



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

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΣΑΛΕΠΙ ΚΑΙ  
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ  
ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΛΑΔΙΟΥ ΣΕ ΝΕΡΟ**

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΟΥΣ ΒΑΛΕΝΤΙΝΟΣ – ΚΕΧΑΓΙΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012**

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΣΑΛΕΠΙ ΚΑΙ  
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ  
ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΛΑΔΙΟΥ ΣΕ ΝΕΡΟ

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΟΥΣ ΒΑΛΕΝΤΙΝΟΣ – ΚΕΧΑΓΙΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

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

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2012

ΓΕΩΡΓΙΑΔΗΣ ΝΙΚΟΣ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον καθηγητή του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων , κ. Γεωργιάδη Νίκο , για την αμέριστη συμπαράσταση του ώστε να έρθει εις πέρας αυτή η εργασία.

# ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΣΑΛΕΠΙ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΛΑΔΙΟΥ ΣΕ ΝΕΡΟ

Αριστοτέλους Βαλεντίνος – Κεχαγιάς Ανδρέας

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης , Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής , Τμήμα  
Τεχνολογίας Τροφίμων , 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141

## Περίληψη

Εκχυλίσματα πολυσακχαριτών παραλήφθηκαν από σαλέπι με την βοήθεια υδατικών διαλυμάτων οξικού νατρίου (HBSS), EDTA, (CHSS) και αραιού αλκάλειου (DASS) και μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης τους στην σταθερότητα γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό.

Η προσθήκη HBSS προκάλεσε αποκορύφωση του γαλακτώματος, ο βαθμός της οποίας ήταν μεγαλύτερος όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του προστιθέμενου εκχυλίσματος πολυσακχαριτών. Αυτό οφείλεται πιθανόν σε φαινόμενα εκκένωσης του ενδιάμεσου χώρου μεταξύ των σταγονιδίων (depletion) που προκαλείται από μη προσροφημένα μακρομόρια λόγω οσμωτικών φαινομένων. Το εκχύλισμα CHSS προκάλεσε καθυστέρηση στην εμφάνιση αποκορύφωσης, αλλά ο βαθμός αποκορύφωσης ήταν πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτή που προκλήθηκε από το HBSS. Υψηλότερη συγκέντρωση CHSS (3%) παρεμπόδιζε την αποκορύφωση, πιθανόν λόγω του υψηλού ιξώδους της υδατικής συνεχούς φάσης. Το εκχύλισμα DASS έδειξε παρόμοια συμπεριφορά με αυτή του CHSS, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις από 0.10% DASS, είχαν ως αποτέλεσμα αυξημένο ιξώδες στην συνεχή φάση που παρεμπόδιζε την αποκορύφωση. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με αεριοχρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μαζών (GS-MS), έδειξε την παρουσία μανόζης, γαλακτόζης και γλυκόζης στο HBSS, μανόζης και γλυκόζης στο CHSS και μόνο γλυκόζης στο DASS.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	3
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ .....	4
2.1 Σαλέπι.....	4
2.2 Πολυζαχαρίτες .....	5
2.3 Γαλακτώματα .....	6
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	8
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
4.1 Η πρώτη ύλη .....	9
4.2 Πορεία εργασίας .....	9
4.3 Υλικά – Μέθοδοι .....	9
4.3.1 Αντιδραστήρια .....	9
4.3.2 Μέθοδοι .....	10
4.3.2.1 Αδιάλυτα σε αλκοόλη συστατικά (AIS).....	10
4.3.2.2 Διαδοχική εκχύλιση των αδιάλυτων σε αλκοόλη συστατικών .....	10
4.3.2.3 Παρασκευή γαλακτωμάτων.....	10
4.3.2.4 Χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων .....	12
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	13
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	22
7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ .....	23
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	24

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Σαλέπι είναι ένα αλευρώδες προϊόν που προέρχεται από τις ξηρές ρίζες του φυτού *Orchis morio var. mascula*. Το θερμό του εκχύλισμα παράγει ένα ιξώδες ρόφημα, γνωστό με το ίδιο όνομα. Το χαρακτηριστικό του σαλεπιού είναι μια βλεννώδης υφή η οποία γίνεται έντονα αντιληπτή κατά τον βρασμό ή τη θερμική επεξεργασία του εν γένει. Η υφή αυτή σχετίζεται με την παρουσία σειράς πολυσακχαριτών οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την σύσταση και το φορτίο που φέρουν, το οποίο οφείλεται κυρίως στην παρουσία γαλακτουρονικού οξέος. (Sengkhampan et al., 2009).

Η βασικότερη λειτουργική ιδιότητα των πολυσακχαριτών είναι η ιδιότητα τους να αυξάνουν το ιξώδες ή να προκαλούν την πήξη υδατικών διαλυμάτων. Κατά συνέπεια, υπάρχει ενδιαφέρον από την βιομηχανία για την απομόνωση, τον 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 στην απομόνωση διαφορετικών κλασμάτων των πολυσακχαριτών του σαλεπιού, καθώς και στην μελέτη της δυνατότητας τους να επηρεάσουν την σταθερότητα γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό (Dickinson, 1992).

## 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 2.1 Σαλέπι

Το σαλέπι ένα λευκό αλευρώδες προϊόν προέρχεται από την άλεση των ξηρών βολβών του φυτού *Orchis mascula* (Kaya & Tekin, 2001) και χρησιμοποιείται για την παρασκευή του ομώνυμου ποτού μετά από ανάμιξη σαλεπιού με αγελαδινό γάλα και ζάχαρη και βράσιμο. Το ποτό αυτό με χαρακτηριστικό άρωμα και υφή, καταναλώνεται ζεστό και είναι ευρέως γνωστό στις χώρες της Ανατολικής Μεσογείου για τις θρεπτικές του ιδιότητες (Ktistis & Georgakopoulos, 1991), ενώ προστίθεται σε ποτά, παγωτά και φάρμακα (Lange, 1998).

Το σαλέπι περιέχει υγρασία (12 %), άμυλο (2.7 %), μεταλλικά στοιχεία (2.4 %), τέφρα (2.1- 3.8 %), αζωτούχες ενώσεις (3.1 έως 7.3 %), λιπίδια (2 %) και γλυκομαννάνη (16–55 %) [Tekinsen, & Karacabey ,(1984), Tekinsen, & Güner, (2010), Farhoosh & Riazi, (2006)].

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), και λειτουργεί ως σταθεροποιητής και πυκνωτικό μέσο (Tekinsen, 1996). Παράλληλα, κλινικές έρευνες έδειξαν ότι η καθημερινή κατανάλωση ορισμένης ποσότητας γλυκομαννάνης μειώνει την κακή χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια στο αίμα (Sood et al., 2008).

### 2.2 Πολυζαχαρίτες

Είναι υδατάνθρακες, στους οποίους δεκάδες, εκατοντάδες ή ακόμα και χιλιάδες μόρια απλών σακχάρων συνδέονται μεταξύ τους μέσω γλυκοζιτικών δεσμών. Επειδή δεν περιέχουν ελεύθερα ανωμερικά υδροξύλια (εκτός από ένα, στο άκρο της πολυμερικής αλυσίδας), οι πολυσακχαρίτες δεν είναι αναγωγικά σάκχαρα, ούτε εμφανίζουν πολυστροφισμό (Mc Murry, 2008).

Η όξινη υδρόλυσή τους οδηγεί στο σχηματισμό μονοσακχαριτών, ενώ η μερική χημική και ενζυμική υδρόλυσή τους είναι υπεύθυνες για τη δομική τους διαφοροποίηση.

Η ενζυμική υδρόλυση παράγει ολιγοσακχαρίτες, η ανάλυση των οποίων δίνει πληροφορίες για την συχνότητα των μονοσακχαριτών, τις θέσεις και τα είδη των δεσμών (Belitz et al., 2009).

Οι πολυσακχαρίτες (γλυκάνες), μπορεί να αποτελούνται από ένα μόνο είδος σακχάρου (ομογλυκάνες) ή από διαφορετικά είδη σακχάρων (ετερογλυκάνες). Μπορεί ακόμη να είναι γραμμικοί (αμυλόζη, κυτταρίνη) ή διακλαδισμένοι (αμυλοπηκτίνη, γλυκογόνο), με την συχνότητα των διακλαδώσεων και το μήκος των πλευρικών αλυσίδων να ποικίλει αρκετά (Belitz et al., 2009).

Οι πολυσακχαρίτες είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση ως: α) δομικά συστατικά (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη στα φυτά, χιτίνη στα ζώα), β) αποθεματικά συστατικά (άμυλο, δεξτρίνες και ινουλίνη στα φυτά, γλυκογόνο στα ζώα) και γ) ενώσεις δέσμευσης νερού (άγαρ και πηκτίνη στα φυτά) (Belitz et al., 2009).

Οι απομονωμένοι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται ευρέως στη τεχνολογία τροφίμων είτε ως έχουν, είτε μετά από τροποποίηση, ως: παράγοντες ζελατινοποίησης (άμυλο, πηκτίνη), σταθεροποιητές για γαλακτώματα, ή συστατικά επικάλυψης για την προστασία ευαίσθητων τροφίμων από ανεπιθύμητες μεταβολές. Όλες οι παραπάνω χρήσεις τους οφείλονται στις ποικίλες ιδιότητές τους. Μπορεί δε, να εμφανίζονται σε αδιάλυτη μορφή, ή με μεγάλη διαλυτότητα στο ζεστό και στο κρύο νερό. Τα διαλύματά τους μπορεί να εμφανίζουν χαμηλά ιξώδη ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις (αραβικό κόμμα) ή μπορεί να έχουν εξαιρετικά υψηλά ιξώδη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Belitz et al., 2009).

### **2.3 Γαλακτώματα**

Τα γαλακτώματα είναι μικροετερογενή συστήματα τα οποία αποτελούνται από τουλάχιστον ένα μη αναμείξιμο υγρό διασπαρμένο σε ένα άλλο υπό μορφή σταγόνων, των οποίων οι διάμετροι είναι συνήθως, μεταξύ 0,1 μm και 100 μm. Σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις, τουλάχιστον η μία υγρή φάση σε ένα γαλακτώμα είναι το νερό. Συνηθίζεται κατά συνέπεια, τα γαλακτώματα να αναφέρονται είτε ως γαλακτώματα λαδιού-σε-νερό O/W (oil-in-water) ή νερού-σε-λάδι W/O (water-in-oil), όπου η πρώτη αναφερόμενη φάση είναι η φάση διασποράς και η δεύτερη η συνεχής φάση. Όταν εξετάζονται οπτικά,



τα γαλακτώματα εμφανίζονται ανάλογα με το μέγεθος των διασπαρμένων σταγόνων ως γαλακτώδη - λευκά - θολά (όταν οι σταγόνες είναι μεγάλες), κυανίζοντα - λευκά - γκρί, - ημιδιαφανή (όταν οι σταγόνες είναι κολλοειδών διαστάσεων), ή διαφανή (μικρογαλακτώματα, όπου οι διάμετροι των διασπαρμένων μικροφάσεων είναι μεταξύ 0,005  $\mu\text{m}$  και 0,1  $\mu\text{m}$ ) (Παναγιώτου, 1998).

Τα γαλακτώματα παρουσιάζουν ελάχιστη σταθερότητα ως συστήματα καθώς για την παρασκευή τους απαιτείται η δημιουργία μίας τεράστιας διεπιφάνειας μεταξύ των δύο μη αναμίξιμων φάσεων με την προσθήκη έργου. Επειδή το έργο αυτό παραμένει στο σύστημα ως δυναμική ενέργεια, το σύστημα αναζητά τρόπους ελαχιστοποίησης της δυναμικής αυτής ενέργειας, με ελαχιστοποίηση της διεπιφάνειας (καταστροφή γαλακτώματος). Η αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων εμφανίζεται με τη μορφή ρήξης (breaking), συνένωσης (coalescence), αποκορύφωσης/ κρέμωσης (creaming), ή θρόμβωσης (flocculation). Αν και οι όροι αυτοί συχνά εμφανίζονται σχεδόν ισοδύναμα, εντούτοις ο καθένας τους αντιστοιχεί σε σαφώς διακριτά φαινόμενα. Η κροκίδωση αναφέρεται στη σύμφυση ή συγκόλληση σταγόνων με σχηματισμό χαλαρών δομών τύπου τσαμπιού σταφυλιού. Κατά την κροκίδωση οι αρχικές σταγόνες διατηρούν την ταυτότητα τους, γεγονός που την καθιστά ως μια αντιστρεπτή διεργασία. Στη αποκορύφωση, οι αρχικές σταγόνες διατηρούν την ταυτότητα τους όμοια με την περίπτωση της θρόμβωσης. Παρατηρείται δε με το χρόνο, σε σχεδόν όλα τα γαλακτώματα στα οποία υπάρχει μια διαφορά πυκνότητας στις δύο φάσεις. Το ιξώδες του μέσου διασποράς παίζει σημαντικό ρόλο στο ρυθμό αποκορύφωσης των γαλακτωμάτων. Η αποκορύφωση είναι κι αυτή μια αντιστρεπτή διεργασία, δηλαδή το σύστημα μπορεί να επαναγαλακτωματοποιηθεί με τη χρήση ελάχιστης ενέργειας. (Παναγιώτου, 1998).

Τα γαλακτώματα παρασκευάζονται και σταθεροποιούνται με τη βοήθεια κατάλληλων τασιενεργών παραγόντων που ονομάζονται γαλακτωματοποιητές (Belitz et al., 2004). Οι γαλακτωματοποιητές είναι μόρια τα οποία προσροφώνται εκλεκτικά στη διεπιφάνεια ελαίου/νερού μειώνοντας την τάση των διασπαρμένων σταγονιδίων προς συνένωση, τόσο με τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης όσο και με το σχηματισμό 'μηχανικών φραγμάτων' μεταξύ των σταγόνων (Παναγιώτου, 1998). Η δραστηριότητα των γαλακτωματοποιητών βασίζεται στη μοριακή τους δομή. Υπάρχει ένα λιπόφιλο ή

υδρόφοβο τμήμα με καλή διαλυτότητα σε μη υδατική φάση, όπως λίπος ή λάδι και ένα υδρόφιλο ή πολικό τμήμα, που είναι διαλυτό στο νερό (Belitz *et al.*, 2004).

Τυπικά παραδείγματα γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό στα τρόφιμα είναι τα salad dressings, επιδόρπια και σάλτσες. Τα φυσικά χαρακτηριστικά τέτοιων γαλακτωμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τον έλεγχο της επεξεργασίας, της χρησιμοποίησης τους και την διατηρησιμότητα τους. Η σταθερότητα τέτοιων γαλακτωμάτων και η παρεμπόδιση του διαχωρισμού τους σε δύο στοιβάδες, επιτυγχάνεται βιομηχανικά με την προσθήκη σταθεροποιητών. Για παράδειγμα ο μικροβιακής προέλευσης πολυσακχαρίτης ξανθάνη, προστίθεται σε κρέμες σαλάτας (salad creams) για τις προσδώσει αδιαφανή και κρεμώδη υφή που επιθυμούν οι καταναλωτές (Moates *et al.*, 2001).

### **3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Οι σκοποί της παρούσης εργασίας ήταν:

- α. Να γίνει απομόνωση πολυσακχαριτών από Σαλέπι με την βοήθεια τριών διαφορετικών μέσων εκχύλισης,
- β. Να μελετηθεί η επίδραση των τριών κλασμάτων των εκχυλισθέντων πολυσακχαριτών στην σταθερότητα γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό.

## **4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

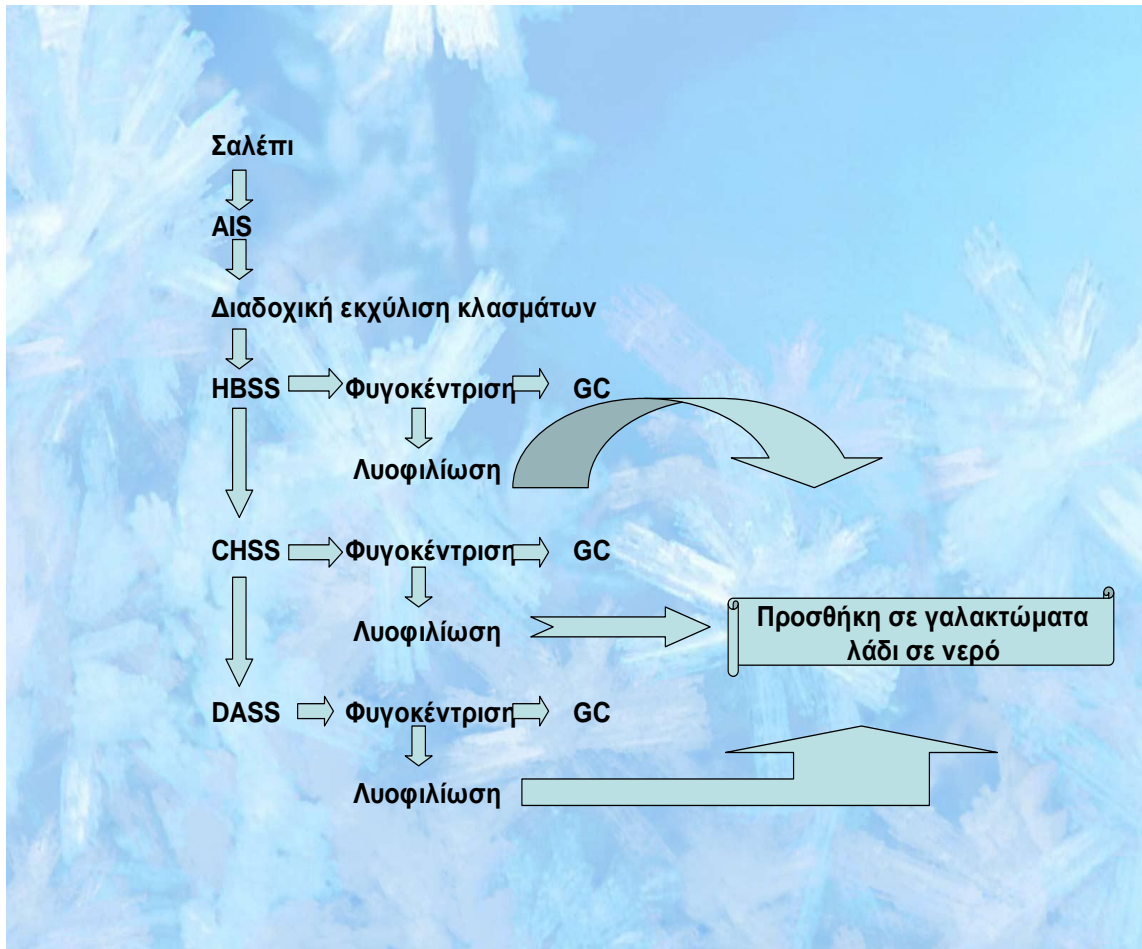
### **4.1 Η πρώτη ύλη**

Το σαλέπι σε μορφή σκόνης ήταν ευγενική προσφορά της εταιρίας «Σαλέπι Όλυμπος» (Νικολαΐδης, Θεσσαλονίκη) και χρησιμοποιήθηκε χωρίς να προηγηθεί απολίπανση.

### **4.2 Πορεία εργασίας**

Η πορεία εργασίας που ακολουθήθηκε (Σχήμα 1) είναι η εξής:

Το σαλέπι θερμαινόταν ελαφρά υπό συνεχή ανάδευση με αιθυλική αλκοόλη (40 ° C για 1h) έτσι ώστε να γίνει παραλαβή των αδιάλυτων σε αλκοόλη συστατικών (AIS) και ακολουθούσε διήθηση και ξήρανση τους. Το ξηρό αυτό υπόλειμμα χρησιμοποιήθηκε για την διαδοχική εκχύλιση κλασμάτων πολυσακχαριτών με την βοήθεια α) Ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (HBSS), β) διαλύματος EDTA (CHSS) και γ) αραιού αλκάλειος (DASS). Ποσότητες από τα κλάσματα των λυοφιλοποιημένων πολυσακχαριτών προσθέτονταν σε γαλάκτωμα λαδιού σε νερό σε διάφορες συγκεντρώσεις και ακολουθούσε η μελέτη της επίδρασής τους στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο. Παράλληλα, τα εκχυλίσματα των πολυσακχαριτών υποβλήθηκαν σε αεριοχρωματογραφική ανάλυση με GC-MS για την εύρεση της σύστασής τους σε σάκχαρα.



Σχήμα 1 : Πορεία εργασίας

## 4.3 Υλικά -Μέθοδοι

### 4.3.1 Αντιδραστήρια

Η προμήθεια των Tween 20 (P 1379), Trizma base (2 –amino-2-hydroxymethyl)-1,2 propanediol), Νατραζιδίου (S 8032), Βοροϋδριδίου του νατρίου (S 9125) και δινάτριου άλατος EDTA (A 1644), έγινε από την Sigma (St Louis, MO). Η προμήθεια του ελαιολάδου έγινε από πολυκατάστημα, ενώ το νερό που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο.

### 4.3.2 Μέθοδοι

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

Σαλέπι (10g) εκχυλιζόταν με αιθυλική αλκοόλη 70% (κ.ο) στους 40 ° C για 1h (2 φορές x 300 mL). Μετά την διήθηση σε χωνί Buchner, ακολουθούσε έκπλυση του στερεού υπολείμματος με ακετόνη ( 2 φορές X 150 mL ) και ξήρανσή του στον αέρα για 24 h (Alcohol-Insoluble Solids). Το δείγμα παρέμενε συσκευασμένο υπό κενό μέχρι την παραπέρα ανάλυση του.

#### 4.3.2.2 Διαδοχική εκχύλιση των αδιάλυτων σε αλκοόλη συστατικών

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., (2009). Συγκεκριμένα, 10g AIS δειγμάτων από σαλέπι 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) διαχωρίζεται από το αδιάλυτο υπόλειμμα με φυγοκέντρηση (5000g X 25 min) και στη συνέχεια λυοφιλοποιούνται.

#### 4.3.2.3 Παρασκευή γαλακτωμάτων

Τα γαλακτώματα που μελετήθηκαν, παρασκευάζονται με ανάμιξη ίσων όγκων Stock γαλακτώματος (A) και διαλύματος εκχυλισμένου πολυσακχαρίτη (B), η παρασκευή των οποίων δίνεται παρακάτω:

**Stock γαλάκτωμα (A):** Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.025 M Trizma και 0.025% Νατραζίδιο και το pH του ρυθμίστηκε στο 7.0. Ακολούθησε η προσθήκη ποσότητας του μη ιονικού τασιενεργού συστατικού Tween 20 για την παρασκευή διαλύματος 4%. Η συγκέντρωση αυτή θεωρείται κατάλληλη για την σταθεροποίηση των μικρών σταγονιδίων του γαλακτώματος ενώ παράλληλα περιορίζονται φαινόμενα εκκένωσης του ενδιάμεσου χώρου μεταξύ των σταγονιδίων (depletion effects), (Dickinson et al.,1999). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα με ελαιόλαδο ώστε να παρασκευαστεί ένα πρωτογενές μίγμα με κλάσμα όγκου (volume fraction) του λαδιού  $\varphi = 0.5$ . Ακολούθησε ομογενοποίηση του μίγματος σε ομογενοποιητή υπερήχων (Hielscher UP -100H, Germany) για 4 min.

**Διάλυμα εκχυλισμένου πολυσακχαρίτη (B):** Το κάθε εκχύλισμα από το σαλέπι (HBSS, CHSS, DASS) αναμίχθηκε με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.025 M Trizma και 0.025% Νατραζίδιο (pH=7.0), ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα 5% από το εκχύλισμα. Από το εκχύλισμα αυτό, με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων ρυθμιστικού διαλύματος (0.025 M Trizma και 0.025% Νατραζιδίου (pH=7.0) παρασκευάστηκε σειρά αραιώσεων (Διαλύματα B).

**Παρασκευή γαλακτωμάτων:** Τα γαλακτώματα που μελετήθηκαν παρασκευάστηκαν με ανάμιξη ίσων όγκων stock γαλακτώματος (A) και διαλύματος εκχυλισμένου πολυσακχαρίτη (B) από HBSS, CHSS και DASS. Προέκυψε έτσι σειρά γαλακτωμάτων

με κλάσμα όγκου σταγονιδίων λαδιού  $\varphi = 0.25$  και διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων των πολυσακχαριτών από 0 έως και 3 %. Η συγκέντρωση αυτή είναι g/mL γαλακτώματος (όχι της συνεχούς φάσης).

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, γινόταν μελέτη της αποκορύφωσής τους. Για τον σκοπό αυτό προσδιοριζόταν ο δείκτης αποκορύφωσης (creaming index), σε συνάρτηση με τον χρόνο παραμονής, όπου:

$$\text{Δείκτης αποκορύφωσης} = \frac{\text{ύψος στοιβάδας του διακριτού ορού}}{\text{συνολικό ύψος του γαλακτώματος}}$$

#### 4.3.2.4 Αεριοχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα των πολυζαχαριτών αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία με την μέθοδο του Charlin (1982), τροποποιημένη. Σε ποσότητα (0,001-0,005 g) λυοφιλοποιημένου εκχυλίσματος πολυζαχαρίτη μέσα σε φιαλίδιο, γινόταν προσθήκη 1 ml μεθανολικού-HCl 0.5 M και 0.25 ml οξικού μεθυλεστέρα ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_3$ ). Τα φιαλίδια σφραγιζόταν ερμητικά, ακολουθούσε έντονη ανακίνηση και παραμονή σε υδατόλουτρο στους 70°-85 °C για 16- 18 h. Στην συνέχεια γινόταν προσθήκη 0.25 ml 1,1 διμέθυλο-αιθανόλης και ανακίνηση του δείγματος. Ακολουθούσε εξάτμιση μέχρι ξηρού με ροή αζώτου σε θερμοκρασία δωματίου. Στα ξηρά πλέον δείγματα, γινόταν προσθήκη 1 ml πυριδίνης, 0.2 ml εξαμεθυλ-δισιλάνιου (HMDS) και 0.1 ml τριμεθυλ-χλωροσιλάνιου (TMCS) και παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για 15- 30 min. Ακολουθούσε εξάτμιση των δειγμάτων μέχρι ξηρού σε ροή  $\text{N}_2$  (~50 min) και η επαναδιάλυσή τους σε 1 ml εξάνιο. Μετά από διήθηση, τα δείγματα τοποθετούνταν σε γυάλινα φιαλίδια με πώμα και ακολουθούσε η ανάλυσή τους στο GC-MS. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο αεριοχρωματογράφος (Agilent Technologies Inc, USA, mod. 7890A) με τετραπολικό φασματογράφο μαζών (mod. 5975C) του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής της ΣΤΕΓ.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολική (fused silica column, επικαλυμμένη με 5% Phenyl Methyl Silox), μήκους 30 m, διαμέτρου 250  $\mu\text{m}$  και εσωτερικής διαμέτρου



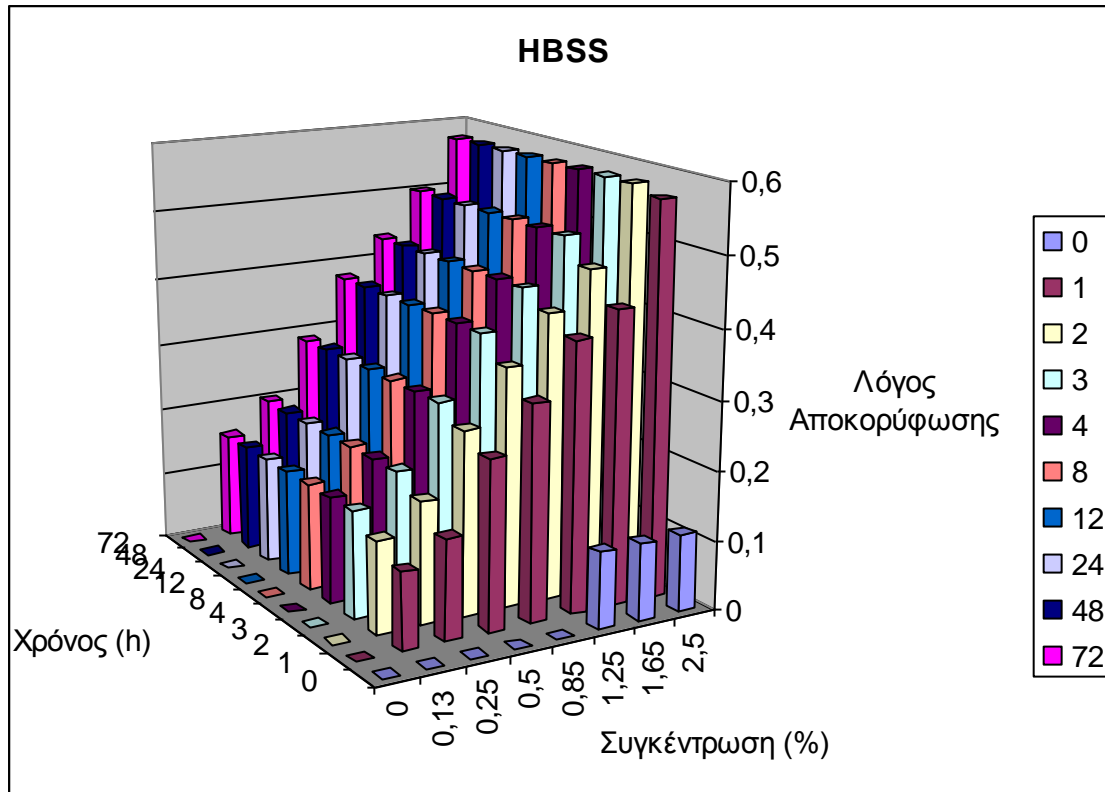
0.25  $\mu\text{m}$ . Η εισαγωγή του δείγματος γινόταν με ένεση 1  $\mu\text{l}$  στους 300  $^{\circ}\text{C}$  (split ratio 1/50). Η θερμοκρασία του φούρνου είχε προγραμματιστεί στους 140  $^{\circ}\text{C}$  για 2 min, που αυξανόταν με ρυθμό 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  μέχρι τους 260  $^{\circ}\text{C}$ . Το φέρον αέριο ήταν Ήλιο (ελάχιστης καθαρότητας 99.9995 %) 20 mL/min, 0.6-0.8 Atm. Ο χρόνος ροής του δείγματος ήταν ~23 min και το εύρος σάρωσης (m/z) 35- 500 amu). Γινόταν τρεις ενέσεις για κάθε δείγμα και η ταυτοποίηση των συστατικών που ανιχνεύονταν γινόταν με την βοήθεια της βάσης δεδομένων που διέθετε ο αεριοχρωματογράφος.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο Σχήμα 2, φαίνεται η τάση αποκορύφωσης των γαλακτωμάτων που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες εκχυλίσματος HBSS. Όπως παρατηρείται, η προσθήκη HBSS σε συγκέντρωση 1.25% είχε ως αποτέλεσμα την γρήγορη εμφάνιση από τα πρώτα λεπτά, ευδιάκριτης στοιβάδας ορού (φάση πλούσια σε νερό) μέχρι το 10 % του ύψους της συνολικής στοιβάδας του γαλακτώματος (δείκτης αποκορύφωσης  $\sim 0.10$ ). Μεγαλύτερη συγκέντρωση HBSS από 1.65% σε 2.50% προκάλεσε τα ίδια αποτελέσματα. Δοκιμή με επιπλέον προσθήκη HBSS (συγκέντρωση  $>2.5$  %) δεν φάνηκε να επηρεάζει το ποσοστό αποκορύφωσης (το αποτέλεσμα δεν παρουσιάζεται). Για τον λόγο αυτό, δεν δοκιμάστηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για το HBSS. Γενικά, ο βαθμός αποκορύφωσης των γαλακτωμάτων φάνηκε να αυξάνεται όσο αυξανόταν η προστιθέμενη ποσότητα του εκχυλίσματος HBSS από 0.13-2.5 %. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε φαινόμενα εκκένωσης του ενδιάμεσου χώρου μεταξύ των σταγονιδίων (depletion) που προκαλείται από μη προσροφημένα μακρομόρια λόγω οσμωτικών φαινομένων. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή, τα μεγαλομόρια του πολυσακχαρίτη δεν προσροφώνται στα σταγονίδια του γαλακτώματος αλλά παραμένουν ελεύθερα στο μέσο διασποράς. Καθώς τα κολλοειδή σωματίδια έρχονται πιο κοντά μεταξύ τους ή σε επαφή, το διάλυμα στην ενδιάμεση περιοχή αραιώνει καθώς το πολυμερές αναγκάζεται να απομακρυνθεί (Σχήμα 3). Στον ενδιάμεσο τότε όγκο, ο διαλύτης εμφανίζει την τάση να απομακρυνθεί επίσης προς το διάλυμα εκτός του όγκου για οσμωτικούς λόγους. Με τον τρόπο αυτό, τα σωματίδια υφίστανται μία έλξη, δηλαδή, θρομβώνονται λόγω της ασκούμενης οσμωτικής πίεσης. Ο μηχανισμός αυτός θρόμβωσης ονομάζεται *θρόμβωση πολυμερικής αραιώσης* (polymer depletion flocculation) (Παναγιώτου, 1998).

Αντίθετα, η αποκορύφωση δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον χρόνο παραμονής του γαλακτώματος. Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από εκείνα των Georgiadis and Ritzoulis (2012), που βρήκαν ότι προσθήκη HBSS από σαλέπι σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.1 %) προκάλεσε κροκίδωση και αυξημένη αποκορύφωση των γαλακτωμάτων, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ( $\geq 0.7$  %) η αποκορύφωση περιορίστηκε δραστικά πιθανόν λόγω της αύξησης του ιξώδους της υδατικής φάσης, κάτι που σύμφωνα με τους ίδιους

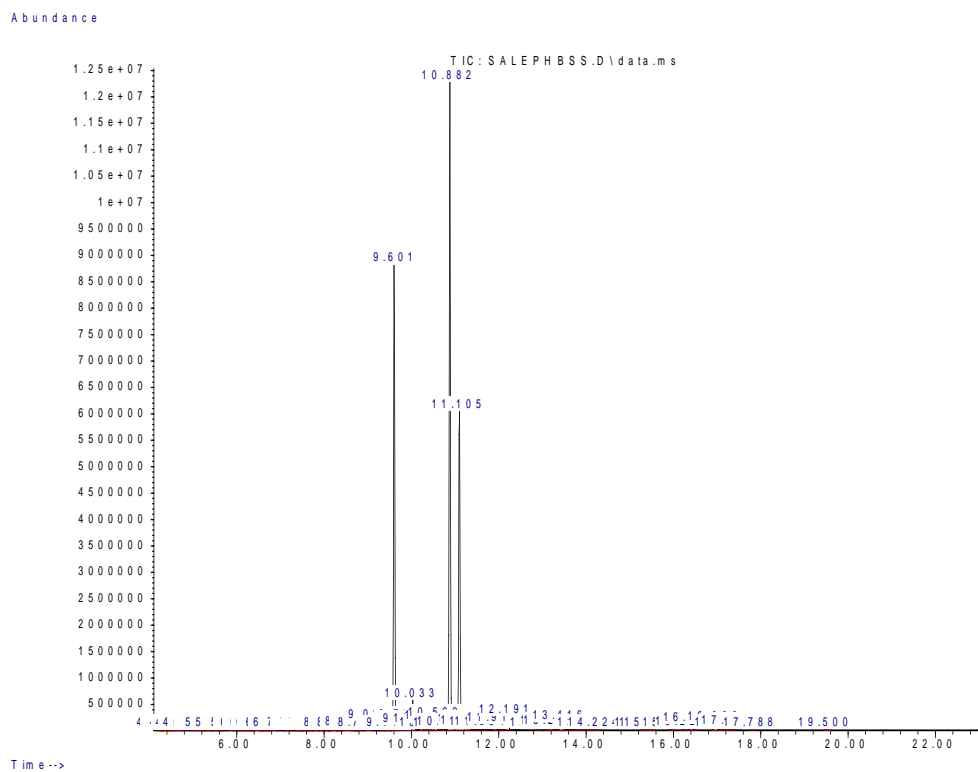
ερευνητές (Georgiadis et al. 2011) επιβεβαιώθηκε και με HBSS από μπάμιες. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι το HBSS από σαλέπι περιέχει ένα πληθυσμό μορίων με εύρος μοριακών βαρών 600-700 kDa, έναν με ~ 50 kDa και έναν με ~12 kDa. Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση (Σχήμα 4) του εκχυλίσματος έδειξε την παρουσία μαννόζης, γαλακτόζης και γλυκόζης. Ο Buchala, et al. (1974) αναφέρει ότι η γλυκομαννάνη αποτελεί τον κύριο πολυσακχαρίτη των εκχυλισμάτων του σαλεπιού και συνίσταται από μονάδες D-γλυκοπυρανόζης και D-μαννοπυρανόζης σε αναλογία 1:3.3.



**Σχήμα 2 :** Επίδραση της προσθήκης HBSS και του χρόνου παραμονής στην αποκορύφωση των γαλακτωμάτων.



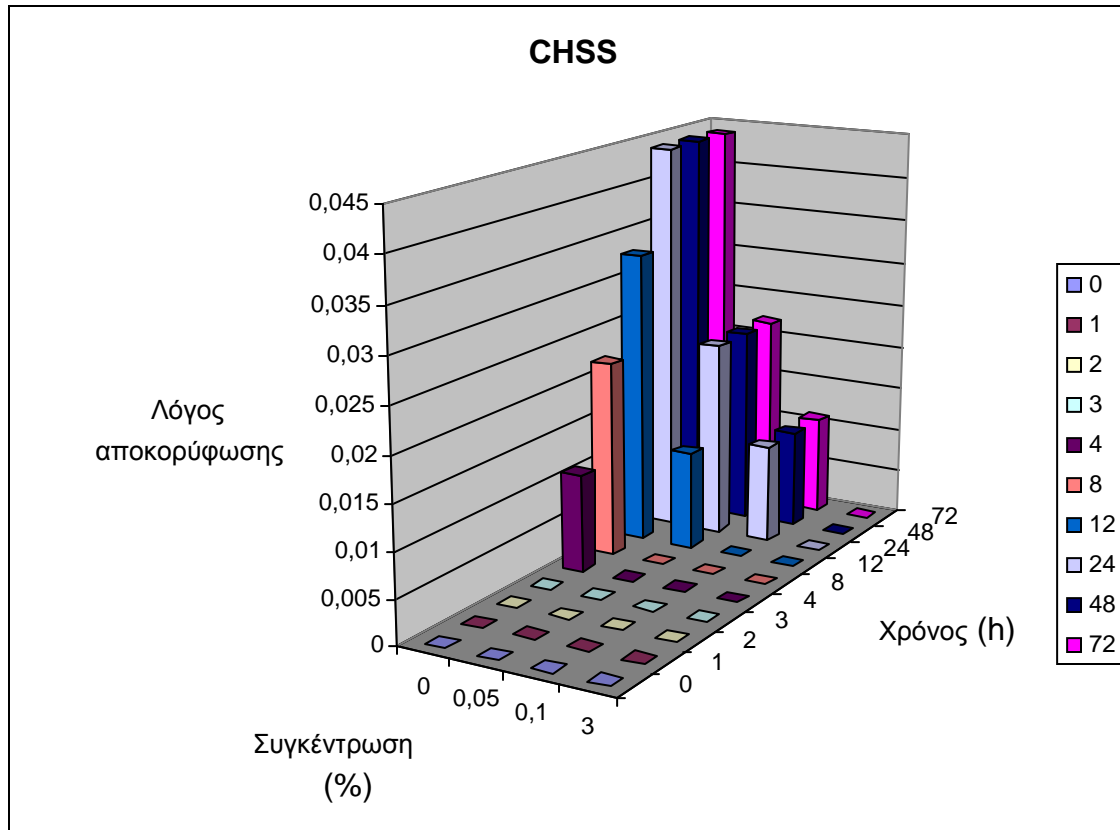
**Σχήμα 3 :** Εκκένωση χώρου μεταξύ των σταγονιδίων (κίτρινα) του γαλακτώματος από τα μεγαλομόρια του μη προσροφημένου πολυσακχαρίτη (πράσινα) λόγω οσμωτικών φαινομένων ( depletion flocculation).



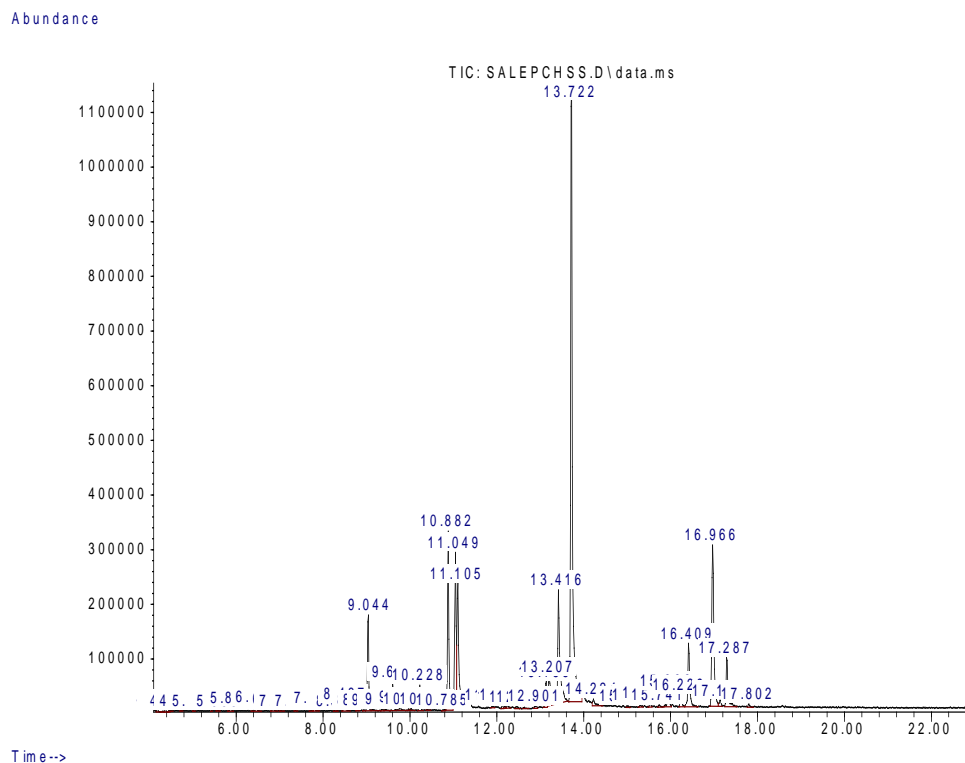
ΧΡΟΝΟΣ (min)	Συστατικό
9.601	Μανόζη
10.033	Γαλακτόζη
10.882 και 11.0105	Γλυκόζη

**Σχήμα 4 :** Χρωματογράφημα GC-MS του εκχυλίσματος πολυσακχαριτών HBSS

Στο Σχήμα 5 φαίνεται η τάση αποκορύφωσης των γαλακτωμάτων στα οποία προστέθηκε CHSS, το δεύτερο εκχύλισμα πολυσακχαριτών από το σαλέπι. Η προσθήκη του CHSS προκάλεσε καθυστέρηση στην εμφάνιση αποκορύφωσης σε σχέση με το δείγμα που δεν περιείχε εκχύλισμα πολυσακχαριτών. Η καθυστέρηση αυτή ήταν μεγαλύτερη με την αύξηση της συγκέντρωσης του CHSS (12 και 24 ώρες για τα δείγματα με 0.05 και 0.1 % CHSS αντίστοιχα). Η αποκορύφωση όμως ήταν μικρή (δείκτης αποκορύφωσης  $\sim 0.01$ ) αρχικά και για τις δύο συγκεντρώσεις. Σχεδόν διπλασιάστηκε μετά από 12 ώρες στο δείγμα με 0.05 % CHSS και παρέμεινε αμετάβλητη στην συνέχεια. Όσον αφορά το δείγμα με 0.1 % CHSS, ο βαθμός αποκορύφωσης παρέμεινε αμετάβλητος. Υψηλότερη συγκέντρωση CHSS (3%) δεν επηρέασε την αποκορύφωση του γαλακτώματος. Πιο συγκεκριμένα, αποκορύφωση δεν έλαβε χώρα, πιθανώς εξαιτίας του πολύ υψηλού ιξώδους της συνεχούς φάσης το οποίο παρεμπόδισε την βαρυτική άνοδο των σταγονιδίων. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Georgiadis and Ritzoulis (2012), όπου γαλακτώματα που περιείχαν CHSS από σαλέπι εμφάνισαν αποκορύφωση μόνο μετά από 24 ώρες και η οποία αυξανόταν στην συνέχεια με πολύ αργό ρυθμό. Όταν το CHSS προερχόταν από μπάμιες, προκάλεσε κροκίδωση και ταχεία κρεμοποίηση σε συγκεντρώσεις  $>0.5$  % (Georgiadis et al. 2011). Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση (Σχήμα 6) του εκχυλίσματος στην παρούσα εργασία έδειξε την παρουσία μαννόζης και γλυκόζης.



**Σχήμα 5 :** Επίδραση της προσθήκης CHSS και του χρόνου παραμονής στην αποκορύφωση των γαλακτωμάτων.



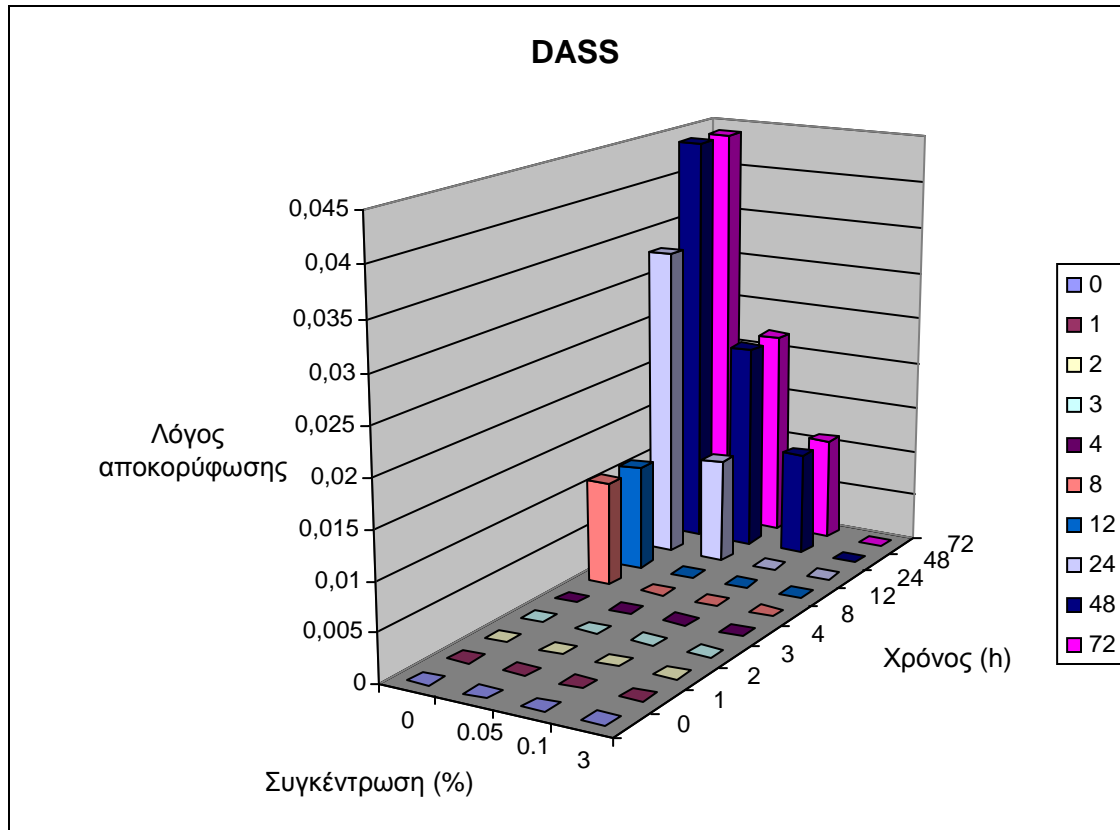
ΧΡΟΝΟΣ (min)	Συστατικό
9.044	2-(4-μεθοξυφενυλ)-2-(3-μεθυλ-4- μεθοξυφενυλ)-προπάνιο
9.601	μανόζη
10.882 και 11.105	γλυκόζη
11.049	δεκαεξανοϊκό οξύ
13.416	δεκαοκτανοϊκό οξύ
13.722	κοβάλτιο
16.409	Τριμεθυλ-συλλ-διυδροαβιτιτικό οξύ

**Σχήμα 6 :** Χρωματογράφημα GC-MS του εκχυλίσματος πολυσακχαριτών CHSS

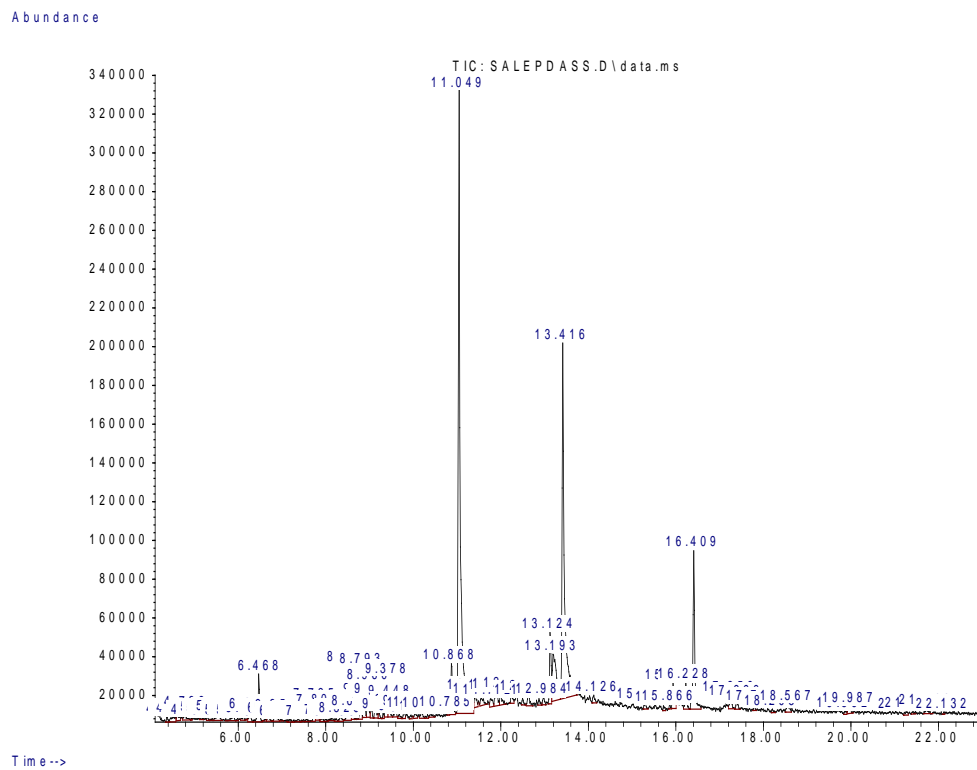


Στο Σχήμα 7 φαίνεται το αποτέλεσμα της προσθήκης του τρίτου εκχυλίσματος των πολυσακχαριτών (DASS). Η αποκορύφωση προχώρησε πιο αργά σε συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 0.05 και 0.10 % (εμφάνιση μικρής ποσότητας ορού σε 24 και 48 ώρες από την προετοιμασία του δείγματος) με ένα μοντέλο παρόμοιο με εκείνο των δειγμάτων στα οποία προστέθηκε CHSS (Σχήμα 5). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε αποκορύφωση με την αύξηση της συγκέντρωσης σε 3 %. Η αποκορύφωση πιθανόν επιβραδύνεται με την προσθήκη του μη προσροφημένου στα σταγονίδια πολυμερούς, καθώς το ιξώδες της συνεχούς φάσης αυξάνει εξ' αιτίας του ίδιου του DASS σε επίπεδα που παρεμποδίζουν την κίνηση των σταγονιδίων (Parker et al., 1995). Το τελευταίο συμφωνεί με όσα αναφέρουν οι Georgiadis et al. (2011) όπου προσθήκη μεγάλης ποσότητας DASS (>1.65 %) από μπάμιες σε γαλακτώματα λαδιού σε νερό προκάλεσαν αύξηση του ιξώδους στην υδατική φάση και καθυστέρηση της αποκορύφωσης.

Το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος DASS (Σχήμα 8) έδειξε την παρουσία μόνο γλυκόζης.



**Σχήμα 7 :** Επίδραση της προσθήκης DASS και του χρόνου παραμονής στην αποκορύφωση των γαλακτωμάτων.



ΧΡΟΝΟΣ (min)	Συστατικό
10.868	Γλυκόζη
11.049	δεκαεξανοϊκό οξύ
13.416	16-μεθυλ-δεκαεπτανοϊκό οξύ
16.409	Τριμεθυλ-σιλυλ-διυδροαβιοτικό οξύ

**Σχήμα 8 :** Χρωματογράφημα GC-MS του εκχυλίσματος πολυσακχαριτών DASS

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προσθήκη εκχυλίσματος πολυσακχαριτών HBSS σε γαλακτώματα σταθεροποιημένα με Tween-20 (μη ιονικό τασιενεργό συστατικό) προκάλεσε ταχεία αποκορύφωση ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος (0.13%). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του ίδιου εκχυλίσματος, η αποκορύφωση αυξήθηκε σημαντικά, γεγονός που πιθανόν οφείλεται πιθανόν σε *θρόμβωση πολυμερικής αραιώσης* (polymer depletion flocculation).

Το εκχύλισμα πολυσακχαριτών CHSS προκάλεσε καθυστέρηση στην εμφάνιση αποκορύφωσης, αλλά ο βαθμός αποκορύφωσης ήταν κατά πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτή που προκλήθηκε από το HBSS. Υψηλότερη συγκέντρωση CHSS (3%) παρεμπόδισε την αποκορύφωση, πιθανόν λόγω του υψηλού ιξώδους των διαλυμάτων CHSS.

Το εκχύλισμα DASS έδειξε παρόμοια συμπεριφορά με αυτή του CHSS, ενώ συγκεντρώσεις DASS υψηλότερες από 0.10 %, είχαν πιθανόν ως αποτέλεσμα αυξημένο ιξώδες στην συνεχή φάση του γαλακτώματος που παρεμπόδιζε την αποκορύφωση.

## 7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

α. Χαρακτηρισμός των πολυσακχαριτών στα διάφορα κλάσματα που παραλαμβάνονται από σαλέπι με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (HPSEC).

β. Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμένων πολυσακχαριτών από άλλες πρώτες ύλες (σπόροι κυδωνιών, καναβούρι, χαρούπια) στην σταθερότητα γαλακτωμάτων.

γ. Παράλληλη εκχύλιση πολυσακχαριτών από σαλέπι με την βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων με διαφορετικά pH.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση :

Belitz H.D., Grosch W . and Schieberle P ., (2004). Χημεία Τροφίμων. 3<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις TZIOΛΑ, Θεσσαλονίκη.

Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P., (2009). “Food Chemistry”, 4<sup>th</sup> Edition, Springer, p. 296-300

Buchala, A. J., Franz, J., & Meier, H. (1974). A glucomannan from the tubers of *Orchis morio*. *Phytochemistry*, 13, 163-166.

Chaplin, M. F. (1982). A Rapid and Sensitive Method for the Analysis of Carbohydrate Components in Glycoproteins Using Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 123, 336-341.

Dickinson E., (1992). An Introduction to Food Colloids. Dickinson, E., (Ed). Oxford University Press, Oxford.

Farhoosh, R. & Riazi, A. (2006). Farhoosh, R. & Riazi, A. (2006). A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 21, 660-666.

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

Georgiadis, N., Ritzoulis, C., Charchari, E., Koukiotis, C., Tsiptsias, C., Vasiliadou, C. (2012). Isolation, Characterization and Emulsion Stabilizing Properties of Polysaccharides from Orchid Roots (Salep). *Food Hydrocolloids*, 28, 68-74.

Kaya, S. & Tekin, AR (2001). Kaya, Σ. & Tekin, AR (2001). The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering*, 47, 59-62.

Ktistis, G. & Georgakopoulos, PP (1991). Rheology of salep mucilages. *Pharmazie*, 46, 55 - 56.

Lange, D. (1998). Lange, Δ. (1998). *Europe's Medicinal and Aromatic Plants: Their use, Trade and Conservation*. Cambridge: Traffic Europe/International.

Mc Murry J., (2008). "Organic Chemistry", 7<sup>th</sup> Edition, Thomson Learning Inc., p.1000

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

Parker, A., Gunning, P. A., Ng, K., & Robins, M. M. (1995). How does xanthan stabilise salad dressing? *Food Hydrocolloids*, 9, 333e342.

Sengkhampan N., Verhoef R., Schols H. A., Sajjaanantakul T. and Voragen A. G. J., (2009). Characterization of Polysaccharides (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Carbohydrate Research*, 344, 1824-1832.

Sood N., Baker L.W., Coleman I.C.,(2008). "Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight and blood pressure: systematic review and meta-analysis", *American Journal of Clinical Nutrition*, 1167-1175

Tekinsen, O.C., & Karacabey, A. (1984). Effect of Some Stabilizers Mix on Physical and Organoleptic Properties of Ice-Cream Kahramanmaras Type; Tubitak, Projects No: VHAG, 594, Turkish Scientific and Technical Research Council: Ankara, Turkey.

Tekinsen, O.C (1996), «*Süt Ürünleri Teknolojisi (Dairy Technology)*» Konya: Selçuk Üniversitesi, pp 69-270.

Tekinsen, K. K., & Güner, A. (2010). Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. *Food Chemistry*, 121, 468-471.

**Ελληνική :**

Παναγιώτου Κ., (1998). Σταθερότητα των Κολλοειδών Συστημάτων, στο: Διεπιφανειακά Φαινόμενα και Κολλοειδή Συστήματα (Εκδ. Παναγιώτου, Κ), Β' Έκδοση, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη. Σελ. 282-327.