



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ
ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΜΠΕΡΟΥΚΑ ΔΑΝΑΗ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΛΙΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ
ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Όνοματεπώνυμο

ΜΠΕΡΟΥΚΑ ΔΑΝΑΗ

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

Ημερομηνία

ΣΕΠΤΕΜΒΡΗΣ 2013

Εισηγητής

ΡΙΤΖΟΥΛΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απομόνωση και η ταυτοποίηση του είδους πολυσακχαριτών που λαμβάνονται ,με την χρήση της εκχύλισης από ερυθρά σταφύλια τύπου Ναούσης μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.

Για να επιτευχθεί αυτό δοκιμάστηκαν εναλλακτικοί τρόποι (θερμοκρασίας , ρΗ) από ότι υπήρχε στην βιβλιογραφία για το παρών θέμα. Τα σταφύλια πατήθηκαν με το χέρι παρομοιάζοντας με αυτό τον τρόπο την σύνθλιψη κατά την οينوποίηση. Αφαιρέθηκαν όσο το δυνατόν περισσότερες ουσίες με διάφορες εκχυλίσεις, έτσι ώστε να απομονωθούν όσο το δυνατότερο περισσότερο καθαροί οι πολυσακχαρίτες. Ακολούθησε η απομόνωση τους.

Μετά το τέλος των παραπάνω επεξεργασιών ακολούθησαν μέθοδοι για την ανίχνευση των ουσιών που υπάρχουν στο δείγμα ,την ταυτοποίηση των πολυσακχαριτών και την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες(FT-IR, HPSEC, Lowry-folin ciocalteau, Phainol-sulphuric-acid)

ABSTRACT

In the present study was recognized and isolated polysaccharides wick containing in red grape Naoussas.

To achieve this alternative ways tested (temperature, pH) than existed in the literature about this subject. The grapes were pressed by hand likening thereby crushing during vinification. Removed as much as possible substances with various extractions so as to isolate pure polysaccharides. Their isolation was follow.

After the end of the above processes followed methods for the detection of substances present in the sample, the identification of the polysaccharides and the protein content (FT-IR, HPSEC, Lowry-folin ciocalteau, Phainol-sulphuric-acid)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή

Θεωρητικό μέρος

Σταφύλια και τα συστατικά τους

Περιεκτικότητα σταφυλιών σε πολυσακχαρίτες

Τεχνικές μέθοδοι

Ζεμάτισμα

Λυοφυλίωση

Άλεση/λειοτριβηση

Soxlet

FT-IR

HPSEC

Lowry-folin ciocalteau

Phainol-sulphuric-acid

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη βιομηχανία τροφίμων ιδανικό είναι «να πάει χαμένη μόνο η ανάσα του ζώου», πράγμα το οποίο είναι εξαιρετικά δύσκολο να επιτευχθεί. Κατά την επεξεργασία οποιασδήποτε πρώτης ύλης υπάρχουν απώλειες για λόγους όπως το ακριβό κόστος επεξεργασίας τους και η έλλειψη τεχνογνωσίας. Αυτό ακριβώς συμβαίνει και στην οινοποίηση όπου τα στέμφυλα ύστερα από την σύνθλιψη τους πετιόνται ή χρησιμοποιούνται σαν ζωοτροφές. Σε αυτά τα παραπροϊόντα υπάρχει περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή των μονοσακχαριτών συνήθως με βαθμό πολυμερισμού 200-3000, υψηλή διατροφική αξία και μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες (Γαλανοπούλου, 2007). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πηγή ενέργειας, γαλακτοματοποιητές, σταθεροποιητές...

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί κατά πόσο είναι εφικτό να απομονωθούν πολυσακχαρίτες από τα στέμφυλα μετά την οινοποίηση και τι μοριακού μεγέθους. Γενικότερα το σταφύλι είναι φτωχό σε πολυσακχαρίτες κρίνοντας το βέβαια ως προς τα άλλα φρούτα και υπάρχει απώλεια στο γλεύκος 0,1-2,5 g/l εκφρασμένα σε γαλακτουρονικό οξύ(Συμέου,2010). Πάραυτα κατά οινοποίηση απορρίπτονται χιλιάδες κιλά στέμφυλων τα οποία μένουν αναξιοποίητα. Μετέπειτα χρήση τους θα είναι για σταθεροποίηση γαλακτωμάτων έτσι πρέπει να εμφανίζουν υψηλό βαθμό πολυμερισμού. Ακόμα θα γίνει σύγκριση των πολυσακχαριτών που λαμβάνονται μεταξύ δειγμάτων που έχουν υποστεί λεύκανση και σε άλλα χωρίς αυτή την επεξεργασία. Το ζεμάτισμα στα σταφύλια γίνεται κατά τη θερμή οινοποίηση και ενδέχεται να επιτρέψει την απομόνωση πολυσακχαριτών μεγαλύτερου μοριακού βάρους διότι αδρανοποιεί τα ένζυμα και στην συγκεκριμένη περίπτωση τα πηκτινολυτικά.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σταφύλια και τα συστατικά τους

Η χρήση των σταφυλιών γίνεται από τα αρχαία χρόνια ως τροφή ή πρώτη ύλη για την παραγωγή κρασιού. Η σύσταση των σταφυλιών ποικίλει από είδος, γεωγραφική θέση και από κλιματολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες. Αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη (30,3%), ημικυτταρίνες (21,0%), λιγνίνη (17,4%), ταννίνες (15,9%) και πρωτεΐνες (6,1%). Μεταξύ των πολυσακχαριτών οι ημικυτταρίνες και η ξυλάνη ήταν οι πιο άφθονες περίπου 15% (Sonia et al., 2012).

Επίσης η σύνθεση τους αποτελείται από ανθοκυανίνες φαινολικά οξέα και άλλα διαλυτά συστατικά(Gonzalez et al., 2003).

Μετά την οινοποίηση τα στέμφυλα και γενικότερα τα απόβλητα της προαναφερθείσας διεργασίας χρησιμοποιούνται ως ζωτροφές κυρίως και λιγότερο ως λιπάσματα (Sonia et al., 2012).

2.2 Περιεκτικότητα πολυσακχαριτών στα σταφύλια

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα σταφύλια περιέχουν πολυσακχαρίτες, οι οποίοι επηρεάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού και είναι απαραίτητη η χρήση τους σε διάφορα στάδια οينوποίησης όπως η ζύμωση, διήθηση, σταθεροποίηση (Magdalena et al., 1998), που δεν αξιοποιούνται μετά το τέλος της οينوποίησης. Στη φλούδα βρίσκονται κυρίως πηκτίνες και αραβινογαλακτάνες. Οι πηκτίνες προέρχονται από την ραμνόζη και το γαλακτουρονικό οξύ ενωμένα με γλυκοζιτικό δεσμό. Ως αραβινογαλακτάνες ορίζονται οι σύνθετοι κολλοειδής υδατάνθρακες (Συμέου, 2010). Οι πολυσακχαρίτες είναι πολύ χρήσιμοι στην βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητές (κόμμι ξανθάνης) και γαλακτοματοποιητές και δεδομένου ότι περίπου μόνο στην Ελλάδα, σύμφωνα με την Hellastat παρήχθησαν 3.800 χιλιάδες λίτρα κρασιού το 2008 γίνεται κατανοητό πόση μεγάλη ποσότητα από αυτούς δεν αξιοποιήθηκε.

Σάκχαρα υπάρχουν είτε στην κυτταρική δομή του φρούτου αυτού είτε παράγονται κατά την διαδικασία της οينوποίησης. Αυτά που βρίσκονται στην φλούδα και τα κύτταρα του σταφυλιού είναι μεγαλύτερου μοριακού βάρους, σε αντίθεση με αυτά που παράγονται από μικροοργανισμούς κατά την ζύμωση ή από επιμόλυνση (Zenaida et al., 2012). Η φλούδα αποτελεί περίπου το 5-10% του συνολικού βάρους του σταφυλιού (Martine et al., 1994).

Η σύσταση των σταφυλιών σε συστατικά διαφέρει από τη γεωγραφική θέση και τις συνθήκες ωρίμανσης αλλά ανάμεσα και σε ίδιες ποικιλίες.

Η μελέτη των πολυσακχαριτών από σταφύλια συνήθως γίνεται με μεθόδους που καθορίζονται από το μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών (SEC, HPLC), ή από το φορτίο που αυτοί φέρουν (IEC).

2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 Ζεμάτισμα

Ζεμάτισμα ή λεύκανση είναι μια ήπια θερμική επεξεργασία στην οποία υποβάλλονται φρούτα και λαχανικά με σκοπό την αδρανοποίηση των ενζύμων τα οποία συνεχίζουν την δράση τους και κατά την ψύξη, την μείωση του αρχικού βάρους του προϊόντος με αποβολή του αέρα από το μεσοκυττάριο χώρο και το μαλάκωμα των ιστών για καλύτερη μετέπειτα θερμική επεξεργασία(Γεωργόπουλος). Επιτυγχάνεται είτε με καταβύθιση σε νερό θερμοκρασίας περίπου 100 βαθμών Κελσίου είτε με άτμιση για μερικά λεπτά.

Ακόμα η δράση του είναι κατάλληλη για τον καθαρισμό της εξωτερικής επιφάνειας φρούτων και λαχανικών από τυχόν ακαθαρσίες, διατηρεί την λάμψη στο χρώμα τους και επιβραδύνει την απώλεια των βιταμινών.

Η αδρανοποίηση των ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση του χρώματος, της υφής και της οσμής των πρώτων υλών.

Το ξεφλούδισμα των παραπάνω προϊόντων μπορεί να αποφευχθεί με την λεύκανση.

Το ζεμάτισμα έχει ως σκοπό και την μείωση του μικροβιολογικού φορτίου έτσι για κάθε τέτοιου είδους επεξεργασία για να βρεθεί η κατάλληλη θερμοκρασία μελετάται και ο αρχικός αριθμός μικροοργανισμών(Elisabete et al., 2011).

Τέλος ανεπαρκής ή υπερβολική επεξεργασία θα επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα. Ζεμάτισμα σε μικρότερη θερμοκρασία ή σε λιγότερο χρόνο ενεργοποιεί τα ένζυμα ενώ το αντίθετο μειώνει τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες.

3.3.2 Λυοφυλίωση

Η μέθοδος της λυοφυλίωσης βασίζεται στην ικανότητα του νερού να εξαχνώνεται σε θερμοκρασίες κάτω του μηδέν και με υψηλό κενό όταν έρχεται σε επαφή με θερμό μέσο. Σε αυτού του είδους την επεξεργασία τρόφιμα ιδιαίτερα θρμοευαίσθητα δεν χάνουν τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Αρχικά το τρόφιμο καταψύχεται , συνήθως κάτω των 10 βαθμών κελσίου και με πίεση μεγαλύτερη των 2 bar. Ακολουθεί αύξηση της θερμοκρασίας του χώρου(όσο μεγαλύτερη η διαφορά θερμοκρασίας χώρου –τροφίμου τόσο αυξάνεται ο ρυθμός εξάχνωσης) με διάφορα μέσα όπως επαφή με θερμαινόμενο μέσο, υπέρυθη ακτινοβολία και μικροκύματα. Το προϊόν δεν πρέπει να αποψυχθεί για καλύτερα αποτελέσματα(Ραφαηλίδης., 2008).

2.3.4 Άλεση/λειοτριβηση

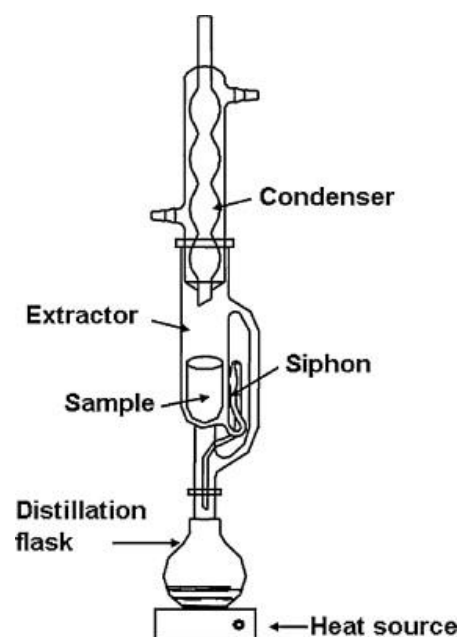
Άλεση ονομάζεται η επεξεργασία κατά την οποία ελαττώνεται το μέγεθος ενός τροφίμου, με την χρήση μηχανικής ενέργειας. Οι δυνάμεις που είναι δυνατόν να συμμετέχουν , ανάλογα την επεξεργασία, είναι η τριβή, η κρούση, και η συμπίεση. Χρησιμοποιείται για την εξαγωγή συστατικών , ελάττωση του μεγέθους , μείωση χρόνου ξήρανσης, αύξηση ρυθμού εκχύλισης καλύτερη ανάμιξη και μείωση της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων.

2.3.5 Soxhlet μέθοδος

Μέθοδος εκχύλισης κατά την οποία το δείγμα έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε υψηλή θερμοκρασία (βρασμού του διαλύτη). Ονομάζεται και εκχύλιση "στερεού-υγρού" διότι είναι κατάλληλη για αυτού του είδους τα δείγματα και έχει χαμηλή απόδοση. Κατάλληλη για διαχωρισμό ουσιών από υψηλού μοριακού βάρους αδιάλυτα κλάσματα και ουσιών που ενδέχεται να επηρεάσουν την μετέπειτα επεξεργασία. Η έκπλυση γίνεται με διαβροχή από τους κατάλληλα επιλεγμένους διαλύτες και για αύξηση του ρυθμού εκχύλισης χρησιμοποιούνται η ανάδευση, θερμότητα, μικροκύματα και το δείγμα να είναι υπερκρίσιμο υγρό.

Ως θετικά αναφέρονται η συχνή επαφή του δείγματος με καθαρό διαλύτη, η υψηλή θερμοκρασία της επεξεργασίας που επιφέρει μεγαλύτερο ρυθμό μεταφοράς της ουσίας στο διαλύτη, το χαμηλό κόστος της συσκευής, η μη εξειδίκευση του προσωπικού και η μη απαίτηση έκπλυσης στο τέλος της επεξεργασίας.

Τα αρνητικά της μεθόδου αυτής είναι η μεγάλη ποσότητα διαλύτη και δείγματος, η δύσκολη μετέπειτα επεξεργασία τους, η υψηλή θερμοκρασία που καταστρέφει θερμοευαίσθητες ουσίες και το ότι είναι χρονοβόρα (Castro et al, 2010).



2.3.6 FT-IR μέθοδος

Η FT-IR μέθοδος είναι η φασματοσκοπία που ασχολείται με την υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, που είναι το φως με μεγαλύτερο μήκος κύματος και χαμηλότερη συχνότητα από το ορατό φως. Βασίζεται στην φασματοσκοπία απορρόφησης και χρησιμοποιείται για πολλές τεχνικές όπως για την απορρόφηση χημικών ουσιών.

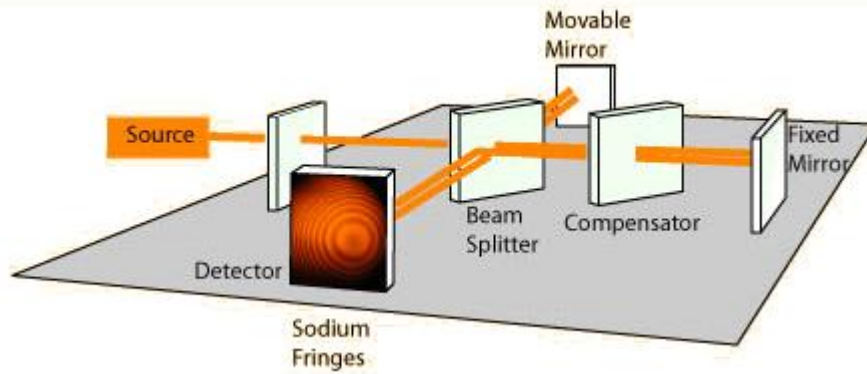
Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην επιλεκτική απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος χημικού δεσμού ή χαρακτηριστικής ομάδας. Αυτό συμβαίνει διότι η συχνότητα της ακτινοβολίας ταιριάζει με την ενέργεια μεταπτώσεως μιας δονούμενης ομάδας ή ενός δεσμού και καθορίζονται από το σχήμα των μοριακών ενεργειακές επιφάνειες, τις μάζες των ατόμων, καθώς και το σχετικό σύνδεσμο vibronic.

Με την χρήση υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier είναι δυνατή η καταγραφή υπέρυθρων φασμάτων.

Το φάσμα που παράγεται από την φασματοσκοπία καταγράφεται σε συμβολόμετρο Michelson και με τον μετασχηματιστή Fourier σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

❖ ΣΥΜΒΟΛΟΜΕΤΡΟ MICHELSON

Αποτελείται από ένα διαχωριστή δέσμης και δύο καθρέπτες εκ των οποίων ο ένας είναι σταθερός ενώ ο άλλος κινητός. Ακτίνα από μονοχρωματική πηγή (ευθυγραμμισμένη και προερχόμενη από τις υπέρυθρες ακτίνες) κατευθύνεται προς τον διαχωριστή δέσμης, ο οποίος έχει κλίση 45° , όπου και διαχωρίζεται σε άλλες δύο με ίδια συχνότητα και ένταση. Η μια εκ των δύο ταξιδεύει προς τον σταθερό κάτοπτρο όπου μέρος αυτής (περίπου 50%) αντεπιστρέφει στον διαχωριστή δέσμης και η υπόλοιπη οδηγείται στο κινητό κάτοπτρο. Η θέση των κατόπτρων σε αυτό το σημείο είναι πολύ σημαντική για την παρεμβολή των ακτινών. Η ακτίνα που αντεπιστρέφει στον διαχωριστή δέσμης από το κινητό κάτοπτρο περνά τρεις φορές από την ανακλαστική του επιφάνεια, σε αντίθεση με την πρώτη που περνά μία έτσι παρατηρείται μια διαφορά στην οπτική διαδρομή που αντισταθμίζεται με την προσθήκη ίδιου γαλιού με αυτού που κινούνται οι ακτίνες μεταξύ σταθερού κατόπτρου και διαχωριστή δέσμης. Τέλος οι ακτίνες διαπερνούν το δείγμα το οποίο απορροφά και συνεχίζουν στον ανιχνευτή. (Lau, 1999).



Ο όρος Μετασχηματισμός Φουριέ (ΜΦ) αναφέρεται σε μία αυστηρώς ορισμένη μαθηματική διεργασία η οποία αποσυνθέτει μία συνάρτηση σε άθροισμα απείρων περιοδικών ημιτονοειδών και συνημιτονοειδών συναρτήσεων. Το αποτέλεσμα του μετασχηματισμού είναι μία νέα συνάρτηση με διαφορετικό πεδίο_ορισμού, επίσης γνωστή ως Μετασχηματισμός Φουριέ ή ως φάσμα, η οποία περιγράφει το κατά πόσο συμμετέχει κάθε στοιχειώδες ημίτονο στον σχηματισμό της αρχικής συνάρτησης (έστω f'). Ο ΜΦ αποτελεί οριακή περίπτωση (για συνάρτηση f με άπειρη περίοδο, δηλαδή ουσιαστικά απεριοδική) της σειράς Φουριέ.

2.3.7 HPSEC μέθοδος

Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) είναι μια χρωματογραφική μέθοδος στην οποία τα μόρια σε διάλυμα διαχωρίζονται από το μέγεθός τους, και σε ορισμένες περιπτώσεις, το μοριακό βάρος. Το πραγματικό μέγεθος των μορίων της ουσίας που διαχωρίζεται επηρεάζει τον μέσο χρόνο παραμονής στους πόρους του υλικού πλήρωσης. Η στήλη περιέχει ως υλικό πλήρωσεως μικρά σωματίδια πυριτίας ή πολυμερούς που δημιουργούν ένα ομοιόμορφο δίκτυο πόρων. Χρησιμοποιούνται διαλύτες οι οποίοι δεν παρουσιάζουν καμία αλληλεπίδραση με το δείγμα και η χρήση τους είναι να μεταφέρουν τα μόρια πρώτα αυτά με διάμετρο μεγαλύτερη των πόρων, ύστερα τα μεσαία διαμέτρου και τέλος τα μικρότερης τα οποία διεισδύουν εντός των πόρων. Για τα μόρια μέσης διαμέτρου ακολουθεί και κλασμάτωση.

συνήθως εφαρμόζεται σε μεγάλα μόρια ή συμπλέγματα μακρομορίων όπως πρωτεΐνες και βιομηχανικά πολυμερή. SEC είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος χαρακτηρισμού πολυμερούς λόγω της ικανότητάς της να παρέχει καλή γραμμομοριακή μάζα κατανομής (M_w).

Υψηλής πίεσης χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (HPSEC) είναι μια ισχυρή τεχνική για τον προσδιορισμό μοριακού βάρους (MB)(Qunhui et al., 2000).

Χρησιμοποιεί μη εξειδικευμένα όργανα της HPLC για τον γρήγορο προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους .

Οι χρήσεις αυτής της μεθόδου είναι

Διαχωρισμός μορίων φυσικών προϊόντων και αλάτων

Διαχωρισμός ομολόγων κ ολιγομερών

Προσδιορισμός φρουκτόζης γλυκόζης και σακχαρόζης σε χυμούς

Ταχύς προσδιορισμός μοριακού βάρους μεγαλοπολυμερών και φυσικών προϊόντων.

2.3.8 Lowry-folin ciocalteau μέθοδος

Η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα είναι εύκολο να προσδιοριστεί με την μέθοδο Lowry-Folin Ciocalteau. Βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος του διαλύματος και από την ένταση του προσδιορίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με χρωματομετρικές τεχνικές. Η συνολική συγκέντρωση υπολογίζεται ουσιαστικά από τη μείωση του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteau(φωσφοβολφραμικού οξέως και φωσφορομολυβδαινικού οξέος) το οποίο ανάγεται και οξειδώνονται κάποια αμινοξέα(τρυπτοφάνη, τυροσίνη κ.α.) και ο χαλκός(Cu^{2+} σε Cu + υπό αλκαλικές συνθήκες)που αντιδρά με τους πεπτιδικούς δεσμούς. Η συγκέντρωση του μειωμένου αντιδραστηρίου Folin μετράται με απορρόφηση στα 750 nm.

Οποιοδήποτε διάλυμα περιέχει πρωτεΐνες θα δώσει μπλε χρώμα ,ανάλογο της συγκέντρωσης των παραπάνω και η μέθοδος ενδείκνυται για συγκεντρώσεις 0,01-1,0 mg / ml πρωτεΐνης.

2.3.9 Phainol-sulphuric-acid μέθοδος

Χρωματομετρική μέθοδος για τη ανάλυση υδατανθράκων. Θεωρείται μια από τις πιο εύκολες και αξιόπιστες μεθόδους. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση όλων των ειδών τα σάκχαρα και για ανάλυση πολλών δειγμάτων. Η μέθοδος βασίζεται στην απορρόφηση που δίνει ο σχηματισμός φαινόλης-σουλφονικού οξέως(masuko et al, 2005).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Η εργασία αυτή έγινε αφενός για να εξακριβωθεί αν είναι δυνατόν να απομονωθούν οι πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα στέμφυλα ύστερα από την οινοποίηση αφετέρου σε περίπτωση που λαμβάνονταν από το δείγμα πολυσακχαρίτες θα είχαν το απαραίτητο μεγάλο μοριακό βάρος ώστε μεταγενέστερα να χρησιμοποιηθούν ως γαλακτοματοποιητές.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ξεκινώντας το πειραματικό μέρος αρχικά 2 kg σταφυλιών χωρίστηκαν ισάριθμα, αποφλοιώθηκαν και πατήθηκαν. Στη συνέχεια το ένα από τα 2 kg ζεματίστηκε. Ακολούθησε με τη σειρά που αναφέρονται τοποθέτηση τους σε τριβλία πετρί, κατάψυξη, λειοφυλίωση και άλεση σε σφαιρόμυλους.

Στην συνέχεια με τη μέθοδο Soxhelt

χρησιμοποιώντας πετρελαϊκό αιθέρα απομακρυνθηκαν οι κηροί και τα λίπη. Το ποσοστό λίπους ή κυρών στο δείγμα είναι ίσο με 14,2%.

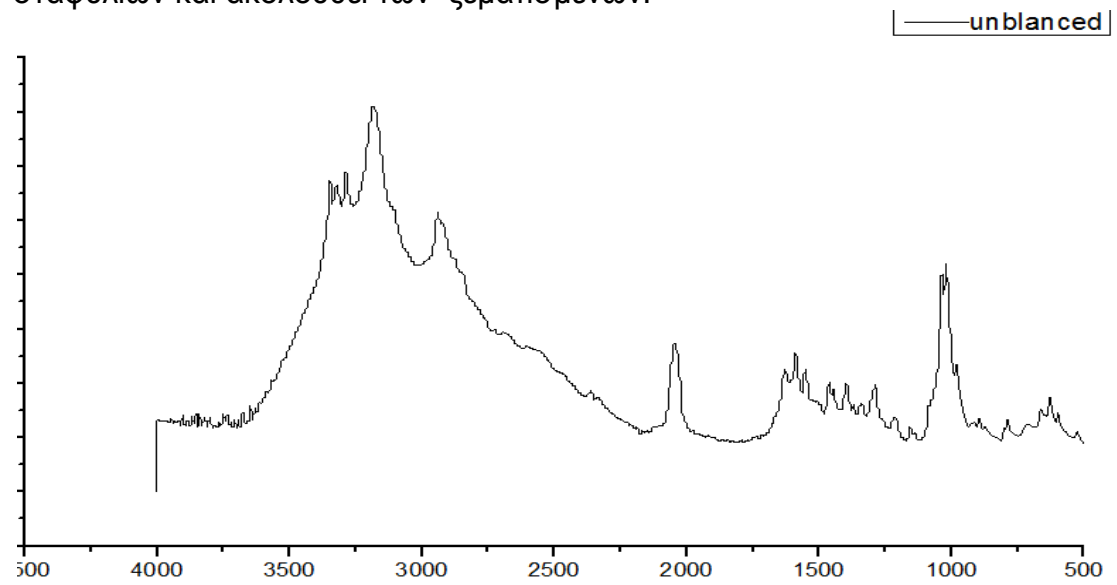
Ακολουθεί μια δεύτερη εκχύλιση με αιθυλική αλκοόλη 70% v/v για μια ώρα στους 40°C με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Στη συνέχεια το δείγμα διηθείται σε ηθμό Buchner με υδραντλία. Στο υπερκείμενο ακολουθεί δεύτερη αντίστοιχη εκχύλιση. Με το τέλος και αυτής της διεργασίας το δείγμα ξεπλένεται με ακετόνη και στεγνώνει σε θερμοκρασία δωματίου για μια νύχτα.

Ύστερα από διαδικασία της εκχύλισης των διαλυτών σε αλκοόλη συστατικών ακολουθεί προσθήκη στο δείγμα HBSS (hot buffer sult sulition pH: 5.2) και ταυτόχρονη ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 30 min στους 70 °C ώστε να καθιζάνουν οι πολυσακχαρίτες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 30 min σε 5000 στροφές. Το υπερκείμενο συλλέγεται και διατηρείται σε θερμοκρασία ψύξης για μία νύχτα. Ακολουθεί η ίδια επεξεργασία στο στερεό υπόλειμμα και το υπερκείμενο τοποθετείται για ξήρανση σε πλάκες με μεταφορά θερμινόμενου αέρα για 24h στους 40°C.

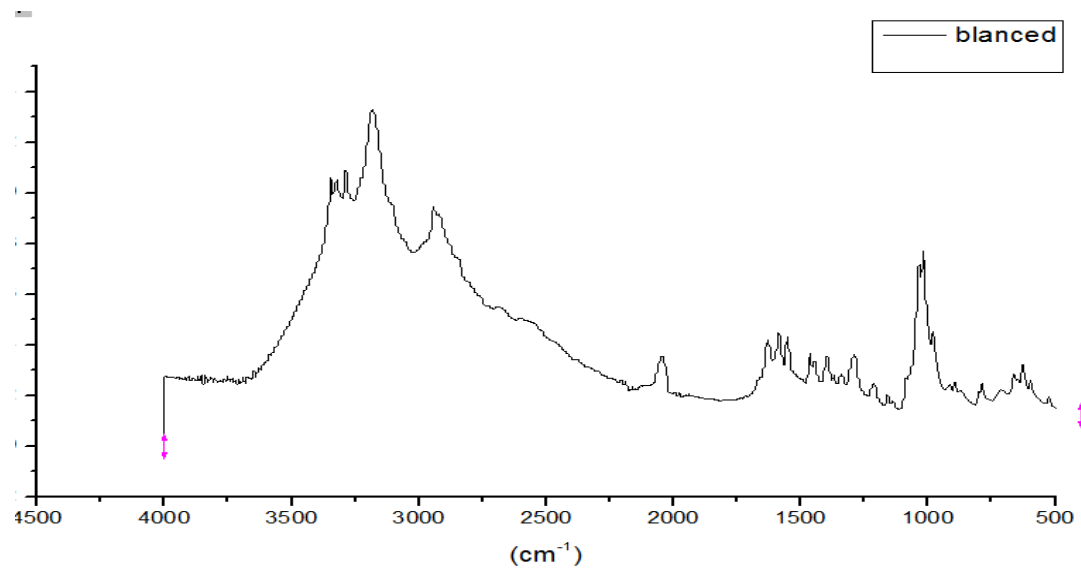
Όλα τα παραπάνω έγιναν και στα δύο δείγματα ζεματισμένα και μη. Τέλος ακολουθούν οι παρακάτω μετρήσεις με τις μεθόδους που αναφέρονται.

➤ **FT-IR**

Αρχικά δείχνεται το διάγραμμα απορροφήσεων των μη ζεματισμένων σταφυλιών και ακολουθεί των ζεματισμένων.



| ΚΥΜΑΤΑΡΥΘΜΟΙ (cm ⁻¹) | ΕΙΔΟΣ ΔΟΝΗΣΗΣ | ΟΜΑΔΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 3350 | ΙΣΧΥΡΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ -OH | ΑΛΚΟΟΛΕΣ |
| 3290 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |
| 2850 | ΣΥΜΜΕΤΡΙΚΗ CH ₃ | |
| 2040 | CH-CH ₂ | |
| 1630 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |
| 1590 | ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΠΗΚΤΙΝΗΣ | ΠΗΚΤΙΝΗ |
| 1550 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |
| 1450-1460 | ΨΑΛΙΔΩΤΗ ΚΙΝΗΣΗ | |
| 1370 | ΑΣΥΜΕΤΡΗ ΤΑΣΗ ΣΤΡΕΨΗΣ | ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ |
| 1090 | ΑΣΥΜΕΤΡΗ ΤΑΣΗ ΣΤΡΕΨΗΣ | ΑΛΚΟΟΛΕΣ |
| 1020-1030 | ΑΣΥΜΕΤΡΗ ΤΑΣΗ ΣΤΡΕΨΗΣ | ΠΗΚΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ |
| 980 | ΣΥΜΜΕΤΡΙΚΗ C-O-C | ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΟΙ ΑΙΘΕΡΕΣ |
| 627 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |



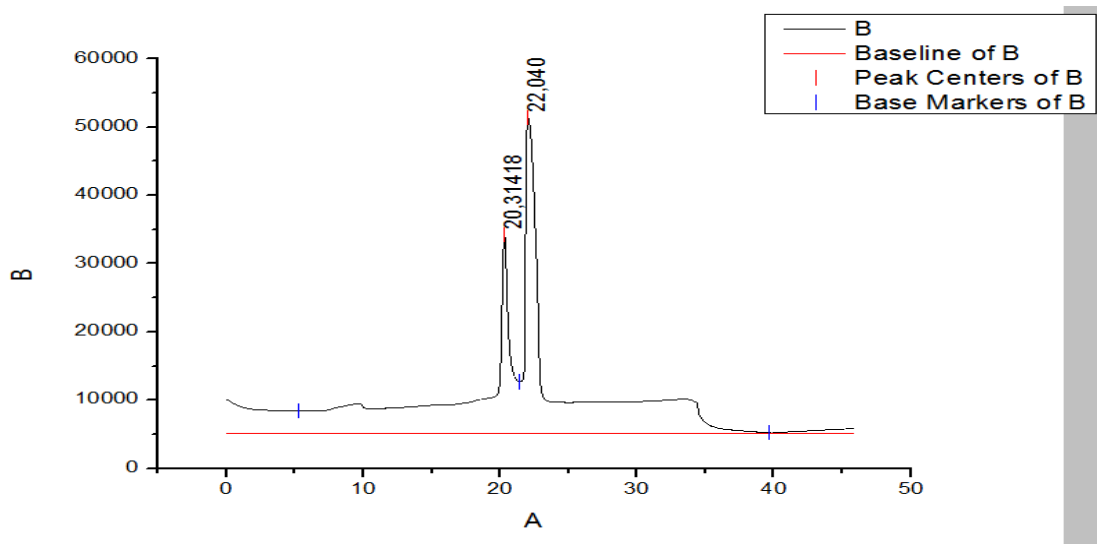
| ΚΥΜΑΤΑΡΥΘΜΟΙ (cm^{-1}) | ΕΙΔΟΣ ΔΟΝΗΣΗΣ | ΟΜΑΔΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 3350 | ΙΣΧΥΡΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ -OH | ΑΛΚΟΟΛΕΣ |
| 3290 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |
| 3100 | ΑΡΩΜΑΤΙΚΗ CH ΔΟΝΗΣΗ ΤΑΣΗΣ | ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ |
| 1630 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |
| 1590 | ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΠΗΚΤΙΝΗΣ | ΠΗΚΤΙΝΗ |
| 1550 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |
| 1450-1460 | | |
| 1400 | ΔΟΝΗΣΗ ΤΑΣΗΣ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ | ΑΝΘΡΑΚΕΝΙΑ |
| 1370 | CH ₃ ΣΥΜΕΤΡΙΚΗ ΔΟΝΗΣΗ ΣΤΡΕΒΛΩΣΗΣ | ΚΥΤΑΡΙΝΗ Η ΗΜΙΚΥΤΑΡΙΝΗ |
| 1090 | ΑΣΥΜΕΤΡΗ ΤΑΣΗ ΣΤΡΕΨΗΣ | ΑΛΚΟΟΛΕΣ |
| 1020-1030 | ΑΣΥΜΕΤΡΗ ΤΑΣΗ ΣΤΡΕΨΗΣ | ΠΗΚΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ |
| 627 | ΑΠΟΡΟΦΗΣΗ ΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΙΔΙΟΥ | ΑΜΙΔΙΑ |

Ταχτοποιώντας τις κορυφές από βιβλιογραφικές πηγές στα δύο δείγματα υπάρχουν κυρίως πρωτεΐνες, αμινοξέα, πηκτίνη, και πιθανότατα άλλοι πολυσακχαρίτες σε μικρή αναλογία. Κάθε ένωση έχει μια χαρακτηριστική απορρόφηση στο υπέρυθρο φάσμα του. Και στα δύο δείγματα εμφανίζεται απορρόφηση των οργανικών ενώσεων αμιδίων πληροφορώντας την ύπαρξη πολύπλοκων οργανικών ενώσεων όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα και βιταμίνες. Ακόμα η εμφάνιση αλειφατικών εστέρων δείχνει την ύπαρξη καρβονικών οξών που εστεροποιήθηκαν.

➤ **HPSEC**

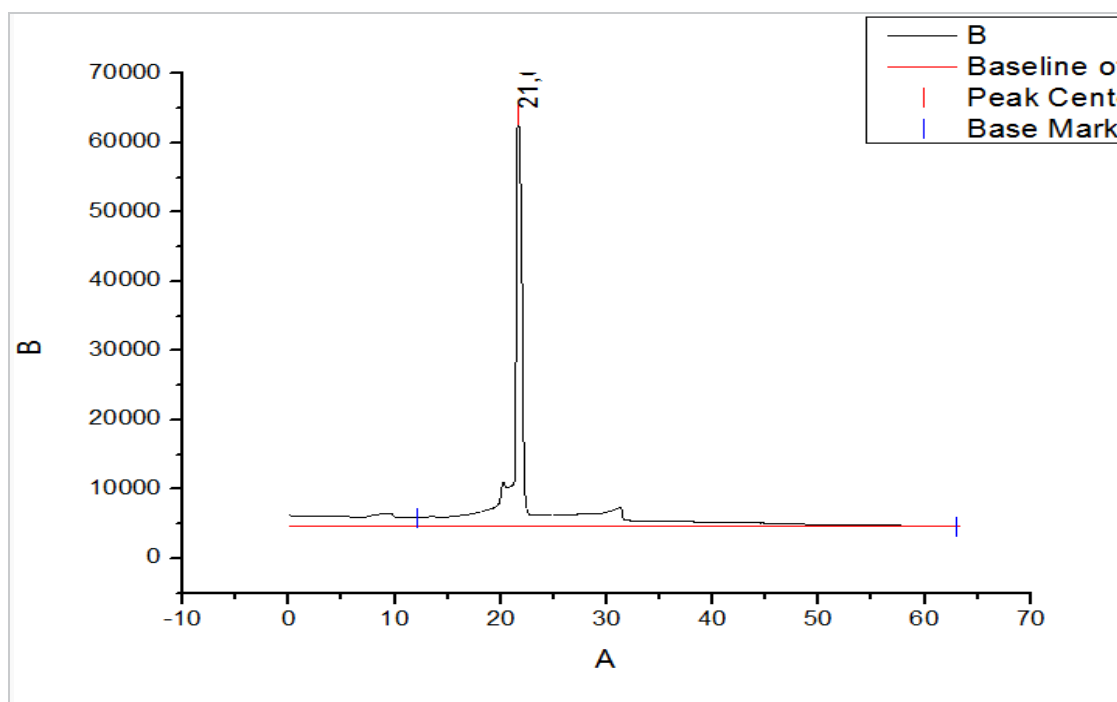
Ξεκινώντας τη μέθοδο το δείγμα διαλύθηκε σε υπερκάθαρο νερό ταυτόσημο με αυτό του διαλύτη έκλουσης της συσκευής. Στη συνέχεια εισάγεται με

ταχύτητα ροής 1ml/min. Η στήλη έχει pH 7 και ακετονιτρίλιο ως διαλύτης. Ακολουθούν τέσσερις μετρήσεις , δύο σε κάθε δείγμα(ζεματισμένο η μη) δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων, 0,1M και 0,2M. Τέλος τα χρωματογραφήματα συγκρίνονται με αυτά που υπάρχουν στη βιβλιογραφία , για τις δεξτράνες, ώστε να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη πολυσακχαριτών και το μοριακό τους βάρος. Οι δεξτράνες είναι κολλοειδή πολυμερή της γλυκόζης(πολυσακχαρίτης).



Σχήμα :sec που προέκυψε από ζεματισμένα σταφύλια.

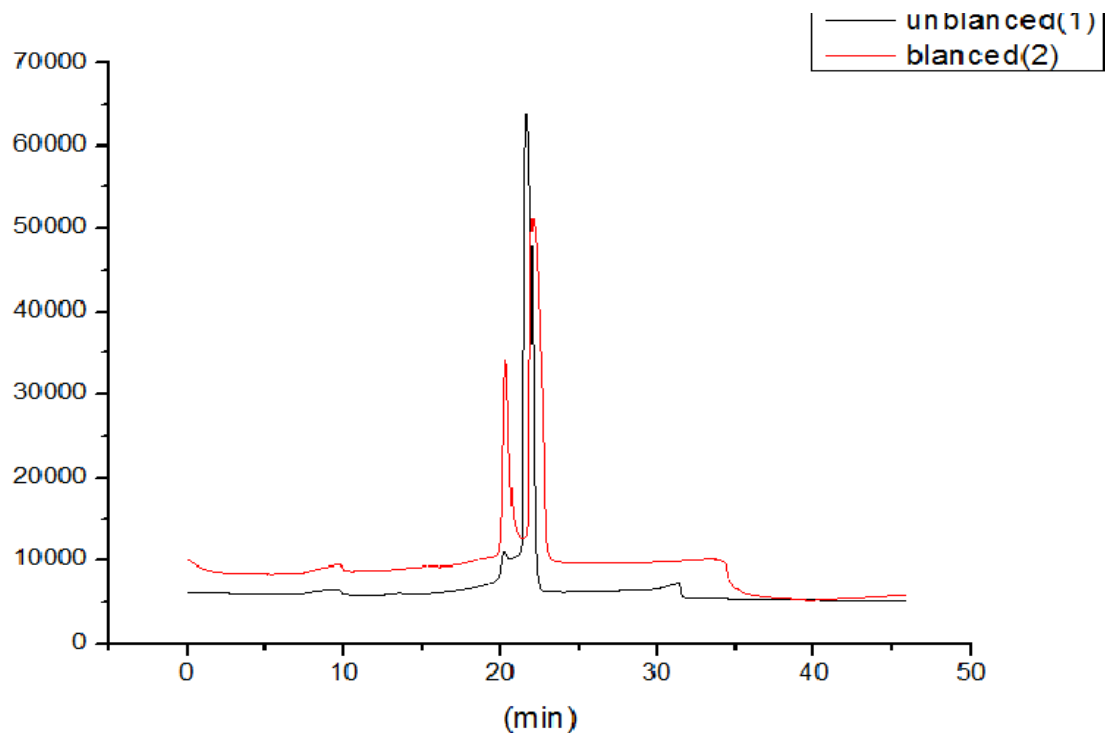
Υπάρχει εμφάνιση δύο κορυφών στα 20,049 και 21,743 min



Σχήμα : sec που προκύπτει από μη ζεματισμένα σταφύλια

Υπάρχει εμφάνιση μιας κορυφής στα 21,6 min.

5.5.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων και σύγκριση με πρότυπα.



Σχήμα: Σύγκριση των δυο sec για ζεματισμένα και μη σταφύλια

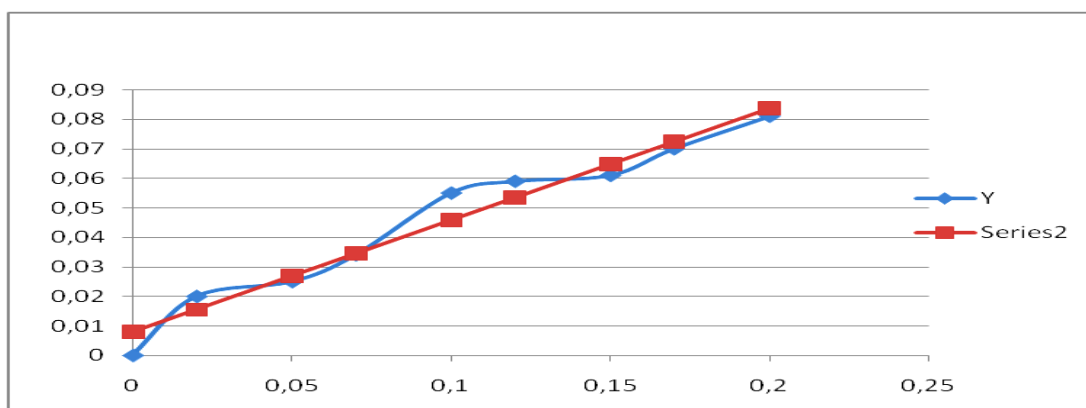
Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την μελέτη των χρωματογραφημάτων δείχνουν την ύπαρξη πολυσακχαριτών, διαφορετικών σε κάθε δείγμα. Στα ζεματισμένα προέκυψαν δύο κορυφές σε αντίθεση με τα μη δείχνοντας έτσι ότι η λεύκανση επέδρασε θετικά αδρανοποιώντας κάποια πηκτινολυτικά ένζυμα.

σο αφορά το μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών τα πρότυπα του χρόνου έκλουσης των δεξτρανών υποδεικνύουν μοριακό βάρος 50kDa και 12 kDa αντίστοιχα για την κάθε κορυφή στα ζεματισμένα και 12-50 kDa στα μη για την μια κορυφή της.

✓ **Lowry-Folin Ciocalteu**

Με την συγκεκριμένη μέθοδο θα υπολογιστεί το ποσοστό της πρωτεΐνης στο δείγμα σταφυλιών. Το ποσοστό της πρωτεΐνης στο δείγμα θα υπολογιστεί σύμφωνα με μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης αλβουμίνης (BSA). Αρχικά θα δημιουργηθεί αυτή, όπως φαίνεται και στο σχήμα , χρησιμοποιώντας 1mg/ml BSA διαλυμένη σε 0,1 N NaOH και μετρώντας την απορρόφηση της στα 600nm.

| BSA (ml) | Νερό (ml) | Αντιδραστήρια 1+2(ml) | Αντιδραστήριο Folin(ml) | Απορρόφηση (nm) |
|----------|-----------|-----------------------|-------------------------|-----------------|
| 0 | 200 | 2 | 200 | 0,0 |
| 25 | 175 | 2 | 200 | 0,02 |
| 50 | 150 | 2 | 200 | 0,025 |
| 75 | 125 | 2 | 200 | 0,034 |
| 100 | 100 | 2 | 200 | 0,055 |
| 125 | 75 | 2 | 200 | 0,059 |
| 150 | 50 | 2 | 200 | 0,061 |
| 175 | 25 | 2 | 200 | 0,07 |
| 200 | 0 | 2 | 200 | 0,081 |



σχ: πρότυπη καμπύλη BSA

Χρησιμοποιώντας την γραμμική μέθοδο προσαρμογής των ελαχίστων τετραγώνων προκύπτει η εξίσωση : $Y = 0,007873 + 0,379704 * X$

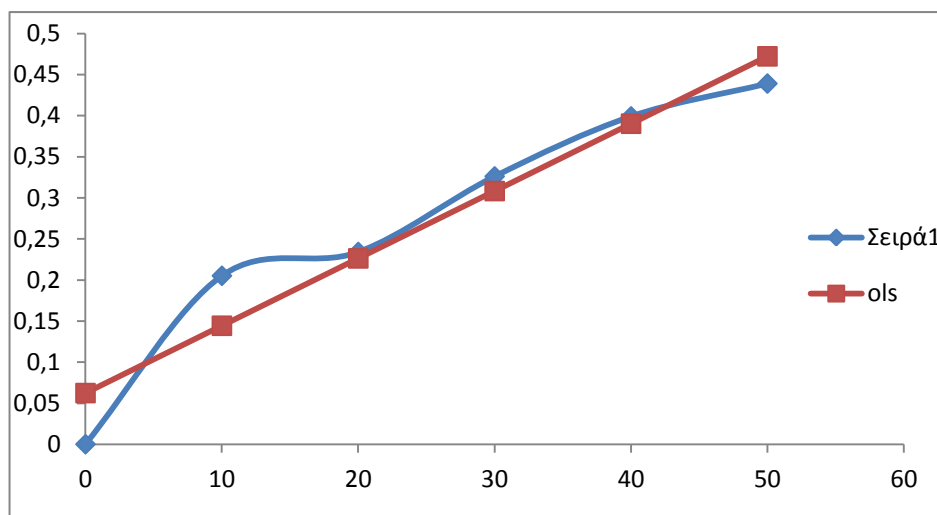
Στη συνέχεια στο δείγμα προστίθεται TCA(τριχλωρικό οξύ) ώστε να καθιζάνουν οι πρωτεΐνες που αυτό περιέχει. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4500rpm για μια ώρα και το ίζημα διαλυτοποιείται στους 70°C με 0,1 N NaOH. Λαμβάνεται η απορρόφηση ίση με 0,061 A για το ζεματισμένο δείγμα και 0,053 A για το μη. Αντικαθιστώντας στην εξίσωση τη μάζα(150 και 120 ml αντίστοιχα) και την απορρόφηση προκύπτει το ποσοστό πρωτεΐνης
Ζεματισμένα: 9%
Αζεμάτιστα : 8%

Τέλος η διαφοράς ως προς το αποτέλεσμα πιθανότατα οφείλονται πιθανότατα στην αδρανοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων είτε στην καταστροφή την τεταρτοταγής δομής των πρωτεϊνών από την παραγωγή οξέων ύστερα από δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων.

➤ *Phenol – Sulphuric Acid*

Αρχικά δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της D- γλυκόζης σχήμα ,προσθέτοντας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της τα παρακάτω αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στον πίνακα και μετρώντας την απορρόφηση στα 490nm.

| D-Glucose (mg) | Νερό (mg) | Φαινόλη (mg) | H ₂ so ₄ (mg) | Απορρόφηση (nm) |
|----------------|-----------|--------------|-------------------------------------|-----------------|
| 0 | 0,5 | 0,5 | 2,5 | 0 |
| 10 | 0,5 | 0,5 | 2,5 | 0,205 |
| 20 | 0,5 | 0,5 | 2,5 | 0,234 |
| 30 | 0,5 | 0,5 | 2,5 | 0,326 |
| 40 | 0,5 | 0,5 | 2,5 | 0,399 |
| 50 | 0,5 | 0,5 | 2,5 | 0,497 |



Χρησιμοποιώντας την γραμμική μέθοδο προσαρμογής των ελαχίστων τετραγώνων προκύπτει η εξίσωση:

$$Y=0,06238 +0,00819*X$$

Αντικαθιστώντας την απορρόφηση και την μάζα που έδωσαν τα ζεματισμένα και μη δείγματα , 0,396 A/50 mg και 0,344/50mg βρίκεται η συνολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα.

Ζεματισμένα: 56%

Αζεμάτιστα :48%

Το ζεμάτισμα φαίνεται ότι έδρασε ευεργετικά στη διατήρηση των σακχάρων στο σταφύλι αδρανοποιώντας τα πηκτινολυτικά ένζυμα, δράση που φαίνεται ξεκάθαρα από τη σημαντική μείωση αυτών στο δείγμα χωρίς λεύκανση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Συμαίου Ε.,(2010) Μελέτη των φαινολικών συστατικών σταφυλιών και οίνου, Χίου και Νεμέας και της επίδρασης ενζύμων και άλλων συστατικών σε αυτά. Διδακτορική διατριβή , Αθήνας.

Γαλανοπούλου Ν., (2007) Διατροφή και Χημεία τροφίμων. pp155-157 , εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.

Ραφαηλίδης Σ.,(2007) Εργαστηριακές σημειώσεις Επεξεργασίες ΙΙ, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙ, Θεσσαλονίκης

Sónia O. Prozil'Dmitry V. Evtugin and Luísa P. Cruz Lopes .,(2012) Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 35, 178-184

G González-Neves L Barreiro G Gil J Franco M Ferrer and M Moutounet,(2003) Anthocyanic composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay. *Analytica Chimica Acta*, 513, 197-202

Zenaida Guadalupe Olga Martínez-Pinilla Álvaro Garrido José David Carrilloand Belén Ayestarán.,(2012) Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chemistry*, 131,367-374

Magdalena López-Barajas Elvira López-Tamames Susana Buxaderas.,(1998) Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides. *Journal of Chromatography A*, 823, 339-347

Martine Lecas Jean-Marc Brillouet.,(1994) Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*,31 , 1241-1243

Γεωργόπουλος., Εργαστηριακές σημειώσεις, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ, Λάρισας
Elisabete M.C. Alexandre, Dora M. Santos-Pedro, Teresa R.S. Brandão, Cristina L.M. Silva.,(2011) Influence of aqueous ozone, blanching and combined treatments on microbial load of red bell peppers, strawberries and watercress. *Journal of Food Engineering*, 105, 277-282

M.D. Luque de Castro,F. Priego-Capote .,(2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383-2389

Qunhui Zhou· Stephen E. Cabaniss Patricia A. Maurice., (2000) Considerations in the use of high-pressure size exclusion chromatography

(HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances.
Water Research, 34, 3505-3514

Tatsuya Masuko Akio Minami, Norimasa Iwasaki, Tokifumi Majima, Shin-Ichiro Nishimura, Yuan C. Lee., (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. Analytical Biochemistry, 339, 67-72