



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χαρακτηρισμός υδροκολλοειδών από σπόρους Κυδωνιού

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΑΣΛΑΝΙΔΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017

Χαρακτηρισμός υδροκολλοειδών από σπόρους Κυδωνιού

ΑΣΛΑΝΙΔΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΤΕΙ), Σχολή ΣΤΕΤΡΟ-Δ,

Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 ΤΘ 141, Θεσσαλονίκη

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

Ημερομηνία

Φεβρουάριος  
2017

Εισηγητής

Ριτζούλης Χρήστος

## Χαρακτηρισμός υδροκολλοειδών από σπόρους Κυδωνιού

ΑΣΛΑΝΙΔΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΤΕΙ), Σχολή ΣΤΕΤΡΟ-Δ,

Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 ΤΘ 141, Θεσσαλονίκη

### Περίληψη

Το κυδώνι είναι καρπός φυλλοβόλου δέντρου με χρήση του ιατρική, φαρμακευτική και στο χώρο των τροφίμων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της δομής των οργανικών ενώσεων (πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες) του εκχυλισματος με τη χρήση της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), η μακροσκοπική και μικροσκοπική μελέτη της συνεισφοράς των εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό και τέλος η μελέτη της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου, άνω (pH 7) και κάτω (pH 3) του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών. Από τα πειράματα προέκυψε πως το ΕΚ 4, το ΕΚ 6 και το ΕΚ 10 αποτελούνται από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, ενώ το ΕΚ 8 μόνο από πολυσακχαρίτες και έτσι το ΕΚ 8 κρίνεται ακατάλληλο για τη χρήση του ως γαλακτωματοποιητή. Η χρήση των εκχυλισμάτων ΕΚ 4 και ΕΚ 6 συμβάλλει στη σταθεροποίησή, ενώ η παρασκευή γαλακτωμάτων πάνω και κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών παρουσίασε πολύ έντονες διαφορές.

## Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1.	Χημική Σύσταση Καρπού.....	1
2.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	4
2.1.	Γαλακτώματα.....	4
2.2.	Γαλακτωματοποίηση.....	4
2.3.	Σταθεροποίηση Γαλακτωμάτων.....	5
2.4.	Μηχανισμοί Αποσταθεροποίησης.....	6
2.4.1.	Βαρυτικός Διαχωρισμός (Gravitational Separation).....	7
2.4.2.	Κροκίδωση-Συσσωμάτωση (Flocculation).....	7
2.4.3.	Συγχώνευση (Coalescence).....	8
2.4.4.	Αντιστροφή Φάσεων (Phase Inversion).....	8
2.4.5.	Ορίμανση κατά Ostwald (Ostwald Ripening).....	8
3.	ΣΚΟΠΟΣ.....	9
4.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	10
4.1.	Υλικά.....	10
4.2.	Εργαστηριακός Εξοπλισμός.....	10
4.3.	Παρασκευή Διαλυμάτων και Δειγμάτων.....	10
4.3.1.	Παρασκευή Ρυθμιστικού Δ/τος Tris (Buffer pH 7).....	10
4.3.2.	Παρασκευή Ρυθμιστικού Δ/τος Κιτρικού Οξέος (Buffer pH 3).....	10
4.3.3.	Παρασκευή Δειγμάτων προς Έλεγχο Σταθεροποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων.....	10
4.3.4.	Παρασκευή Δειγμάτων προς Έλεγχο Γαλακτωματοποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων.....	11
4.3.5.	Παρασκευή Γαλακτωμάτων Εκχυλίσματος EK 10.....	11
4.4.	Μέθοδοι.....	11
4.4.1.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	11
4.4.2.	Οπτική Μικροσκοπία.....	12
4.4.3.	Οπτικός διαχωρισμός φάσεων, Αποκορύφωση.....	13
4.4.4.	Προσδιορισμός Μεγέθους Σωματιδίων.....	14
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	16
5.1.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR).....	16
5.2.	Μελέτη Σταθεροποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων.....	20
5.3.	Μελέτη Γαλακτωματοποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων.....	23
5.4.	Γαλακτωματοποιητική Ικανότητα Εκχυλίσματος 10.....	27

6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	29
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	30

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κυδώνι ανήκει στην οικογένεια “Rosaceae” (Silva et al., 2005) και είναι καρπός φυλλοβόλου δέντρου. Η προέλευση του είναι από τον ανατολικό Καύκασο και απαντάται σε χώρες με κλίμα μέτριο έως θερμό (Yasunori, 2011). Άλλα είδη του (π.χ. *Cydonia oblonga* Miller) καλλιεργούνται σε χώρες της Νοτιοδυτικής Ευρώπης και τη Μικρά Ασία (Rodriguez-Guisado et al., 2009; Patel et al., 2011).

Η χρήση του είναι ιατρική, φαρμακευτική και στο χώρο των τροφίμων. Το χρώμα του είναι κίτρινο προς χρυσό (όταν είναι ώριμο) (Patel et al., 2011), η γεύση του στυφή, η οξύτητα του υψηλή και η σκληρότητα του αυξημένη (Silva et al., 2005; Yasunori et al., 2011). Χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή μαρμελάδων και χυμών διότι απελευθερώνει έντονο άρωμα συνέπεια της περιεκτικότητας του σε πτητικά συστατικά (Mierina et al., 2011).

Η σύσταση του είναι 90,6% σώμα, 4,4% περίβλημα (φλοιίδα) και 5% σπόροι. Ο σπόρος του καρπού αποτελείται σε ποσοστό 10-20% έλαια και συγκεκριμένα κατά 52,4% από λινελαϊκό και κατά 35,6% από ελαιικό οξύ. Επίσης περιέχει 9,9% παλμιτικό, 0,92% στεατικό, 0,55% αραχιδονικό και 0,63% λινολενικό οξύ και 238mg πολυφαινόλες ανά 100g (Mierina, 2011). Τα παραπάνω καταδεικνύουν την ιδιαιτερότητα του.

### 1.1. Χημική Σύσταση Καρπού

Σύμφωνα με τους Rodriguez-Guisado et al. (2009), το pH εμφανίζει τιμές 3,6 έως 3,8 και τα ολικά διαλυτά στερεά (TSS-Total Soluble Solids) από 11,57 έως 14,70°Brix, αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά των Sharma et al. (2011), όπου τα διαλυτά στερεά ανέρχονται στα 14,2 °Brix, ενώ η τιτλοποιήσιμη οξύτητα (Titratable Acidity) κυμαίνεται σε εύρος 4,71-7,95 (g/l μαλικού οξέος) (Rodriguez-Guisado et al., 2009). Στον πίνακα 1 αναλύεται η σύσταση του κυδωνιού.

Πίνακας 1. Βασικά συστατικά του κυδωνιού (Sharma et al., 2011).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SD
Νερό	84,6 ± 2
Διαλυτά στερεά ( Β <sup>ο</sup> rix)	14,2 ± 0,5
Μαλικό Οξύ (%)	1,2 ± 0,8
Δευτερεύοντα Σάκχαρα (%)	5±1
Συνολικά Σάκχαρα (%)	9±1
Ταννίνες (%)	0,8 ± 0,02
Πηκτίνη (%)	1,8 ± 0,1
Ασκορβικό οξύ (mg/100g)	16,8 ± 0,8
Ίνες (%)	1,6 ± 0,05

\*SD: Standard Deviation (Τυπική Απόκλιση)

Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η αναλογία κάθε τύπου σακχάρου στα συνολικά σάκχαρα 2 (Rodriguez-Guisado et al., 2009).

Πίνακας 2. Εύρος της εκατοστιαίας σύστασης του καρπού σε σάκχαρα (%).

ΣΑΚΧΑΡΑ	ΕΥΡΟΣ (%)
Φρουκτόζη	5,31-10,89
Γλυκόζη	4,08-5,44
Σουκρόζη	1,51-2,41
Μαλτόζη	0,31-0,42

Στο Πίνακα 3, παρουσιάζεται η εκατοστιαία σύσταση των οργανικών οξέων του καρπού. Κυριαρχεί το μαλικό με μέση τιμή 0,78% (Rodriguez-Guisado et al., 2009)

Πίνακας 3. Εκατοστιαία σύσταση του καρπού σε οργανικά οξέα (%).

ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ	ΕΥΡΟΣ (%)
Οξαλικό	0,05-0,07
Τρυγικό	0,15-0,33
Μαλικό	0,55-0,91
Ασκορβικό	0,027-0,033
Οξικό	0,10-0,18
Κιτρικό	0,004-0,014
Φουμαρικό	*Not detected

Η βιολογική αξία του κυδωνιού ενισχύεται από τα ανόργανα στοιχεία του, όπως είναι ο φώσφορος, το νάτριο, το κάλιο και το ασβέστιο. Στο Πίνακα 4 παρουσιάζονται το εύρος των ανιχνεύσιμων τους τιμών/ 100gr φρούτου καθώς ο μέσος όρος πειραματικών τιμών (Rop et al., 2011).

Πίνακας 4. Εκατοστιαία σύσταση του καρπού σε ανόργανα στοιχεία και μέσος όρος πειραματικών μετρήσεων.

ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΕΥΡΟΣ (mg/100g FW)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (n=15)
Φώσφορος	12,95-22,46	17,36
Νάτριο	0,82-3,91	2,32
Κάλιο	107,97-251,99	173,01
Ασβέστιο	7,27-15,10	11,90

\*FW: Fruit Weight



## 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 2.1. Γαλακτώματα

Ως γαλάκτωμα ορίζεται το μίγμα δύο μη-μικνυόμενων υγρών, το ένα εκ των οποίων διασπείρεται μέσα στο άλλο υπό τη μορφή μικρών σταγονιδίων μεγέθους από 0,1 έως 100μm. Το υγρό στη μορφή διεσπαρμένων σταγονιδίων συνιστά τη φάση διασποράς και αναφέρεται πρώτο, ενώ το υγρό που αναφέρεται δεύτερο αποτελεί τη συνεχή φάση.

Τα γαλακτώματα κατηγοριοποιούνται βάσει της κατανομής υδατικής και λιπαρής φάσης στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Γαλάκτωμα ελαίου σε νερό (O/W), όπου τα σταγονίδια της λιπαρής φάσης είναι διεσπαρμένα στην υδατική (π.χ. Μαγιονέζα & Γάλα).
- Γαλάκτωμα νερού σε έλαιο (W/O), όπου τα σταγονίδια της υδατικής φάσης είναι διεσπαρμένα στην λιπαρή (π.χ. Μαργαρίνη & Βούτυρο).

Ο διαχωρισμός των δύο φάσεων του γαλακτώματος αποτρέπεται με τη χρήση διάφορων σταθεροποιητών. Ως σταθεροποιητής ορίζεται οποιοδήποτε μέσο μπορεί να ενισχύσει τη σταθερότητα του γαλακτώματος, και μπορεί να είναι είτε κάποιος γαλακτωματοποιητής είτε κάποιο πηκτικό μέσο, όπως αυτά ορίζονται παρακάτω.

Οι γαλακτωματοποιητές είναι επιφανειοδραστικά μόρια, που απορροφούνται από την επιφάνεια των σχηματιζόμενων κατά την ομογενοποίηση σταγόνων.

Τα πηκτικά μέσα αντίθετα, δεν απορροφούνται από την επιφάνεια των μορίων, αλλά αυξάνουν το ιξώδες της υδατικής φάσης της και ενισχύουν τη σταθερότητα καθώς επιβραδύνουν την κίνηση των σταγονιδίων (McClements, 1999).

### 2.2. Γαλακτωματοποίηση

Τα μόρια μίας ουσίας με γαλακτωματοποιητική δράση διαθέτουν υδρόφιλο και υδρόφοβο χαρακτήρα είναι συνήθως αμφίφιλα πολυμερή τα οποία πρέπει να διαλυτοποιηθούν σε υδατικό διάλυμα έτσι ώστε να μπορούν να αποδώσουν τις επιθυμητές γαλακτωματοποιητικές τους ικανότητες . Αυτή η διαδικασία συνήθως αποτελείται από περισσότερα από ένα βήματα όπως διασπορά, διαβροχή, διόγκωση και διάλυση.

Η αποτελεσματικότητα και ο ρυθμός της διαλυτοποίησης εξαρτώνται από την φυσική κατάσταση της ουσίας (π.χ. υγρό, σκόνη ή κόκκοι), τον τύπο του πολυμερούς και τη διάταξη του στο χώρο, το pH, την ιοντική ισχύ, τη θερμοκρασία, την σύσταση της υδατικής φάσης καθώς και την εφαρμογή διατμητικών δυνάμεων.

Οι μικρές δυνάμεις μεταξύ των σταγονιδίων δεν επαρκούν για να αποτρέψουν τη συσσωμάτωση τους και αυτό καθιστά δύσκολη την παραγωγή πρωτεϊνικών γαλακτώματων σε τιμές pH που βρίσκονται κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης ή σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων.

Η ταυτόχρονη ύπαρξη υδρόφιλων και υδρόφοβων περιοχών στη δομή των βιοπολυμέρων τους προσδίδει την επιφανειακή ενεργότητα τους. Οι πρωτεΐνες έχουν ορισμένο αριθμό εκτεθειμένων μη-πολικών αμινοξέων, ενώ οι πολυσακχαρίτες διαθέτουν μη-πολικές διακλαδισμένες αλυσίδες στην κύρια τους πολική αλυσίδα (Backbone).

Όταν το πολυμερές απορροφάται από την εσωτερική επιφάνεια τα μη-πολικά μόρια στρέφονται στην ελαιώδη φάση και τα υδρόφιλα στην υδατική. Η απορρόφηση μειώνει την επιφάνεια επαφής μεταξύ των μορίων νερού και ελαίου στην εσωτερική επιφάνεια και έτσι ελαττώνεται και η ενδοεπιφανειακή τάση. Οι δύο αυτοί παράγοντες ευνοούν την απορρόφηση των αμφιφιλικών πολυμερών στην εσωτερική επιφάνεια ελαίου-νερού.

Βασική προϋπόθεση για την αποτελεσματική γαλακτωματοποιητική δράση ενός βιοπολυμερούς είναι η άμεση απορρόφηση των σταγονιδίων από την επιφάνεια και ο σχηματισμός μίας ενδοεπιφανειακής μεμβράνης που θα δρα ως μηχανικό φράγμα και θα αποτρέψει τη συσσωμάτωση των σταγονιδίων (McClements, 1999).

### **2.3. Σταθεροποίηση Γαλακτωμάτων**

Η προσθήκη πολυσακχαριτών αυξάνει το ιξώδες της συνεχούς φάσης, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της κίνησης των σταγονιδίων του γαλακτώματος και την ενίσχυση των στερεοχημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνικά επικαλυμμένων σταγονιδίων λίπους. Έτσι καθυστερούν η αποκορύφωση και ο διαχωρισμός των δύο φάσεων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε συστήματα γαλακτωμάτων που περιέχουν πρωτεΐνη και πολυσακχαρίτη, οι πρωτεΐνες απορροφούνται από την επιφάνεια των σταγονιδίων και σχηματίζουν ένα προστατευτικό υμένιο στο εξωτερικό τους, ενώ οι υδρόφιλοι πολυσακχαρίτες ενδεχομένως να σχηματίζουν ένα δεύτερο παχύ στρώμα, το οποίο ενισχύει τις στερεοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνικά επικαλυμμένων σταγονιδίων.

Επιπροσθετως η χρήση πολυσακχαριτών, μπορεί να δημιουργεί σύμπλοκο στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τη βελτίωση του σχηματιζόμενου υμενίου, και επομένως της σταθερότητας των γαλακτωμάτων (Ercelebi & Ibanoglu, 2007).

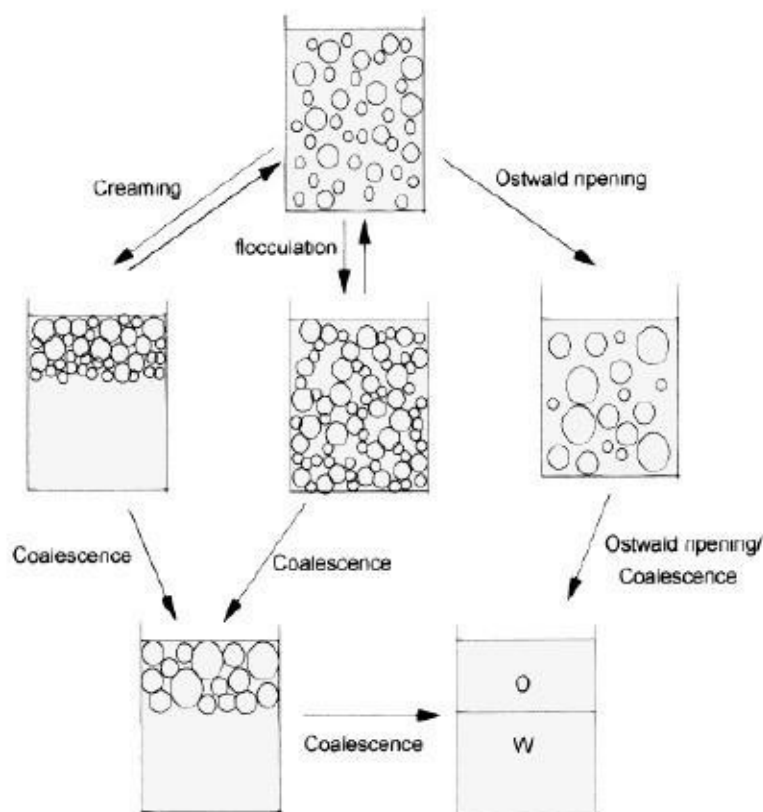
Η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη που χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητικό μέσο είναι μείζονος σημασίας, όπως και η ύπαρξη μη προσροφημένων μορίων πολυσακχαριτών από την επιφάνεια της συνεχούς φάσης, η οποία επιφέρει ανεπιθύμητα αποτελέσματα στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων, καθώς μειώνει την απόσταση μεταξύ των σταγονιδίων και προκαλεί τη συσσωμάτωσή τους (Khalloufi et al., 2008).

Τα μη προσροφημένα υδροκολλοειδή της υδατικής φάσης συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων καθώς πραγματοποιείται κροκίδωση κένωσης (depletion flocculation). Αυτό συμβαίνει όταν δύο σταγονίδια πλησιάζουν σε απόσταση μικρότερης της μέσης διαμέτρου του μορίου του ελευθερού πολυμερούς. Ενδομοριακές δυνάμεις που προκαλούνται από την τάση του διαλύτη να «εκρέει» από το κενό υπό την επίδραση οσμωτικής πίεσης καταλήγουν στην απομάκρυνση του πολυμερούς από το κενό.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ελεύθερου πολυμερούς το σύστημα παραμένει σταθερό . Ωστόσο, πάνω από μία κρίσιμη συγκέντρωση πολυμερούς, η οποία μειώνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους και με την αύξηση του κλάσματος όγκου των σωματιδίων, πραγματοποιείται αντιστρεπτή κροκίδωση κένωσης, που οδηγεί σε εκτεταμένη καθίζηση και διαχωρισμό φάσεων (Dickinson, 2003).

#### **2.4. Μηχανισμοί Αποσταθεροποίησης**

Τα γαλακτώματα είναι συστήματα κινητικά και θερμοδυναμικά ασταθή . Η θερμοδυναμική καθορίζει αν θα συμβεί ή όχι ένα φαινόμενο και η κινητική παρέχει πληροφορίες σχετικά με το ρυθμό που θα συμβεί το φαινόμενο. Έτσι, υπεισέρχεται ο όρος “σταθερότητα γαλακτωμάτων”, που αντανακλά την ικανότητά τους να αντιστέκονται στις αλλαγές με τη πάροδο του χρόνου. Σε αυτή την ιδιότητα, οφείλεται η ικανότητα των τροφίμων να διατηρούν τις φυσικοχημικές και τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (McClements, 1999). Παρακάτω παρουσιάζονται οι συνηθέστεροι φυσικοί τρόποι αποσταθεροποίησης ενός γαλακτώματος (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Φυσικοί μηχανισμοί αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων (Taylor, 1998).

#### 2.4.1. Βαρυτικός Διαχωρισμός (Gravitational Separation)

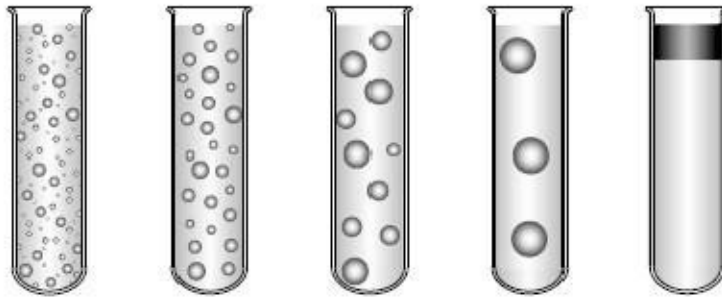
Ο βαρυτικός διαχωρισμός ενός γαλακτωματος συμβαίνει εξαιτίας της διαφορετικής πυκνότητας των δύο υγρών. Όταν τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσης έχουν χαμηλότερη πυκνότητα από της συνεχούς, έχουν την τάση να κινούνται ανοδικά, φαινόμενο το οποίο αναφέρεται ως αποκορύφωση ή κρεμοποίηση (creaming). Αντίθετα, όταν τα σταγονίδια έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το περιβάλλον υγρό τότε έχουν την τάση να κινούνται καθοδικά, φαινόμενο το οποίο αναφέρεται ως καθίζηση (sedimentation) (McClements, 1999).

#### 2.4.2. Κροκίδωση-Συσσωμάτωση (Flocculation)

Η συσσωμάτωση είναι μια διαδικασία αντιστρεπτή ή μη, κατά την οποία δύο ή περισσότερα σταγονίδια ενώνονται και δημιουργούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα, μέσα στο συνδέονται χαλαρά με ελκτικές δυνάμεις ακολουθώντας την κίνηση Brown. Έτσι συγκρούονται και τελικά συσσωματώνονται δημιουργώντας κροκιδωμάτα. Κυριότερο ρόλο παίζουν οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις, οι δυνάμεις Van der Waals και οι πολυμερικές δυνάμεις (steric forces) των προσροφημένων μορίων των γαλακτωματοποιητών (McClements, 1999; Van Aken & Van Vilet, 2002).

### 2.4.3. Συγχώνευση (Coalescence)

Η συγχώνευση (Σχήμα 2) γίνεται με διάσπαση του διεπιφανειακού υμενίου και συνένωση στη συνέχεια δύο ή περισσότερων σταγονιδίων προς σταγονίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία, που τελικά προκαλεί ολική κατάρρευση του γαλακτώματος και διαχωρισμό των δύο φάσεων. Μακροσκοπικά, παρατηρείται τότε, η δημιουργία ελαιώδους στοιβάδας στο πάνω μέρος του γαλακτώματος. Το φαινόμενο της συγχώνευσης εμφανίζεται κυρίως σε γαλακτώματα με σταγονίδια που έχουν παραμείνει συσσωματωμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα (McClements, 1999).



Σχήμα 2. Σταδιακή συγχώνευση σταγονιδίων (McClements, 1999).

### 2.4.4. Αντιστροφή Φάσεων (Phase Inversion)

Στην αντιστροφή φάσεων αλλάζει ο τύπος του γαλακτώματος. Έτσι, ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό μετατρέπεται σε γαλάκτωμα νερού σε έλαιο και αντίστροφα. Από φυσικής άποψης, η αντιστροφή φάσεων αποδίδεται σε μεταβολές στη σύσταση ή στο περιβάλλον του γαλακτώματος, όπως το κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης, ο τύπος του γαλακτωματοποιητή, η συγκέντρωσή του και η θερμοκρασία. Ωστόσο η αντιστροφή φάσεων είναι δυνατή μόνο σε ορισμένους τύπους γαλακτωμάτων. Στα υπόλοιπα πραγματοποιείται διαχωρισμός των δύο φάσεων (McClements, 1999).

### 2.4.5. Ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald Ripening)

Πρόκειται για ένα φαινόμενο κατά το οποίο μειώνεται ο αριθμός των σταγόνων, και αυξάνει το μέσο μέγεθος τους, χωρίς τη συγχώνευση σταγονιδίων. Τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσης διαχέονται μέσα στη συνεχή, έως ότου επαναδιαλυτοποιούνται σε ένα άλλο σταγονίδιο. Έτσι μεγαλώνουν τα μεγαλύτερα σωματίδια εις βάρος των μικρότερων. (McClements, 1999; Ριζούλης, 2013).

### 3. ΣΚΟΠΟΣ

- ❖ Χρήση της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) για τη μελέτη της δομής των οργανικών ενώσεων (πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες) του εκχυλίσματος που αποκτήθηκε με υδατική εκχύλιση κυδωνόσπορου σε pH 4,6,8 και 10 (EK4,EK6,EK8 και EK 10 αντίστοιχα ).
- ❖ Μακροσκοπική και μικροσκοπική μελέτη της συνεισφοράς των εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό.
- ❖ Μελέτη της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου, άνω (pH 7) και κάτω (pH 3) του ισηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών.

## 4. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1. Υλικά

- ❖ Εκχυλίσματα κυδωνόσπορου
- ❖ Tris Base  $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$ -M.B. 121,14
- ❖ Κιτρικό οξύ ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )-M.B. 192
- ❖ Νατραζίδιο- $\text{NaN}_3$
- ❖ Δεκαεξάνιο ( $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ )- $\rho_{\Delta} = 0,776 \text{ g/cm}^3$
- ❖ Tween 20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ )

### 4.2. Εργαστηριακός Εξοπλισμός

- ❖ Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου (FT-IR) Nicolet 380 της Thermo για το προσδιορισμό οργανικών ενώσεων των εκχυλισμάτων.
- ❖ Οπτικό Μικροσκόπιο Axion Star της Zeiss
- ❖ Malvern Mastersizer 2000 για το προσδιορισμό μεγέθους των σταγονιδίων
- ❖ Συσκευή μέτρησης ιξώδους Bohlin CVOR 150 για το προσδιορισμό της ρεολογίας των γαλακτωμάτων

### 4.3. Παρασκευή Διαλυμάτων και Δειγμάτων

#### 4.3.1. Παρασκευή Ρυθμιστικού Δ/τος Tris (Buffer pH 7)

Σε 1000 g απιονισμένο νερό διαλύονται 3 g Tris-Base με μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια προστίθενται 1,625g νατραζιδίου για την αποφυγή μικροβιακής ανάπτυξης και ρυθμίζεται το διάλυμα σε pH 7 με χρήση HCl 0,1M.

#### 4.3.2. Παρασκευή Ρυθμιστικού Δ/τος Κιτρικού Οξέος (Buffer pH 3)

Σε 1000 g απιονισμένο νερό διαλύονται 1,92 g κιτρικού οξέος με μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια προστίθενται 1,625g νατραζιδίου για την αποφυγή μικροβιακής ανάπτυξης και ρυθμίζεται το διάλυμα σε pH 3 με χρήση HCl 0,1M.

#### 4.3.3. Παρασκευή Δειγμάτων προς Έλεγχο Σταθεροποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων

Παρασκευάζεται γαλάκτωμα λαδιού σε νερό (40% v/v), χρησιμοποιώντας δεκαεξάνιο ως ελαιώδη φάση, ρυθμιστικό διάλυμα Tris ως υδατική και 2% Tween ως επιφανειοδραστική ουσία. Ακολουθεί ομογενοποίηση για 30 sec.

Τέλος, παρασκευάζονται αρχικά πυκνά διαλύματα 4% w/v εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου EK 4 και EK 6, καθώς και αραιώσεις αυτών χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα Tris, τα οποία προστίθενται στο παρασκευασμένο γαλάκτωμα, προκειμένου να ελεγχθεί η σταθεροποιητική τους ικανότητα.

#### **4.3.4. Παρασκευή Δειγμάτων προς Έλεγχο Γαλακτωματοποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων**

Παρασκευάζεται γαλάκτωμα λαδιού σε νερό (10% v/v), χρησιμοποιώντας δεκαεξάνιο ως ελαιώδη φάση, ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 και pH 3 ως υδατική και 1% εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου EK 4, EK 6, EK 8 και EK 10 ως γαλακτωματοποιητή. Ακολουθεί ομογενοποίηση για 30 sec.

#### **4.3.5. Παρασκευή Γαλακτωμάτων Εκχυλίσματος EK 10**

Παρασκευάζονται γαλακτώματα 1-10% v/v λάδι σε νερό, χρησιμοποιώντας δεκαεξάνιο ως ελαιώδη φάση, ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 και 1% εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου EK 10 ως γαλακτωματοποιητή. Ακολουθεί ομογενοποίηση για 30 sec.

\* Οι συγκεντρώσεις λαδιού που χρησιμοποιήθηκαν είναι 1%, 2%, 4%, 6%, 8% και 10%.

### **4.4. Μέθοδοι**

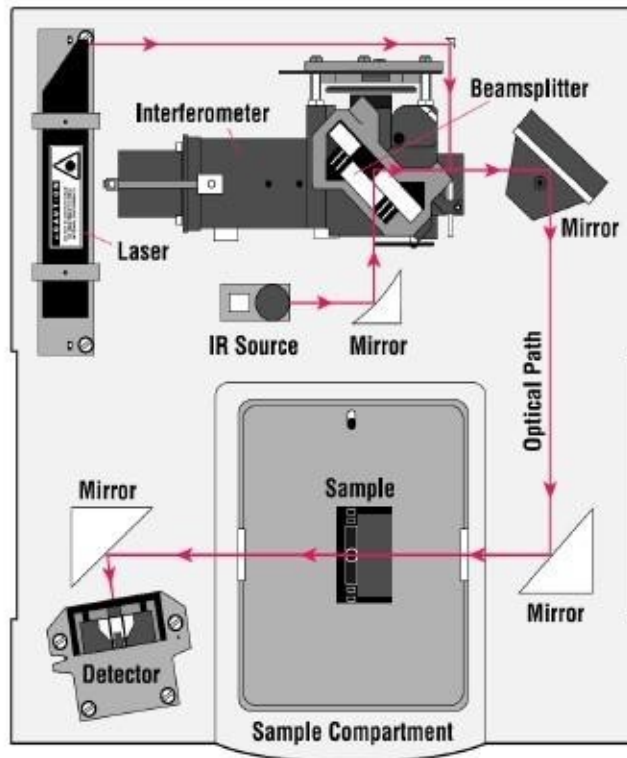
#### **4.4.1. Ωφασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)**

Η φασματοσκοπία συνιστά σημαντικό εργαλείο προσδιορισμού της δομής, της ποιότητας και της ποσότητας οργανικών και βιοχημικών ουσιών. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή, η οποία εκτείνεται περίπου από 670  $\text{cm}^{-1}$  έως 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Skoog et al., 2005).

Κατά τη φασματοσκοπία υπέρυθρου, το δείγμα ακτινοβολείται με υπέρυθρη ακτινοβολία, μέρος της οποίας απορροφάται από το δείγμα και μέρος της οποίας ανακλάται.

Το φάσμα και οι κορυφές απορρόφησης που προκύπτουν αντιστοιχούν στις συχνότητες δόνησης μεταξύ των δεσμών των ατόμων που αποτελούν το υλικό, και επομένως αποτελούν μοναδικό αποτύπωμα του κάθε δείγματος.





Σχήμα 3. Απεικόνιση συσκευής υπέρυθρης φασματοσκοπίας (ThermoNicolet, 2001).

Στο σχήμα 3 απεικονίζεται μία συσκευή υπέρυθρης φασματοσκοπίας, η οποία λειτουργεί ως εξής:

Η πηγή εκπέμπει υπέρυθρη ακτινοβολία που διέρχεται από ένα άνοιγμα, το οποίο ρυθμίζει το ποσό της ενέργειας που θα προσπέσει στο δείγμα και θα καταγράψει ο ανιχνευτής. Η ακτινοβολία εισέρχεται στο συμβολόμετρο (interferometer), αποκωδικοποιείται το φάσμα και εξέρχεται από το συμβολόμετρο ως συμβολογράφημα (interferogram). Ύστερα προσπίπτει στο υλικό από το οποίο είτε απορροφάται είτε ανακλάται.

Τέλος, η ακτίνα καταλήγει στον ανιχνευτή (detector), ο οποίος αναγνωρίζει τα σήματα των συμβολογραφημάτων. Το σήμα ψηφιοποιείται και αποστέλλεται στον υπολογιστή, όπου λαμβάνει χώρα ο μετασχηματισμός Fourier. Μετά το μετασχηματισμό παρουσιάζεται το τελικό φάσμα υπέρυθρου (ThermoNicolet, 2001).

#### 4.4.2. Οπτική Μικροσκοπία

Το μικροσκόπιο είναι μία διάταξη φακών με την οποία επιτυγχάνεται η μεγέθυνση των σωμάτων με διαστάσεις από 0,1-1000 μm.

Το οπτικό τμήμα αποτελείται από δύο συγκλίνοντα ομοαξονικά συστήματα φακών, τα οποία αποτελούν τον αντικειμενικό και τον προσοφθάλμιο φακό. Ο πρώτος έχει μικρή εστιακή απόσταση και το αντικείμενο τοποθετείται σε μικρή απόσταση από την εστία του φακού και έτσι σχηματίζεται είδωλο πραγματικό και ανεστραμμένο. Ο δεύτερος είναι ο φακός με τον οποίο ο παρατηρητής βλέπει το αντικείμενο και χρησιμεύει για να μεγενθύνει την πραγματική εικόνα που δίνει ο αντικειμενικός. Η απόσταση μεταξύ των δύο φακών πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των εστιακών τους αποστάσεων, έτσι ώστε

το είδωλο του αντικειμενικού να σχηματίζεται ανάμεσα στο οπτικό κέντρο και την κύρια εστία του προσοφθάλμιου. Κατά συνέπεια προκύπτει φανταστικό είδωλο, μεγεθυμένο, του αρχικού ειδώλου.

Η μικροδομή των γαλακτωμάτων μελετάται με τη χρήση μικροσκοπίου με φακό στα 10μm, το οποίο είναι εξοπλισμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται και καλύπτεται με καλυπτρίδα σταγόνα από κάθε γαλάκτωμα, με διαφορετική συγκέντρωση εκχυλίσματος, ώστε να ληφθούν μικροσκοπικές φωτογραφίες των δειγμάτων.

#### **4.4.3. Οπτικός διαχωρισμός φάσεων, Αποκορύφωση**

Όπως έχει αναφερθεί, αποκορύφωση καλείται ο διαχωρισμός των δυο φάσεων ενός κολλοειδούς που αποδίδεται στη μεταξύ τους διαφορά πυκνότητας. Σε ένα γαλάκτωμα ελαίου/νερού οι σταγόνες του ελαίου που είναι μικρότερης πυκνότητας από το νερό εμφανίζουν ανοδική τάση. Έτσι κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των γαλακτωμάτων, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της αποκορύφωσης και τα γαλακτώματα διαχωρίζονται σε δύο στιβάδες, την “κρέμα” και τον “ορό”.

Ο οπτικός διαχωρισμός, αξιολογείται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των γαλακτωμάτων μέσα σε δειγματοφορείς (με καπάκι) μέγιστης χωρητικότητας 15ml. Οι δειγματοφορείς γεμίζουν περί τα 3 τέταρτα και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η αποκορύφωση μετράται κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου, καθορίζοντας το ύψος κάθε φάσης οπτικά, χρησιμοποιώντας ένα χάρακα.

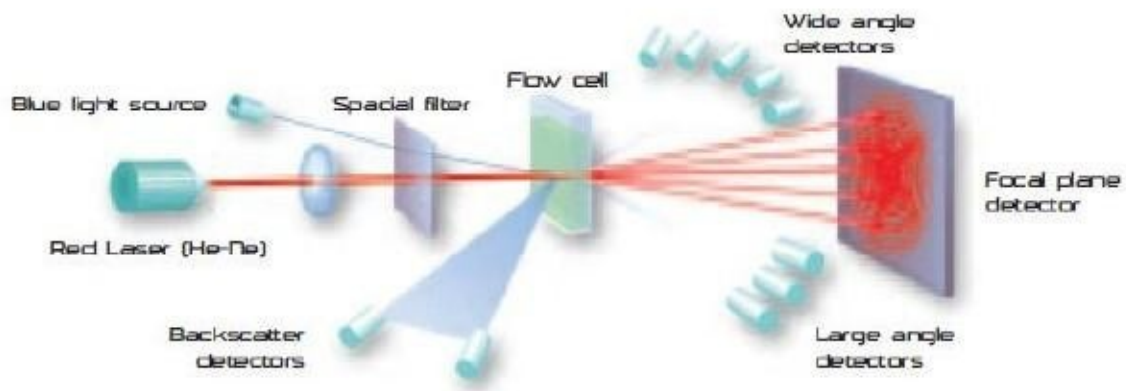
Ο συντελεστής αποκορύφωσης (Creaming Index) υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

Όπου  $H_L$  Το ύψος του ορού  
 $H_E$  Το συνολικό ύψος του γαλακτώματος (Onsaard et al., 2006).

#### 4.4.4. Προσδιορισμός Μεγέθους Σωματιδίων

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων των γαλακτωμάτων γίνεται με τη χρήση του Mastersizer 2000, το οποίο μπορεί να προσδιορίσει μέγεθος σταγονιδίων από 0.02- 2000  $\mu\text{m}$ .

Βασική αρχή λειτουργίας του είναι η σκέδαση του φωτός (light scattering), κατά την οποία όταν δέσμη φωτός προσπέσει σε κολλοειδές διάλυμα ένα μέρος της φωτεινής ακτινοβολίας διέρχεται δια του διαλύματος και το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η όλη τεχνική της σκέδασης του φωτός συνίσταται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με τη προσπίπτουσα ακτινοβολία, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4 (Παναγιώτου, 199).



Σχήμα 4. Βασική αρχή λειτουργίας σκέδασης φωτός (Malvern Instruments, 2005).

Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των σωματιδίων (Malvern Instruments, 2005). Το μέγεθος των σταγονιδίων αναλύεται αμέσως μετά την παρασκευή καθώς και κατά τη διάρκεια παραμονής τους, σε θερμοκρασία δωματίου. Ως μέσο διασποράς των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό.

Το μέσο μέγεθος των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων χαρακτηρίζεται με τους όρους  $d_{4,3}$  και  $d_{3,2}$ . Ο όρος  $d_{4,3}$  που ορίζεται ως η μέση διάμετρος όγκου υπολογίζεται από την εξίσωση:

Όπου  $n_i$  Ο αριθμός των σταγονιδίων με διάμετρο  $d_i$

Ο όρος  $d_{4,3}$  αναφέρεται στον ισοδύναμο όγκο για το πραγματικό μέγεθος των σωματιδίων. Αυτή η παράμετρος χρησιμοποιείται για να μετρήσει τις αλλαγές στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, και εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία στη παρουσία μεγάλων σωματιδίων/κροκιδωμάτων ( $>10\mu\text{m}$ ).

Ο όρος  $d_{3,2}$  ή μέση διάμετρος επιφάνειας είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση και καταγραφή των αλλαγών του μέσου όρου της επιφάνειας των σταγονιδίων επαφής και εκφράζεται ως:

(HORIBA Instruments, 2012).

Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί πως τα λαμβανόμενα αποτελέσματα μπορεί να έρθουν σε αντιπαράθεση με τη μικροσκοπία και τον οπτικό διαχωρισμό. Η αντιπαράθεση αυτή προκύπτει από την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου σκέδασης φωτός, διότι απαιτείται εκτεταμένη αραίωση του δείγματος, με τελικό αποτέλεσμα τη ρήξη των κροκιδωμάτων. Έτσι, η συγκέντρωση των μορίων του μη προσροφημένου κολλοειδούς πέφτει κάτω από τη κρίσιμη συγκέντρωση που παρουσιάζει φαινόμενα κροκίδωσης από κένωση και οι μετρήσεις φαίνονται να μην εμφανίζουν διαφορές στο μέγεθος των σταγονιδίων (Khalloufi et al., 2008).

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)

Η φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), παρέχει πληροφορίες σχετικά με την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Στην άπυ υπέρυθη περιοχή του φάσματος (infrared spectra), εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνουν τις ζώνες απορρόφησης του Αμιδίου I και του Αμιδίου II. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από τους αμιδικούς δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξέων. Η απορρόφηση που σχετίζεται με την ζώνη του Αμιδίου I οφείλεται σε δονήσεις κάμψης του δεσμού C=O, ενώ η απορρόφηση που σχετίζεται με την ζώνη του Αμιδίου II οφείλεται σε δονήσεις κάμψης του δεσμού N-H. Στο Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα πιθανά μήκη κύματος στα οποία απορροφούν οι πρωτεΐνες (Kong & Yu, 2007).

Πίνακας 5. Φάσματα απορρόφησης ( $\text{cm}^{-1}$ ) των πρωτεϊνών.

Ζώνη Αμιδίου	Wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ )
Ζώνη Αμιδίου A	3300
Ζώνη Αμιδίου B	3100
Ζώνη Αμιδίου I	1600-1690
Ζώνη Αμιδίου II	1480-1575
Ζώνη Αμιδίου III	1229-1301
Ζώνη Αμιδίου IV	625-767
Ζώνη Αμιδίου V	640-800
Ζώνη Αμιδίου VI	537-606
Ζώνη Αμιδίου VII	200

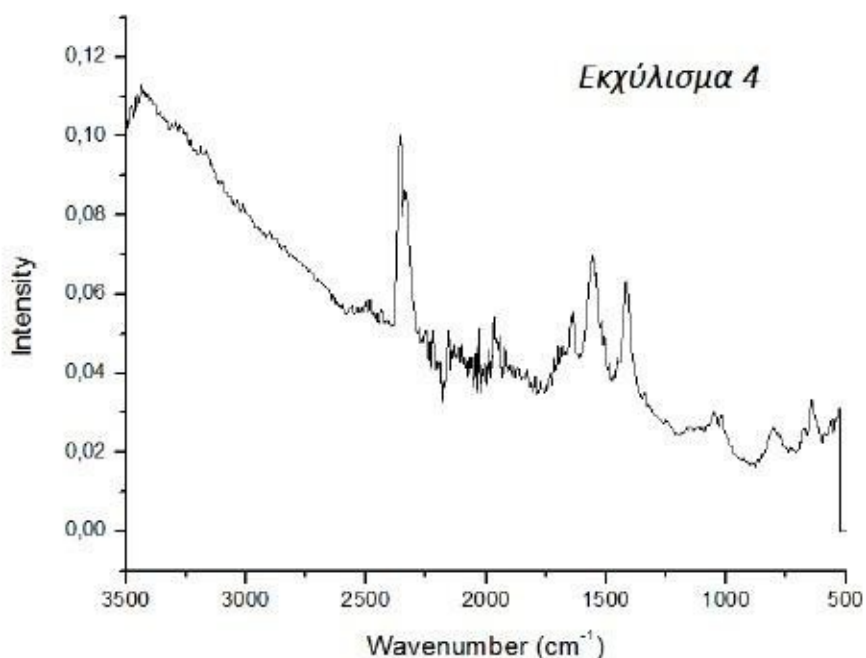
Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι εξαιτίας των δεσμών αζώτου οι πρωτεΐνες απορροφούν επίσης στο φάσμα των  $1400\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ .

Αναφέρονται κάποια χαρακτηριστικά μήκη κύματος και τα αμινοξέα στα οποία οφείλεται η απορρόφησή τους. Ασπαράγινη  $1638\text{ cm}^{-1}$ , αργινίνη  $1673\text{ cm}^{-1}$ , λυσίνη  $1629\text{ cm}^{-1}$  και τυροσίνη  $1602\text{ cm}^{-1}$  (Kong & Yu, 2007).

Οι πολυσακχαρίτες απορροφούν εξαιτίας των δονήσεων δακτυλίου (ring-vibrations) C-OH και C-O-C και εμφανίζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις σε μια περιοχή  $800\text{ - }1200\text{ cm}^{-1}$ , καθώς τα πηκτικά παράγωγα απορροφούν στα  $1500\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$  (Kakuracova et al., 2000). Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των γλυκοζιτικών δεσμών είναι στα  $1020\text{ cm}^{-1}$  (Sekkal et al., 1995) καθώς και στα  $1160\text{ cm}^{-1}$  (Sun et al., 1998). Σε κάποιες περιπτώσεις αναφέρεται πως η απορρόφηση στα  $1160\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να οφείλεται και σε συμμετρικές δονήσεις κάμψης C-C και C-O-C των ημικυτταρινών (Xu et al, 2004). Κορυφές οι οποίες έχουν ταυτιστεί με την ύπαρξη ημικυτταρινών είναι αυτές στα  $897\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1044\text{ cm}^{-1}$  (δονήσεις κάμψης C-OH)

(Sun et al., 2005), καθώς και στα  $1375\text{ cm}^{-1}$  (Sun et al., 1998), η οποία οφείλεται σε δονήσεις κάμψης του  $\text{-CH}$  που υπάρχουν στις δομές των κυτταρινών και ημικυτταρινών. Οι μονοσακχαρίτες απορροφούν στα  $980\text{-}1170\text{ cm}^{-1}$  και οφείλονται σε δονήσεις του  $\text{-OH}$  (Leema et al., 2010), φάσμα το οποίο αλληλεπικαλύπτεται με το φάσμα των πολυσακχαριτών, γεγονός αναμενόμενο μιας και οι μονοσακχαρίτες αποτελούν δομικά μόρια πολυσακχαριτών.

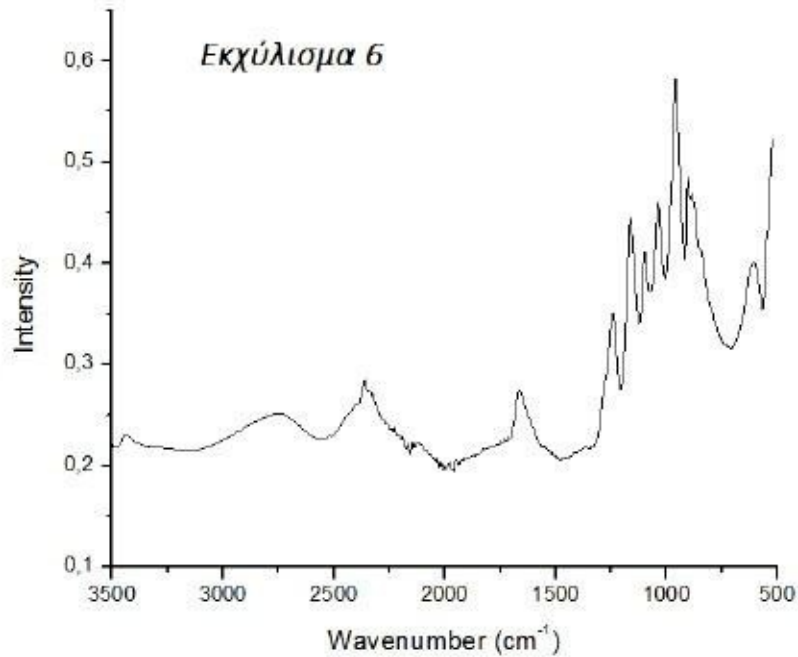
Στο Σχήμα 5 και στο Σχήμα 6 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης των εκχύλισμάτων ΕΚ 4 και ΕΚ 6 και υποδηλώνεται πως τα δύο αυτά δείγματα ομοιάζουν καθώς εμφανίζουν κορυφές απορρόφησης και για τα δύο είδη οργανικών ενώσεων.



Σχήμα 5. Φασματοσκοπία υπερώθρου για το εκχύλισμα 4 (ΕΚ 4).

Το ΕΚ 4 παρουσιάζει τις ακόλουθες ενδιαφέρουσες κορυφές:

- ❖ Κορυφές στις οποίες απορροφούν οι πρωτεΐνες: 538, 547, 559, 586, 592, 644, 669, 678, 690, 773, 784, 798, 1243, 1251, 1290, 1415, 1448, 1456, 1471, 1488  $\text{cm}^{-1}$ .
- ❖ Κορυφές στις οποίες απορροφούν οι πολυσακχαρίτες & οι μονοσακχαρίτες: 804, 1022, 1051, 1076, 1081, 1099, 1108, 1120, 1130, 1149, 1164, 1182, 1197  $\text{cm}^{-1}$ .
- ❖ Κορυφές με κοινό φάσμα (πρωτεΐνες & πηκτικά παράγωγα): 1508, 1519, 1541, 1556, 1619, 1637, 1646, 1668, 1681, 1699  $\text{cm}^{-1}$ .
- ❖ Κορυφές στις οποίες απορροφούν τα πηκτικά παράγωγα: 1716, 1731, 1742, 1760, 1772, 1783, 1793, 1801, 1812, 1828, 1845, 1861, 1868 και 1889  $\text{cm}^{-1}$ .



Σχήμα 6. Φασματοσκοπία υπερόυθρου για το εκχύλισμα 6 (EK 6).

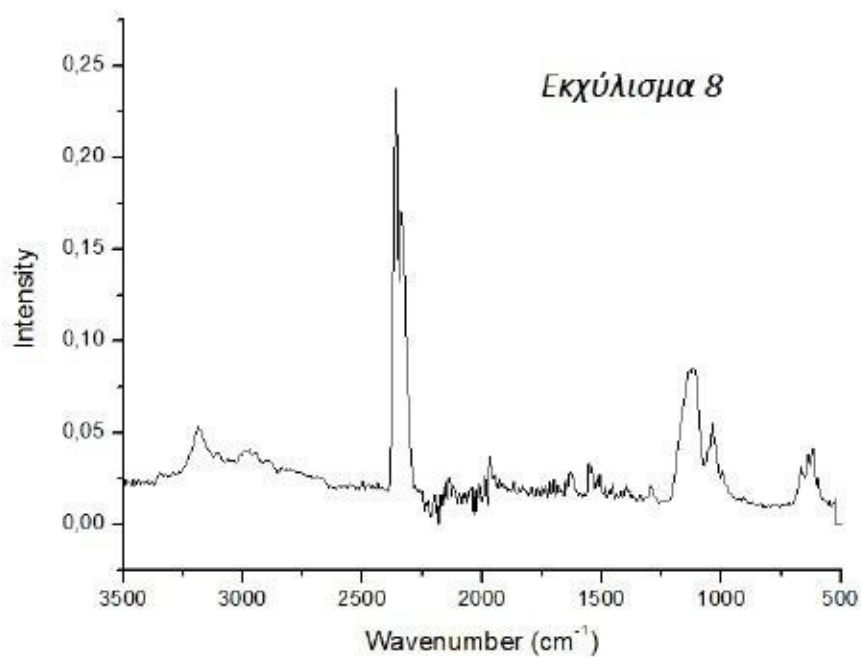
Το EK 6 παρουσιάζει σαφώς μικρότερο φάσμα του EK 4 με τις ακόλουθες ενδιαφέρουσες κορυφές:

- ❖ Κορυφές στις οποίες απορροφούν οι πρωτεΐνες: 601, 709, 719, 732, 761, 1241  $\text{cm}^{-1}$ .
- ❖ Κορυφές στις οποίες απορροφούν οι πολυσακχαρίτες & οι μονοσακχαρίτες: 846, 887, 904, 958, 1037, 1097, 1162  $\text{cm}^{-1}$  (Πιθανή ύπαρξη κυτταρίνης).
- ❖ Κορυφές με κοινό φάσμα (πρωτεΐνες & πηκτικά παράγωγα): 1666  $\text{cm}^{-1}$ .

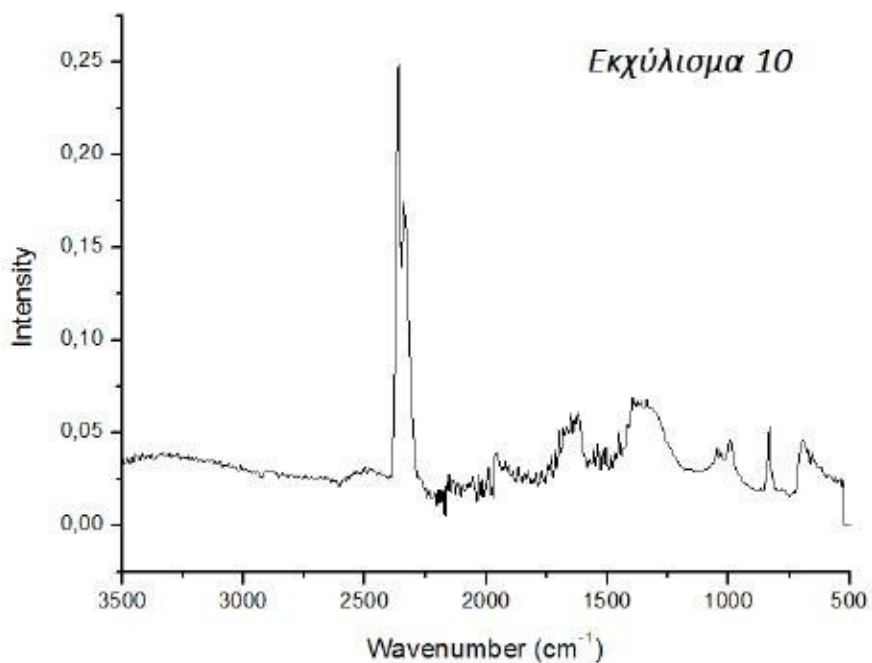
Μία παρόμοια εικόνα δίνουν το EK 8 και το EK 10 τα οποία ομοιάζουν μεταξύ τους, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7 και στο Σχήμα 8. Ιδιαίτερης σημασίας σε αυτή τη περίπτωση είναι και η εμφάνιση κορυφής αρωματικού δακτυλίου.

Το EK 8 παρουσιάζει πολύ μικρό φάσμα με μόνο τρεις κορυφές απορρόφησης, στα 1037  $\text{cm}^{-1}$ , στα 1116  $\text{cm}^{-1}$  και στα 1133  $\text{cm}^{-1}$ , όπου απορροφούν μονοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

Αντίθετα, το EK 10 παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερο φάσμα με απορρόφηση στα 833  $\text{cm}^{-1}$ , κορυφή η οποία οφείλεται αποκλειστικά στην ύπαρξη πολυσακχαρίτη, στα 1373  $\text{cm}^{-1}$ , και εμφανίζεται λόγω της ύπαρξης δομών κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Επίσης, εμφανίζονται και δύο κορυφές στα 1417  $\text{cm}^{-1}$  και στα 1456  $\text{cm}^{-1}$  οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη πρωτεϊνών, καθώς και ένα κοινό φάσμα απορρόφησης πρωτεϊνών και πηκτικών παραγώγων, στα 1621  $\text{cm}^{-1}$ , 1635  $\text{cm}^{-1}$ , 1646  $\text{cm}^{-1}$ , 1668  $\text{cm}^{-1}$ , 1681  $\text{cm}^{-1}$  και 1697  $\text{cm}^{-1}$ .



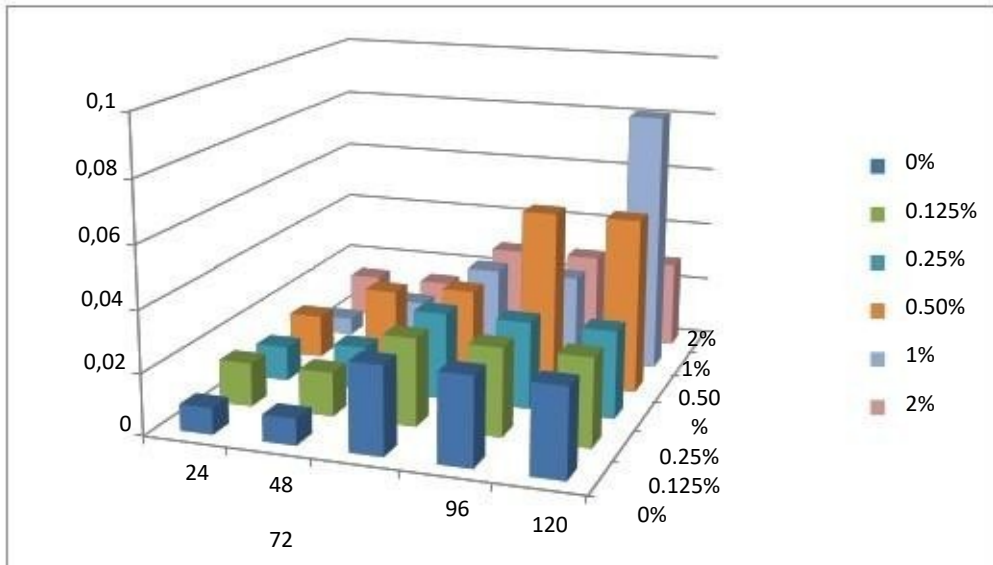
Σχήμα 7. Φασματοσκοπία υπερόθρου για το εκχύλισμα 8 (EK 8).



Σχήμα 8. Φασματοσκοπία υπερόθρου για το εκχύλισμα (EK 10).



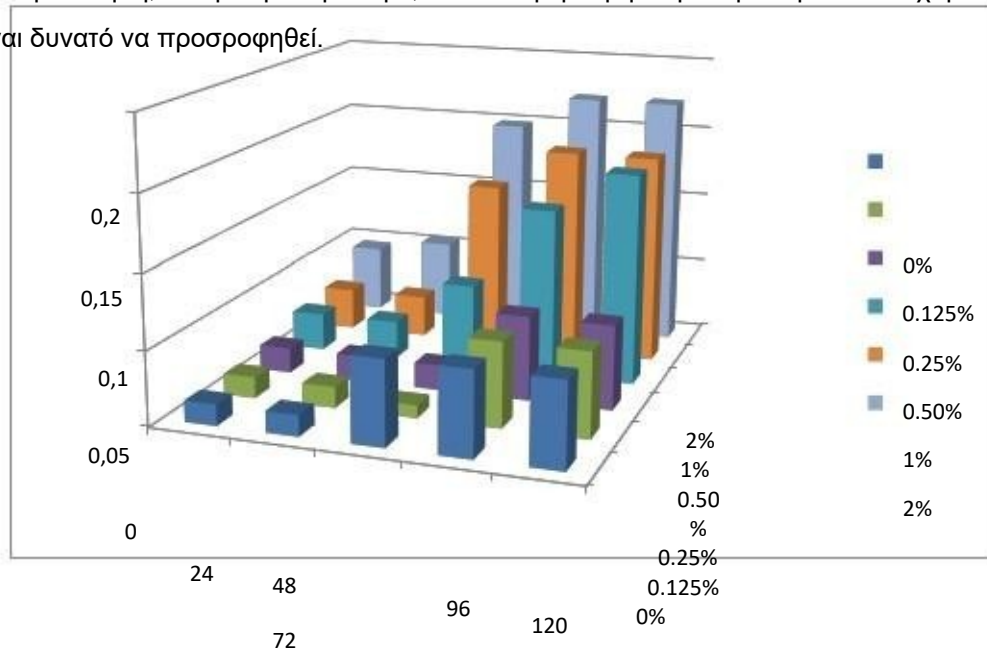
## 5.2. Μελέτη Σταθεροποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων



Σχήμα 9. Δείκτης αποκορύφωσης γαλακτωμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων σε EK 4.

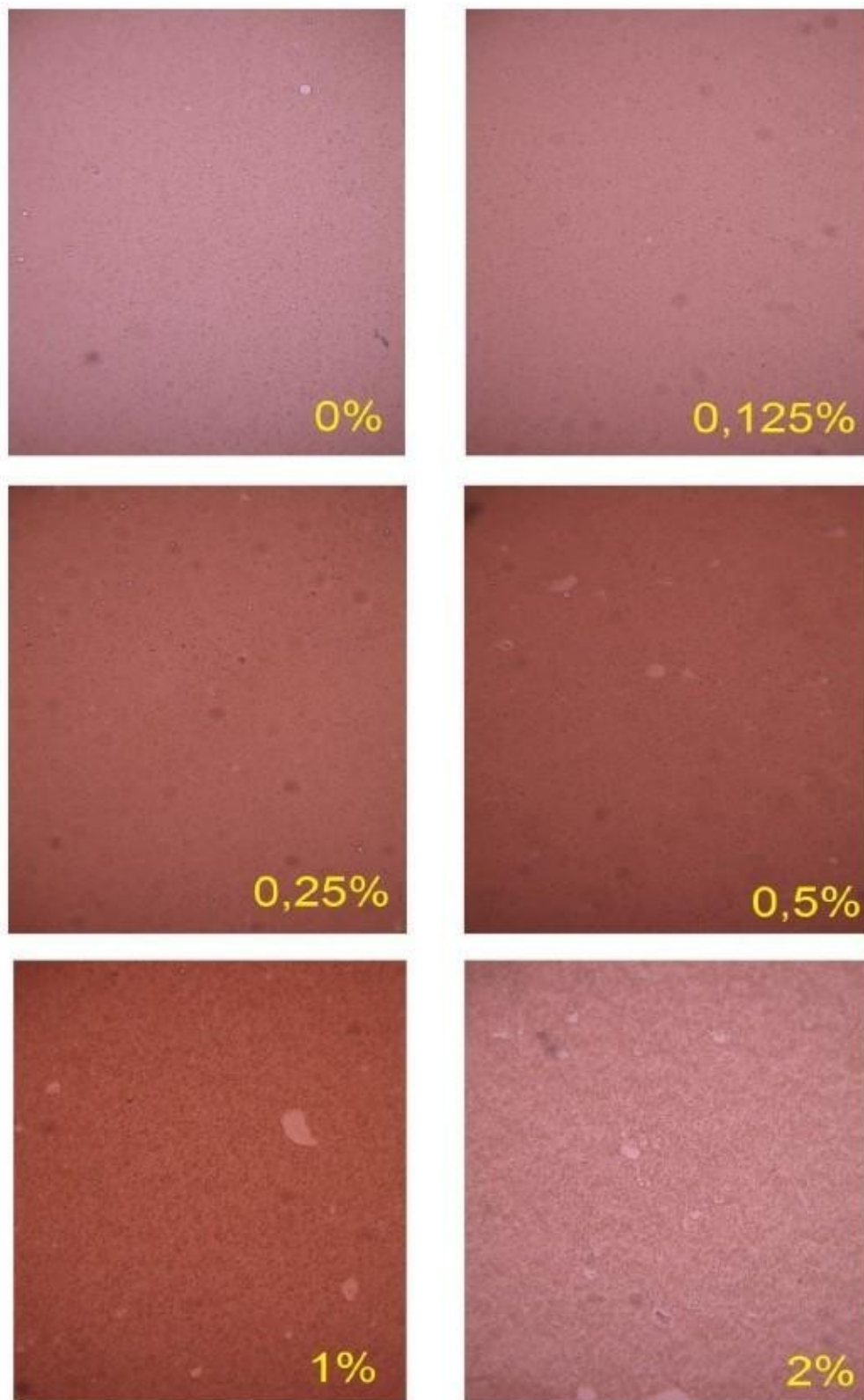
Ο δείκτης αποκορύφωσης χρησιμοποιείται για τη μελέτη του οπτικού διαχωρισμού. Από τα σχήματα 9 και 10 προκύπτει ότι και στις δύο κατηγορίες δειγμάτων, που είναι σταθεροποιημένα με EK 4 και EK 6, τα δείγματα παρουσιάζουν διαχωρισμό φάσεων. Ιδιαίτερα τα δείγματα που περιέχουν EK 4 εμφανίζουν αποκορύφωση, απόλυτα εξαρτώμενη από το χρόνο.

Αντίθετα, στο EK 6, ενώ παρουσιάζεται αρκετά μεγάλη αποκορύφωση σε υψηλές συγκεντρώσεις και σε σύγκλιση 0%, στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις (0,125% ; 0,25% και 0,5%), τα δείγματα εμφανίζουν αποκορύφωση την τρίτη και όχι τη δεύτερη μέρα. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως υποδεικνύει ότι η προσθήκη εκχυλίσματος EK 6 επιδρά θετικά στη σταθεροποίηση, και η συγκέντρωση 0,5% είναι η κρίσιμη συγκέντρωση πολυσακχαρίτη που είναι δυνατό να προσροφηθεί.



Σχήμα 10. Δείκτης αποκορύφωσης γαλακτωμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων σε EK 6.

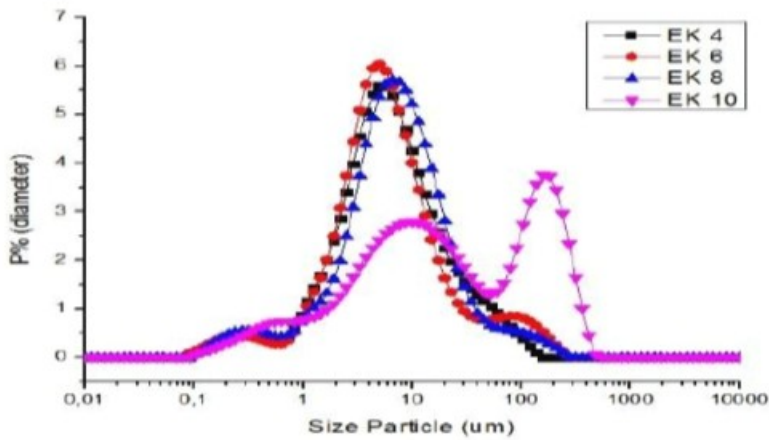




Σχήμα 11. Οπτική μικροσκοπία (Κλίμακα: 10μm) γαλακτωμάτων σταθεροποιημένα με εκχύλισμα κυδωνόσπορου EK 4.

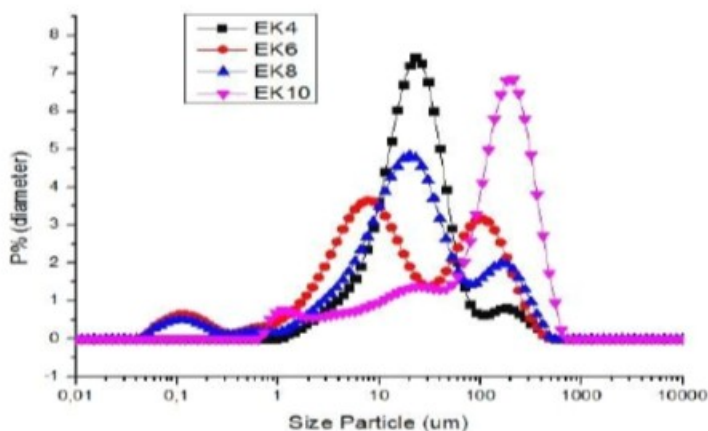
Η οπτική μικροσκοπία των γαλακτωμάτων με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος ΕΚ 4 (Σχήμα 11), αποκαλύπτει πως το γαλάκτωμα που δεν περιέχει καθόλου εκχύλισμα (0%) είναι ομοιογενές και παρουσιάζει κίνηση Brown, ενώ η συγκέντρωση εκχυλίσματος 0,125% δεν παρουσιάζεται ιδιαίτερη διαφορά. Μικροσκοπικά παρατηρείται η έναρξη της κροκίδωσης στις συγκεντρώσεις 0,25% και 0,5%, η οποία φαίνεται καθαρότερα στη συγκέντρωση 1%, ενώ στη συγκέντρωση 2% παρατηρείται συγκέντρωση από κένωση.

### 5.3. Μελέτη Γαλακτωματοποιητικής Ικανότητας Εκχυλισμάτων



Σχήμα 13. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτωμάτων παρασκευασμένα σε pH 3 την ημέρα παρασκευής τους.

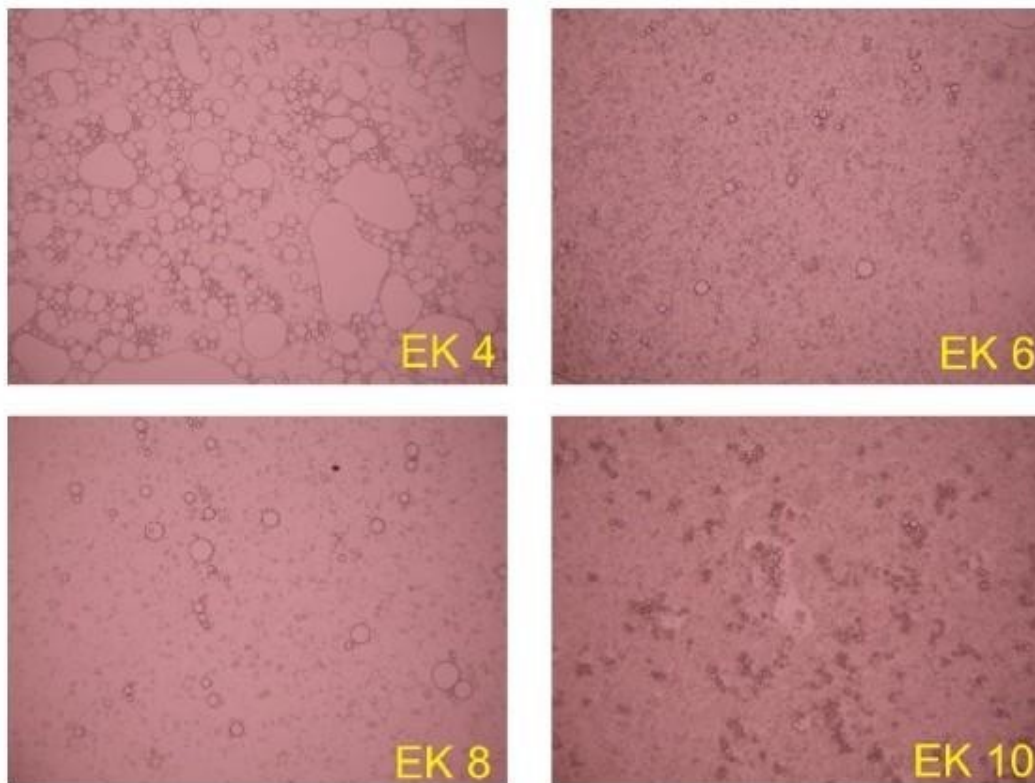
Το Σχήμα 13 παρουσιάζει την κατανομή των σωματιδίων γαλακτωμάτων, στα οποία τα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν ως γαλακτωματοποιητές και όχι σαν σταθεροποιητές. Δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διαφορά μεταξύ των μεγεθών των σωματιδίων. Όμως, μία ιδιαιτερότητα που πρέπει να σημειωθεί, είναι ότι τα δείγματα τείνουν να εμφανίσουν πληθυσμό στα 100μm και το EK 10 παρουσιάζει έντονη ανομοιογένεια. Η μικροσκοπική εξέταση επιβεβαίωσε ότι οι μεγάλες αυτές κορυφές δεν είναι μεμονωμένα σταγονίδια αλλά κροκιδώματα, οφειλόμενα σε κένωση (depletion) λόγω μη προσροφημένου πολυσακχαρίτη από κυδωνόσπορο.



Σχήμα 14. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτωμάτων παρασκευασμένα σε pH 3 μετά τη πάροδο πέντε ημερών.

Η παρατήρηση που έγινε στο προηγούμενο διάγραμμα δικαιολογείται και στο Σχήμα

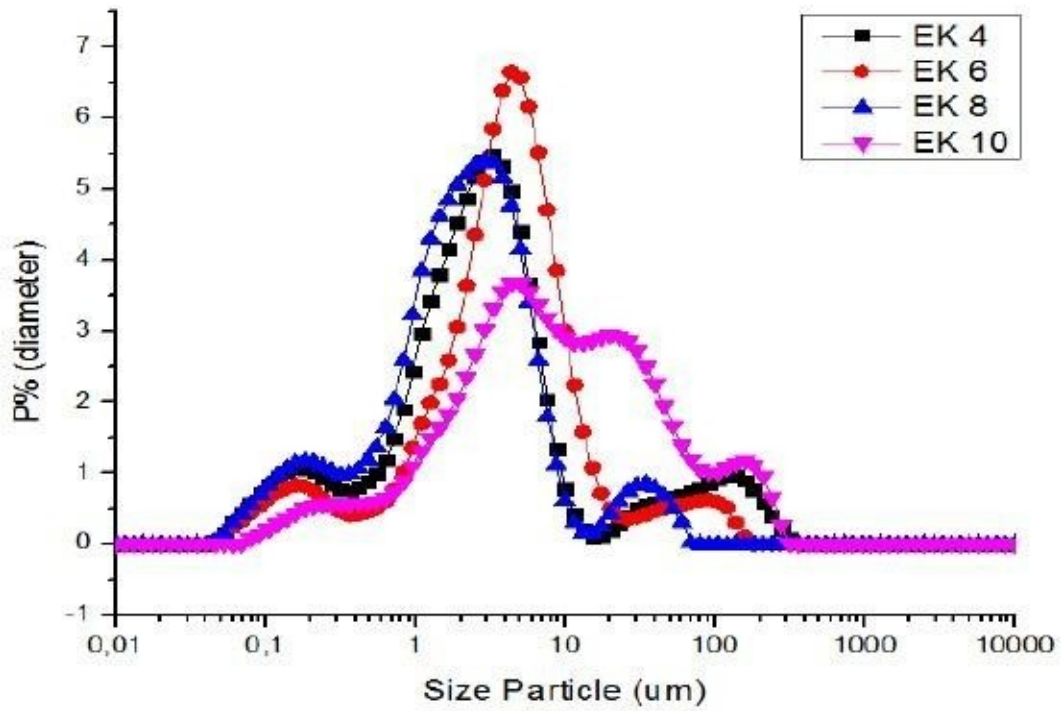
14. Μετά την πάροδο 5 ημερών, τα σταγονίδια εμφανίζουν αλλαγές ως προς το μέγεθος, και οι κατανομές του μεγέθους τους αρχίζουν να μετατοπίζονται προς τη δεξιά ζώνη, όπου εμφανίζονται σωματίδια μεγαλύτερης διαμέτρου.



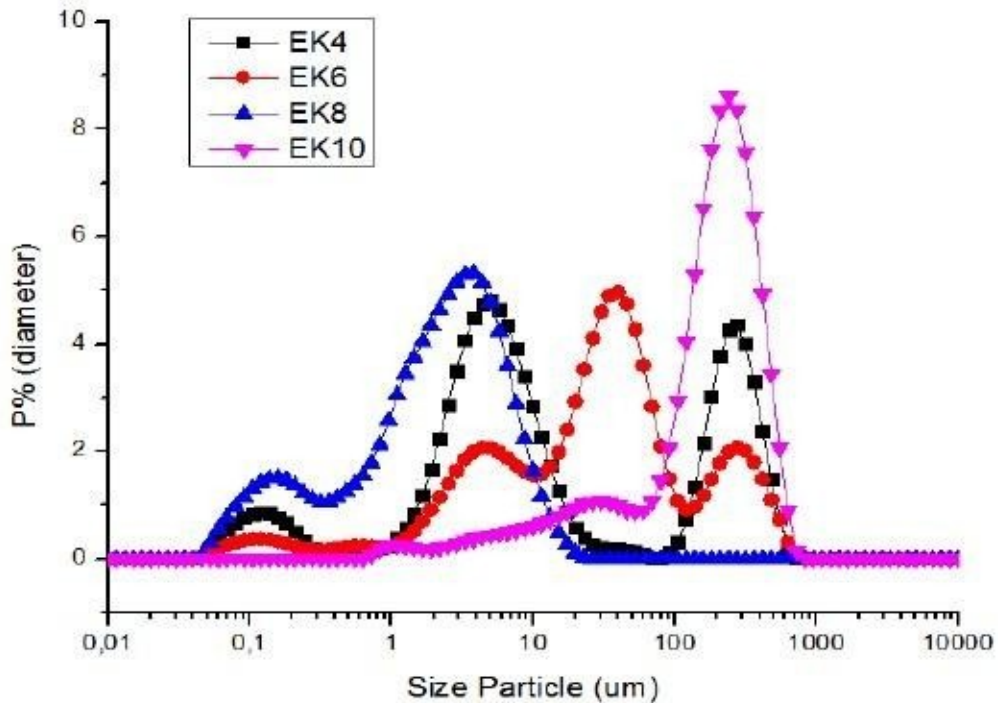
Σχήμα 15. Οπτική μικροσκοπία (Κλίμακα: 10 $\mu$ m) γαλακτωμάτων με χρήση εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου σε pH 3.

Στο Σχήμα 15, παρουσιάζεται η οπτική μικροσκοπία των παραπάνω γαλακτωμάτων. Παρατηρείται ότι και τα τέσσερα εκχυλίσματα, αν και σε διαφορετικό βαθμό έκτασης, εμφανίζουν το φαινόμενο της κροκίδωσης.

Τη μέγιστη αποσταθεροποίηση παρουσιάζει το EK 4 και παρατηρείται αυξημένη έκταση συγχώνευσης των κροκιδωμάτων γεγονός που θα οδηγήσει σε πολύ γρήγορη κατάρρευση του γαλακτώματος. Το EK10 είναι το αμέσως επόμενο δείγμα που παρουσιάζει έντονα το φαινόμενο της κροκίδωσης, ενώ τα δείγματα EK 6 και EK 8, εμφανίζουν το φαινόμενο σε μικρότερη έκταση. Οι εικόνες αυτές έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μέτρησης του μεγέθους σωματιδίων της πέμπτης ημέρας, όπου παρατηρούνται πληθυσμοί μεγάλης διαμέτρου σωματιδίων και επομένως έντονη αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων.



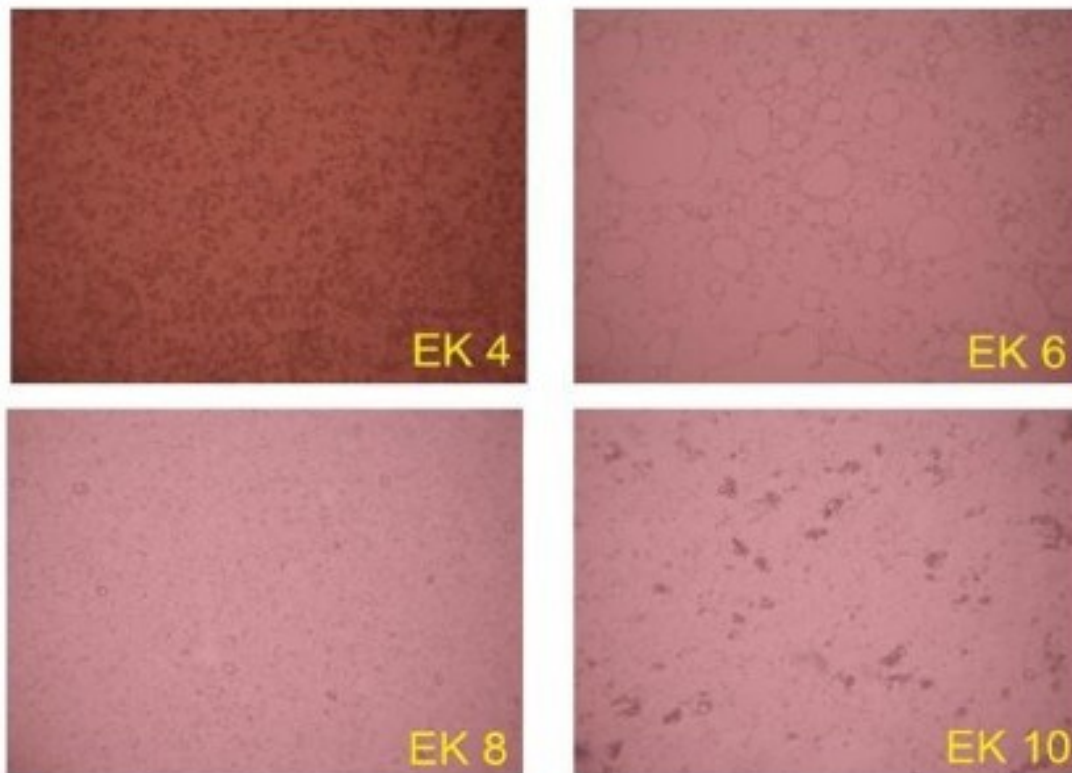
Σχήμα 16. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτωμάτων παρασκευασμένα σε pH 7 την ημέρα παρασκευής τους.



Σχήμα 17. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτωμάτων παρασκευασμένα σε pH 7 μετά τη πάροδο πέντε ημερών.



Από το σχήμα 16, προκύπτει πως συγκρινόμενα τα δείγματα με αυτά που παρήχθησαν σε pH 3, παρουσιάζουν διαφορά, ήδη από τη πρώτη μέρα παραγωγής τους. Η καμπύλη κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων είναι ελαφρώς μετατοπισμένη προς τη αριστερή ζώνη, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη πληθυσμού με μικρότερη διάμετρο. Αυτό αποδίδεται και στο περιβάλλον του γαλακτώματος ( $pH > pI$ ). Ωστόσο η έντονη ανομοιογένεια του μεγέθους των σωματιδίων μπορεί να οδηγήσει στη γρήγορη αποσταθεροποίηση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 17, του οποίου τα δεδομένα είναι τη τέταρτη ημέρα.



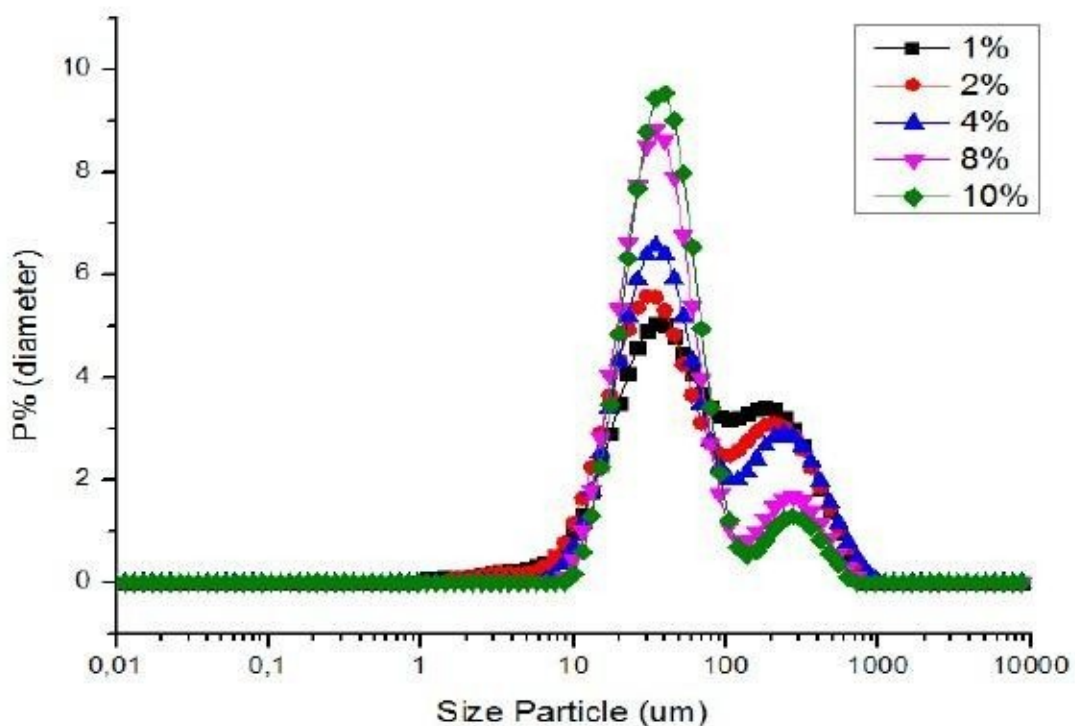
Σχήμα 18. Οπτική μικροσκοπία (Κλίμακα: 10 $\mu$ m) γαλακτωμάτων με χρήση εκχυλισμάτων κυδωνόσπορου σε pH 7.

Στο Σχήμα 18 παρατηρείται μεγαλύτερη σταθερότητα των εκχυλισμάτων σε σύγκριση με τα δείγματα σε pH 3. Όπως, προαναφέρθηκε και στα αποτελέσματα της μέτρησης μεγέθους σωματιδίων αυτό μπορεί να οφείλεται και στο περιβάλλον που παρασκευάζονται τα γαλακτώματα. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζεται το φαινόμενο της κροκίδωσης αλλά σε μικρότερη έκταση.

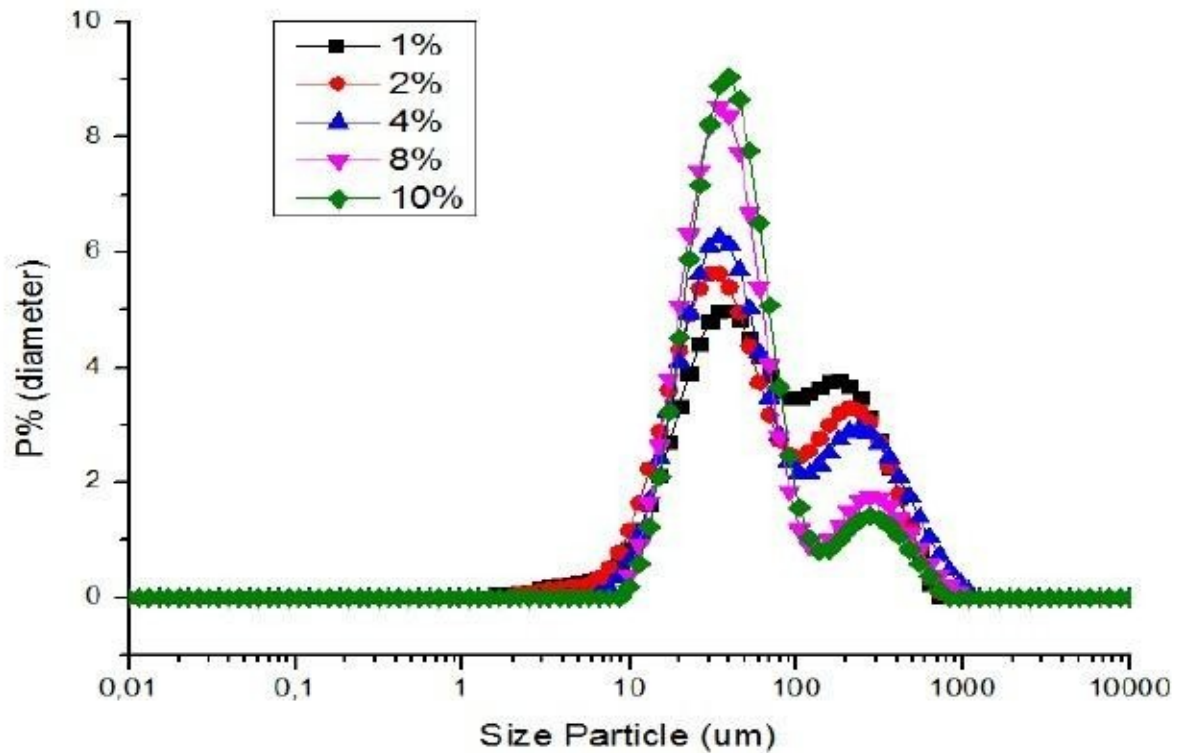
Τη μεγαλύτερη αστάθεια παρουσιάζει το EK6 εμφανίζοντας πάρα πολύ έντονα το φαινόμενο της κροκίδωσης καθώς και της συγχώνευσης. Στο EK 4 επίσης παρατηρείται πολύ έντονα το φαινόμενο της κροκίδωσης, στο EK 10 είναι περιορισμένο και στο EK 8 διακρίνεται ελάχιστα. Η κροκίδωση οφείλεται σε κένωση (depletion flocculation) λόγω της παρουσίας μη ποσοφημένων πολυσακχαριτών. Καθώς τα κροκιδώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακτίνα από τα μεμονωμένα σταγονίδια (100  $\mu$ m σε σχέση με το 1  $\mu$ m των σταγονιδίων), η έντονη αποκορύφωση που παρατηρήθηκε στις δοκιμές σταθερότητας μπορεί να αποδοθεί σε κροκίδωση από κένωση.

Αυτή η αντιπαράθεση μεταξύ της σταθερότητας ίσως να οφείλεται στην αναλογία των εκχυλίσματος σε πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Έτσι, το EK 8, το οποίο κατά την ανάλυση με FT-IR εμφάνισε μόνο την ύπαρξη πολυσακχαριτών, φαίνεται να εμφανίζει κοινή συμπεριφορά στα δύο περιβάλλοντα. Αντίθετα, τα EK 4, EK 6 και EK 10 παρουσιάζουν αλλαγές καθώς περιέχουν πρωτεΐνες που επηρεάζονται από το pH. Μεταξύ των δειγμάτων EK 4, EK 6 και EK 10, αυτό που έχει παρόμοια συμπεριφορά και στα δύο περιβάλλοντα είναι το EK 10.

#### 5.4. Γαλακτωματοποιητική Ικανότητα Εκχυλίσματος 10



Σχήμα 19. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτωμάτων με χρήση εκχυλίσματος κυδωνόσπορου EK 10 ως γαλακτωματοποιητή την ημέρα παρασκευής τους.



Σχήμα 20. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτωμάτων με χρήση εκχυλίσματος κυδωνόσπορου EK 10 ως γαλακτωματοποιητή την ημέρα παρασκευής τους.

Στα σχήματα 19 και 20 μελετάται η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων των γαλακτωμάτων που έχουν ως γαλακτωματοποιητή EK 10 και δεν προκύπτουν αξιοσημείωτες διαφορές στα μεγέθη. Όμως, πρέπει να υπενθυμιστεί η ευαισθησία της μεθόδου σκέδασης φωτός, κατά την οποία απαιτείται εκτεταμένη αραίωση του δείγματος, με τελικό αποτέλεσμα τη ρήξη των κροκιδωμάτων και μη ανίχνευση αποσταθεροποίησης αν η αιτία είναι η κροκκίδωση. Ο αντιστρέψιμος χαρακτήρας της κροκκίδωσης από κένωση (depletion) με την αραίωση (Ριτζούλης 2011) συνηγορεί στην απόδοση των παρατηρηθέντων φαινομένων σε αυτόν τον μηχανισμό.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ❖ Η ανάλυση των αρχικών εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία υπερύθρου αποκάλυψε πως το ΕΚ 4, το ΕΚ 6 και το ΕΚ 10 αποτελούνται από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, ενώ το ΕΚ 8 μόνο από πολυσακχαρίτες. Ως εκ τούτου το ΕΚ 8 κρίνεται ακατάλληλο για τη χρήση του ως γαλακτωματοποιητή.
- ❖ Η χρήση των εκχυλισμάτων ΕΚ 4 και ΕΚ 6 συμβάλλει στη σταθεροποίησή , καθώς όπως φαίνεται από τον οπτικό διαχωρισμό, η αποκορύφωση καθυστέρησε χρονικά.
- ❖ Η παρασκευή γαλακτωμάτων πάνω και κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών παρουσίασε πολύ έντονες διαφορές, επαληθεύοντας τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας. Το ΕΚ 4 και το ΕΚ 6 είναι αυτά που επηρεάστηκαν περισσότερο από την αλλαγή του pH, επιβεβαιώνοντας τη σύστασή τους σε πρωτεΐνες.
- ❖ Η μέτρηση μεγέθους σωματιδίων έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας παρουσιάζοντας διαφορές στις καμπύλες κατανομής του μεγέθους.
- ❖ Η κροκίδωση των γαλακτωμάτων οφείλεται σε φαινόμενα κένωσης ( depletion flocculation) από μη-προσροφημένο υδρολολλοειδές κυδωνόσπορου ,γεγονός που επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση και μετρήσεις σκέδασης φωτός .Ως απευθείας επίπτωση της εν λόγω κροκίδωσης είναι η αύξηση της υδροδυναμικής ακτίνας των σωματιδίων (κροκιδώματα αντί για μεμονωμένα σταγονίδια ) και η ταχεία αποκορύφωση των γαλακτωμάτων που παρασκευαστήκαν με υψηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κυδωνόσπορου .

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Dickinson, E., (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.

Ercelebi, E. A., and Ibanoglu, E. (2007). Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 80, 454–459.

Hellín, P., Jordán, M.J., Vila, R., Gustafsson, M., Goransson, E., Akesson, B., Groon, I., Laencina, J. and Ros, J.M. (2003). Processing and Products of Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*) Fruits In: Japanese Quince-Potential Fruit Crop for Northern Europe, Rumpunen K. (Ed.), pp. 169-176, Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences.

HORIBA Instruments. (2012). A Guidebook to Particle Size Analysis. (Φυλλάδιο). HORIBA Instruments Inc, USA.

Kacurakova, M., Capeka, P., Sasinkova, V., Wellner, N. and Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195-203.

Khalloufi, S., Alexander, M., Goff, D.H. and Corredig, M. (2008). Physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions when mixed with flaxseed gum at neutral pH. *Food Research International*, 41, 964–972.

Kong J. and Yu S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39 (8), 549–559.

Leema, R.A., Regis, P.P., Rajendran, S., Rajammal, F. and Krishnaveni, S.R.A. (2010). Synergistic effect of Fructose and Zn<sup>2+</sup> in controlling corrosion of carbon steel. *Zastita Materijala*, 51, 317-426.

Malvern Instruments. (2005). Mastersizer 2000. (Φυλλάδιο). Malvern Instruments Limited, UK.

McClements, D.J. (1999). *Food Emulsions: Principles, Practise and Techniques*, CRC Press, New York.

Mierina, I., Serzane, R., Strele, M., Moskaluka, J., Seglina, D. and Jure, M. (2011). Extracts of Japanese Quince Seeds-Potential Source of Antioxidants. *Foodbalt*, 98-103.

Onsaard, E., Vittayanont, M., Srigam, S. and McClemets, D.J. (2006). Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate. *Food Research International*, 39, 78-86.

Patel, N.C., Rathod, B.G., Shah, V.N. and Mahajan, A.N. (2011). *Cydonia vylgaris Pers.:* A Review on Diversity, Cultivation, Chemistry and Utilization. *Der Pharmacia Lettre*, 3 (3), 51-61.

Rodriquez-Guisado, I., Hernandez, F., Melgarejo, P., Legua, P., Martinez, R. and Martinez, J.J. (2009). Chemical, Morphological and Organoleptical Characterisation of Five Spanish Quince Tree Clones (*Cydonia oblonga* Miller). *Scientia Horticulturae*, 122, 491-496.

Rop, O., Balik, J., Reznicek, V., Juricova, T., Skardova, P., Salas, P., Sochor, J., Mlcek, J. and Kramarova, D. (2011). Chemical Characteristics of Fruits of Some Selected Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Cultivars. *Czech Journal of Food Science*, 29 (1), 65-73.

Sekkal, M., Dincq, V., Legrand, P. and Huvenne, J.P. (1995). Investigation of the glycosidic linkages in several oligosaccharides using FT-IR and FT Raman spectroscopies. *Journal of Molecular Structure*, 349, 349-352.

Sharma, R., Joshi, V.K. and Rana, J.C. (2011). Nutritional Composition and Processed Products of Quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2 (3), 354-357.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Ferreres, F., Seabra, R.M., Beatriz-Oliveira, M.P.P. and Ferreira, M. (2005). Composition of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Seeds: Phenolics, Organic Acids and Free Amino Acids. *Natural Product Research*, 19 (3), 275-281.

Sun, R.C., Fang, J.M., Goodwin, A., Lawther, J.M. and Bolton, A.J. (1998). Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre. *Carbohydrate Polymers*, 37, 351–359.

Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P. and Baird, M.S. (2005). Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 60, 15–26.

Taylor, P. (1998). Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 75 (2), 107-163.

ThermoNicolet. (2001). Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. (Φυλλάδιο). ThermoNicolet Corporation, USA.

Van Aken, G.A. and Van Vliet, T. (2002). Flow-induced coalescence in protein stabilized highly concentrated emulsions: Role of shear-resisting connections between the droplets. *Langmuir*, 18 (20), 7364-7370.

Xu, F., Sun, R.C., Sun, X.F., Geng, Z., Xiao, B. and Sun, J.X. (2004). Analysis and characterization of acetylated sugarcane bagasse hemicelluloses. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 9, 229–244.

Yasunori, H. (2011). Anti-Ulcerative Potential of Some Fruits and the Extracts In: *Peptic Ulcer Disease*, Jianyuan, C. (Ed.), pp. 401-418, Shinshu University, Japan.

#### Ελληνική Βιβλιογραφία

Skoog, D. A., Holler, F.J. και Nieman, T.A. (2005). Εφαρμογές Φασματομετρίας Υπερύθρου In: *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 5η έκδοση, pp. 474 & 489, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα.

Παναγιώτου, Κ. (1998). Οπτικές Ιδιότητες των Κολλοειδών In: *Διεπιφανειακά Φαινόμενα & Κολλοειδή Συστήματα*, Β' Έκδοση, pp. 159-160, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Ριτζούλης, Χ. (2013). *Φυσικοχημεία Τροφίμων*, 2η έκδοση, pp. 127-167, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

#### Ηλεκτρονικές Πηγές

Wikipedia, The Free Encyclopedia. Διαθέσιμο σε <http://en.wikipedia.org/wiki/Cydoniaoblonga> (Ανακτήθηκε 17 Ιουνίου, 2013).