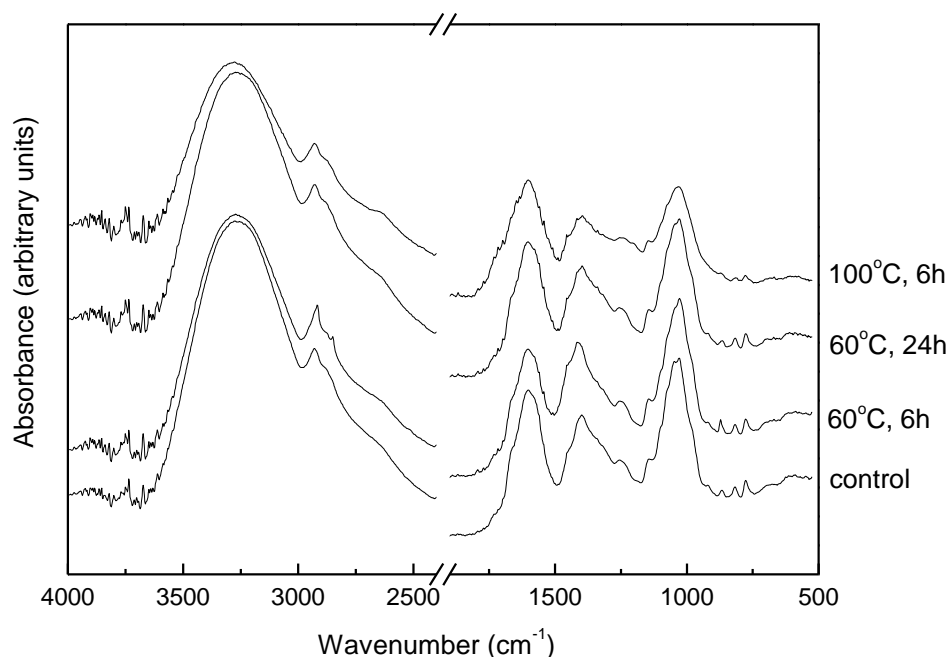
Στην παρούσα σειρά πειραμάτων, εκχυλίσματα μπάμιας υποβλήθηκαν σε τρία σχέδια θερμικής επεξεργασίας ώστε να προκληθούν αντιδράσεις Maillard μεταξύ των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών τους.

#### **4.1.1. Μελέτη φασμάτων υπερύθρου**

Στο Σχήμα 2 φαίνονται τα φάσματα των υπό μελέτη υλικών. Οι γραφικές παραστάσεις, από κάτω προς τα πάνω, αντιστοιχούν σε μη επεξεργασμένο εκχύλισμα μπάμιας, εκχύλισμα επεξεργασμένο στους 60°C για 6 ώρες, 24 ώρες και 100°C για 6 ώρες. Σε όλα τα διαγράμματα εμφανίζεται μια πολύ πλατειά κορυφή στα 3260 cm<sup>-1</sup> που μπορεί να σχετίζονται με δεσμούς N-H και O-H που εκτείνονται. Οι κορυφές μεταξύ 2915 cm<sup>-1</sup> και 2935 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχούν σε ασύμμετρη έκταση δεσμών C-H των ομάδων μεθυλίου και μεθυλενίου, ενώ οι κορυφές μεταξύ 2880 cm<sup>-1</sup> και 2850 cm<sup>-1</sup> σε συμμετρική έκταση ομάδων C-H. Η σχετική μείωση στην ένταση των κορυφών αυτών στα δυο δείγματα που αντιστοιχούν στις πιο έντονες θερμικές επεξεργασίες υποδηλώνει αλλαγές στο μοριακό περιβάλλον κοντά στις μεθυλ' ομάδες.

Η ευρεία περιοχή που εκτείνεται μεταξύ 1600 cm<sup>-1</sup> και 1200 cm<sup>-1</sup> μπορεί να φιλοξενήσει δονήσεις που οφείλονται σε μεγάλο αριθμό ομάδων. Οι μεγάλες κορυφές περίπου στα 1600 cm<sup>-1</sup> μπορούν να αποδοθούν σε δεσμούς έκτασης C=O από περιοχές αμιδίου I (Kong & Yu, 2007). Οι κορυφές στα 1400 cm<sup>-1</sup> έχουν αποδοθεί σε συμμετρική έκταση COO<sup>-</sup> και αυτές στα 1600 cm<sup>-1</sup> σε ασυμμετρική έκταση COO<sup>-</sup> (Omoike & Chorover, 2004). Το κύρτωμα στα 1450 cm<sup>-1</sup> θα πρέπει να αποδοθεί σε δονήσεις δεσμών C-H (Wilson et al., 2000), ενώ οι δονήσεις μεταξύ 1255 cm<sup>-1</sup> και 1245 cm<sup>-1</sup> στη ζώνη αμιδίου III (Neugebauer et al., 2007). Όσον αφορά τον κύριο πληθυσμό υδατανθράκων, οι κορυφές στα 1030 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχούν σε δεσμούς έκτασης C-O, C-C και C-C-O, ενώ το κύρτωμα στα 978 cm<sup>-1</sup> μπορεί να αποδοθεί σε δονήσεις C=O (Wilson et al., 2000). Οι κορυφές στα 1140 cm<sup>-1</sup> μπορεί να συνεπάγονται την ύπαρξη πιθανών γλυκοζιτικών δεσμών, ενώ το κύρτωμα στην καμπύλη στα 1040 cm<sup>-1</sup> μπορεί να αποδοθεί σε δονήσεις δαλτυλίου C-O-C, C-O (Robert et al., 2005).

Αύξηση στην θερμική επεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μίας κύρτωσης στα 1240 cm<sup>-1</sup> και την μείωση της έντασης της κύριας κορυφής υδατανθράκων στα 1030 cm<sup>-1</sup>. Επιπλέον, με θέρμανση στους 100°C, οι κορυφές μεταξύ 850 cm<sup>-1</sup> και 680 cm<sup>-1</sup> στην περιοχή των υδατανθράκων γίνονται πολύ ασθενής. Τα παραπάνω υποδηλώνουν χημικές μεταβολές στον πληθυσμό πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών με την θερμική επεξεργασία, ιδιαίτερα στους 100°C για 6 ώρες, καθώς και τον σχηματισμό νέων δεσμών.

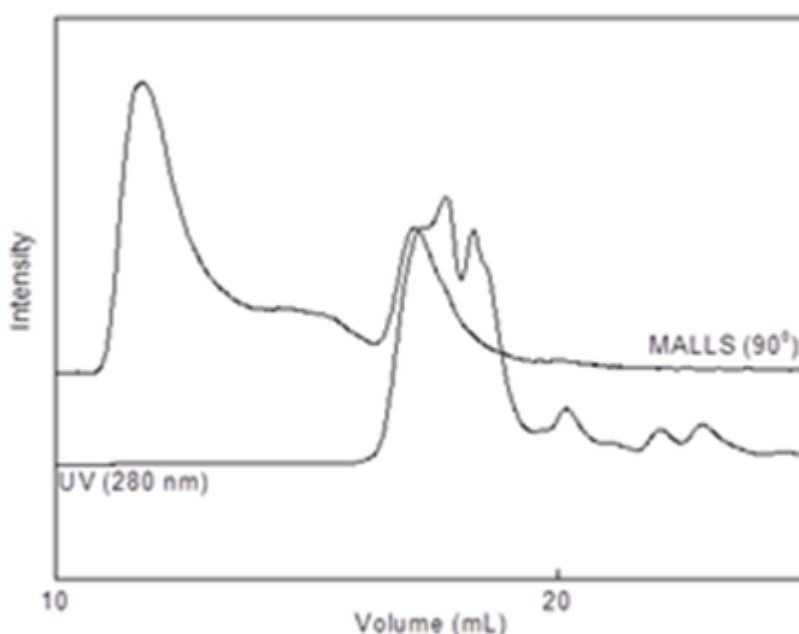


Σχήμα 2. Φάσματα υπερέυθρων μετασχηματισμού Fourier που λαμβάνονται για τα θερμικά και μη επεξεργασμένα εκχυλίσματα.

#### **4.1.2. Μελέτη χρωματογραφαφημάτων αποκλεισμού μεγέθους**

Το Σχήμα 3 δείχνει τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους από τα δείγματα μετά την θερμική επεξεργασία. Για την καταγραφή της έκλυσης των υπό διαχωρισμό συστατικών χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα ένας φασματοσκοπικός ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ο οποίος λειτουργεί στα 280nm, και ένας ανιχνευτής σκέδασης φωτός, με λέιζερ πολλαπλών γωνιών (MALLS). Όπως αναφέρθηκε, η SEC διαχωρίζει τα μίγματα πολυμερών επιτρέποντας τα μεγάλα μόρια να εκκλύονται πριν από τα μικρότερα. Υποθέτοντας μια γενική σχέση μεταξύ του μεγέθους ενός πολυμερούς και του μοριακού του βάρους (όχι πάντα σωστή υπόθεση) και συγκρίνοντας τους όγκους έκλυσης των αναλυτών (που ισοδυναμεί με χρόνους έκλυσης εφόσον υπάρχει σταθερός ρυθμός ροής) με εκείνους των πρότυπων πολυμερών μπορεί σχηματιστεί μια πρώτη εικόνα για το μοριακό βάρος των πολυμερών. Η αντιστοίχιση σε μοριακά βάρη από κορυφές προτύπων θα πρέπει να γίνεται με προσοχή (Gaborieau & Castingolles, 2011), καθώς η διακλάδωση και η σύνθεση έχει σημαντική επίδραση στην αναδίπλωση ενός πολυμερούς και ως εκ τούτου στη δομή του και στις φυσικές διαστάσεις του (Ritzoulis, 2013). Καθώς τα αμινοξέα Tyr, Trp, Phe και οι δισουλφιδικοί απορροφούν στο εγγύς υπεριώδες (Aitken & Learmonth, 2009), ο ανιχνευτής UV μπορεί να βοηθήσει στη διαφοροποίηση μεταξύ πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών.

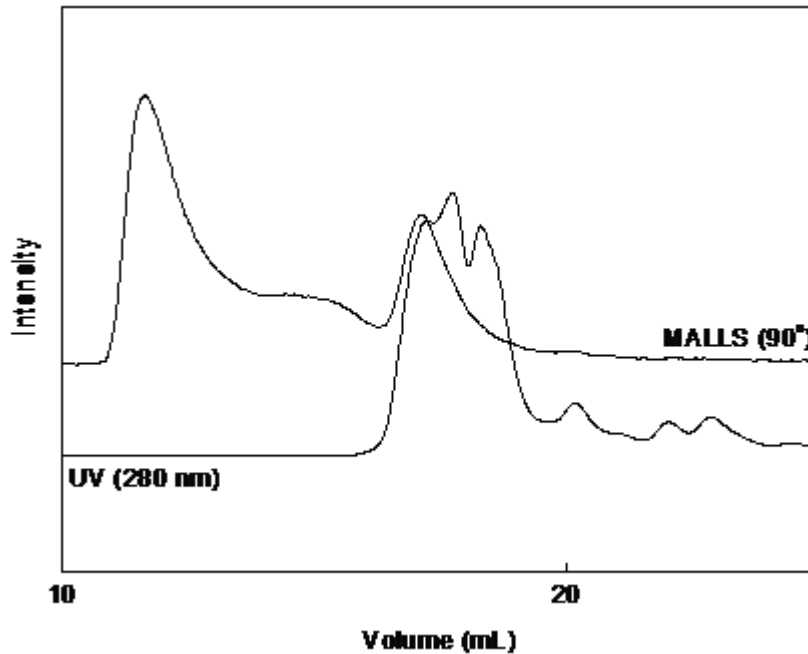
Στο Σχήμα 3α φαίνεται το χρωματογράφημα του μη θερμικά επεξεργασμένου δείγματος (μάρτυρα). Τρεις μακρομοριακοί πληθυσμοί καταγράφηκαν από τον ανιχνευτή MALLS με την μορφή τριών κορυφών, μια σε όγκο έκλουσης 11,7 ml, μια πλατειά κορυφή στα 14,6 ml και μια τρίτη κορυφή στα 17,2 ml. Συγκρίνοντας τους όγκους (ή το χρόνο) έκλουσης τους με των προτύπων δεξτράνης υποδηλώνονται μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 1,4 MDa, 600-700 kDa και περίπου 25 kDa αντίστοιχα. Η τελευταία κορυφή, επίσης, απορροφά στα 280 nm στον ανιχνευτή UV, πράγμα που σημαίνει ότι πιθανότερο είναι να πρόκειται για πληθυσμό πρωτεϊνών παρά πολυσακχαριτών.



Σχήμα 3α. Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγέθους για το μη επεξεργασμένο εκχύλισμα μπάμιας. Το έκλουσμα αναλύθηκε με τη χρήση δύο ανιχνευτών σε συνδιασμό: ένας ανιχνευτής UV που λειτουργεί στα 280 nm και ένας ανιχνευτής σκέδασης φωτός, ο οποίος λειτουργεί με λέιζερ υπό πολλαπλών γωνιών, τα δεδομένα λαμβάνονται στις 90°.

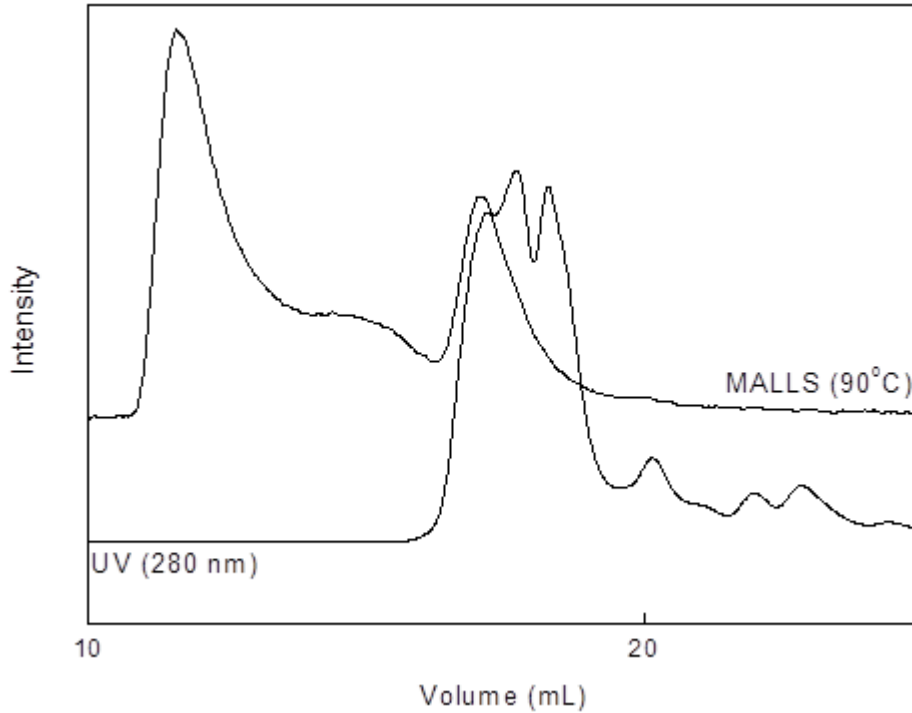
Το Σχήμα 3β δείχνει το χρωματογράφημα του θερμικά επεξεργασμένου δείγματος στους 60°C για 6 ώρες. Η σχετική ένταση των κορυφών και του χρόνου έκλουσης είναι ουσιαστικά τα ίδια με του μάρτυρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπήρξαν μεταβολές από άποψη μεγέθους στα μακρομόρια του εκχυλίσματος (πιθανόν πολυσακχαριτών, εφόσον δεν απορροφούν στα 280 nm).



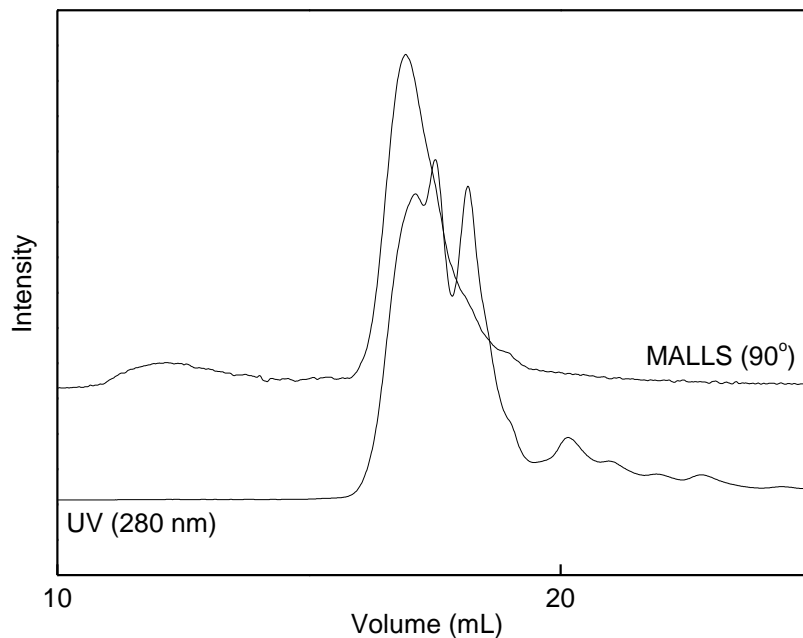


Σχήμα 3β. Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγέθους για το εκχύλισμα μπάμιας το οποίο θερμάνθηκε στους 60°C για 6 ώρες. Το έκλουσμα αναλλυθηκε με τη χρήση δύο ανιχνευτών σε συνδιασμό: ένας ανιχνευτής UV που λειτουργεί στα 280 nm και ένας ανιχνευτής σκέδασης φωτός, ο οποίος λειτουργεί με λέιζερ υπό πολλαπλών γωνιών, τα δεδομένα λαμβάνονται στις 90ο.

Το ίδιο παρατηρήθηκε και για το δείγμα που θερμάνθηκε στους 60°C για 24 ώρες (Σχήμα 3γ). Ωστόσο, το χρωματογράφημα αλλάζει ριζικά στην περίπτωση των 100°C για 6 ώρες (Σχήμα 3δ). Η κορυφή που ανταποκρίνεται στον πληθυσμό των μεγάλων μακρομορίων μετατοπίζει το μέγιστό της σε μικρότερου μεγέθους μόρια (με χρόνο έκλουσης στα 12,1 ml), ακόμα μεγαλύτερα από τα πρότυπα ισοδύναμα της δεξτράνης στα 1,4 MDa. Η ενδιάμεση πλατειά κορυφή εξαφανίζεται, ενώ η κορυφή που αποδίδεται σε πρωτεΐνες αυξάνεται σε ένταση. Παρ' όλο που καμία επίσημη σχέση δεν μπορεί να καθοριστεί εύκολα μεταξύ της έντασης της σκέδασης και της συγκέντρωσης, οι προαναφερθήσες μεταβολές σε απόλυτη ένταση σκέδασης στις 90° πρέπει να σχετίζονται με αλλαγές στην σχετική συγκέντρωση και το μέγεθος των μακρομοριακών πληθυσμών.



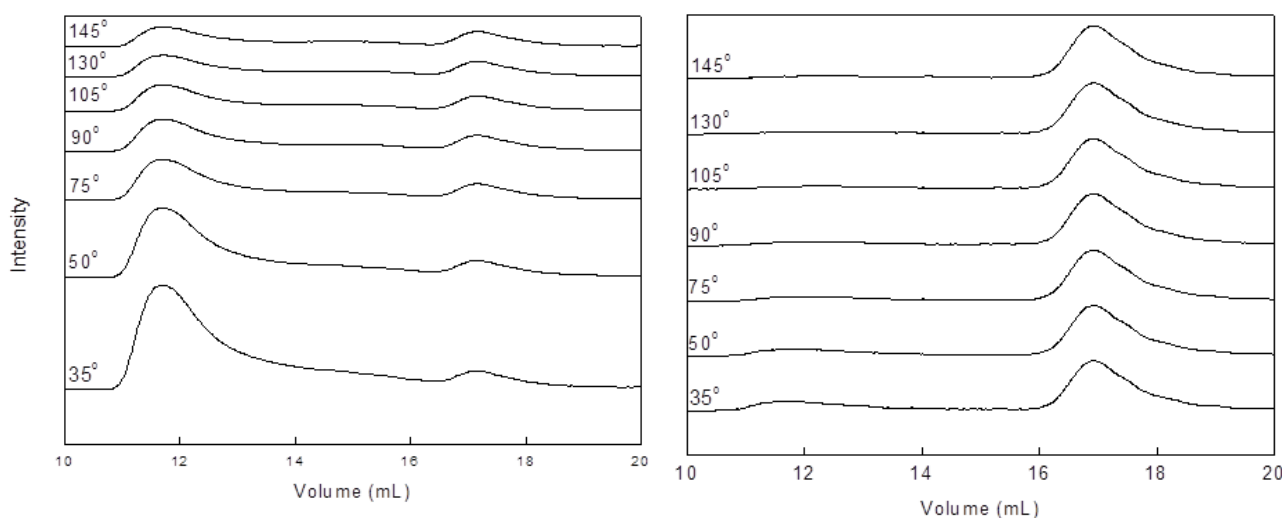
Σχήμα 3γ. Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγέθους για το εκχύλισμα μπάμιας το οποίο θερμάνθηκε στους 60°C για 24 ώρες. Το έκλουσμα αναλύθηκε με τη χρήση δύο ανιχνευτών σε συνδιασμό: ένας ανιχνευτής UV που λειτουργεί στα 280 nm και ένας ανιχνευτής σκέδασης φωτός, ο οποίος λειτουργεί με λέιζερ υπό πολλαπλών γωνιών, τα δεδομένα λαμβάνονται στις 90ο.



Σχήμα 3δ. Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγέθους για το εκχύλισμα μπάμιας το οποίο θερμάνθηκε στους 100°C για 6 ώρες. Το έκλουσμα αναλύθηκε με τη χρήση δύο ανιχνευτών σε συνδιασμό: ένας ανιχνευτής UV που λειτουργεί στα 280 nm και

ένας ανιχνευτής σκέδασης φωτός, ο οποίος λειτουργεί με λέιζερ υπό πολλαπλών γωνιών, όπου στην προκειμένη περίπτωση τα δεδομένα λαμβάνονται στις 90°.

Η γωνιακή εξάρτηση της σκέδασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί εδώ για να παρέχει κάποια συμπληρωματική εικόνα του σχετικού μεγέθους των σωματιδίων. Το Σχήμα 4 δείχνει το χρωματογράφημα με ανιχνευτή MALLS για επτά γωνίες σκέδασης, του μάρτυρα και του δείγματος που θερμάνθηκε στους 100°C για 6 ώρες. Το μέρος του σχήματος που αφορά τις 90° είναι κατα βάση το ίδιο με αυτό του Σχήματος 3. Μπορεί να φανεί ότι για τα σωματίδια που αντιστοιχούν στους μικρούς χρόνους έκλουσης, υπάρχει άμεση εξάρτηση μεταξύ σκέδασης φωτός και γωνίας σκέδασης, σε αντίθεση με τους πληθυσμούς των 16-18 ml. Η παρατήρηση ότι η σκέδαση μετατρέπεται σε ισοτροπική μετά από την θερμική επεξεργασία υποδηλώνει σαφώς ότι τα μακρομόρια γίνονται μικρότερα, ενώ σχεδόν όλοι οι μακρομοριακοί πληθυσμοί πλέον συνδέονται με χαρακτηριστικές ομάδες που απορροφούν στα 280 nm, δηλαδή περιέχουν αμινοξέα ή στα συστατικά τους στη δομή τους. Τέτοιες αλλαγές στην ταυτότητα των μακρομορίων συνδέονται και με αλλαγές στην χημική τους σύνθεση όπως είδαμε στην περίπτωση της FT-IR.

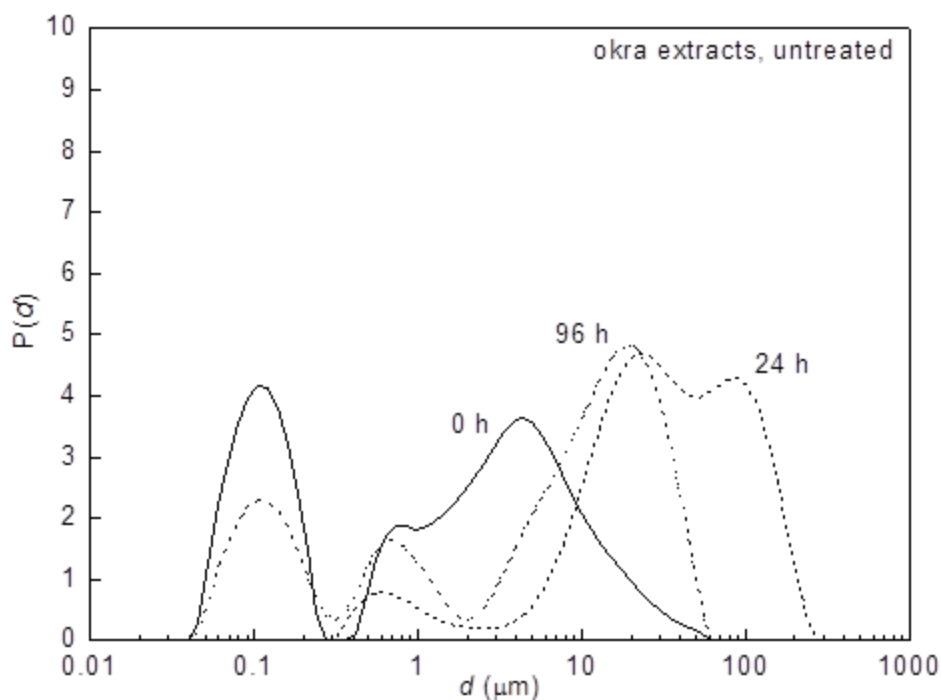


Σχήμα 4. γωνιακή εξάρτηση της σκέδασης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων μπάμιας (αριστερά) και του εκχυλίσματος που θερμάνθηκε στους 100°C για 6 ώρες (δεξιά). Η κλίμακα στους άξονες των  $y$  είναι η ίδια και στα δύο διαγράμματα ώστε να διευκολύνεται η άμεση σύγκρισή τους.

#### **4.1.3. Μελέτη κατανομής μεγέθους σταγονιδίων**

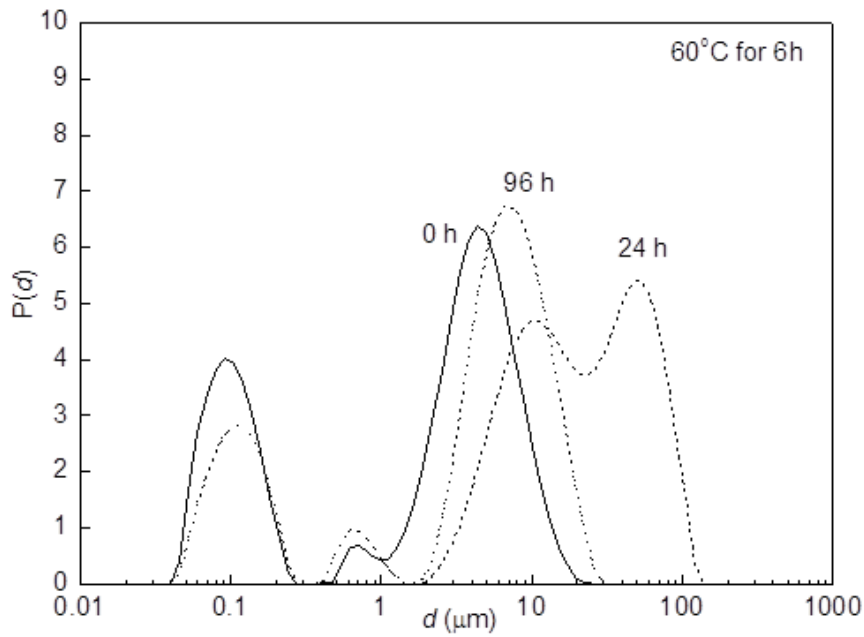
Το Σχήμα 5 παρουσιάζει την κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων δεκαεξανίου σε νερό (1% εκχύλισμα,  $\phi=0,13$ , pH 7). Όπως μπορεί να φανεί, στο Σχήμα 5α, το εκχύλισμα από μόνο του είναι φτωχός γαλακτωματοποιητής, παρά το περιεχόμενό του σε πρωτεΐνες. Μια αρχική

κατανομή μεγέθους σωματιδίων τριών μορφών λαμβάνεται με κορυφές στα 0,1  $\mu\text{m}$ , 0,7  $\mu\text{m}$  και 3  $\mu\text{m}$ . Η κορυφή των 0,1  $\mu\text{m}$  θα πρέπει να αποδοθεί σε μη προσροφημένα μακρομόρια, ενώ οι άλλες δύο ως σταγονίδια δεκαεξανίου. Ο μεγαλύτερος πληθυσμός μετατοπίζεται σε ένα μέγιστο κορυφής των 0,8  $\mu\text{m}$  μέσα σε 24 ώρες, ενώ μια πολυτροπική κατανομή των σωματιδίων της τάξεως των 10  $\mu\text{m}$  λαμβάνει χώρα μετά από 96 ώρες (Σχήμα 5α).

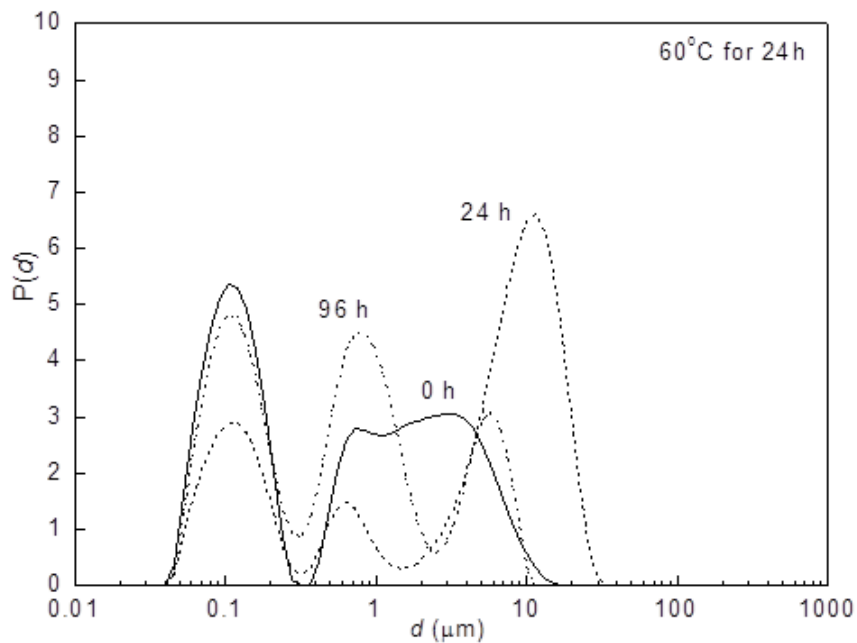


Σχήμα 5α. Χρονική εξέλιξη της κατανομής μεγέθους σωματιδίων του γαλακτώματος που περιέχει  $\varphi = 0,13$  δεκαεξάνιο γαλακτωματοποιημένο ( $\text{pH} 7$ ) με τη χρήση 1% εκχυλίσματος μπάμιας μη επεξεργασμένο.

Η μικροσκοπική εξέταση δείχνει ότι τα μεγαλύτερα σταγονίδια είναι συνενωμένα σωματίδια (Σχήμα 6). Η φτωχή γαλακτωματοποιητική ικανότητα των εκχυλισμάτων μπάμιας σε ουδέτερο  $\text{pH}$  είναι μια καλά εδραιωμένη πραγματικότητα (Alba et al., 2013). Η θέρμανση στους  $60^\circ\text{C}$  για μέχρι 24 ώρες δεν φαίνεται να αυξάνει την γαλακτωματοποιητική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Σχήμα 5β, 5γ). Το Σχήμα 5 δείχνει ότι τέτοια δείγματα συγχωνεύονται σε μεγάλο βαθμό 24 ώρες μετά την προετοιμασία τους.

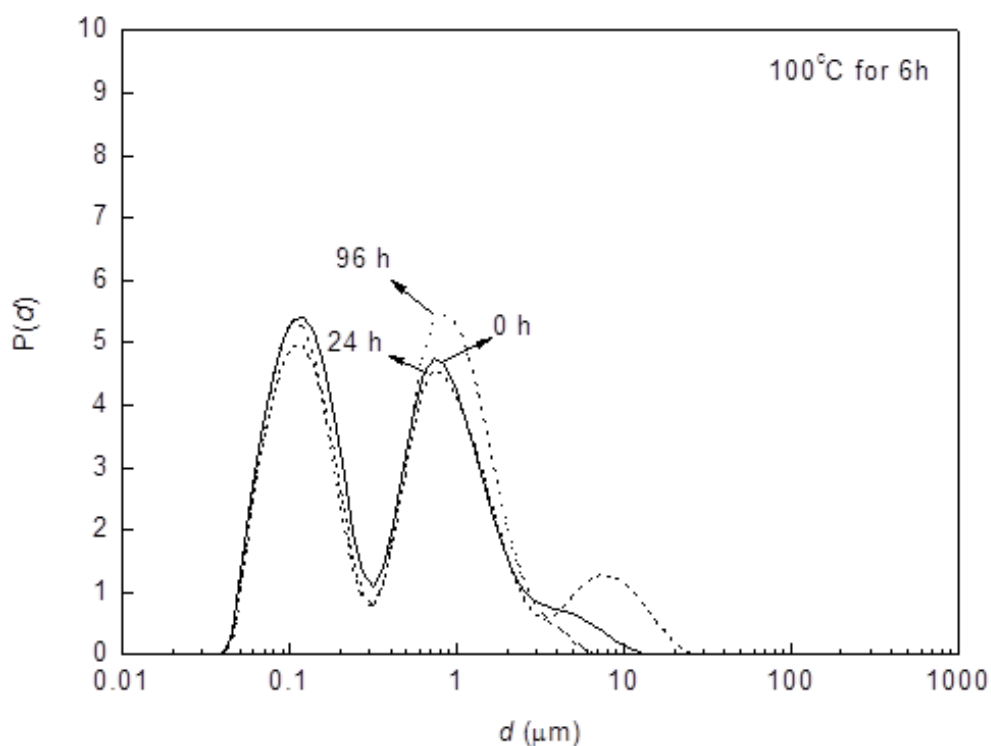


Σχήμα 5β. Χρονική εξέλιξη της κατανομής μεγέθους σωματιδίων του γαλακτώματος που περιέχει  $\phi = 0,13$  δεκαεξάνιο γαλακτωματοποιημένο ( $\rho H$  7) με τη χρήση 1% εκχυλίσματος μπάμιας επεξεργασμένο στους  $60^{\circ}C$  για 6 ώρες.

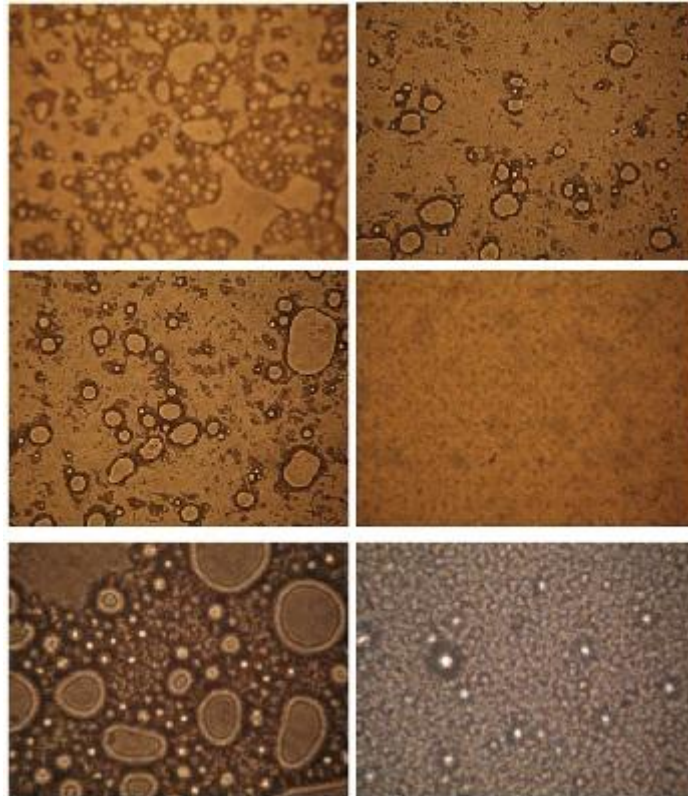


Σχήμα 5γ. Χρονική εξέλιξη της κατανομής μεγέθους σωματιδίων του γαλακτώματος που περιέχει  $\phi = 0,13$  δεκαεξάνιο γαλακτωματοποιημένο ( $\rho H$  7) με τη χρήση 1% εκχυλίσματος μπάμιας επεξεργασμένο στους  $60^{\circ}C$  για 24 ώρες.

Αυτό ήταν αναμενόμενο, εφόσον τα στοιχεία από τη SEC δείχνουν ότι τα κομμάτια του πολυσακχαρίτη είναι σε μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστα από άποψη μεγέθους και σύνθεσης μετά από τις επεξεργασίες των 60°C (Σχήμα 3α, 3β). Η εικόνα διαφοροποιείται μετά από την επεξεργασία των 100°C για 6 ώρες, το Σχήμα 5δ δείχνει τα αποτελέσματα που προήλθαν από αυτό το δείγμα. Η κορυφή που αντιστοιχεί στα σταγονίδια διαμέτρου 1 μm, δεν μεταβάλλεται σχεδόν καθόλου μέσα σε 96 ώρες. Η μικροσκοπική εξέταση του δείγματος επιβεβαιώνει αυτήν την παρατήρηση, καθώς απεικονίζει γαλακτώμα 24 ωρών αποτελούμενο εξ ολοκλήρου από μικρά σταγονίδια.



Σχήμα 5δ. Χρονική εξέλιξη της κατανομής μεγέθους σωματιδίων του γαλακτώματος που περιέχει  $\phi = 0,13$  δεκαεξάνιο γαλακτωματοποιημένο (pH 7) με τη χρήση 1% εκχυλίσματος μπάμιας επεξεργασμένο στους 100°C για 6 ώρες.



Σχήμα 6. Φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας που λήφθηκαν 24 ώρες μετά την προετοιμασία γαλακτωμάτων που περιέχουν  $\varphi=0,13$  δεκαεξανίου γαλακτωματοποιημένο με 1% υδατικό διάλυμα εκχυλισμάτων μπάμιας (pH 7). Επάνω αριστερά: απο μη επεξεργασμένο εκχύλισμα (με φακό 10x). Επάνω δεξιά: απο επεξεργασμένο εκχύλισμα στους 60°C για 6 ώρες (με φακό 10x). Μέση αριστερά: 60°C για 24 ώρες (με φακό 10x). Μέση δεξιά: 100°C για 6 ώρες (με φακό 10x). Κάτω αριστερά: από μη επεξεργασμένο εκχύλισμα (με φακό 100x). Κάτω δεξιά: από εκχύλισμα επεξεργασμένο στους 100°C για 6 ώρες (με φακό 100x).

Η σημαντική αύξηση των γαλακτωματοποιητικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, πρέπει να αποδοθεί στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των υδροφοβικών τμημάτων των πρωτεϊνών και το υδροφιλικού τμήματος του πολυσακχαρίτη. Το υψηλό ζ-δυναμικό των προϊόντων των αντιδράσεων Maillard υποδηλώνει ότι ηλεκτροστατικές απώσεις λόγω των αρνητικά φορτισμένων προσροφημένων πολυμερών μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην σταθερότητα του γαλακτώματος. Σε ένα ιδανικό σενάριο, το πρώτο θα πρέπει να προσφέρει στα προϊόντα σύζευξης τη δυνατότητα να προσροφηθούν σε υδρόφοβη επιφάνεια, μια τυπική ιδιότητα των πρωτεϊνών, ενώ το τελευταίο θα πρέπει να προσφέρει στερεοχημική σταθεροποίηση ως προς την συγχώνευση των σταγονιδίων (Dickinson, 1992)(Ritzoulis, 2013)

Ένα εύλογο ερώτημα που τίθεται είναι γιατί το μη επεξεργασμένο εκχύλισμα δεν δείχνει ικανότητα γαλακτωματοποίησης, ενώ τα επεξεργασμένα το κάνουν, δεδομένου ότι τα πρώτα έχουν επίσης ένα πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Η απάντηση πρέπει να σχετίζεται με το γεγονός ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των

εκχυλισμάτων είναι μικρό (στην συγκεκριμένη περίπτωση περίπου 15%). Αυτό υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται πραγματικά για γαλακτωματοποίηση στο γαλάκτωμα που γίνεται με μη επεξεργασμένο εκχύλισμα δεν είναι πάνω από 0,15%, ποσότητα πολύ μικρή για να παρέχει πλήρη κάλυψη της διεπαφής σε γαλάκτωμα που περιέχει  $\phi=0,13$  και σταγονίδια μεγέθους από 1  $\mu\text{m}$ . Το ίδιο ισχύει και για τα εκχυλίσματα που θερμάνθηκαν στους 60°C. Σύμφωνα με τα δεδομένα από την SEC και την FT-IR, η κατάσταση αλλάζει δραματικά μόνο μετά από θέρμανση στους 100°C για 6 ώρες. Οι αλυσίδες των πολυσακχαριτών χωρίστηκαν και συνδέθηκαν ομοιοπολικά μέσω αντιδράσεων Maillard με τα συστατικά της πρωτεΐνης. Αυτές οι νέες ενώσεις σχηματίζουν ένα πολύ μεγαλύτερο ποσοστό του εκχυλίσματος και ως επί το πλείστον αρκούν για να κορεστεί η διεπιφάνεια δεκαεξανίου-νερού και να σχηματιστεί ένα προστατευτικό στρώμα προσροφημένων πολυμερών.

Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η μπάμια μπορεί να σχηματίσει τη βάση για κατασκευή καλών γαλακτωματοποιητών για εφαρμογές τροφίμων. Μεγάλης τεχνολογικής σημασίας είναι το γεγονός ότι οι αντιδράσεις Maillard λαμβάνουν χώρα εντός των συστατικών του εκχυλίσματος της μπάμιας.

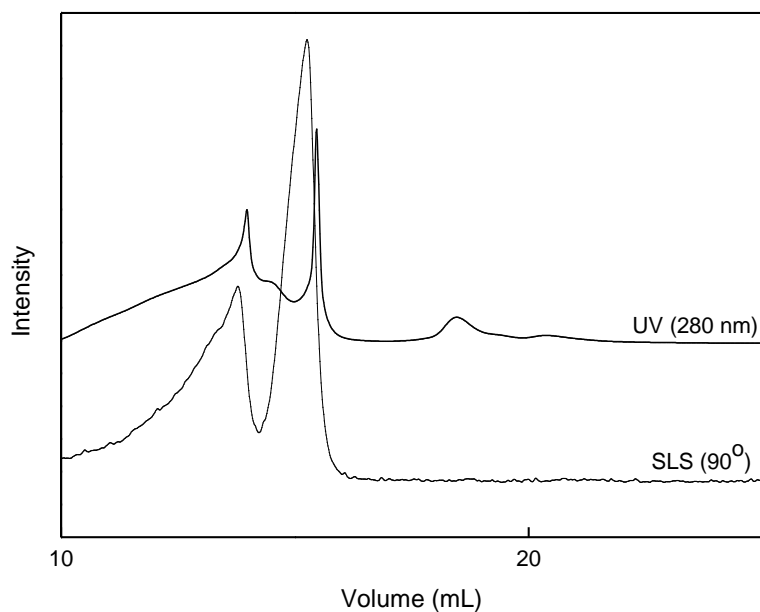
## **4.2. 2<sup>ο</sup> στάδιο πειραματικής διαδικασίας**

Στα πλαίσια αυτής της έρευνας, κρίθηκε σκόπιμο να συγκριθούν οι γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες αυτού του νέου γαλακτωματοποιητή με ένα πιο συμβατικό γαλακτωματοποιητή από αντιδράσεις Maillard κατασκευασμένο συγκεντρώνοντας εκχύλισμα μπάμιας με μια τυπική πρωτεΐνη τροφίμων. Ένα από τα κύρια μοντέλα πρωτεϊνών, η αλβουμίνη ορού των βοοειδών (BSA: bovine serum albumin) επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί με αυτήν την ιδιότητα, λόγω της εμπορικής της διαθεσιμότητας σε υψηλή καθαρότητα, της πολύ καλά χαρακτηρισμένης δομής της και τις καλά κατανοητές δυνατότητες γαλακτωματοποίησης της. Για την παρασκευή αυτών των προϊόντων σύζευξης, εκχυλίσματα μπάμιας και BSA θερμάνθηκαν στους 100°C για 6 ώρες σε αναλογίες 3:1 και 1:1. Η επιλογή των συνθηκών θέρμανσης έγινε βάση των καλύτερων αποτελεσμάτων των μη εμπλουτισμένων δειγμάτων μπάμιας.

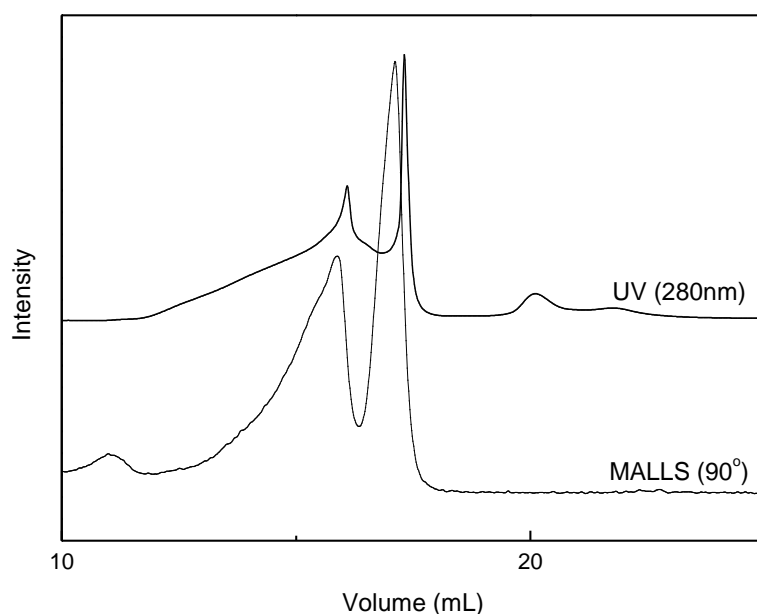
### **4.2.1. Μελέτη χρωματογραφήματων αποκλεισμού μεγέθους**

Τα Σχήματα 7α και 7β δείχνουν τα χρωματογραφήματα αποκλεισμού μεγέθους των υλικών που παράχθηκαν. Συγκριτικά με αυτά του Σχήματος 3α, όπου απεικονίζεται το ανεπεξέργαστο δείγμα, παρατηρούμε ότι οι μεγάλοι μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες έχουν διασπαστεί, ενώ το χρωματογράφημα αποτελείται από δύο πληθυσμούς, οι οποίοι απορροφούν και οι δύο στα 280 nm, δηλαδή περιέχουν λογικά πεπτιδικά τμήματα. Αυτός που αντιστοιχεί στα μεγαλύτερα μόρια, περίπου στα 15 ml, πρέπει να σχετίζεται με σύμπλοκα πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη τα οποία είναι μεγαλύτερα από την BSA και τις πρωτεΐνες της μπάμιας, αλλά μικρότερα από τους αρχικούς πολυσακχαρίτες (εδώ καταγράφονται ως μια μικρή κορυφή στα 11 ml περίπου στο Σχήμα 7β).





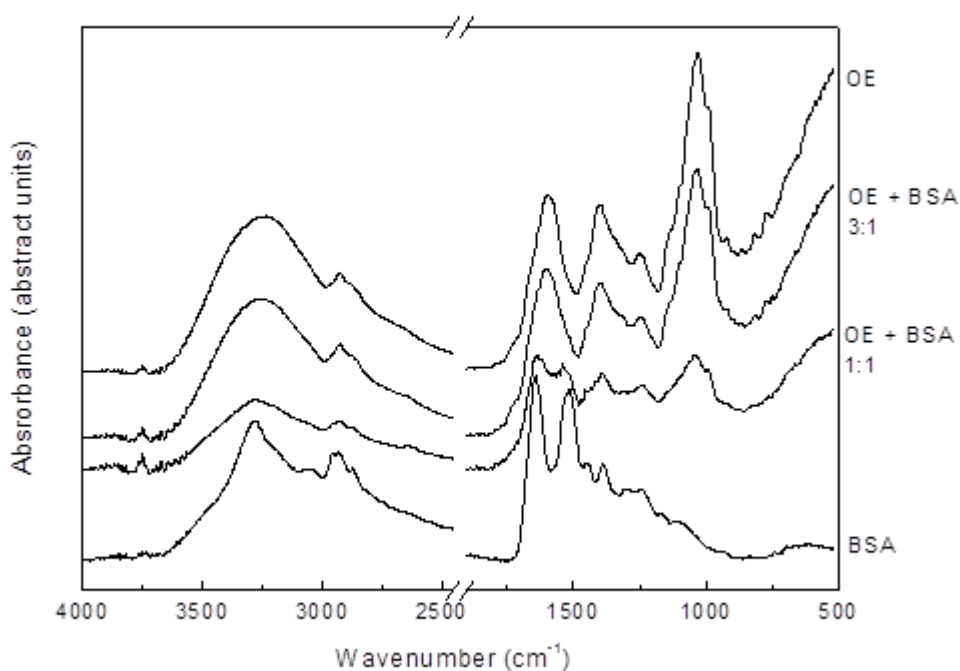
Σχήμα 7α: Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγέθους εχυλίσματος μπάμιας που συνεπεξεργάστηκε με BSA (1:1). Το έκλουσμα αναλύθηκε με τη χρήση δύο ανιχνευτών σε συνδιασμό: ένας ανιχνευτής UV που λειτουργεί στα 280 nm και ένας ανιχνευτής σκέδασης φωτός, ο οποίος λειτουργεί με λέιζερ υπό πολλαπλών γωνιών, τα δεδομένα λαμβάνονται στις 90°.



Σχήμα 7β: Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγέθους εχυλίσματος μπάμιας που συνεπεξεργάστηκε με BSA (εκχύλισμα:BSA 3:1). Το έκλουσμα αναλύθηκε με τη χρήση δύο ανιχνευτών σε συνδιασμό: ένας ανιχνευτής UV που λειτουργεί στα 280 nm και ένας ανιχνευτής σκέδασης φωτός, ο οποίος λειτουργεί με λέιζερ πολλαπλών γωνιών, τα δεδομένα λαμβάνονται στις 90°.

#### 4.2.2. Μελέτη φασμάτων υπερύθρου

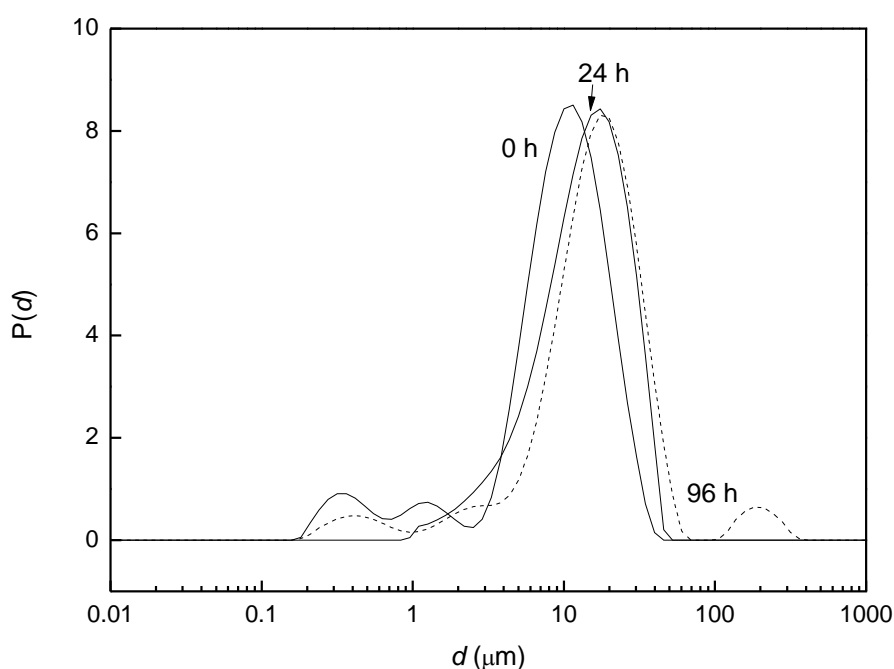
Η ριζική αλλαγή στους πολυσακχαρίτες καθώς και στη BSA μπορεί να επιβεβαιωθεί μέσω της FT-IR. Το Σχήμα 8 δείχνει τα φάσματα υπερύθρων της BSA και των προϊόντων σύζευξης των εκχυλισμάτων μπάμιας με τη BSA. Η σύγκριση του τελευταίου με την BSA και των μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων στο Σχήμα 2, δείχνει ότι τα νέα προϊόντα έχουν σημαντικά διαφορετική χημική σύσταση από τους δύο προκατόχους τους. Η δραματική μείωση της κορυφής περίπου στα  $1000\text{ cm}^{-1}$  υποδηλώνει την διάσπαση της δομής του πολυσακχαρίτη, ενώ οι περιοχές αμιδίου της BSA έχουν επίσης μεταβληθεί σημαντικά στα δυο προϊόντα σύζευξης. Μια σύνθετη σειρά νέων κορυφών εμφανίζεται στα  $1400\text{ cm}^{-1}$  και  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Οι κορυφές αυτές θυμίζουν αυτές που σχηματίστηκαν μετά από την θέρμανση των γαλακτωμάτων στους  $100^{\circ}\text{C}$  για 6 ώρες (Σχήμα 2). Μετά τα παραπάνω, είναι ασφαλές να ισχυριστούμε ότι τα προϊόντα αυτά είναι όντως προϊόντα σύζευξης με ομοιοπολικούς δεσμούς από αντιδράσεις Maillard.



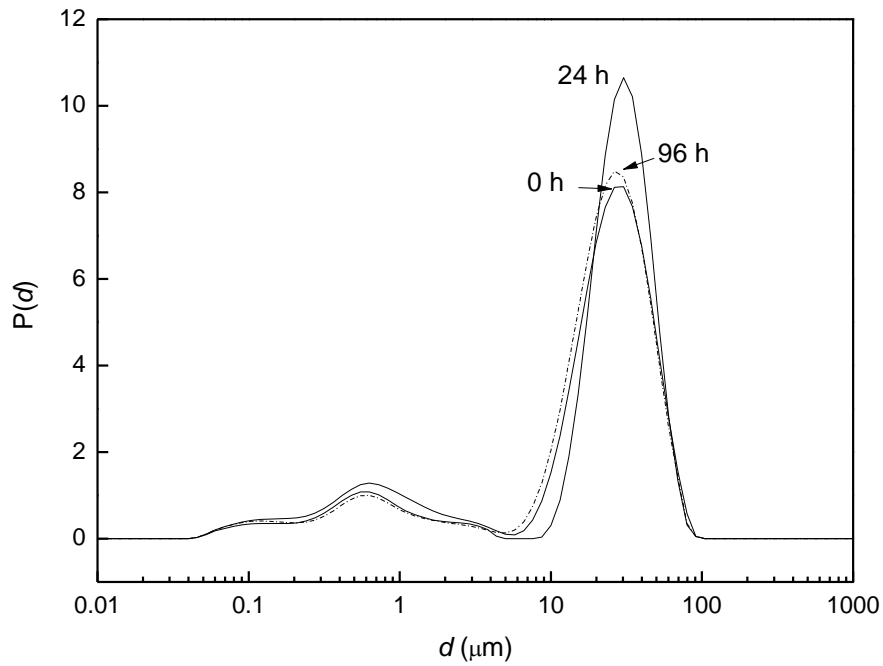
Σχήμα 8. Φάσματα υπερύθρων μετασχηματισμού Fourier που λαμβάνονται για τα θερμικά και μη επεξεργασμένα εκχυλίσματα, με τα πρώτα να περιέχουν BSA σε διαφορετικές αναλογίες.

### 4.2.3. Μελέτη κατανομής μεγέθους σταγονιδίων

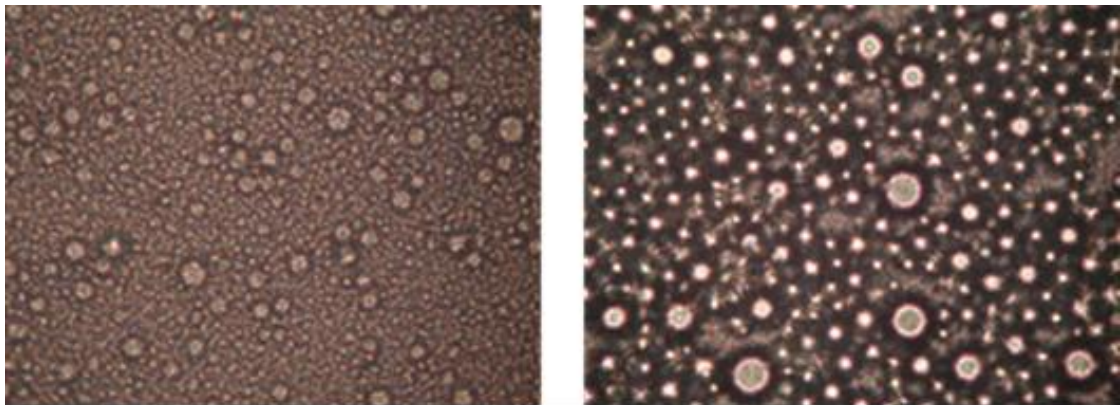
Τα Σχήματα 9α και 9β δείχνουν την εξέλιξη της κατανομής μεγέθους σωματιδίων σε βάθος χρόνου για τα δύο προϊόντα σύζευξης που παρασκευάστηκαν. Και τα δύο υλικά είναι αποτελεσματικοί γαλακτωματοποιητές όσον αφορά τη σταθεροποίηση βάση χρόνου, με μικρή αλλαγή να παρατηρείται στην διάμετρο των σταγονιδίων μέσα σε 96 ώρες. Τα σταγονίδια που παράχθηκαν, παρόλα αυτά, είναι είκοσι με τριάντα φορές μεγαλύτερα από αυτά που παράχθηκαν με το μη εμπλουτισμένο θερμικά επεξεργασμένο εκχύλισμα μπάμιας στους 100°C για 6 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή που αντιστοιχεί στον κυρίως πληθυσμό των συζευγμάτων του δείγματος 1:1 επικεντρώνεται γύρω στα 20 μm, ενώ αυτή που ανταποκρίνεται στα προϊόντα σύζευξης του δείγματος 3:1 επικεντρώνεται γύρω στα 30 μm. Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται με τις εικόνες οπτικής μικροσκοπίας του Σχήματος 10. Συγκριτικά, θα πρέπει να υπενθυμιστεί ότι η κυρίως κορυφή για το δείγμα των 100°C για 6 ώρες ήταν στο 1 μm, σταθερή για 96 ώρες. Αυτό σημαίνει, πως τα εγγενή προϊόντα σύζευξης του τελευταίου είναι πιο αποτελεσματικοί γαλακτωματοποιητές από εκείνων του εμπλουτισμένου με BSA εκχυλίσματος. Αυτό προσθέτει αξία στο ευρέως χρησιμοποιούμενου υλικό υδροκolloειδούς, το οποίο χρησιμοποιείται περισσότερο σαν πυκνωτικό μέσω παρά σαν γαλακτωματοποιητής.



Σχήμα 9α. Χρονική εξέλιξη της κατανομής μεγέθους σωματιδίων του γαλακτώματος που περιέχει  $\phi = 0,13$  δεκαεξάνιο γαλακτωματοποιημένο (pH 7) με τη χρήση 1% εκχυλίσματος μπάμιας με BSA 1:1.



Σχήμα 9α. Χρονική εξέλιξη της κατανομής μεγέθους σωματιδίων του γαλακτώματος που περιέχει  $\phi = 0,13$  δεκαεξάνιο γαλακτωματοποιημένο (pH 7) με τη χρήση 1% εκχυλίσματος μπάμιας με BSA 3:1.

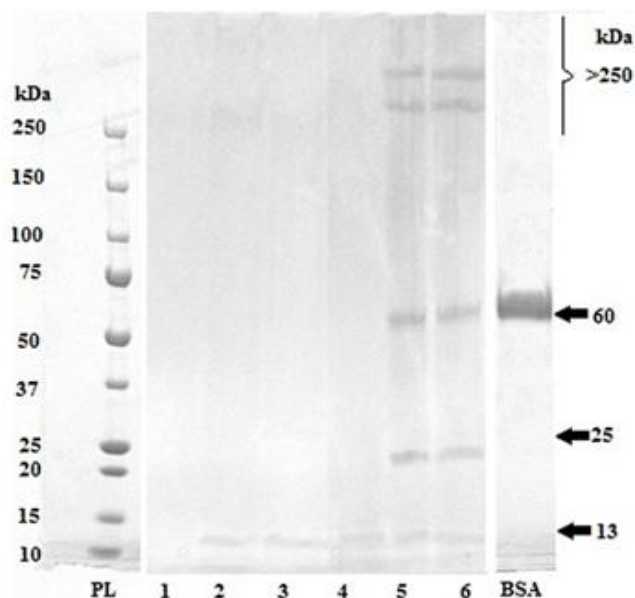


Σχήμα 10. Φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας που λήφθηκαν 24 ώρες μετά την προετοιμασία γαλακτωμάτων που περιέχουν  $\phi=0,13$  δεκαεξανίου γαλακτωματοποιημένο με 1% υδατικό διάλυμα εκχυλισμάτων μπάμιας με BSA (pH 7). Αριστερα: 1:1. Δεξιά: 3:1.

## 4.2.4. Μελέτη επιφανειακού φορτίου και μεγέθους σωματιδίων

### 4.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση

Το Σχήμα 11 δείχνει τα ηλεκτρογράμματα του μη επεξεργασμένου και όλων των προαναφερθέντων προϊόντων σύζευξης. Μπορεί να φανεί ότι τόσο στο ακατέργαστο όσο και στο κατεργασμένο εκχύλισμα μπάμιας, εμφανίζεται μια μόνο ζώνη πρωτεΐνης, η οποία ανταποκρίνεται στο χρόνο έκλουσης των πρότυπων πρωτεϊνών της τάξεως των 13 kDa. Αυτή πρέπει λογικά να είναι η κορυφή στα 17-18 ml στα Σχήματα που αφορούν την SEC (Σχήμα 3, 4). Καμία άλλη ζώνη δεν μπορεί να διακριθεί στα δείγματα που παρασκευάστηκαν μόνο με εκχύλισμα μπάμιας. Φαίνεται ότι η σύζευξη με τα τμήματα των πολυσακχαριτών οδηγεί σε σωματίδια χαμηλής πυκνότητας φορτίου και δύσκολα συνδέεται με τα μόρια του SDS ώστε να αποκλείσει κινητικότητα στο πεδίο ηλεκτροφόρησης. Σχετικά με τα δείγματα που περιέχουν και BSA, η αρχική ζώνη της BSA είναι ορατή κατά προσέγγιση στα 60 kDa, πράγμα που σημαίνει ότι μέρος της πρωτεΐνης δεν έχει αντιδράσει. Μεγάλου ενδιαφέροντος είναι οι άλλες ζώνες και πιο συγκεκριμένα αυτές που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες περίπου των 25 kDa και αυτές που αντιστοιχούν σε πολύ μεγάλα μόρια, τέσσερις φορές μεγαλύτερα από το αρχικό βάρος της BSA ή και ακόμη περισσότερο. Τα μακρομόρια που αντιστοιχούν στην πρώτη ζώνη (25 kDa) είναι προφανώς προϊόντα διάσπασης της BSA, ενώ αυτά που αντιστοιχούν στην δεύτερη (>250 kDa) πρέπει να περιλαμβάνουν ουσιαστικά συστατικά πολυσακχαρίτη, όπως μπορεί να φανεί και στα Σχήματα 7α και 7β (κορυφή των 15 ml).



Σχήμα 11. Ηλεκτρογράφημα από SDS-PAGE των υπό μελέτη δειγμάτων. PL: πρότυπα μοριακά βάρη, 1: μάρτυρας (ακατέργαστο εκχύλισμα), 2: δείγμα 60°C για 6 ώρες, 3: 60°C για 24 ώρες, 4: 100°C για 6 ώρες, 5: 100°C για 6 ώρες με BSA (1:1), 6: 100°C για 6 ώρες με BSA (3:1).

#### 4.2.4.2. Z-δυναμικό

Η μέτρηση του Z-δυναμικού των δειγμάτων μπορεί να δώσει κάποιες πληροφορίες σχετικά με το επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων που σχηματίζονται από τα μακρομοριακά συστατικά των εκχυλισμάτων. Ο Πίνακας 2 εκθέτει το ζ-δυναμικό των διαλυμάτων των υλικών πριν και μετά την θερμική επεξεργασία. Όπως φαίνεται, το μη επεξεργασμένο εκχύλισμα έχει αρνητική τιμή ζ-δυναμικού στα -26,7 mV. Αυτό θα πρέπει να αποδοθεί στους προαναφερθέντες πληθυσμούς πρωτεϊνών και, σε κάποιο βαθμό, στους καρβοξυλικούς υποκαταστάτες των πολυσακχαριτών. Η θερμική επεξεργασία οδηγεί σε μια αύξηση των απόλυτων τιμών του μετρούμενου ζ-δυναμικού. Έτσι, η επεξεργασία στους 60°C φέρνει τιμές μεταξύ 34 mV και 36 μV. Καθώς το ζ-δυναμικό σχετίζεται με την κινητικότητα των φορτισμένων πληθυσμών σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, τέτοιες αλλαγές μπορούν να αποδοθούν σε μεταβολές στην διαμόρφωση και στην κατανομή των πληθυσμών μεταξύ των δειγμάτων. Αν και τα δεδομένα της SEC δέν έδειξαν μεταβολές στην αναλογία των πληθυσμών, όσον αναφορά τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους στους 60°C, μια προσεκτική εξέταση των δεδομένων της FTIR δείχνει κάποιες μικρές χημικές διαφοροποιήσεις μεταξύ του μάρτυρα και των δειγμάτων στους 60°C (πχ. Στις περιοχές μεταξύ 1500 cm<sup>-1</sup> και 1000 cm<sup>-1</sup>). Η θέρμανση στους 100°C οδηγεί σε περαιτέρω μείωση του ζ-δυναμικού, δίνοντας μια μέση τιμή -38,14 mV. Όπως μπορεί να φανεί από τα διαγράμματα της SEC, τα δείγματα αυτά είναι αισθητά διαφορετικά από τα άλλα δείγματα και αλλαγές στην διαμόρφωση και την κινητικότητα είναι εύκολα εμφανείς στις τιμές του ζ-δυναμικού τους.

Πίνακας 2. Τιμές ζ-δυναμικού των υπό μελέτη δειγμάτων

Δείγμα	Μάρτυρας	60°C, 6h	60°C, 24h	100°C, 6h	100°C, 6h μπάμια + BSA 1:1	100°C, 6h μπάμια + BSA 3:1
Z-δυναμικό (mV)	-26.70	-33.63	-34.61	-38.14	-42.51	-24.21
st. dev. (mV)	2.70	3.97	2.05	3.25	6.31	6.84

Τα παραπάνω μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δώσουν μια πρώτη γενική εικόνα των αλλαγών που έλαβαν χώρα κατά την θερμική επεξεργασία. Ο πολυσακχαρίτης που σχηματίζει το υψηλού μοριακού βάρους συστατικό των εκχυλισμάτων μπάμια διασπάται σε επιμέρους συστατικά τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα αντιδράσεων Maillard με τις υπάρχουσες πρωτεΐνες. Η διάσπαση δεν είναι σημαντική στους 60°C, παρ'όλαυτά αντιδράσεις Maillard μεταξύ των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών συμβαίνουν ακόμη και σε αυτή την θερμοκρασία, ειδικά κατά την διάρκεια της μεγαλύτερης επεξεργασίας (24 ώρες). Μετά από 6 ώρες στους 100°C, το δείγμα συνθέτουν κατα κύριο λόγο

μικρότερα μόρια, που αποτελούνται από τμήματα πολυσακχαριτών και πρωτεΐνης.

Συστατικά σαν αυτά που σχηματίζονται στους 100°C μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν γαλακτωματοποιητές, καθώς συνδυάζουν υδροφοβικά κομμάτια που αποτελούνται από πεπτίδια πρωτεΐνης, μαζί με μεγάλες υδρόφιλες ουρές αποτελούμενες από τα πολικά κομμάτια των πεπτιδίων και τα ομοιοπολικά δεσμευμένα μέρη του πολυσακχαρίτη.

## **5. Συμπεράσματα**

Κατά την ελεγχόμενη θέρμανση, στην συγκεκριμένη περίπτωση 100°C για 6 ώρες, το λυοφιλιωμένο εκχύλισμα από υδροκολλοειδή μπάμιας μπορεί να αποκτήσει πολύ καλές γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες. Αυτό οφείλεται στο σχηματισμό συζυγών που προκύπτουν από αντιδράσεις Maillard μεταξύ των πολυσακχαριτών και των πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων. Αυτά τα προϊόντα σύζευξης είναι καλύτεροι γαλακτωματοποιητές απ' ό,τι τα άλλα προϊόντα που κατασκευάστηκαν με αντιδράσεις Maillard μεταξύ των συστατικών εκχυλίσματος και της BSA, μιας πρωτεΐνης γνωστής για την γαλακτωματοποιητική της ικανότητα. Η διαπίστωση αυτή αποκτά κάποια σημασία λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το ακατέργαστο εκχύλισμα μπάμιας σε pH 7 είναι κακός γαλακτωματοποιητής, ενώ, κάτω από τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα, γίνεται καλός γαλακτωματοποιητής χωρίς καμία επιπλέον προσθήκη συστατικών.

## **6. Βιβλιογραφία**

Aitken A., Learmonth P. (2009) Protein determination by UV absorption in Walker J.W. (ed) *The Protein Protocols Handbook* (3<sup>rd</sup> ed) Humana Press, NY

Akhtar M., Dickinson E. (2007). Whey protein–maltodextrin as emulsifying agents: An alternative to gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, **21**, 607–616

Alba K., Ritzoulis C., Georgiadis N., Kontogiorgos V. (2013). Okra extracts as emulsifiers for acidic emulsions. *Food Research International*, **54**, 1730–1737

Belton P.S., Hirsch J., & Ebringerová A. (1998). Hydration properties of xylan-type structures: An FTIR study of oligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**, 38–44.

Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (2008). Fennema's Food Chemistry 4<sup>th</sup> edition pp 784-793. CRC Press, NY.

Dickinson E., Galazka V.B. (1991). Emulsions stabilization by ionic and covalent complexes of  $\beta$ -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **5**, 281–296

Dickinson E., Semenova M.G. (1992). Emulsifying properties of covalent protein–dextran hybrids. *Colloids and Surfaces*, **64**, 299–310

Diftis N., Kiosseoglou V. (2003). Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethylcellulose. *Food Chemistry*, **81**, 1–6

Dunlap C.A., Côté G.L. (2005).  $\beta$ -Lactoglobulin–dextran conjugates: Effect of polysaccharide size on emulsion stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 419–423

Einhorn-Stoll U., Ulbrich M., Sever S., Kunzek H. (2005). Formation of milk protein–pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled heat-drying. *Food Hydrocolloids*, **19**, 329–340

Gaborieau M., Castingolles P (2011). Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Anal Bioanal Chem*; **399**, 1413–1423.

Georgiadis N., Ritzoulis C., Sioura G., Kornezou P., Vasiliadou C., Tsiptsias C. (2011). Contribution of okra extracts to the stability and rheology of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, **25**, 991–999



Karayannakidis P.D. (2007). The effect of washing, frozen storage and various additives on the properties of sardine (*Sardina pilchardus*) kamaboko gels. Ph.D. thesis, University of Lincoln, Lincoln, Lincolnshire, U.K, 2007

Kong J., Yu S., (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **39**, 549–559

Kontogiorgos V., Margelou I., Georgiadis N., Ritzoulis C. (2012). Rheological characterization of okra pectins. *Food Hydrocolloids*, **29**, 356–362

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685

Ledl F. (1990). The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology, pp 19-20, edited by Finot P.A., Aeschbacher H.U., Hurrell R.F., Lkardon R., Berlin.

Li C., Hue H., Chen Z., Ding Q., Wang X. (2014). Comparative studies on the physicochemical properties of peanut protein isolate-polysaccharide conjugates via glucosylation. *Food Research International*, **57**, 1–7

Mishra S., Mann B., Joshi V.K. (2001). Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. *Food Hydrocolloids*, **15**, 9–15

Neugebauer U., Schmid U., Baumann K., Ziebuhr W., Kozitskaya S., Deckert V., Schmitt M., Popp J. (2007). Towards a Detailed Understanding of Bacterial Metabolism – Spectroscopic Characterization of *Staphylococcus Epidermidis*. *ChemPhysChem*, **8**, 124–137.

Omoike A., Chorover, J. (2004). Spectroscopic Study of Extracellular Polymeric Substances from *Bacillus subtilis*: Aqueous Chemistry and Adsorption Effects, *Biomacromolecules*, **5**, 1219–1230.

Sengkhampan N., Sagis L.M.C, Vries R., Schols H.A., Sajjaanantakul T., Voragen A.G.J. (2010). Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) *Food Hydrocolloids*, **24**, 35-41.

Sengkhampan N., Verhoef R., Schols H.A., Sajjaanantakul T., Voragen A.G.J. (2009). Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) *Carbohydrate Research*, **344**, 1824-1832.

Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. (2005). Principles of instrumental analysis 5<sup>th</sup> edition. pp 881-885, 904-906.

Ritzoulis C (2013). Introduction to the physical chemistry of foods. CRC Press: Boca Raton;

Richardson R. Scattering and Reflection Techniques (2005) Chapter 12 in Colloid Science. Principles, Methods and Applications, Cosgrove T. (ed) p 228–254, Blackwell Publishing, Oxford.

Robert P., Marquis M., Barron C., Guillon F., Saulnier L. (2005). FT-IR Investigation of Cell Wall Polysaccharides from Cereal Grains. Arabinoxylan Infrared Assignment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7014–7018.

Spotti M.J., Martinez M.J., Pilosof A.M.R., Candiotti M., Rubiolo A.C., Carrara C.R. (2014). Rheological properties of whey protein and dextran conjugate at different reaction times. *Food Hydrocolloids*, **38**, 76–84

Wilson R.H., Smith A.C., Kačuráková M., Saunders P.K., Wellner N., Waldron K.W. (2000). The Mechanical Properties and Molecular Dynamics of Plant Cell Wall Polysaccharides Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Plant Physiology*, **124**, 397–405.

Zhang J., Wu N., Lan T., Yang X. (2014). Improvement in emulsifying properties of soy protein isolate in conjugation with maltodextrin using high-temperature, short-time dry-heating Maillard reaction. *International Journal of Food Science and Technology*, **49**, 460–467