



ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



Βελτιστοποίηση εκχύλισης πρωτεϊνών από κατεψυγμένες μπάμιες με τη μέθοδο του pH και μελέτη κάποιων φυσικοχημικών ιδιοτήτων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μακρής Βασίλης

Μπανιτσιώτου Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Βαρελτζής Πάτροκλος

Βελτιστοποίηση εκχύλισης πρωτεϊνών από κατεψυγμένες μπάμιες με τη μέθοδο του pH και μελέτη κάποιων φυσικοχημικών ιδιοτήτων

Μακρής Βασίλης
Μπανιτσιώτου Μαρία

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ), Τμήμα
Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη, ΤΘ 141.

Εισηγητής: Βαρελτζής Πάτροκλος

Περίληψη

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η βελτιστοποίηση εκχύλισης πρωτεϊνών από κατεψυγμένες μπάμιες με τη μέθοδο του pH και κάποιες φυσικοχημικές ιδιότητες καθώς και οι γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες τους.

Σύμφωνα με τα πειράματα που διενεργήθηκαν για την μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης της ομογενοποιημένης μπάμιας σε αλκαλικά pH στις τιμές 9.0, 9.5, 10.5, 11.5 βρέθηκε ότι ακολουθεί σημαντική αύξηση του ποσοστού της διαλυτοποιημένης πρωτεΐνης για τιμή pH 10.5, το οποίο είναι και το μέγιστο της καμπύλης διαλυτοποίησης. Ενώ στην όξινη διαλυτοποίηση το pH ρυθμίστηκε στις τιμές 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 και 3.5 δεν παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό διαλυτοποίησης σε σχέση με τα πιο αυξημένα pH (2.0, 2.5, 3.5), αντίθετα στο pH 3.0 παρατηρείται το χαμηλότερο ποσοστό διαλυτοποίησης. Επιπλέον μετά από την εφαρμογή αλκαλικής διαλυτοποίησης στις τιμές pH 8.0, 7.0, 6.0, 5.30, 4.5, 4.0, 3.0 και 2.5 διαπιστώθηκε ότι παρατηρείται μια αύξηση του ποσοστού καθίζησης των πρωτεϊνών που κορυφώνεται στο pH 4.0. Μια ακόμα παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο αναμονής (1,2 και 3 ώρες) του διαλύματος μπάμιας σε pH 10.5 όπου το βέλτιστο ποσοστό διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών παρατηρείται την 1^η ώρα αναμονής του διαλύματος μπάμιας στο αλκαλικό pH.

Τέλος μελετήθηκε η γαλακτοματοποιητική ικανότητα των πρωτεϊνών σε γαλακτώματα με διαφορετικές περιεκτικότητες σε πρωτεΐνες (0%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% και 1.3%), για τον έλεγχο της σταθεροποιητικής ικανότητάς τους σε γαλάκτωμα δεκαεξανίου. Παρατηρήθηκε μετά από εποπτεία της αποκορύφωσης των δειγμάτων την 1^η, την 3^η και 5^η ημέρα ότι τα γαλακτώματα με ποσοστό περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες από 0.1-0.75%, έχουν μειωμένο δείκτη γαλακτωματοποίησης σε σύγκριση με τον μάρτυρα (0%), κάτι που δηλώνει ότι οι πρωτεΐνες για τις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις, έδρασαν ως σταθεροποιητές

Πίνακας περιεχομένων

1.Εισαγωγή.....	1
2.Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	2
2.1.Μπάμια.....	2
2.1.1.Φυσιολογία βλαστού.....	2
2.1.2. Καλλιεργητικές Συνθήκες.....	2
2.1.3.Ποικιλίες Μπάμιας.....	2
2.1.4. Χρήσεις Της Μπάμιας.....	3
2.1.5. Χημική Σύσταση Της Μπάμιας.....	3
2.1.5.1. Αμινοξέα Μπάμιας.....	6
2.1.5.2.Λιπαρά οξέα μπάμιας.....	7
2.1.5.3.Υδατάνθρακες που εμπεριέχονται στην μπάμια	9
2.2.Υδατικό εκχύλισμα πολυσακχαριτών μπάμιας	10
2.2.1.Εκχύλιση AIS	10
2.2.2.Εκχύλιση HBSS	11
2.2.3.Εκχύλιση CHSS	11
2.2.4.Εκχύλιση DASS	12
2.3.Γαλακτώματα	13
2.3.1.Επίδραση του pH γαλακτώματος στην πρωτεΐνη	14
2.3.2.Γαλακτωματοποιητές	15
2.4.Διαλυτότητα πρωτεϊνών	16
2.4.1.Απομόνωση των πρωτεϊνών	18
2.4.1.1.Ηλεκτροφόρηση πηκτής - SDS PAGE	18
2.4.1.2. Η Υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier – FTIR	20
2.5.Μεθοδοι που έχουν εφαρμοστεί στη μπάμια.....	20
2.5.1.Μέθοδοι απομόνωσης πρωτεϊνών που έχουν εφαρμοστεί στην μπάμια.....	20
2.5.2.Όξινη υδρόλυση που έχει εφαρμοστεί στο εκχύλισμα μπάμιας.....	21
3.Σκοπός της πτυχιακής εργασίας.....	23
4. Υλικά & μέθοδοι	24

4.1.Πρώτη ύλη.....	24
4.1.1.Αντιδραστήρια	24
4.1.2.Όργανα και σκεύη	24
4.2.Προετοιμασία δειγμάτων.....	25
4.2.1.Βέλτιστο pH διαλυτοποίησης - καθίζησης πρωτεϊνών και αλκαλική - όξινη διαλυτοποίηση τους.....	25
4.2.2.Απολίπανση μπάμιας	26
4.2.3.Λυοφιλίωση	26
4.3.Μέθοδοι ανάλυσης.....	27
4.3.1. Προσδιορισμός υγρασίας.....	27
4.3.2. Προσδιορισμός του λίπους με την μέθοδο Lee-Folch	27
4.3.3.Προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry.....	28
4.3.4.Απομόνωση πρωτεϊνών μετά την απολίπανση.....	29
4.4.Γαλακτωματοποίηση.....	29
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
5.1Βέλτιστο αλκαλικό και όξινο pH διαλυτοποίησης.....	30
5.2. Βέλτιστο pH καθίζησης.....	32
5.3. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου διαλυτοποίησης πρωτεϊνών	33
5.4. Δείγματα πριν τη λυοφιλίωση	34
5.4.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνών, υγρασίας και λίπους σε δείγματα μπάμιας και μπάμιας μετά από απολίπανση(defatted).....	34
5.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών, υγρασίας και λίπους στο ίζημα από αλκαλική διαλυτοποίηση.....	35
5.5. Δείγματα μετά την λυοφιλίωση.....	36
5.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών, υγρασίας και λίπους στο ίζημα μετά τη λυοφιλίωση.....	36
5.5.2. Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier.....	37
5.5.3. SDS PAGE.....	38
5.6.Φυσικοχημική ανάλυση.....	39

5.6.1. Γαλακτοματοποιητική ικανότητα των πρωτεϊνών.....	39
5.6.2. Σταθεροποιητική ικανότητα των πρωτεϊνών.....	39
5.6.3. Μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal laser scanning microscopy).....	47
6.Συμπεράσματα	48
7.Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	49
8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

1.Εισαγωγή

Αρχικά στην εργασία αυτή παρουσιάζεται το γνωστό στην ανατολική μεσόγειο και όχι μόνο, λαχανικό μπάμια το οποίο είναι γνωστό ακόμα και με το όνομα όκρα (okra). Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση στα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά, καθώς και στις ευεργετικές και τεχνολογικές ιδιότητες της μπάμιας όπως αυτά προέκυψαν από τους μελετητές Udayasekhara, 1985; W&awi, 1983; Savello et al.,1980; Karakoltsidis & Constantinides, 1975; Longe et al.,1982; Tomada et al.,1980; Ames και Macleod 1990; Sengkhampan et al.,2009; Lengsfeld et al.,2004; Ndjouenkeu et al.,1996).

Στην συνέχεια επεξηγούνται ορισμένες μέθοδοι εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των πολυσακχαριτών της μπάμιας όπως περιγράφονται από τους Sengkhampan et al.,(2009) καθώς οι ιδιότητες και οι χημική σύσταση αυτών. Μετέπειτα για την καλύτερη κατανόηση του πειραματικού μέρους από τους αναγνώστες πραγματοποιήθηκε ανάλυση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων της μπάμιας καθώς και διάφορων άλλων φυσικών, χημικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των γαλακτωμάτων.

Ακολουθεί αναλυτική επεξήγηση, όλων των πειραματικών διεργασιών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία, για την ανάλυση και των χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών που έχουν τα εκχυλίσματα μπάμιας, τα οποία έχουν εκχυλιστεί με διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης και της βλέννης σε αλκαλικό pH και κατακρήμνιση αυτών σε όξινο pH (Jideani & Bello, 2009). Αυτό το φαινόμενο βασίζεται την χημική αρχή, ότι τα κολλοειδή συστήματα υφίστανται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αυτό έχει σαν συνέπεια να καθιζάνουν (Brückner & Weigalt, 1984).

Παράλληλα πραγματοποιείται ανάλυση της μεθόδου εκχύλισης των δειγμάτων και περιγραφή όλων των χημικών και φυσικών διεργασιών που ακολουθήθηκαν με ταυτόχρονη παράθεση των χημικών ουσιών και των μηχανημάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη αυτού.

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή εργασία, γίνεται παράθεση όλων των αποτελεσμάτων από τα πειράματα που διενεργήθηκαν με πίνακες και σχήματα. Πραγματοποιείται σχολιασμός αυτών σε κάθε πειραματική διεργασία με παράλληλη προσπάθεια επεξήγησης των φαινομένων που παρατηρήθηκαν, βάση της βιβλιογραφίας πάνω σε όμοια προϊόντα και μεθόδους.

2.Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1.Μπάμια

Η μπάμια όπως είναι γνωστό στα νοτιοανατολικά της μεσογείου (Ελλάδα, Τουρκία) και γνωστό με το επιστημονικό όνομα (*Abelmoschus esculentus moench*) ανήκει στην βοτανική οικογένεια (*Malvaceae*) σύμφωνα με τους Sengkhamparn et al.,(2010); Longe et al.,(1982); Adelacun et al.,(2009) και κατά τους Ames & Macleod,(1990); Ndjouenkeu et al.,(1996); Jideani & Bello,(2009) γνωστό με το όνομα (*Hibiscus esculentus,Linn*). Το φυτό αυτό καλλιεργείται σε πάρα πολλά κράτη σε όλο τον κόσμο που ανήκουν στην τροπική και υποτροπική ζώνη όπως νότια Αμερική, Ινδία, Ελλάδα, Τουρκία, Αίγυπτος, Μέση και Άπω Ανατολή, καθώς και δυτική και κεντρική Αφρική (Νιγηρία) από όπου είναι και η καταγωγή του φυτού αυτού, αφού καλλιεργείται σε αυτά τα εδάφη πάνω από 2000 χρόνια σύμφωνα με τους (Ames & Macleod,1990).

2.1.1. Φυσιολογία βλαστού

Το φυτό της μπάμιας καρποφορεί μέσα σε διάστημα 40-90 ημερών από την σπορά, το ύψος του φυτού φτάνει σε ύψος περίπου τα 4 μέτρα με ελικοειδή τοποθέτηση φύλλων που φτάνουν σε διάμετρο τα 50 εκατοστά. Ο καρπός είναι χρώματος πράσινου και το σχήμα τους κυλινδρικό ή πυραμιδοειδές, το μέγεθος ποικίλοι από 5-35cm σε μήκος και από 1-5cm σε διάμετρο.

2.1.2. Καλλιεργητικές Συνθήκες

Το έδαφος στο οποίο καρποφορεί ποικίλοι, μπορεί να είναι από αμμώδη μέχρι πηλώδη αργιλώδη, το εύρος τις θερμοκρασίας μεγάλο, από μέσο μέγιστο στους 35°C έως μέσο ελάχιστο στους 18°C. Η καλλιέργεια του φυτού γίνεται δυο φορές τον χρόνο από Απρίλιο μέχρι Ιούνιο και από Οκτώβριος μέχρι Ιανουάριο.

2.1.3.Ποικιλίες Μπάμιας

Οι ποικιλίες τις μπάμια που καλλιεργούνται στον κόσμο είναι πάρα πολλές και κάθε μία έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και ιδιότητες, κάποιες από αυτές αναλύονται στον πίνακα 1.

2.1.4. Χρήσεις Της Μπάμιας

Η πράσινοι καρποί σε πολλές χώρες καταναλώνονται ως λαχανικό είτε μόνα τους είτε συνοδεύουν άλλα τρόφιμα όπως κρέας. Η πιο γνωστή και ευρεία χρήση τους όμως είναι ως πυκνωτικός παράγοντας σε σούπες, σάλτσες και κρέμες. Στην παραδοσιακή ιατρική έχει χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών και οδοντικών παθήσεων εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε πολυσακχαρίτες Sengkhampan et al.,(2009), καθώς και ως διουρητικό Sengkhampan et al.,(2010); Mishra et al.,(2008), οι πολυσακχαρίτες αυτοί σύμφωνα με τους Lengsfeld et al.,(2004) έχουν υπογλυκαιμικές ιδιότητες και μείωσαν επίσης τα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα των ποντικών. Σε βιομηχανική κλίμακα έχει χρησιμοποιηθεί ως αντικροκιδωτικός παράγοντας σε βιομηχανία χαρτιού και ως διαυγαστικό μέσο σε χυμό ζαχαροκάλαμου Ndjouenkeu et al.,(1996). Σε εφαρμογές πάνω σε τρόφιμα οι πολυσακχαρίτες της μπάμιας είχαν επιτυχή εφαρμογή ως υποκατάστατο του ασπραδιού του αβγού καθώς και της μαργαρίνης σε μπισκότα Cerponicz et al.,(2002) και ως υποκατάστατο του λίπους του γάλακτος σε κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια όπως τα παγωτά Constantino & Cerponicz, (2004); Cerponicz et al.,(2006). Τέλος χάρη στο πανομοιότυπο άρωμα της μπάμιας με την μελιτζάνα χρησιμοποιείτε σε πολλές συνταγές ως υποκατάστατο αυτού σε χώρες όπως η Τουρκία, ακόμα στην ίδια χώρα έχει γίνει χρήση των ψημένων σπόρων της μπάμιας ως υποκατάστατο του καφέ (Calisir et al.,2005)

2.1.5. Χημική Σύσταση Της Μπάμιας

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί το φυτό της μπάμιας καλλιεργείται σε πολλά μέρη και υπάρχουν πάρα πολλές ποικιλίες, με την κάθε μια να έχει και διαφορετικές ιδιότητες, όπως είναι φυσικό και η χημική τους σύσταση να έχει διακυμάνσεις από ποικιλία σε ποικιλία καθώς ακόμα και στα διαφορετικά τμήματα του ίδιου του καρπού (σάρκα και σπόροι).

Γενικότερα η μπάμια είναι γνωστή ως λαχανικό που έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σε σχέση με άλλα λαχανικά, όπως και μεγάλη περιεκτικότητα σε λιπαρά και σε ανόργανα. Σύμφωνα με τους Adetuyi et al.,(2011) οι περιεκτικότητες σε υγρασία στο καρπό έξι τοπικών ποικιλιών της Νιγηρίας που μελετήθηκαν (Benin, Auchi, Ikaro, Akure, Okene & Lokoja) κυμαίνεται από 87,59% έως 90,13%, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη κυμαίνεται από 13,61% έως 16,27%, η περιεκτικότητα σε ίνες και λιπαρά κυμαίνεται σε 10,15% έως 11,63% και από 9,03% έως 10,57% αντίστοιχα, τέλος τα ανόργανα συστατικά κυμαίνονται από 7,19% έως 9,63% όπως φαίνεται και στο πίνακα 1 οι τιμές είναι επί ξηρού βάρους.

Πίνακας 1 : Σύσταση ποικιλιών μπάμιας σε (%)) (επί ξηρού βάρους)

Ποικιλία	Υγρασία	Πρωτεΐνη	Φυτικές ίνες	Λιπαρά	Τέφρα
Benin	88.73	14.87	10.63	9.67	8.26
Auchi	87.59	13.61	10.15	9.82	7.19
Ikaro	90.13	16.27	11.18	9.03	9.63
Akure	89.02	15.17	10.93	9.97	8.56
Okene	89.63	15.77	11.63	10.57	9.16
Lokoja	88.35	14.41	10.28	9.22	7.89

Μεγαλύτερη θρεπτική αξία όμως στην μπάμια έχουν τα σπόρια, όπου και συγκεντρώνονται οι περισσότερες έρευνες. Σύμφωνα με τον Udayasekhara (1985), ο οποίος μελέτησε μια ποικιλία της Ινδίας που ονομάζεται Pusa savani βρήκε πως η σύσταση των σπόρων αυτού είναι όπως φαίνεται στο πίνακα 2.

Πίνακας 2: Χημική σύσταση σπόρων τριών ποικιλιών μπάμιας (% ξηρού βάρους)

Συστατικά	Pusa savani	Emerdal	Ibtaira
Υγρασία (g%)	6.6	6.96	17.66
Πρωτεΐνη (g%)	21.1	21.82	27.20
Λιπαρά (g%)	17.9	14.70	27.14
Ακατέργαστες ίνες (g%)	23.4	27.30	268.8
Τέφρα (g%)	4.7	4.33	7.0
Υδατάνθρακες (g%)	26.3	24.89	3.80
Φώσφορος (mg/100g)	631	643.8	1591.40
Μαγνήσιο (mg/100g)	504	375.5	6.96
Ασβέστιο (mg/100g)	245	9.80	14.70
Σίδηρος (mg/100g)	8.6	8.60	4.33
Ψευδάργυρος (mg/100g)	6.2	<1	643.8
Χαλκός (mg/100g)	0.6	4.85	9.80
Μαγγάνιο (mg/100g)	1.2	647.20	<1

*Υπολογισμένο από τη διαφορά (100 – υγρασία – πρωτεΐνη – ακατέργαστες ίνες – λιπαρά – τέφρα)

(Udayasekhara., 1985) (Wandawi.,1983)

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 2 την μεγαλύτερη σύσταση έχουν οι υδατάνθρακες (26,3%) και ακολουθούν οι ακατέργαστες ίνες (23,4%) και οι πρωτεΐνες (21,1%), με το ποσοστό των λιπαρών να είναι εξίσου πολύ υψηλό (17,9%). Στις ποικιλίες (Emerald και Ibtaira) που μελέτησε ο Wandawi (1983) βρήκε την σύσταση των πρωτεϊνών της

ποικιλίας Emerald περίπου στο ίδιο με την ποικιλία Pusa savani της προηγούμενης μελέτης, δεν βρήκε όμως παρόμοια αποτελέσματα στην ποικιλία Ibtaira όπου το ποσοστό των πρωτεϊνών είναι μειωμένο (17,66%), απεναντίας το ποσοστό των λιπαρών (16,65%) στην ποικιλία Ibtaira είναι περίπου το ίδιο με την προηγούμενη μελέτη και αισθητά μειωμένη στην ποικιλία Emerald όπου βρέθηκε να είναι μόλις (14,7%).

2.1.5.1. Αμινοξέα Μπάμιας

Τα αμινοξέα είναι η βασική δομική μονάδα σύνθεσης των πρωτεϊνών, για αυτό και θεωρούνται βασικά στην διατροφή του ανθρώπου και όχι μόνο. Από τα 21 γνωστά αμινοξέα, ο ανθρώπινος οργανισμός χρειάζεται να λαμβάνει απαραίτητα από την τροφή του τα εννιά που ονομάζονται βασικά ή απαραίτητα αμινοξέα, τα υπόλοιπα μπορεί να τα συνθέσει από μόνος του. Τα εννιά αυτά αμινοξέα σύμφωνα με τους Beliz et al,(2006) είναι τα: βαλίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, φαινυλαλανίνη, θρυπτοφάνη, μεθειονίνη, θρεονίνη, ιστιδίνη (για τα νήπια), λυσίνη και αργινίνη που είναι ημί- απαραίτητη.

Η μπάμια είναι μια πηγή αμινοξέων που συμπεριλαμβάνει τα βασικά αυτά αμινοξέα, σε ποσοστό μάλιστα συγκρίσιμο ακόμα και με του αυγού. Σύμφωνα με τις έρευνες των Udayasekhara (1985) ; W&awi (1983) ; Savello et al.,(1980) ; Karakoltsidis και Constantinides (1975) η σύσταση της μπάμιας σε αμινοξέα είναι αυτή που παρουσιάζεται στον πίνακα 3, όπου και γίνεται σύγκριση τριών ποικιλιών μπάμιας με αυτού του αυγού και της σόγιας που είναι οι κατεξοχήν πλούσιες πηγές αμινοξέων του ζωικού και του φυτικού βασιλείου, αντίστοιχα, καθώς και με δύο παλαιότερες μελέτες.

Πίνακας 3: Σύσταση Αμινοξέων Μπάμιας, Αυγού Και Σόγιας σε (g/16gN)

Αμινοξέα	Pusa savani	Emerald	Ibtaira	Karakoltsidis Constantinids (1975)	Savello et al, (1980)	σόγια	αυγό
Lysine	9.3	7.24	8.9	8.0	8.03	8.0	7.0
Histidine	3.6	1.78	1.83	3.0	2.97	2.7	2.4
Arginine	13.8	11.04	10.16	12.5	12.44	10.1	6.1
Aspartic acid	12.9	11.82	13.17	15.5	15.45	17.0	9.6
Threonine	3.6	3.02	3.49	4.4	4.36	5.5	5.1
Serine	5.9	5.25	6.35	6.7	6.70	7.4	7.6
Glutamic acid	22.0	22.08	20.74	20.5	20.48	21.1	12.7
Proline	-	3.83	4.18	6.1	6.06	7.7	4.2
Glycine	6.0	6.13	6.66	5.8	5.77	4.3	3.3
Alanine	4.4	5.51	6.66	5.9	5.88	6.1	5.9
Cystine	-	2.45	2.53	1.5	1.53	1.6	2.4
Valine	5.8	4.0	4.95	6.4	6.4	5.3	6.8
Methionine	2.3	1.66	1.85	1.3	1.29	1.3	3.4
Isoleucine	4.2	3.15	3.32	4.7	4.64	6.5	6.3
Leucine	7.2	6.68	7.03	8.5	8.46	9.4	8.8
Tyrosine	3.0	3.69	3.83	3.6	3.6	3.7	4.2
Phenylalanine	4.0	4.28	3.93	4.7	4.70	5.3	5.7
Tryptophan	1.9	0.96	0.85	-	-	-	1.7

(Udayasekhara,1985 ; W&awi,1983 ; Savello et al, 1980 ; Karakoltsidis & Constantinides, 1975)

2.1.5.2.Λιπαρά οξέα μπάμιας

Η μπάμια όπως έχει προαναφερθεί είναι φυτό πλούσιο σε λιπαρά τα οποία βρίσκονται κατά κόρον στους σπόρους του. Σύμφωνα με τους Savello et al., (1980) τα λιπαρά οξέα της μπάμιας είναι σε μεγάλο ποσοστό (61%) ακόρεστα. Αυτό όμως που κάνει τα λιπαρά της μπάμιας πολύ επιθυμητά, είναι η ιδιαίτερα αυξημένη συγκέντρωση του λινολεϊκού οξέος (C18:2) σε ποσοστό (42%), το λιπαρό αυτό οξύ είναι ένα από τα απαραίτητα για

τον ανθρώπινο οργανισμό μαζί με τα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα τα οποία δεν μπορεί να συνθέσει ο οργανισμός. Απεναντίας ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί το πολύ μικρό ποσοστό του λινολενικού οξέος (C18:3) ενός ακόμα απαραίτητου λιπαρού οξέος που στην έρευνα των Savello et al., (1980) βρέθηκε να είναι πολύ μικρό (0,24%) ενώ στην έρευνα των Karakoltsidis και Constantinides (1975) το ποσοστό έφτανε το (1,42%), γεγονός που δεν υποβαθμίζει την θρεπτική αξία της μπάμιας αφού στον ανθρώπινο οργανισμό πραγματοποιείται μετατροπή του λινολεϊκού οξέος σε λινολενικό οξύ. Αξιοσημείωτη εντύπωση κάνει ακόμα το αποτέλεσμα της έρευνα του W&awi (1983) όπου στις ποικιλίες Emerald και Ibtaira βρήκε πως το ποσοστό του ελαϊκού οξέος είναι εξαιρετικά υψηλό 55,92% και 62,87, αντίστοιχα, ενώ βρήκε ελάχιστο λινολεϊκό οξύ 0,1% και 0,09% αντίστοιχα, αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των ερευνών παρουσιάζονται στο πίνακα 4.

Πίνακας 4: Σύσταση της μπάμιας σε λιπαρά οξέα σε (%)

Λιπαρό οξύ	Pusa savani	Emerald	Ibtaira	Karakoltsidis & Constantinides,(1975)	Savello et al, (1980)
myristic acid (14:0)	0.4	0.30	0.30	0.12	0.24
palmitic acid (16:0)	23.5	39.14	32.91	33.72	33.53
stearic acid (18:0)	4.3	4.19	3.46	3.28	3.81
oleic acid (18:1)	28.9	55.92	62.87	17.88	29.29
linoleic acid (18:2)	42.4	0.1	0.09	42.15	31.48
linolenic acid (18:3)	<0.5	-	-	0.24	1.42

(Udayasekhara,1985 ; W&awi,1983 ; Savello et al, 1980 ; Karakoltsidis & Constantinides, 1975)

2.1.5.3.Υδατάνθρακες που εμπεριέχονται στην μπάμια

Όπως έχουμε παρατηρήσει στον πίνακα 2 και στον πίνακα 3 για τις ποικιλίες που έχουν εξεταστεί οι συγκέντρωση των υδατανθράκων και των φυτικών ή ακατέργαστων ινών είναι μεγαλύτεροι όλων. Σύμφωνα με τους Longe et al.,(1982) οι συγκέντρωση των υδατανθράκων μεταβάλετε με τον βαθμό ωρίμανσης του καρπού για αυτό στον πίνακα 6 δίνονται οι μέσες τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν με την τυπική απόκλιση σε τέσσερις ποικιλίες μπάμιας όπως τις υπολόγισαν.

Πίνακας 5: Συγκέντρωση υδατανθράκων σε τέσσερις ποικιλίες μπάμιας σε g/100g ξηρού βάρους.

Ποικιλία	Ελεύθερα σάκχαρα	Άμυλο	Υδατοδιαλυτοί υδατάνθρακες + πηκτίνη + πολυσακχαρίτες	Ημικυτταρίνες	Κυτταρίνη	Λιγνίνη
α	7.91±1.61	3.27±0.66	14.2±6.05	17.6±6.62	8.90±5.05	8.56±1.37
β	7.76±1.59	3.26±0.48	14.1±2.44	11.5±6.65	16.9±7.75	7.33±7.75
γ	7.76±0.82	3.36±0.67	18.4±4.19	12.0±2.97	7.29±4.20	6.46±2.26
δ	7.86±1.30	2.87±0.83	13.4±2.57	14.7±2.08	7.90±4.80	13.1±3.28

Όπως φαίνεται στο πίνακα 5 δεν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών όσον αφορά τα ελεύθερα σάκχαρα και το άμυλο, δεν συμβαίνει το ίδιο όμως για τα υπόλοιπα τέσσερα συστατικά που μελετήθηκαν, αφού το εύρος για τους υδατοδιαλυτούς υδατάνθρακες κυμαίνεται από 13,4 έως 18,4 , αντίστοιχα το εύρος για τις ημικυτταρίνες είναι από 11,5 έως 17,6 , για την κυτταρίνη από 7,29 έως 16,9 και για την λιγνίνη από 6,46 έως 13,1 g/100g ξηρού βάρους. Το γεγονός αυτό, κάνει την επιλογή τις ποικιλίας και του βαθμού ωρίμανσης του καρπού πολύ σημαντικά ως προς την χρήση για την οποία προορίζονται. Στην τεχνολογία τροφίμων, πέραν των λεύθερων σακχάρων και του αμύλου, οι πηκτίνη και οι πολυσακχαρίτες τις μπάμιας είναι μείζονος σημασίας όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω αφού αυτά είναι που προσδίδουν τις ιδιαίτερες ιδιότητες που έχει το λαχανικό αυτό.

2.2.Υδατικό εκχύλισμα πολυσακχαριτών μπάμιας (βλέννη)

Ο όρος βλέννη μπάμιας αναφέρεται στην παχιά και γλοιώδη ουσία που συγκεντρώνεται στα τοιχώματα του περικάρπιου του λοβού της μπάμιας. Από χημικής άποψης είναι όξινοι πολυσακχαρίτες που συνδέονται με πρωτεΐνες και μέταλλα (Woolfe et al.,1977). Το βασικό δομικό στοιχείο του πολυσακχαρίτη της μπάμιας αποτελείται από επαναλαμβανόμενες και εναλλασσόμενες μονάδες α-(1→2)-ραμνόζης και α-(1→4)-γαλακτουρονικού οξέος, εκ των οποίων οι μισές ομάδες της ραμνόζης φέρουν διακλαδισμένη αλυσίδα δισακχαρίτη αποτελούμενη από β-(1→4)-γαλακτόζης σύμφωνα με τους (Tomada et al.,1980).

Η εκχύλιση της βλέννης ως κολλώδη ουσία πραγματοποιείται με διάφορες τεχνικές, η διαφοροποίηση αυτή συμβάλλει στην χημική σύνθεση της βλέννης (Ndjouenkeu et al.,1996). Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες περιλαμβάνουν την υψηλή διαλυτότητα στο νερό, την πλαστικότητα, την ελαστικότητα και το ιξώδες. Οι ιδιότητες αυτές επηρεάζονται από την θερμοκρασία, το Ph, την περιεκτικότητα σε σάκχαρα ή νάτριο και από τον χρόνο αποθήκευσης (Woolfe et al., 1977., Baht & Tharanathan, 1987).

Επιπλέον η βλέννη κατά την εκχύλιση της με την πρωτεΐνη σε αλκαλικό pH και συν-καταβύθισης αυτών σε όξινο pH συμβάλλει στην βελτίωση των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών, στην δέσμευση νερού, στις γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και στο ιξώδες των πρωτεϊνών μπάμιας.

2.2.1.Εκχύλιση AIS

Η πρώτη εκχύλιση πολυσακχαριτών που πραγματοποιείται στην πούλπα της μπάμιας σύμφωνα με τους Sengkhampan et al.,(2009a,b); Georgiadis et al.,(2011); kontogiorgos et al.,(2012) γίνεται με την χρήση αιθανόλης 70% και παραλαμβάνονται από αυτό τα ονομαζόμενα αδιάλυτα στην αλκοόλη στερεά (alcohol-insoluble solids) [AIS] η απόδοση του οποίου φτάνει κατά τους Sengkhampan et al.,(2009a,b) τα 5,8g/100g φρέσκια μπάμιας συμπεριλαμβανομένων και υλικών κυτταρικού τοιχώματος. Το περιεχόμενο σε σάκχαρα του AIS όπως το ερεύνησαν οι Sengkhampan et al.,(2009a,b) αποτελείται από κυρίως γλυκόζη σε ποσοστό (44 mol%) ακολουθεί η γαλακτόζη με ποσοστό (17 mol%) και γαλακτουρονικό οξύ σε ποσοστό (16 mol%) τα

οποία προέρχονται από πολυσακχαρίτες όπως η πηκτίνη, οι ημικυτταρίνες (ξυλόζη και γλυκοξυλόζη) και κυτταρίνη. Πέραν των πολυσακχαριτών στο AIS εκχυλίζονται και πρωτεΐνες σε ποσοστό (15%).

2.2.2.Εκχύλιση HBSS

Μετά την πρώτη εκχύλιση ακολουθεί δευτερεύουσα με την οποία ουσιαστικά εξετάζεται η εκχυλισιμότητα των πηκτινών, ημικυτταρινών και κυτταρινών, η πρώτη μέθοδος εκχύλισης είναι με θερμό ρυθμιστικό διάλυμα (Hot Buffer Soluble Solids), το οποίο κατά τους Sengkhamporn et al.,(2009a,b) έχει την παρακάτω σύσταση, 35 mol% γαλακτουρονικού οξέος, 26 mol% ραμνόζης και 34 mol% γαλακτόζης. Η αναλογία σύστασης γαλακτουρονικού οξέος και ραμνόζης είναι περίπου 0,7 γεγονός που αποδεικνύει την παρουσία της κυρίως αλυσίδας ραμνογαλακτουράνης I σε ποσοστό 85%, μιας και η αναλογία μέσα στην αλυσίδα των σακχάρων αυτών είναι 1:1. Κατά συνέπεια η παρουσία της αλυσίδας της ομογαλακτουράνης είναι πολύ μικρή σε σχέση με την ραμνογαλακτουράνη I. Ο βαθμός μεθυλίωσης της HBSS πηκτίνης όπως φαίνεται στον συγκεντρωτικό πίνακα 6 είναι ιδιαίτερα χαμηλός (24%), επειδή όμως δεν υπάρχουν ενδείξεις πως τα γαλακτουρονικά οξέα της ραμνογαλακτουράνης είναι μεθυλιωμένα, ο βαθμός μεθυλίωσης αποδίδεται μόνο στην αλυσίδα της ομογαλακτουράνης με αποτέλεσμα ο βαθμός μεθυλίωσης να πολύ υψηλός (96%). Όσον αφορά τον βαθμό ακετυλίωσης, ο οποίος αποδίδεται κυρίως στην αλυσίδα της ραμνογαλακτουράνης I ανέρχεται σε (58%).

2.2.3.Εκχύλιση CHSS

Η δεύτερη μέθοδος δευτερεύουσας εκχύλισης είναι με χηλικές ουσίες όπως το EDTA και ονομάζεται (Chelating Agent Soluble Solids) CHSS. Με την μέθοδο αυτή οι Sengkhamporn et al.,(2009a,b) υπολόγισαν την σύσταση του εκχυλίσματος ως: γαλακτουρονικό οξύ σε ποσοστό (63 mol%), γαλακτόζη (17 mol%), ραμνόζη (14 mol%), αραβινόζη (3 mol%) και γλουκορονικό οξύ (2 mol%). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά υπολόγισαν ότι η CHSS πηκτίνη αποτελείται περισσότερο από αλυσίδα ομογαλακτουράνης σε ποσοστό (74%) και λιγότερο από ραμνογαλακτουράνη I. Ο

βαθμός μεθυλίωσης υπολογίστηκε σε ποσοστό (48%) και ο βαθμός ακετυλίωσης σε (18%). Ακόμα στο πίνακα 6 φαίνεται και το σημαντικό ποσοστό πρωτεϊνών (10,5%) που εκχυλίστηκαν με αυτή την μέθοδο.

2.2.4.Εκχύλιση DASS

Η τρίτη μέθοδος δευτερεύουσας εκχύλισης είναι με αραιό αλκαλικό διάλυμα (Dilute Alkaline Soluble Solids) DASS. Στην τρίτη μέθοδο η σύσταση του εκχυλίσματος υπολογίστηκε από τους Sengkhamarn et al.,(2009a,b) ως εξής: ποσοστό γαλακτουρονικού οξέος (48 mol%), ποσοστό γαλακτόζης (19 mol%), ποσοστό ραμνόζης και αραβινόζης (13 mol%) το καθένα, μικρό ποσοστό γλυκόζης (4 mol%) και ακόμα μικρότερο ποσοστό γλουκορινικού οξέος. Με τα ποσοστά αυτά κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η DASS πηκτίνη αποτελείται από 43% ραμνογαλακτουράνη Ι και 57% από ομογαλακτουράνη. Στα αποτελέσματα δεν συμπεριλαμβάνονται ο βαθμός μεθυλίωσης και ακετυλίωσης αφού αυτά απομακρύνθηκαν κατά την εκχύλιση με το αλκάλι. Ιδιαίτερη εντύπωση κάνει το ποσοστό των πρωτεϊνών που εκχυλίστηκαν με αυτή την μέθοδο (16,6%) η οποία είναι μεγαλύτερη από τις δύο προαναφερθέντες μεθόδους.

Πίνακας 6: Απόδοση και Σύσταση των Πολυσακχαριτών με τις διάφορες Μεθόδους, AIS, HBSS, CHSS και DASS

Εκχύλιση	Απόδοση g/100gAIS	Rha mol %	Ara mol%	Gal mol%	Glu mol%	GalA mol%	GlcA mol%	CC %	DA	DM	PC %
AIS		3	5	17	44	16	7		40	59	15.8
HBSS	11.12	26	0	34	1	35	3		58	24	3.5
CHSS	4.8	14	3	17	1	63	2		18	48	10.5
DASS	13.2	13	13	19	4	48	2		-	-	16.6

Rha: Ραμνόζη Ara: Αραβινόζη Gal: Γαλακτόζη Glu: Γλυκόζη GalA: Γαλακτουρονικό οξύ
 GlcA: Γλουκορινικό οξύ PC: Ποσοστό Πρωτεϊνών CC: Ποσοστό Υδατανθράκων
 DA: Βαθμός Ακετυλίωσης (mol/100mol GalA) DM: Βαθμός Μεθυλίωσης(mol/100mol GalA)

(Sengkhamarn et al., 2009)

2.3.Γαλακτώματα

Με τον όρο γαλάκτωμα εννοούμε ένα ετερογενή μίγμα τουλάχιστον δύο μη αναμίξιμων ρευστών εκ το οποίων το ένα βρίσκεται διεσπαρμένο υπό την μορφή πολύ μικρών σταγονιδίων μεγέθους (0,1 έως 100μm) μέσα στην μάζα του άλλου. Το ρευστό που είναι διεσπαρμένο στην μάζα του άλλου ρευστού ονομάζεται διεσπαρμένη ή ασυνεχής ή εσωτερική φάση ενώ το ρευστό που το περικλείει ονομάζεται διασπείρουσα ή συνεχής ή εξωτερική φάση (Παναγιώτου,1998).Τα πιο γνωστά είδη γαλακτωμάτων κατά των Lissant, (1974) είναι δύο ειδών:

α. Σταγονίδια ελαίου διεσπαρμένα μέσα στη συνεχή φάση του νερού, το σύστημα αυτό ονομάζεται γαλάκτωμα ελαίου σε νερό και συμβολίζεται ως O/W (oil in water).

β. Σταγονίδια νερού διεσπαρμένα μέσα στη συνεχή φάση του ελαίου, το σύστημα αυτό ονομάζεται γαλάκτωμα νερού σε λάδι και συμβολίζεται ως W/O (water in oil).

Η αναγνώριση κάποιου γαλακτώματος σε ποια από δυο προαναφερθείσες κατηγορίες ανήκει (O/W ή W/O) γίνεται με πολλούς και σχετικά εύκολους τρόπους, σύμφωνα με τον Παναγιώτου, (1998) ορισμένοι μέθοδοι είναι:

Ένα γαλάκτωμα O/W αναμιγνύεται εύκολα με νερό, ενώ ένα γαλάκτωμα W/ O αναμιγνύεται με λάδι.

Το γαλάκτωμα O/W χρωματίζεται εύκολα με υδατοδιαλυτές χρωστικές, ενώ ένα γαλάκτωμα W/O με λιποδιαλυτές χρωστικές.

Τα γαλακτώματα O/W έχουν, συνήθως, πολύ μεγαλύτερη αγωγιμότητα από τα γαλακτώματα W/O.

Ένα O/W γαλάκτωμα έχει μία κρεμώδη υφή, ενώ ένα W/O γαλάκτωμα έχει μία λιπαρή υφή.

Η φυσικές, χημικές καθώς και οι φυσικοχημικές ιδιότητες ενός γαλακτώματος σύμφωνα με των Lissant, (1974) επηρεάζεται και εξαρτάτε από δυο παραμέτρους:

α. τις ιδιότητες της συνεχούς φάσης και

β. την αναλογία της ασυνεχούς φάσης με την συνεχή

Σαν μέγεθος των σωματιδίων ενός γαλακτώματος και προσδιορισμός αυτών ορίζεται η διάμετρος των σφαιριδίων της εσωτερικής φάσης. Ένα γαλάκτωμα το χαρακτηρίζουμε συνήθως με ένα εύρος τιμών διαμέτρου διότι είναι πολύ δύσκολο να πετύχουμε γαλάκτωμα με σταγονίδια ίδιου διαμέτρου. Τα γαλακτώματα που περιέχουν σωματίδια

με μικρή διάμετρο ονομάζονται λεπτά (fine) γαλακτώματα, ενώ αυτά που περιέχουν σφαιρίδια μεγάλης διαμέτρου ονομάζονται αδρά (coarse) γαλακτώματα. Οι παράμετροι που ορίζουν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι τρείς:

α. συνθήκες προετοιμασίας του γαλακτώματος (θερμοκρασία, μηχανήματα)

β. τύπος και την ποσότητα του γαλακτωματοποιητή

γ. σειρά με την οποία προστέθηκαν τα συστατικά

Η πιο απλή μέθοδος μετρήσεως της διαμέτρου των σταγονιδίων είναι με την μέθοδο της δυναμικής σκέδασης του φωτός, πιο συγκεκριμένα μια πηγή φωτός εκπέμπει μια ακτινοβολία με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά η οποία όταν συναντά τα σωματίδια που διέρχονται από ένα θάλαμο μέτρησης σκεδάζουν την ακτίνα προς διάφορες κατευθύνσεις ανάλογα με το μέγεθος τους, οι σκεδαζόμενοι ακτινοβολία ανιχνεύονται με διάφορους ανιχνευτές που είναι τοποθετημένοι περιμετρικά του θαλάμου μέτρησης και στέλνουν το σήμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου και βλέπουμε την καμπύλη κατανομής των σωματιδίων ανάλογα με το μέγεθός τους.

Η οπτική εμφάνιση των γαλακτωμάτων εξαρτάται από δυο παραμέτρους:

- το είδος των συστατικών δηλαδή το χρώμα και την διαφορά που έχουν στο δείκτη διάθλασης
- το μέγεθος των διεσπαρμένων σταγονιδίων

Ένα γαλάκτωμα είναι αδιαφανές και συνήθως παίρνει το χρώμα της συνεχούς φάσης όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι μεταξύ 0,5 έως 5μm και υπάρχει σημαντική διαφορά στο δείκτη διάθλασης της συνεχούς και ασυνεχούς φάσης. Ένα γαλάκτωμα είναι διαφανές, είτε όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι τις τάξεως των nm και μάλιστα μικρότερο από το μήκος κύματος του ορατού φωτός (400-700nm), είτε όταν το γαλάκτωμα έχει ρυθμιστή έτσι ώστε οι δύο φάσης να έχουν το ιδανικό δείκτη διάθλασης.

2.3.1.Επίδραση του pH γαλακτώματος στην πρωτεΐνη

Το pH ενός γαλακτώματος έχει πολύ μεγάλη σημασία, διότι από αυτό εξαρτάται το είδος του γαλακτωματοποιητή που θα χρησιμοποιηθεί και ιδιαίτερα όταν πρόκειται για γαλακτωματοποιητές πρωτεϊνικής φύσεως, μιας και το ηλεκτρικό φορτίο αυτών αλλάζει συναρτήσει του pH και του ισοηλεκτρικού σημείου. Σύμφωνα με τους Tokle & McClements (2011) σε χαμηλό pH οι αμινομάδες των πρωτεϊνών φορτίζονται θετικά

ενώ οι καρβοξυλομάδες παραμένουν ουδέτερες, αντίστοιχα όταν το pH είναι υψηλό οι καρβοξυλομάδες φορτίζονται αρνητικά και οι αμινομάδες παραμένουν ουδέτερες, κατά συνέπεια όταν το pH είναι μικρότερο από το ισοηλεκτρικό σημείο ο συνολικός αριθμός των αμινομάδων είναι μεγαλύτερος από των καρβοξυλομάδων και όλη η πρωτεΐνη φορτίζεται θετικά και αντίστοιχα όταν το pH είναι μεγαλύτερο από το ισοηλεκτρικό σημείο ο συνολικός αριθμός των καρβοξυλομάδων είναι μεγαλύτερος των αμινομάδων με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να φορτίζεται αρνητικά. Σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο τα φορτία βρίσκονται σε ισορροπία με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην είναι φορτισμένη. Είναι γνωστό ότι γενικά τα γαλακτώματα σταθεροποιούνται εξαιτίας των απωθητικών φορτίων στην επιφάνεια της διεσπαρμένης φάσης και από το προσροφημένο στρώμα που δρα ως διεπιφανειακό φράγμα και αποτρέπει την στενή επαφή και συνένωση των διάσπαρτων σταγονιδίων (Chen et al., 2000) γεγονός που κάνει το φορτίο της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείτε πολύ σημαντικό και κατά συνέπεια και το pH.

2.3.2.Γαλακτωματοποιητές

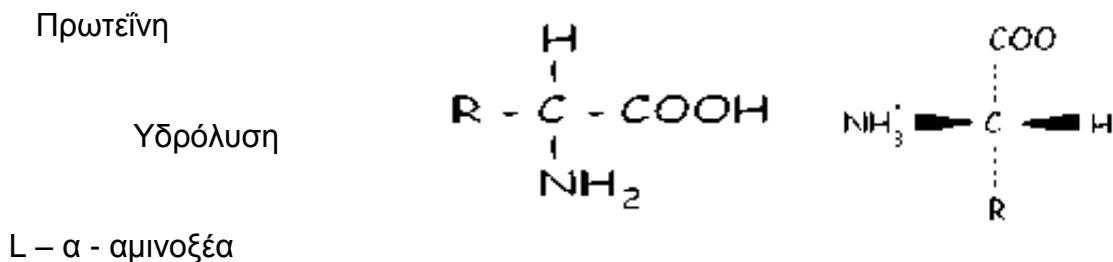
Η γαλακτωματοποιητές είναι τασιενεργές ενώσεις (επιφανειοδραστικές ουσίες) οι οποίες στο μόριο τους έχουν και λιπόφιλες (συνήθως αλκυλική ομάδα) και υδρόφιλες ομάδες (συνήθως υδρόξυλο ομάδα). Σε ένα μη αναμίξιμο σύστημα όπως το λάδι στο νερό οι γαλακτωματοποιητές εντοπίζονται στην διεπιφάνεια όπου και μειώνουν την επιφανειακή τάση. Ο τρόπος δράσεις τους έχει να κάνει με την διαλυτότητα των ουσιών αυτών στη λιπαρή και την υδατική φάση. Οι λιπόφιλες ομάδες διαλυτοποιούνται στις σταγόνες λίπους, ενώ οι πολικές υδρόφιλες ομάδες προβάλλονται στην επιφάνεια τις υδατικής φάσεις. Η συμμετοχή αντίθετα φορτισμένων ιόντων προκαλεί τον σχηματισμό μιας ηλεκτροστατικής διπλής στοιβάδας η οποία εμποδίζει την συσσωμάτωση των σταγόνων λίπους. (Belitz et al., 2006). Στην τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιούνται πάρα πολύ οι γαλακτωματοποιητές σε πάρα πολλά τρόφιμα μιας και μεγάλη ομάδα αυτών είναι σε μορφή γαλακτωμάτων, τα πιο χαρακτηριστικά αυτών είναι οι μαγιονέζες, τα βούτυρα και τα παγωτά. Οι γαλακτωματοποιητές μπορεί να είτε φυσικοί, είτε τεχνητοί, μεγαλύτερη έμφαση όμως στην τεχνολογία τροφίμων δίνεται στους φυσικούς γαλακτωματοποιητές η

πηγή των οποίων είναι τρόφιμα που περιέχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις τις παρακάτω χημικές ουσίες:

- Μόνο και διγλυκερίδια: η ανθρακική αλυσίδα των λιπαρών οξέων εισχωρεί στο λιπαρό τμήμα ενώ τα αλκοολικά υδροξύλια στο υδατικό τμήμα με αποτέλεσμα να έχουν πολύ καλή γαλακτωματοποιητική ισχύ.
- Φωσφολιπίδια: τα φωσφολιπίδια είναι και αυτά διγλυκερίδια που περιέχουν φωσφορικό οξύ και μια αζωτούχα βάση (χολίνη, αιθανολαμίνη). Το πιο γνωστό φωσφολιπίδιο είναι η λεκιθίνη η οποία σαν αζωτούχα βάση έχει την χολίνη.
- Πρωτεΐνες: η γαλακτωματοποιητική ικανότητα των πρωτεϊνών εξαρτάτε από την σύσταση και την αλληλουχία των αμινοξέων, καθώς και από την δομή του(δευτεροταγής, τριτοταγής, τεταρτοταγής). Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται πολύ είναι η καζεΐνη του γάλακτος, οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος Neiryngck et al.,(2004), οι πρωτεΐνες σόγιας Lin et al.,(2011); Baoru et al.,(2012) και του αυγού (Kontogiorgos et al.,2004).
- Εστέρες της προπυλενογλυκόλης: όπως ο στεατικός
- Εστέρες των λιπαρών οξέων με σορβιτόλη.

2.4. Διαλυτότητα πρωτεϊνών

Με πλήρη υδρόλυση των πρωτεϊνών λαμβάνονται τα 20 αμινοξέα που αποτελούν τις δομικές μονάδες (μονομερή) των πρωτεϊνών. Ορισμένα άλλα αμινοξέα επίσης συναντώνται στη φύση αλλά ο ρόλος τους στις πρωτεΐνες τροφίμων είναι ασήμαντος.



Η φυσικοχημική συμπεριφορά των αμινοξέων σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από την ομάδα R και από την ιδιότητα τους ως αμφολύτες. Αυτή η συμπεριφορά θα καθορίσει τις φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες της πρωτεΐνης στο τρόφιμο σε σχέση με την σύστασή του και τις διεργασίες που θα υποστεί.

Σε τιμές pH περί το ουδέτερο τα αμινοξέα σε υδατικά διαλύματα έχουν ιοντισμένες τόσο τις άμινο όσο και τις καρβοξυλομάδες. Το καρβοξύλιο χάνει ένα πρωτόνιο και αποκτά αρνητικό φορτίο, ενώ η αμινομάδα προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο και φορτίζεται θετικά. Η συνέπεια αυτού είναι ότι τα αμινοξέα έχουν χαρακτηριστικά διπόλου της ακόλουθης γενικής δομής.

Τα αμινοξέα είναι αμφολύτες, σε υδατικό διάλυμα συμπεριφέρονται σαν αμφολύτες, με όξινο ή βασικό τρόπο, ανάλογο με την τιμή του pH τους. Τα μονοαμινοκαρβοξυλικά οξέα, όπως το γλουταμινικό οξύ, είναι ισχυρά οξέα, ενώ από το άλλο μέρος τα διαμινομονοκαρβοξυλικά οξέα όπως η λυσίνη, αντιδρούν σαφώς με αλκαλικό τρόπο.

Ως ισοηλεκτρικό σημείο pI ενός αμινοξέος ορίζεται το pH του διαλύματος στο οποίο το συνολικό φορτίο του αμινοξέος είναι μηδέν, έχουμε δηλαδή κυρίως και ίσο αριθμό θετικά και αρνητικά φορτισμένων ιόντων.

Η διαφορά στην ιοντική ισχύ επιτρέπει το διαχωρισμό και ποιοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων, που βασίζεται στη δίοδο του μίγματος των αμινοξέων από ιοντοανταλλάκτες. Η έκλυση της στήλης με ρυθμιστικά διαλύματα που το pH τους μεταβάλλεται σταδιακά επιτρέπει την εκλεκτική εκρόφηση των αμινοξέων, τα οποία στη συνέχεια δίνουν χρωστική αντίδραση με νινυδρίνη και μετρώνται φασματοφωτομετρικά. Η ένταση της προσρόφησης στην επιφάνεια της ρητίνης και συνεπώς η σειρά έκλυσης κάθε αμινοξέος εξαρτάται κυρίως από την ιοντική ισχύ, υπεισέρχονται όμως και άλλοι παράγοντες όπως το μέγεθος του μορίου, η αρωματικότητα καθώς και η σχετική συγγένεια της ιοντοεναλλακτικής ρητίνης προς το κάθε αμινοξύ χωριστά. Έτσι λαμβάνεται το αμινογράφημα το οποίο ανάλογα με τον αριθμό των στηλών και τα χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα περιλαμβάνουν είτε το σύνολο των αμινοξέων είτε χωριστά τα βασικά και χωριστά τα όξινα και ουδέτερα αμινοξέα, που συνήθως απαντούν σε μια φυτική ή ζωική πρωτεΐνη.

Η διαλυτότητα της πρωτεΐνης είναι σύνθετη και μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως θερμότητα, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες

αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Τα επίπεδα αυτών των τριών δυνάμεων συμβάλλουν στην διαλυτότητα πρωτεϊνών, ευνοώντας αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, η οποία οφείλεται στην χαμηλή διαλυτότητα πρωτεΐνης ή ευνοώντας αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-διαλύτη, η οποία στην υψηλή διαλυτότητα πρωτεΐνης (Kinsella et al., 1985).

2.4.1.Απομόνωση των πρωτεϊνών

Η απομόνωση των πρωτεϊνών αποτελεί προϋπόθεση για τη μελέτη τους. Τα στάδια στην απομόνωση είναι:

- ❖ επιλογή της πρώτης ύλης,
- ❖ επιλογή του εκχυλιστικού μέσου,
- ❖ ομογενοποίηση.
- ❖ Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο διαχωρισμό:
- ❖ χρωματογραφία στήλης:
- ❖ μοριακή διήθηση,
- ❖ ιοντο-ανταλλακτικές ρητίνες,
- ❖ ηλεκτροφόρηση,
- ❖ υπερφυγοκέντρωση,
- ❖ διαπίδυση,
- ❖ υπερ-διήθηση.

2.4.1.1.Ηλεκτροφόρηση πηκτής - SDS PAGE

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης των φορτισμένων σωματιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα, κατά μήκος του οποίου έχει εφαρμοστεί ένα ηλεκτρικό πεδίο συνεχούς ρεύματος. Έχει την δυνατότητα διαχωρισμού πρωτεϊνών, υδατανθράκων, πεπτιδίων κ.α.

Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε ένα επίπεδο στρώμα πορώδους ημιστερεάς πηκτής που περιέχει υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στους πόρους της. Η πλάκα αυτή έχει μήκος λίγων εκατοστών και τα δείγματα τοποθετούνται πάνω της σαν κηλίδες

ή ζώνες. Στην συνέχεια εφαρμόζεται συνεχής τάση κατά το μήκος της πλάκας για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Όταν ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός το ρεύμα διακόπτεται και οι διαχωρισμένες ουσίες εμφανίζονται με έντονο χρώμα (Weber & Osborn., 1969).

Σύμφωνα με τον Laemmli (1970) η ηλεκτροφόρηση με πηκτή αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τον διαχωρισμό των πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε σύνθετα βιολογικά δείγματα. Αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα τους. Η ηλεκτροφόρηση εκτελείται σε μια πλάκα συσκευής πηκτής όπου η βήτα 2-μερκαπτο-αιθανόλη μειώνει τους ενδο και δια-μοριακών δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών έτσι ώστε να επιτρέπουν τον διαχωρισμό με βάση το μέγεθος και όχι το σχήμα. Το Laemmli Buffer αποτελείται από:

- 4% SDS
- 20% glycerol
- 10% 2-mercaptoethanol
- 0.004% bromphenol blue
- 0.125 M Tris HCl

Το SDS δεσμεύει όλες τις θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες ανά τακτό χρονικό διάστημα, δίνοντας έτσι σε κάθε πρωτεΐνη το ίδιο συνολικό αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν με βάση το μέγεθος και όχι το φορτίο. Το SDS επίσης μετουσιώνει τις πρωτεΐνες υποχρεώνοντας τις να διαχωριστούν με βάση το μέγεθος όχι το σχήμα. Επιπλέον δεσμεύει πρωτεΐνες σε αναλογία 1,3 g του SDS / g πρωτεΐνης περίπου. Η γλυκερόλη αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος έτσι ώστε αυτό να πέσει στο κάτω μέρος του φρεατίου, ελαχιστοποιώντας διόγκωση ή απώλεια του δείγματος πρωτεΐνης στο ρυθμιστικό διάλυμα. Η βρωμοφαινόλη είναι δείκτης και λειτουργεί ως χρωστική για τις πρωτεΐνες ώστε να είναι ορατές.

Το DTT συμβάλει στην μείωση τυχόν δι-σουλφιδικών δεσμών S-S που θα μπορούσε να παρέχει δευτερεύουσα τριτοταγή δομή ή το σχηματισμό διμερούς. Ενώ το διάλυμα έχει pH 6.8.

2.4.1.2. Η Υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier – FTIR

Η Υπέρυθρη (RI) φασματοσκοπία είναι μια από τις παλαιότερες πειραματικές τεχνικές για την ανάλυση της δευτερεύουσας δομής των πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η χρήση του ισχυρού και σταθερού laser οδήγησε στην ανάπτυξη του μετασχηματισμού Fourier για την υπέρυθρη απόκτηση δεδομένων και αξιόπιστη ψηφιακή ανίχνευση. Τα όργανα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούνται τόσο για ποιοτικές όσο για ποσοτικές μετρήσεις (Liang et al., 1956).

Βασίζεται στην απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια της ένωσης, τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. «Ενεργά» υπέρυθρες ενώσεις είναι αυτές στις οποίες οι δονήσεις και οι περιστροφές έχουν μια διαρκεί διπολική ροπή ή τα μόρια κατά τα οποία αλλάζει η διπολική ροπή κατά την διάρκεια της διαδικασίας.

Πρόκειται για μια τεχνική μέτρησης συλλογής των υπέρυθρων φασμάτων στην οποία αντί να καταγράφεται το ποσό της ενέργειας που απορροφάται για διαφορετικές συχνότητες της ακτινοβολίας, το φως IR οδηγείται στο δείγμα αφού πρώτα διαμορφωθεί μέσω ενός συμβολόμετρου. Η εκτέλεση μετασχηματισμού Fourier στο «συμβολογράφημα» έχει ως αποτέλεσμα ένα φάσμα όμοιο με εκείνο που το παίρνουμε από τη συμβατική φασματοσκοπία διασποράς (Jieli & Shaoning 2007).

Η FTIR έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της σύστασης της δευτεροταγής δομής, την δυναμική και την σταθερότητα της δομής, τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και τις αλλαγές διαμόρφωσης που συμβαίνουν από την επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της πίεσης Byler & Susi (1986).

2.5.1. Μέθοδοι απομόνωσης πρωτεϊνών που έχουν εφαρμοστεί στην μπάμια

Η προετοιμασία των δειγμάτων σύμφωνα με τους El-Mahdy & El-Sebaiy έγινε ομογενοποιώντας τα δείγματα με τέσσερις φορές το βάρος τους με απιονισμένο H₂O. Το παχύρευστο διάλυμα θερμαίνεται στους 70 ° C για 15 min, με σκοπό την αδρανοποίηση των ενζύμων. Στην συνέχεια ψύχεται και διηθείται μέσω ενός

βαμβακερού υφάσματος. Από το ιξώδες διάλυμα που προκύπτει, το ακατέργαστο εκχύλισμα μπάμιας καταβυθίζεται με τρεις όγκους ακετόνης και πλένεται χρησιμοποιώντας τρεις όγκους αιθανόλης. Ακολούθησε ξήρανση του παρασκευάσματος πάνω σε δίσκους στους 35°C και άλεση διαμέσου ενός κοσκίνου 60 mesh.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος περιγράφεται από τους Woolfe et al. (1977) που αποτελεί προσαρμογή της γενικής μεθόδου απομόνωσης κόμμεος από τρόφιμα (Glicksman, 1969). Η ακατέργαστη βλέννη ομογενοποιείται με κρύο διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος 5%, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 20 λεπτά, εξουδετέρωση με προσθήκη NaOH και ακολούθως υποβάλλεται σε διαπίδυση για 30 ώρες με απιονισμένο H₂O στους 4°C. Το νερό διάλυσης αλλάζεται κάθε 6 ώρες. Τέλος το εκχύλισμα καταβυθίζεται με τρεις όγκους αιθανόλης, πλένεται με αιθανόλη, ακετόνη και διαιθυλεθαίρα και αφήνεται να στεγνώσει πάνω σε δίσκους από ανοξείδωτο χάλυβα σε θερμοκρασία δωματίου.

Τόσο το ακατέργαστο όσο και το καθαρισμένο εκχύλισμα μπάμιας αναλύθηκαν ως προς την υγρασία, την τέφρα και την ολική περιεκτικότητα σε άζωτο με βάση τις προτεινόμενες μεθόδους από την Association of Official Analytical Chemists (1975). Για την εκτίμηση της περιεκτικότητας σε ολικό άζωτο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος micro-Kjeldahl και η θεωρητική (ακατέργαστη) πρωτεΐνη υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας το συνολικό άζωτο με τον συντελεστή 6,25. Η πραγματική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με την μέθοδο Lowry et al. (1951) μετά από διάλυση των δειγμάτων σε NaOH 0.1 M.

2.5.2. Ώξινη υδρόλυση που έχει εφαρμοστεί στο εκχύλισμα μπάμιας

Σύμφωνα με τον Pearson, (1970) χρησιμοποιήθηκαν τρεις βαθμοί υδρόλυσης. Ο πρώτος που διασπά τις 6-δεοξυεξόζες με 0.5 M H₂SO₄ για 1 ώρα στους 100°C. Ο δεύτερος που διασπά τις εξόζες και τις πεντόζες με 0.1 M H₂SO₄ για τέσσερις ώρες στους 100 °C και ο τρίτος όπου υδρολύει τους δεσμούς ουρονικού οξέος με 2 M H₂SO₄ για τέσσερις ώρες στους 100 °C. Ζυγίστηκαν 100 mg καθαρού εκχυλίσματος σε ένα πωματισμένο σωλήνα και προστέθηκαν 5 ml του κατάλληλου οξέος. Στην συνέχεια διοχετεύθηκε άζωτο μέσω του εναιωρήματος, και οι σωλήνες πωματίζονται

και τοποθετήθηκαν σε λουτρό ζέοντος ύδατος για ορισμένο χρόνο. Τα υδρολύματα ψύχθηκαν, εξουδετερώθηκαν με κεκορεσμένο διάλυμα υδροξειδίου του βαρίου και διηθήθηκαν μέσω διηθητικού χαρτιού. Το διήθημα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπολείμματος σε περιστροφικό εξατμιστήρα και τελικά διαλύθηκε σε 3 ml απεσταγμένου νερού.

Στο ακατέργαστο εκχύλισμα το ποσοστό της πραγματικής πρωτεΐνης ήταν 6.38 % επί ξηρού βάρους ενώ μετά τον καθαρισμό ήταν 3.97 % επί ξηρού βάρους, συγκριτικά χαμηλό σε ακατέργαστα παρασκευάσματα και μειωμένο περίπου στο μισό μετά τον καθαρισμό. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες συνδέονται με τους πολυσακχαρίτες με ένα τέτοιο τρόπο ώστε να μην καταβυθίζονται με τριχλωροξικό οξύ κατά τη διάρκεια του καθαρισμού (McGarvie & Parolis, 1979).

Σε μια παλιότερη μελέτη, σύμφωνα με τους Karakoltsides & Constantinides (1975) διαπιστώθηκε ότι ο λόγος απόδοσης της πρωτεΐνης (PER) από αλεύρι σπόρων μπάμιας, μετά από θέρμανση στους 130 °C για 3 ώρες, δεν ήταν διαφορετικός από ένα αλεύρι μπάμιας που δεν είχε υποστεί θερμική επεξεργασία, διατηρώντας τις θρεπτικές ιδιότητες της πρωτεΐνης ακόμα και μετά από θέρμανση. Σύμφωνα με αυτούς τους συγγραφείς, η σύνθεση των αμινοξέων στην πρωτεΐνη των σπόρων μπάμιας είναι παρόμοια με εκείνη της σόγιας και το PER είναι υψηλότερη από εκείνη της σόγιας. Το υψηλό ποσοστό του λινολεϊκού οξέος (42%) που εμπεριέχεται καθιστά το έλαιο των σπόρων μπάμιας και τα αμινοξέα της πρωτεΐνης ισάξιο συμπλήρωμα διατροφής με τα όσπρια ή τα δημητριακά (Savello et al., 1982). Οι Jambhale & Nerkar, (1998) στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής μελέτησαν τους σπόρους ώριμης μπάμιας ως προς την περιεκτικότητά τους σε έλαιο και πρωτεΐνη. Οι μελέτες έδειξαν ότι παρόλο που οι ώριμοι βλαστοί μπάμιας και το έλαιο αντίστοιχα έχουν πικρή γεύση μπορεί να βελτιωθεί με επεξεργασία προκειμένου να καταναλωθεί γιατί είναι πλούσιο σε αμινοξέα.

Επιπλέον, σύμφωνα με τους (Martin & Ruberte., 1979) παρασκευάστηκε τυρί από ώριμο βλαστό μπάμιας και προϊόντα αρτοποιίας αντικαθιστώντας το αλεύρι σιταριού με αλεύρι μπάμιας σε επίπεδα αναπλήρωσης από 25 έως 100% με αποδεκτές αισθητικές ιδιότητες.

3.Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της εργασίας ήταν η εκχύλιση πρωτεϊνών μπάμιας και η μελέτη κάποιων φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών. Παράλληλα έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της διαδικασίας της εκχύλισης μελετώντας το κατάλληλο pH διαλυτοποίησης, χρόνο εκχύλισης, pH καθίζησης καθώς και η απομάκρυνση του λίπους, πριν από την εκχύλιση.

4. Υλικά & μέθοδοι

4.1. Πρώτη ύλη

Οι μπάμιες προέρχονται από την εταιρεία κατεψυγμένων προϊόντων Μπαρμπά Στάθης σοδειάς 2009 και διατηρείτο στην κατάψυξη στους -20 °C μέχρι να επεξεργαστούν.

4.1.1. Αντιδραστήρια

Υδροξείδιο του Νατρίου NaOH (ION PLUS)

Χλωριούχο Νάτριο NaCl (ION PLUS)

Τρυγικό Καλιο- Νάτριο (ION PLUS)

Βουτανόλη (ION PLUS)

Αιθανόλη (ION PLUS)

Ανθρακικό Νάτριο Na₂CO₃ (ION PLUS)

Μεθανόλη (ION PLUS)

Χλωροφόρμιο (ION PLUS)

Folin Ciocalteu (ION PLUS)

BSA (Sigma, St Louis, MO, USA)

Twin 20 (Sigma, St Louis, MO, USA)

Tris base (Sigma, St Louis, MO, USA)

Δεκαεξάνιο (Sigma, St Louis, MO, USA)

Όξινο ανθρακικό νάτριο NaHCO₃ (ION PLUS)

4.1.2. Όργανα και σκεύη

Αναλυτικός ζυγός Shidmatzu

Φασματοφωτόμετρο Thermo Helios alpha UV-Vis

Vortex

Φυγόκεντρος Heraeus Christ Labofuge II Centrifuge Πεχάμετρο Thermo Scientific Orion

3-star benchtop pH meter, 115/220 VAC Ομογενοποιητής Υπερήχων Hielscher UP 100H

Ομογενοποιητής Blender Kenwood

Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK

Βιομηχανικό λυοφιλιωτή (Christ, model Gamma 1-20, Osterode, Germany).

4.2. Προετοιμασία δειγμάτων

4.2.1. Βέλτιστο pH διαλυτοποίησης - καθίζησης πρωτεϊνών και αλκαλική - όξινη διαλυτοποίηση τους.

Το βέλτιστο pH διαλυτοποίησης και καθίζησης προσδιορίστηκε με την μέθοδο των King et al., (1985) με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή 100g μπάμιας με απιονισμένο H₂O, σε αναλογία 1:10. Το εναιώρημα μοιράστηκε ισότοπα σε πέντε ποτήρια ζέσεως και ακολούθησε αύξηση του pH με NaOH 2N στις τιμές 9.0, 9.5, 10.5, 11.5 και 12.5. Κατόπιν ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 20 min στους 25 °C. Στο υπερκείμενο υγρό που παραλάβαμε από κάθε δείγμα με διαφορετικό pH εφαρμόστηκε η μέθοδος Lowry με σκοπό να βρεθεί το βέλτιστο pH απορρόφησης των πρωτεϊνών του δείγματος.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για τα χαμηλά pH είναι σχεδόν ίδια με την παραπάνω. Αρχικά ομογενοποιήθηκαν 100g μπάμιας με απιονισμένο H₂O, σε αναλογία 1:10. Το εναιώρημα ρυθμίστηκε σε pH 10.5, μοιράστηκε ισότοπα σε έξι ποτήρια ζέσεως και ακολούθησε μείωση του pH με προσθήκη HCl στις τιμές 8.0, 7.0, 6.0, 5.30, 4.5 και 4.0 έτσι ώστε να επέλθει η καθίζηση των πρωτεϊνών. Ακολούθησε αναμονή για 30 λεπτά και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 20min. Στο υπερκείμενο υγρό που παραλάβαμε από κάθε δείγμα με διαφορετικό pH τόσο για τα χαμηλά όσο και για τα υψηλά εφαρμόστηκε η μέθοδος Lowry με σκοπό να βρεθεί το βέλτιστο pH απορρόφησης των πρωτεϊνών του δείγματος

Αφού βρέθηκε το βέλτιστο pH διαλυτοποίησης και καθίζησης των πρωτεϊνών ακολούθησε η αλκαλική και όξινη διαλυτοποίηση τους. Στην αλκαλική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, η μπάμια ομογενοποιείται σε κρύο απιονισμένο H₂O σε αναλογία 1/10. Το αιώρημα ρυθμίστηκε σε pH 10.5 με 2N NaOH, επωάστηκε για 30 λεπτά στους 25° C και φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 30 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ρυθμίστηκε σε pH 4.0, στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας 2 N HCl. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 15 min στους 25 °C. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του υπερκείμενου υγρού προσδιορίζεται με την μέθοδο Lowry.

Στην όξινη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, ομογενοποιήθηκε η μπάμια σε κρύο απιονισμένο απιονισμένο H₂O σε αναλογία 1/10. Το αιώρημα ρυθμίστηκε σε pH 3.0 με 2 N HCl. Οι διαλυτές πρωτεΐνες ανακτήθηκαν με ισοηλεκτρική καθίζηση σε pH 4.0, κατόπιν το διάλυμα επωάστηκε για 1 h και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 15 min στους 25 °C. Το ίζημα διηθείται και οδηγείται προς λυοφυλίωση (Hultin & Kelleher , 2000)

4.2.2.Απολίπανση μπάμιας

Η απομάκρυνση του λίπους έγινε με δύο διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες όπως αιθανόλη και βουτανόλη. Παρασκευάστηκαν δύο δείγματα όπου αναμίχθηκαν 100g μπάμιας με 1000 ml από τον κάθε διαλύτη και αφού ομογενοποιήθηκαν ακολούθησε 1 ημέρα επώασης στους 3-5°C. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση, παραλαβή του διηθήματος και ξήρανση αυτού στον απαγωγό για 3 ημέρες με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη. Το ίζημα που παραλάβαμε μετά την ξήρανση βρίσκεται υπό μορφή αλεύρου. Το άλευρο αναμιγνύεται με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:50. Το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 10.5 με NaOH 2N και επωάζει 1h στους 25°C. Κατόπιν ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 20 min παραλαμβάνοντας το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 4 με HCL 2N και επωάζει για 15 min στον πάγο. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 15 min στους 25 °C με αποτέλεσμα την παραλαβή του ιζήματος. Στην συνέχεια το ίζημα οδηγείται για λυοφυλίωση (Abdelatif S. H. El-Jasser).

4.2.3.Λυοφιλίωση

Λυοφιλίωση ονομάζεται η διεργασία κατά την οποία το ελεύθερο ή δεσμευμένο νερό που υπάρχει στο τρόφιμο απομακρύνεται μεταβαίνει από την στερεή στην αέρια φάση με εξάχνωση, χωρίς να περάσει το στάδιο της υγρής φάσης.

Συνεπώς, προκειμένου να ξηράνουμε μια ουσία αρχικά ψύχεται οπότε το περιεχόμενο σ' αυτή νερό παγώνει. Στη συνέχεια, την τοποθετείται σε αεροστεγή χώρο όπου μειώνεται η πίεση σε σημείο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού (ή γενικότερα του

διαλύτη, σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί άλλο υγρό). Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση και απομακρύνεται με κατάλληλο συμπυκνωτή – παγίδα υδρατμών, ενώ ταυτόχρονα το υλικό ψύχεται, δεδομένου ότι για την εξάχνωση του νερού απαιτείται η αντίστοιχη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης.

Συνήθως για την επιτάχυνση της διεργασίας το υλικό θερμαίνεται ελαφρά. Στην πράξη, ακολουθείται ένας διαφορετικός τρόπος απομάκρυνσης της υγρασίας: ο θάλαμος, μέσα στον οποίο έχει τοποθετηθεί το υλικό, επικοινωνεί με άλλον θάλαμο, όπου επικρατεί ακόμα χαμηλότερη θερμοκρασία, και οι υδρατμοί τείνουν να φύγουν από το υλικό προς ξήρανση και να αποτεθούν στην πιο κρύα επιφάνεια.

Η διαφορά πίεσης που παρατηρείται ανάμεσα στην επιφάνεια του υλικού και στην πιο κρύα επιφάνεια είναι αρκετή για να επιτείνει την απομάκρυνση της υγρασίας του υλικού και την ξήρανσή του (Schafer & Stahnke .,1979).

4.3.Μέθοδοι ανάλυσης

4.3.1. Προσδιορισμός υγρασίας

Ο προσδιορισμός της υγρασίας έγινε με βάση την προτεινόμενη μέθοδο από το AOAC (1984). Περίπου 1g δείγματος ζυγίστηκε σε ένα τρυβλίο petri και απλώθηκε καλά σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Το δείγμα στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε φούρνο με αέρα στους 105°C για τρεις ημέρες μέχρι σταθερού βάρους. Μετά το πέρας αυτών των ημερών τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα για να κρυώσουν και ακολούθησε η ακριβής ζύγιση τους.

Υπολογισμός Ποσοστού Υγρασίας

$$\text{Υγρασίας \%} = \frac{\text{Αρχικό βάρος δείγματος (g)} - \text{Τελικό βάρος δείγματος (g)}}{\text{Αρχικό βάρος δείγματος (g)}} 100$$

4.3.2. Προσδιορισμός του λίπους με την μέθοδο Lee-Folch

Ο προσδιορισμός του λίπους έγινε με τη μέθοδο Lee-Folch. Η μέθοδος αυτή ανήκει στον Οργανισμό Επίσημων Χημικών Μεθόδων (Association of Official Agricultural Chemist method). Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο πραγματοποιείται εκχύλιση του λίπους με φυγοκέντριση και με την βοήθεια του χλωροφορμίου και της μεθανόλης που είναι διαλύτες των λιπών, ακολουθεί έπειτα απομάκρυνση των υπολειμμάτων διαλυτών με εξάτμιση. Σε αναλυτικό ζυγό, ζυγίστηκε περίπου 1g δείγματος, προστέθηκαν 20ml διαλύματος χλωροφόρμιου- μεθανόλης σε αναλογία 2:1 και ακολούθησε ανάδευση για δύο λεπτά. Στην συνέχεια έγινε διήθηση του διαλύματος και το διήθημα συγκεντρώνεται σε διαχωριστική χοάνη. Ακολούθησε προσθήκη NaCl 0.3% σε αναλογία 1:6 για τον διαχωρισμό των φάσεων. Το διάλυμα που προέκυψε αποτελείται από δύο στοιβάδες: μια στοιβάδα αποτελείται από μεθανόλη-H₂O και η άλλη από λίπος-χλωροφόρμιο. Αφήνεται σε ηρεμία για 24 h ε ως ότου διαχωριστεί καλά. Από την δημιουργία των δύο στοιβάδων, ακολούθησε μετάγγιση της μη υδατικής στοιβάδας όπου πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του διαλύτη μέσω βρασμού με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη και την παραλαβή του λίπους (Bligh et al., 1959).

Υπολογισμός Ποσοστού Λίπους

$$\text{Λίπος επί ξηρή βάση \%} = \frac{\text{Λίπος επί υγρή βάση \%}}{100 - \text{Υγρασία \%}} 100$$

4.3.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry

Η μέτρηση της πρωτεΐνης έγινε με την μέθοδο Lowry et al, (1951) Η μέθοδος περιγράφει την διαδικασία εκτέλεσης φασματομετρικής εξέτασης πρωτεϊνών στο υπεριώδες στα 600nm. Ο προσδιορισμός βασίζεται στον σχηματισμό χρώματος με την μέθοδο Folin-Ciocalteu το οποίο ανάγει τις πρωτεΐνες παρουσία διαλύματος Na_2CO_3 . Αρχικά παρασκευάζουμε το διάλυμα Lowry που είναι συνδυασμός δύο διαλυμάτων A+B. Το διάλυμα A αποτελείται από 50 ml Na_2CO_3 2% και 50 ml NaOH 0.1N. Ενώ το διάλυμα B αποτελείται από 10 ml θειικό χαλκό 1,56% και 10 ml τρυγικό καλιονάτριο 2,37%. Lowry διάλυμα: 2ml B + 100 ml A.

Μετά την Παρασκευή του διαλύματος Lowry εισάγουμε 0,1 ml δείγματος αραιωμένο 1:10 σε δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέτουμε 2,2 ml διαλύματος Lowry και αφήνουμε 10 min σε ηρεμία. Στην συνέχεια τοποθετούνται 0,2 ml διάλυμα folin (Folin Ciocalteu και H_2O με αραιώση 1:1) και αφήνουμε 30 min. Τέλος γεμίζεται μια κυψελίδα με το αποκτηθέν διάλυμα και μετρώνται οι απορροφήσεις σε κατάλληλο μήκος κύματος, στα 600nm, λαμβάνοντας ένα λευκό διάλυμα ως αναφορά (Lowry et al., 1951).

Υπολογισμός θεωρητικού ποσοστού πρωτεΐνης

$$\text{Πρωτεΐνη \%} = \frac{\text{πρωτεΐνη (mg/ml)} * 100 / \text{βάρους δείγματος (g)}}{1000}$$

4.3.4. Απομόνωση πρωτεϊνών μετά την απολίπανση

Για την απομάκρυνση του λίπους χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί διαλύτες βουτανόλη και αιθυλικός αιθέρας σε αναλογία 1:10. Το αιώρημα ομογενοποιήθηκε με Ομογενοποιητή Υπερήχων Hielscher UP 100H για 5 min έτσι ώστε να γίνει ένα ομοιόμορφο εναιώρημα και ακολούθησε διήθηση μέσω ενός διηθητικού χαρτιού. Το ίζημα που παραλάβαμε τοποθετήθηκε σε ένα φύλλο αλουμινίου και παρέμεινε για 24h στον απαγωγό με σκοπό την εξάτμιση του διαλύτη (Hamada J.S., 1996) Αφού

απομακρύνθηκε το λίπος από το δείγμα βρίσκεται υπό μορφή σκόνης. Η σκόνη αναμιγνύεται με απιονισμένο H₂O σε αναλογία 1:10 προκειμένου να ενυδατωθεί, το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 10 χρησιμοποιώντας 1N και 0.1N NaOH και το pH του διαλύματος διατηρείται σταθερό ενώ επωάζεται για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα λαμβάνεται με φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 20 min στους 10°C. Κατά την αλκαλική εκχύλιση, η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται ρυθμίζοντας το pH στο 4.5 χρησιμοποιώντας 1N και 0.1N HCL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4.500 rpm για 20 min στους 10°C και στο υπερκείμενο υγρό που λαμβάνουμε από την φυγοκέντρηση μετράται η απορρόφηση των πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry (Tarbush & Ahmed.,1996).

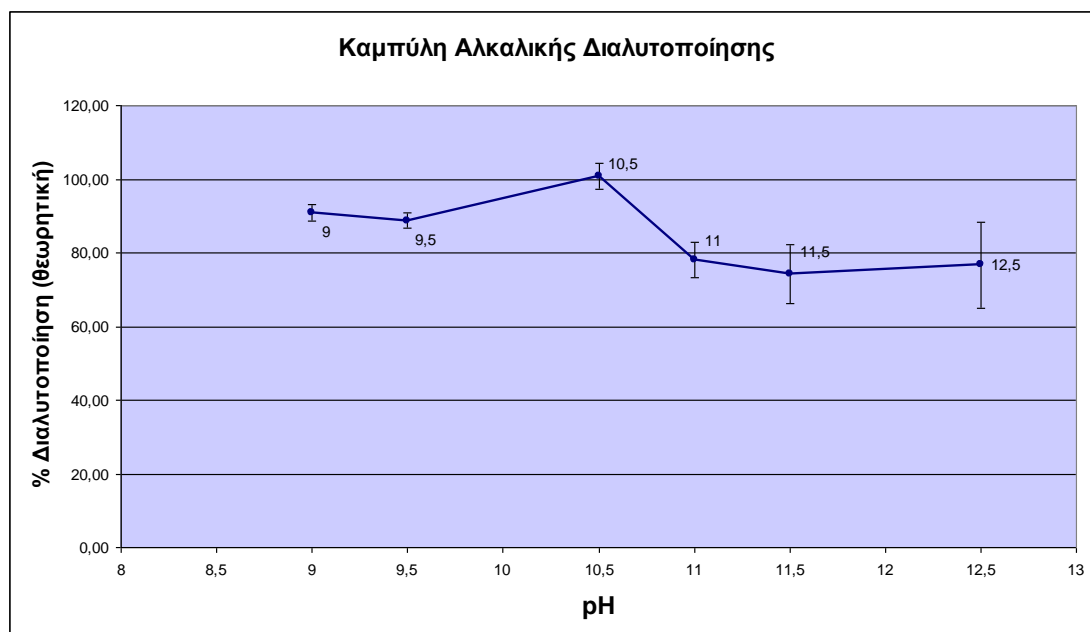
4.4.Γαλακτωματοποίηση

Κατά την παρασκευή γαλακτώματος ομογενοποιήθηκαν 4 διαφορετικά δείγματα (Ph=3, pH=4, Deffating με n-Butanol και με Ethyl alcohol) με δεκαεξάνιο. Σε μικρά φιαλίδια προσθέτουμε 0.5 ml του δείγματος και 2 ml τασιενεργού διαλύματος SDS 2% ή Twin 20 (2g SDS σε 100 ml buffer pH με 10) αυτή είναι μια συγκέντρωση επαρκής για την σταθεροποίηση των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Στην συνέχεια μετράται το μέγεθος των σταγονιδίων στο Mastersizer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Επιπλέον ελήφθησαν μικρογραφήματα χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο με φακό Carl Zeiss Axioskop 40 , εφοδιασμένο με μια ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Οι μετρήσεις στο Mastersizer έγιναν σε pH 7.0 γιατί χρησιμοποιείται απιονισμένο H₂O ενώ λήψη των φωτογραφιών γίνεται σε pH 10 γιατί το buffer είναι 10 (Dickinson, Ritzoulis, &Povey, 1999)

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Βέλτιστο αλκαλικό και όξινο pH διαλυτοποίησης

Δείγμα μπάμιας ομογενοποιήθηκε με νερό σε αναλογία 1:10. Μικρή ποσότητα δείγματος πάρθηκε για την μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης της ομογενοποιημένης μπάμιας. Ακολουθεί προσαρμογή του pH με NaOH 2N στις τιμές 9.0, 9.5, 10.5, 11.5 και 12.5. Στη συνέχεια τα διαλύματα αφήνονται για 1h και κατόπιν αυτού ακολουθεί φυγοκέντριση στις 5000rpm για 20min. Γίνεται δειγματοληψία 0.1ml υπερκείμενου υγρού από κάθε pH και στη συνέχεια εφαρμογή της μεθόδου Lowry για τον προσδιορισμό των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών.

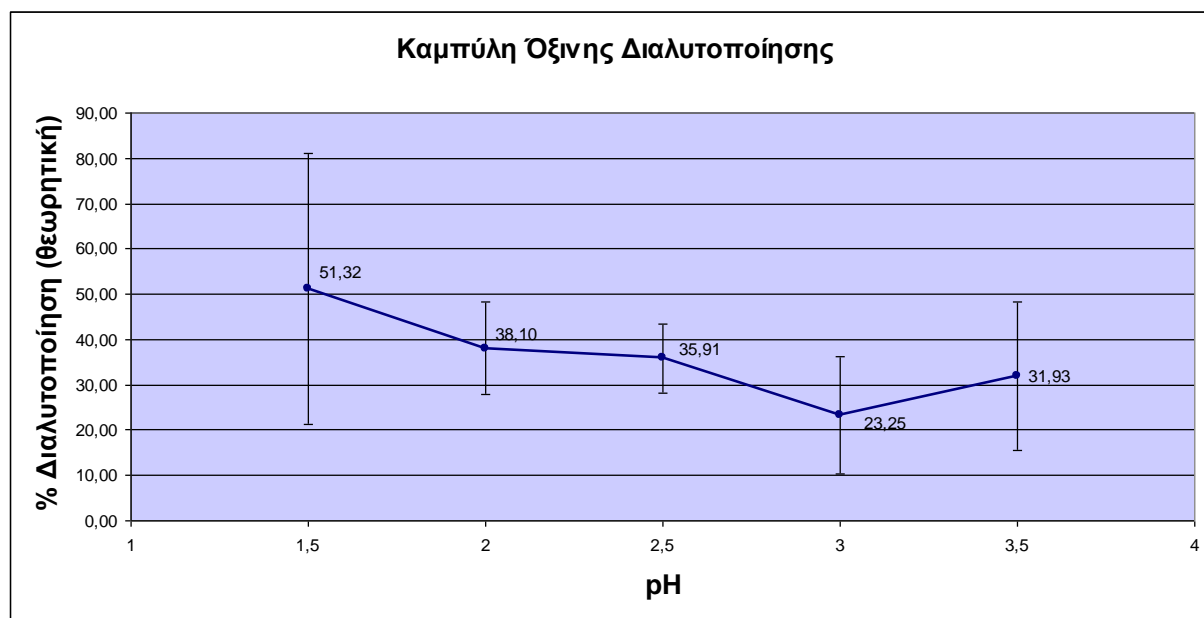


Σχήμα 1. Ποσοστό διαλυτοποίησης πρωτεϊνών σε διαφορετικές τιμές αλκαλικού pH.

Τα συμπεράσματα καθώς και η καμπύλη διαλυτοποίησης προέκυψαν από τον υπολογισμό του θεωρητικού ποσοστού διαλυτοποίησης, βάση των φασμάτων απορρόφησης του αρχικού δείγματος μπάμιας και του δείγματος μετά την αλκαλική μεταχείριση. Στο Σχήμα 1. οι μετρήσεις έδειξαν ότι για τις τιμές pH 9.0 και 9.5 δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο ποσοστό διαλυτοποίησης. Ακολουθεί σημαντική αύξηση του ποσοστού της τάξης του $\approx 10\%$ για τιμή pH 10.5, το οποίο είναι και το μέγιστο της καμπύλης διαλυτοποίησης. Στη συνέχεια παρατηρούμε αισθητή μείωση του

ποσοστού για αύξηση 0.5 μονάδων pH, πιο κάτω από τα ποσοστά των pH 9.0 και 9.5. Η μείωση του ποσοστού συνεχίζει να παραμένει στα ίδια επίπεδα όταν προχωράμε στην αύξηση των τιμών του pH σε 11.5 και 12.5.

Για την όξινη διαλυτοποίηση, ομογενοποιημένο (1:10) δείγμα μπάμιας προσαρμόστηκε σε pH 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 και 3,5 με 1 ή 2N HCl. Στη συνέχεια τα διαλύματα αφήνονται για μια ώρα και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 20min. Γίνεται δειγματοληψία 0.1ml υπερκείμενου υγρού από κάθε pH και στη συνέχεια εφαρμογή της μέθοδο Lowry για τον προσδιορισμό των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών.



Σχήμα 2. Ποσοστό διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών από διαλύματα ομογενοποιημένης μπάμιας σε διαφορετικές τιμές όξινου pH.

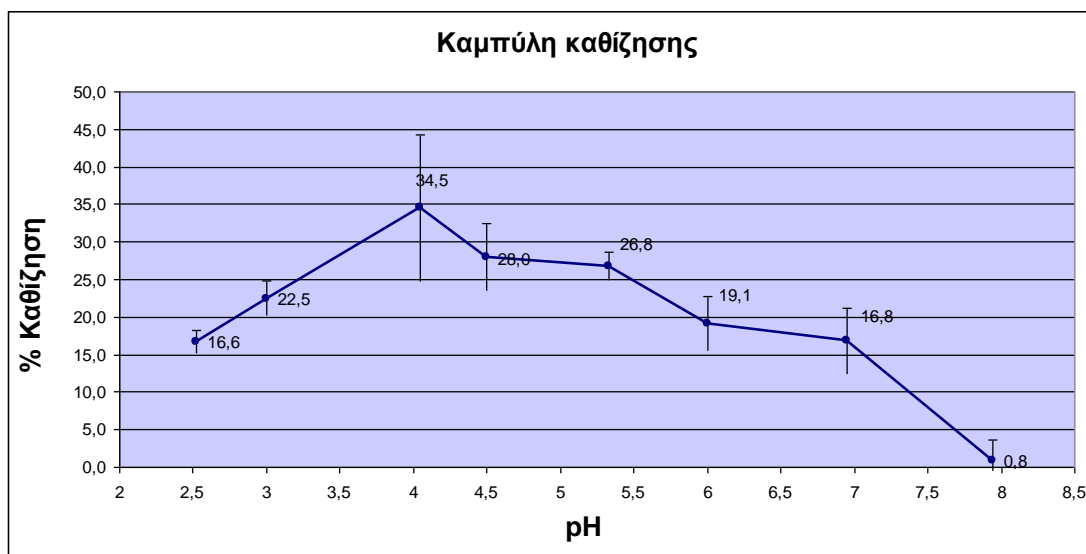
Τα συμπεράσματα καθώς και η καμπύλη διαλυτοποίησης προέκυψαν από τον υπολογισμό του θεωρητικού ποσοστού διαλυτοποίησης, βάση των φασμάτων απορρόφησης του αρχικού δείγματος μπάμιας και του δείγματος μετά την όξινη μεταχείριση. Στο Σχήμα 2. για την τιμή pH 1.5, παρατηρούμε το υψηλότερο ποσοστό διαλυτοποίησης σε σχέση με τα πιο αυξημένα pH (2.0, 2.5, 3.5), στα οποία δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Αντίθετα στο pH 3.0 παρατηρείται το χαμηλότερο ποσοστό διαλυτοποίησης.

Γενικά, οι πρωτεΐνες είναι διαλυτές σε έντονα πολικούς διαλύτες όπως το νερό. Η διαλυτότητα στο νερό εξαρτάται από το pH, τη συγκέντρωση των αλάτων καθώς και από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (Belitz et al. 2006).

Βάση των παραπάνω πειραμάτων αποδείχθηκε ότι η μέθοδος της αλκαλικής διαλυτοποίησης ήταν πιο αποδοτική από την μέθοδο της όξινης διαλυτοποίησης με μια διαφορά της τάξης του 50% περίπου. Η χαμηλή απόδοση της μεθόδου της όξινης διαλυτοποίησης πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η έκθεση σε χαμηλό pH μπορεί να οδήγησε σε υδρόλυση των πρωτεϊνών σε μικρότερα μόρια, με αποτέλεσμα να μην ήταν δυνατή η καθίζησή τους με τη φυγοκέντριση.

5.2. Βέλτιστο pH καθίζησης

Εφαρμόστηκε αλκαλική διαλυτοποίηση σε pH 10.5 σε δείγμα μπάμιας (1:10). Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό συγκεντρώθηκε και ακολούθησε πτώση του pH στις τιμές 8.0, 7.0, 6.0, 5.30, 4.5, 4.0, 3.0 και 2.5 με 1 ή 2N HCl, για να επέλθει η καθίζηση των πρωτεϊνών. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε αντίστοιχες φιάλες, ακολούθησε αναμονή για 30 λεπτά και κατόπιν φυγοκέντριση στις 5000rpm για 20min. Δείγματα από το υπερκείμενο υγρό κάθε φιάλης πάρθηκαν για τον προσδιορισμό του ποσοστού των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.

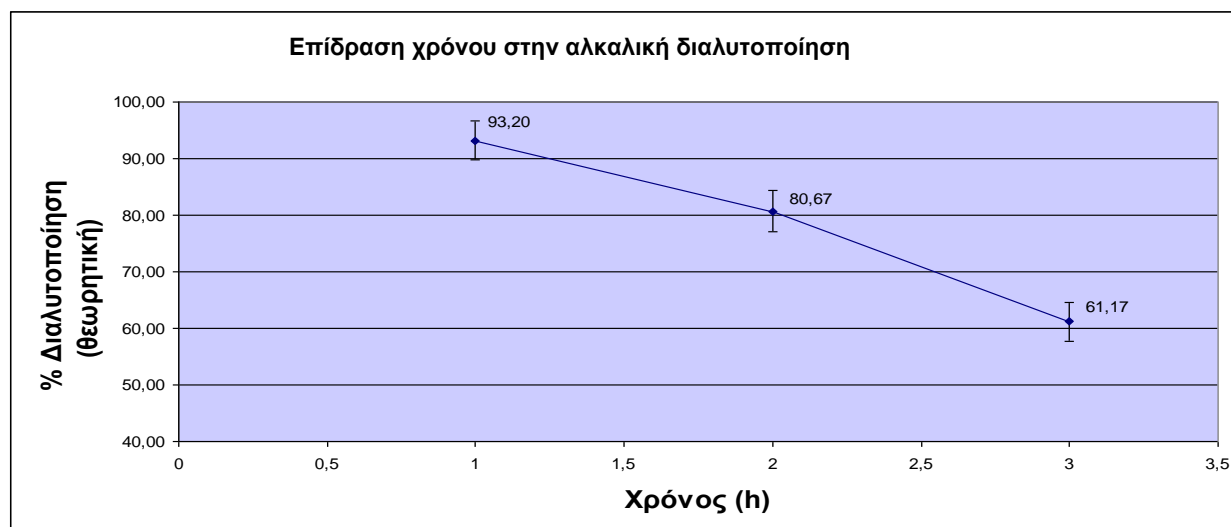


Σχήμα 3. Η καμπύλη αναφέρεται στο θεωρητικό ποσοστό των πρωτεϊνών που έχουν καθιζάνει σε χρονικό διάστημα 30min, σε διαφορετικές τιμές pH.

Στην καμπύλη καθίζησης (Σχήμα 3.) παρατηρούμε τα ποσοστά καθίζησης των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών σε σχέση με το pH. Ξεκινώντας από τα πολύ όξινα pH, παρατηρείται μια αύξηση του ποσοστού καθίζησης, που κορυφώνεται στο pH 4.0 και στη συνέχεια, ακολουθεί μείωσή του όσο προχωρεί στα πιο υψηλά pH. Αυτό πιθανόν συμβαίνει γιατί το μεγαλύτερο ποσοστό των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών του δείγματος μπάμιας που εξετάστηκε να έχουν ισοηλεκτρικό σημείο κοντά στο pH 4.5 ως αποτέλεσμα της θρόμβωσης και καθίζησης.

5.3. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου διαλυτοποίησης πρωτεϊνών

Δείγμα μπάμιας ομογενοποιήθηκε σε αναλογία 1:10 με νερό και στη συνέχεια εφαρμόστηκε η αλκαλική διαλυτοποίηση σε pH 10,5. Το διάλυμα παρέμεινε σε υψηλό pH για 3h. Κάθε ώρα απομονωνόταν ποσότητα διαλύματος και ακολουθούσε φυγοκέντριση στις 5000rpm. Δείγμα από το υπερκείμενο πάρθηκαν για προσδιορισμό πρωτεϊνών, ώστε να προσδιοριστεί ποια χρονική στιγμή δίνει το μέγιστο (θεωρητικό) ποσοστό διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών.



Σχήμα 4. Η διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο αναμονής του διαλύματος μπάμιας σε pH 10.5.

Από την καμπύλη διαλυτοποίησης (Σχήμα 4.) είναι εύκολο να διαπιστώσουμε ότι με το πέρασμα του χρόνου το ποσοστό διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών ελαττώνεται. Το βέλτιστο ποσοστό διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών παρατηρείται την 1^η ώρα αναμονής του διαλύματος μπάμιας στο αλκαλικό pH. Ακολουθεί πτώση του ποσοστού κατά 12,5%

την 2^η ώρα, η οποία συνεχίζεται και την 3^η ώρα αναμονής, μειώνοντας στο ποσοστό διαλυτοποίησης στο 61%. Είναι πιθανόν ότι αύξηση του χρόνου έκθεσης στο υψηλό pH να μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, ευνοώντας τη συσσωμάτωση και κατ' επέκταση την καθίζηση τους.

5.4. Δείγματα πριν τη λυοφιλίωση

5.4.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνών, υγρασίας και λίπους σε δείγματα μπάμιας και μπάμιας μετά από απολίπανση(defatted)

Σε δείγματα μπάμιας και μπάμιας μετά από απολίπανση με βουτυλική και αιθυλική αλκοόλη, εφαρμόστηκε η μέθοδος Lowry για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Επίσης, δείγματα τοποθετήθηκαν σε αλουμινένια δισκία, ζυγίστηκαν και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε φούρνο θερμοκρασίας 105 °C για 5 h. Τα δείγματα μετά το πέρας του χρόνου, αφέθηκαν να κρυώσουν σε αφυγραντήρα και τέλος ζυγίστηκε το τελικό τους βάρος με σκοπό τον υπολογισμό της υγρασίας.

Ο προσδιορισμός του λίπους έγινε με τη μέθοδο Lee-Folch. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον Πίνακα 7. που ακολουθεί. Παρατηρείται ότι κατά την απολίπανση απομακρύνεται μεγάλο ποσοστό της υγρασίας και του αρχικού λίπους. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ βουτυλικής και αιθυλικής αλκοόλης.

Πίνακας 7. Αναφορά ποσοστών υγρασίας, λίπους καθώς και το ποσοστό μείωσής του, μετά την εφαρμογή της μεθόδου της απολίπανσης με αιθυλική και βουτυλική αλκοόλη.

Δείγμα	% Πρωτεΐνη ± SD	%Υγρασία	%Λίπος επί ξηρού	% Μείωση λίπους
Μπάμια	2,12 ± 0,28	83,2	4,140	-
Μπάμια defatted βουτυλική	2,1 ± 0,21	16,48	0,047	98,86
Μπάμια defatted αιθυλική	2,43 ± 0,47	12,11	0,137	96,70

5.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών, υγρασίας και λίπους στο ίζημα από αλκαλική διαλυτοποίηση.

Δείγμα ιζήματος βάρους 1,63g που συγκεντρώθηκε μετά από την εφαρμογή της απομόνωσης με αλκαλική διαλυτοποίηση, καθώς και ιζήματα βάρους 2g από αλκαλική διαλυτοποίηση απολιπασμένης μπάμιας με βουτυλική και αιθυλική αλκοόλη, αναλύθηκαν με τη μέθοδο Lowry για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Λόγω της μικρής ποσότητας του τελικού ιζήματος από αιθυλική και αιθυλική αλκοόλη, για τα δείγματα αυτά προσδιορίστηκε μόνο το ποσοστό της πρωτεΐνης.

Πίνακας 8. Σύσταση ιζήματος μετά από την εφαρμογή της μεθόδου για την απομόνωση των πρωτεϊνών.

Δείγμα	% Υγρασία	% Λίπος επί ξηρού	% Πρωτεΐνης \pm SD
Ίζημα	93,3	3,85	6,96 \pm 0,24
Ίζημα βουτυλική	-	-	8,65 \pm 1,2
Ίζημα αιθυλική	-	-	8,57 \pm 1,68

Με βάση τα αποτελέσματα από τον πίνακα 8 παρατηρείται ότι το ίζημα από την αλκαλική διαλυτοποίηση έχει μικρότερο ποσοστό διαλυτοποιημένης πρωτεΐνης σε σχέση με την μέθοδο απολίπανσης ενώ δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στο ποσοστό πρωτεΐνης ανάμεσα στην αιθυλική και βουτυλική αλκοόλη.

5.5. Δείγματα μετά την λυοφιλίωση

5.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών, υγρασίας και λίπους στο ίζημα μετά τη λυοφιλίωση.

Εφαρμόστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες διαλυτοποίησης και καθίζησης σε δείγματα μπάμιας. Στο ίζημα που συγκεντρώθηκε, έγινε ξήρανση με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Στη συνέχεια η ποσότητα της σκόνης ενυδατώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:100 και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry. Η μέτρηση του λίπους και της υγρασίας έγιναν με τον ίδιο τρόπο, όπως περιγράφεται παραπάνω. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα ποσοστά των πρωτεϊνών, της υγρασίας και του λίπους, από το λυοφιλοποιημένο ίζημα μπάμιας και μπάμιας μετά από απολίπανση.

Μετά τη λυοφιλίωση η ποσότητα των δειγμάτων από απολίπανση, δεν ήταν ικανοποιητική για περαιτέρω ανάλυση του λίπους και της υγρασίας. Επίσης, λόγω της μικρής απόδοσης της διεργασίας της απολίπανσης για τη συγκέντρωση ιζήματος και της κατανάλωσης μεγάλης ποσότητας διαλυτών, δεν προχωρήσαμε σε νέα παραγωγή δειγμάτων.

Πίνακας 9. Σύσταση ιζήματος μπάμιας που συγκεντρώθηκε από την εφαρμογή της μεθόδου για απομόνωση πρωτεϊνών, μετά τη λυοφιλίωση.

Δείγμα	% Πρωτεΐνη \pm SD	%Λίπος	%Υγρασία
Ίζημα μπάμιας	77,14 \pm 2,8	0,92	3,3
Μπάμια defatted βουτυλική	54,84 \pm 12,6	-	-
Μπάμια defatted αιθυλική	54,43 \pm 1,8	-	-

5.5.2. Φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier

Στο δείγμα μπάμιας μετά την λυοφιλίωση εφαρμόστηκε η μέθοδος της φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) για την ανίχνευση πρωτεϊνικών δεσμών. Η καμπύλη απορρόφησης (Σχήμα 5.) έδωσε απορροφήσεις (Πίνακας 10.) οι οποίες δηλώνουν την ύπαρξη πρωτεϊνών.



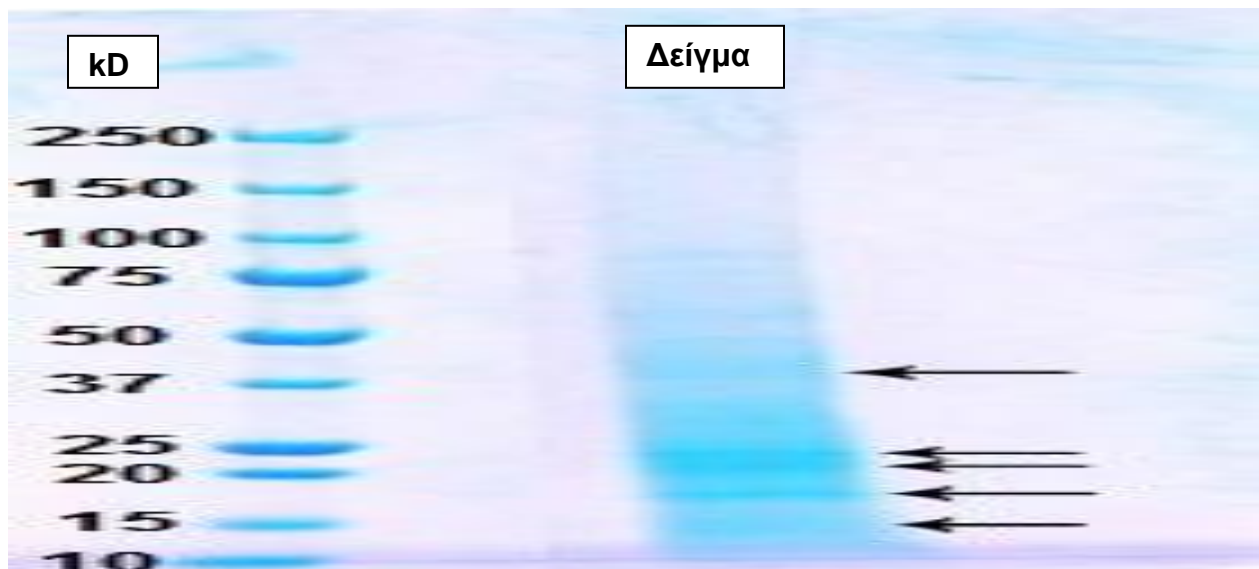
ABS cm ⁻¹	Χαρακτηριστική ομάδα
3274	H ₂ O
2925	Αλκάνιο (C-H)
1644	Αμίδιο 1 (C=O)
1538	Αμίδιο 2 (N-H)
1444	Αρωματικό (C=C)
1034	(C-O) ή (C-N)

Σχήμα 5. Φάσμα απορρόφησης ιζήματος μπάμιας από αλκαλική διαλυτοποίηση Πίνακας 10 (δεξιά). Τιμές απορρόφησης που προκύπτουν από τη μέθοδο FTIR για το δείγμα μπάμιας και οι αντίστοιχες χαρακτηριστικές ομάδες.

Με βάση τις κορυφές του Σχήματος 5., το δείγμα περιείχε τις χαρακτηριστικές ομάδες N-H και C=O, κάτι που αιτιολογεί την πιθανή ύπαρξη πρωτεϊνών σε αυτό

5.5.3. SDS PAGE

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους αλλά και το μοριακό τους βάρος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πηκτής (SDS Page). Το δείγμα τοποθετήθηκε στο πάνω μέρος του gel και αναλύθηκε. Η πρώτη στήλη περιέχει μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται ως δείκτες ενώ η δεύτερη το πρωτεϊνικό δείγμα μπάμιας. Η ένταση του χρώματος είναι ενδεικτικό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενώ τα βέλη υποδεικνύουν τις διαχωριζόμενες πρωτεΐνες(εικόνα 3). Με βάση το μοριακό βάρος και από όσο μπορούμε να διακρίνουμε το δείγμα περιέχει αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη με kD 22, κυσίνη με kD 20 και θειούχα αμινοξέα όπως γλουταθειόνη με kD 32 (Weber K., & Osborn M., 1969).



Εικόνα 3. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πηκτής (SDS Page) δείγμα πρωτεϊνών μπάμιας.

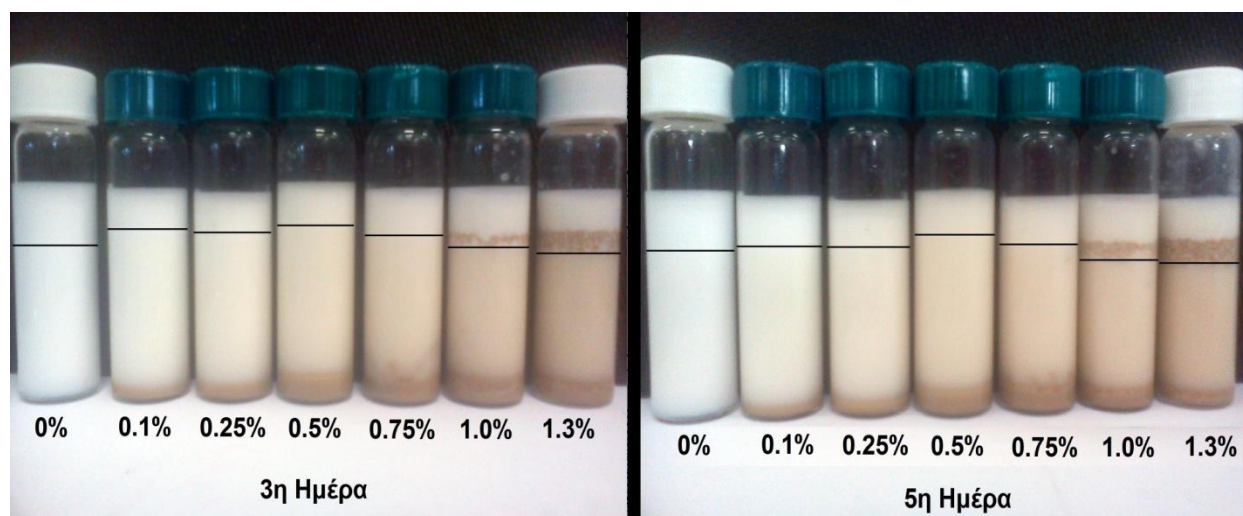
5.6. Φυσικοχημική ανάλυση

5.6.1. Γαλακτοματοποιητική ικανότητα των πρωτεϊνών

Διάλυμα Triss buffer και νιτραζιδίου ολικού pH 7.0, περιεκτικότητας 1% σε πρωτεΐνη μπάμιας ομογενοποιήθηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα για 1 ημέρα . Στη συνέχεια έγινε προσθήκη δεκαεξανίου 10% επί της συνεχούς φάσης και ακολούθησε ομογενοποίηση 30s σε ομογενοποιητή υπερήχων. Έγινε επανάληψη του πειράματος δύο φορές. Το αποτέλεσμα μετά το πέρας της ομογενοποίησης ήταν ότι η πρωτεΐνη δημιούργησε κροκιδώματα, καθιστώντας αδύνατη τη δημιουργία γαλακτώματος. Συμπερασματικά η πρωτεΐνη του δείγματος δεν έχει καλή γαλακτοματοποιητική ικανότητα.

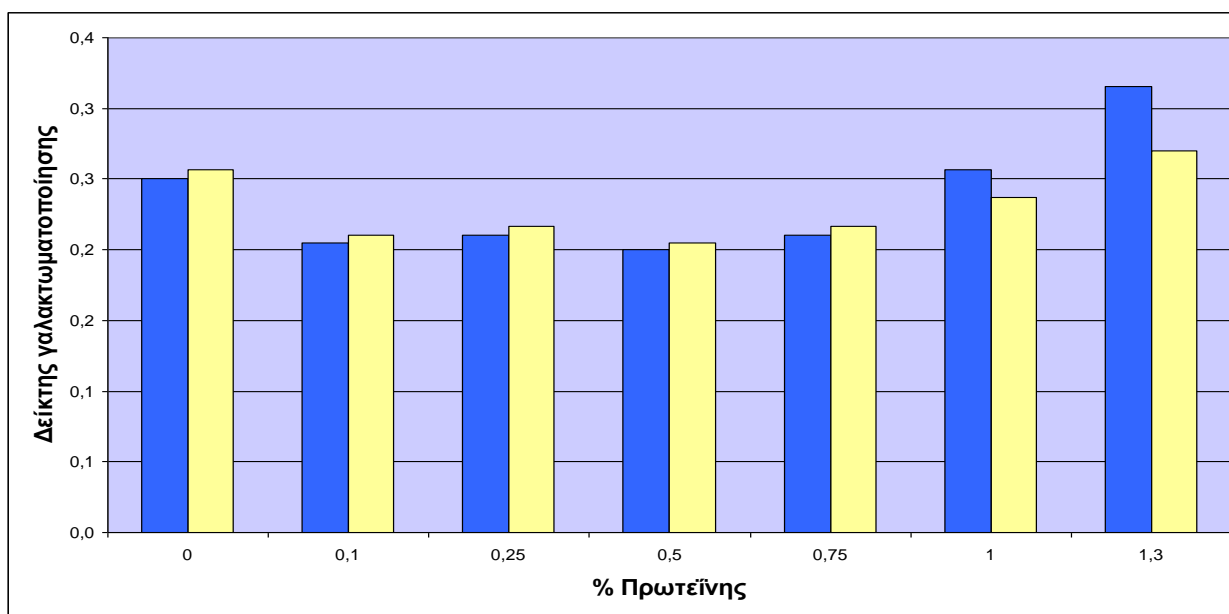
5.6.2. Σταθεροποιητική ικανότητα των πρωτεϊνών

Παρασκευάστηκαν γαλακτώματα με διαφορετικές περιεκτικότητες σε πρωτεΐνες (0%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% και 1.3%), για τον έλεγχο της σταθεροποιητικής ικανότητάς τους σε γαλάκτωμα δεκαεξανίου. Ακολούθησε εποπτεία της αποκορύφωσης των δειγμάτων την 3^η και 5^η ημέρα.



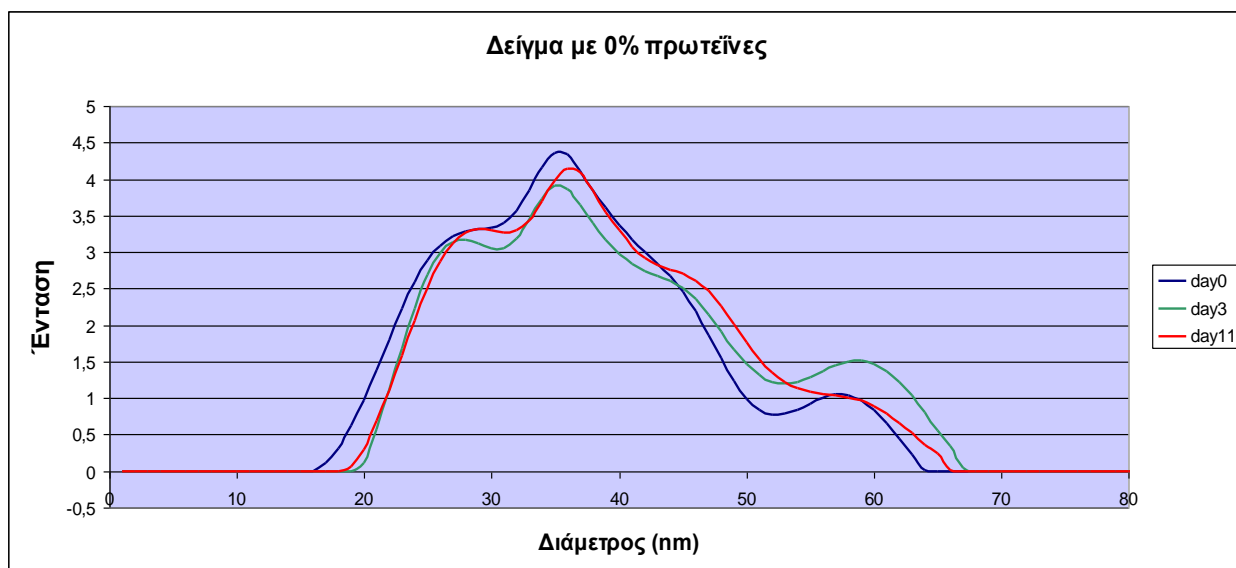
Εικόνα 4. Φωτογραφίες από γαλακτώματα διαφορετικών πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων αμέσως μετά την αποκορύφωση ορού, την 3^η και 5^η ημέρα.

Από το οπτικό αποτελέσματα των γαλακτωμάτων της εικόνας 4., δεν ήταν εύκολο να διαπιστωθεί διαφορά μεταξύ των δειγμάτων της 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας. Για να είναι πιο σαφής η εικόνα της αποκορύφωσης των γαλακτωμάτων, υπολογίστηκε τον “δείκτη γαλακτωματοποίησης” (ύψους του ορού / συνολικό ύψος του γαλακτώματος). Όπως παρατηρούμε στο Σχήμα 6. τα γαλακτώματα με ποσοστό περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες από 0.1-0.75%, έχουν μειωμένο δείκτη γαλακτωματοποίησης σε σύγκριση με τον μάρτυρα (0%), κάτι που δηλώνει ότι οι πρωτεΐνες για τις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις, έδρασαν ως σταθεροποιητές. Αντίθετα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις με 1.0 και 1.3%, παρουσίασαν τον ίδιο και μεγαλύτερο δείκτη γαλακτωματοποίησης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.



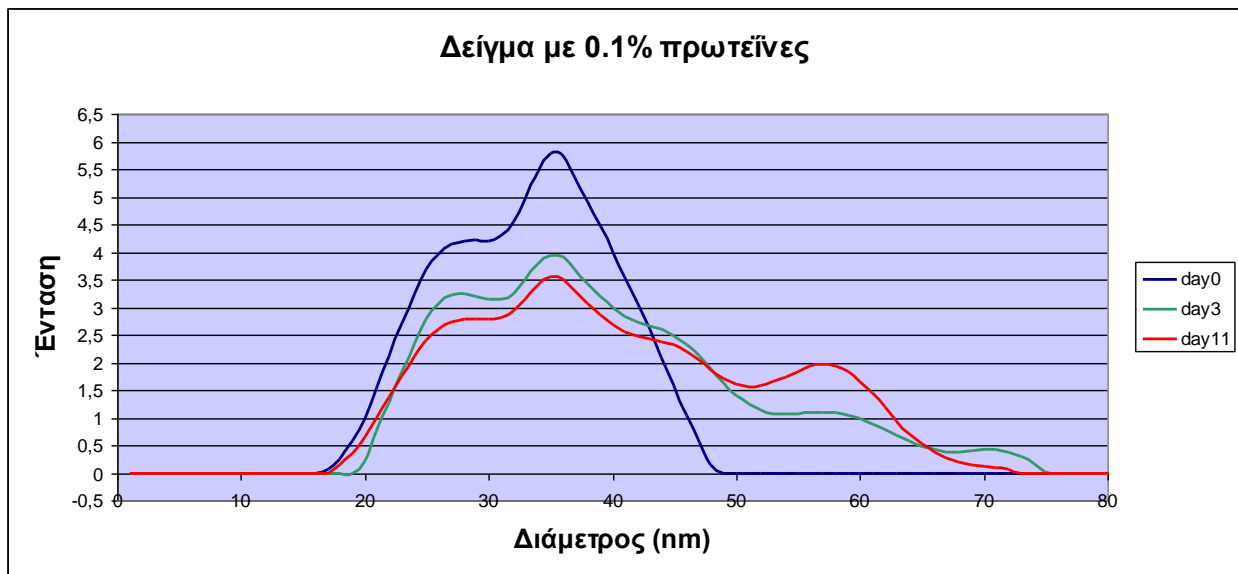
Σχήμα 6. Ανάπτυξη της αποκορύφωσης σε δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων σε πρωτεΐνες την 3^η (μπλε) και την 5^η ημέρα (κίτρινο).

Παράλληλα έγιναν μετρήσεις με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης του φωτός (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων των γαλακτωμάτων, την 1^η, 3^η και 11^η ημέρα. Στα διαγράμματα που ακολουθούν αναπαριστώνται οι καμπύλες κατανομής των σωματιδίων για κάθε γαλάκτωμα ξεχωριστά (Σχήμα 7– 13).



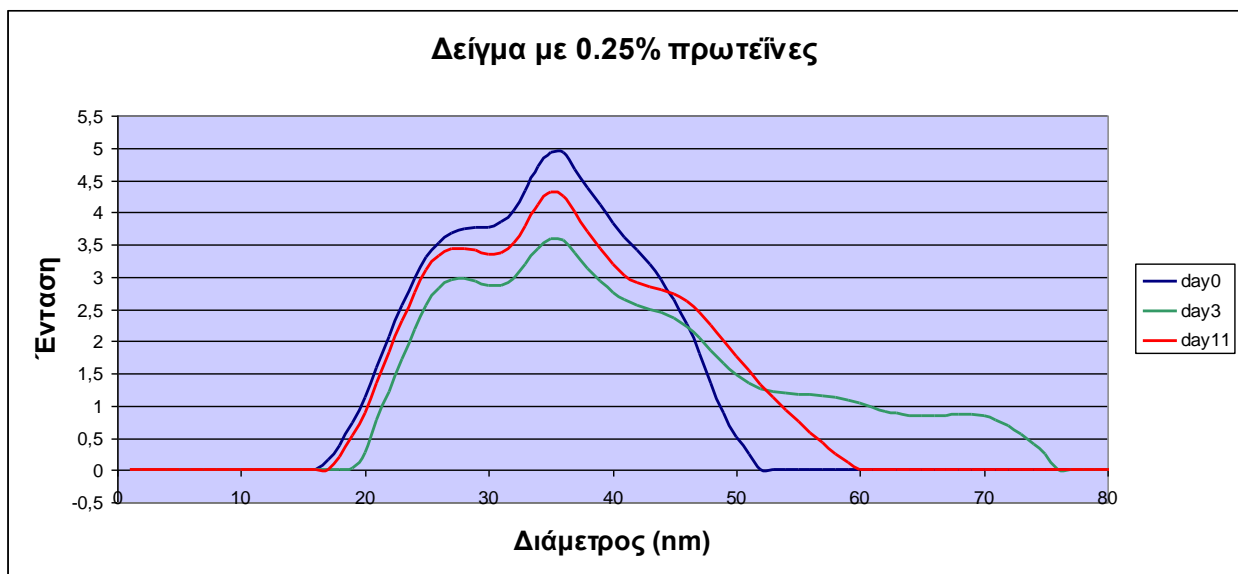
Σχήμα 7. Καμπύλες κατανομής σωματιδίων του γαλακτώματος (0% πρωτεΐνη) βάση του μεγέθους τους, την 0^η, 3^η και 11^η ημέρα.

Το Σχήμα 7. αναφέρεται στο γαλάκτωμα με 0% συγκέντρωση πρωτεΐνης και οι καμπύλες σε αυτό, τις αντίστοιχες ημέρες μέτρησης των σωματιδίων. Με την πάροδο των ημερών παρατηρούμε μία μικρή μείωση του ύψους της καμπύλης και μετατόπιση της κορυφής προς τα δεξιά. Αυτό σημαίνει μείωση της συγκέντρωσης των μικρών σταγονιδίων και παράλληλη αύξηση των μεγαλύτερων, ως αποτέλεσμα της συσσωμάτωσής τους σε μεγαλύτερου μεγέθους σταγονίδια. Στα γαλακτώματα με ποσοστό πρωτεΐνης 0.1 και 0.25% το φαινόμενο είναι πιο εμφανές, δηλαδή μείωση του ύψους των κορυφών και μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Στο Σχήμα 8. αυτό που παρατηρείται πιο έντονα, είναι ότι την 11^η ημέρα έχουμε μείωση του ύψους της αρχικής κορυφής και δημιουργία μίας δεύτερης κάτι που δηλώνει αύξηση της συσσωμάτωσης των σταγονιδίων με το πέρασμα των ημερών. Αντίθετα το γαλάκτωμα με περιεκτικότητα



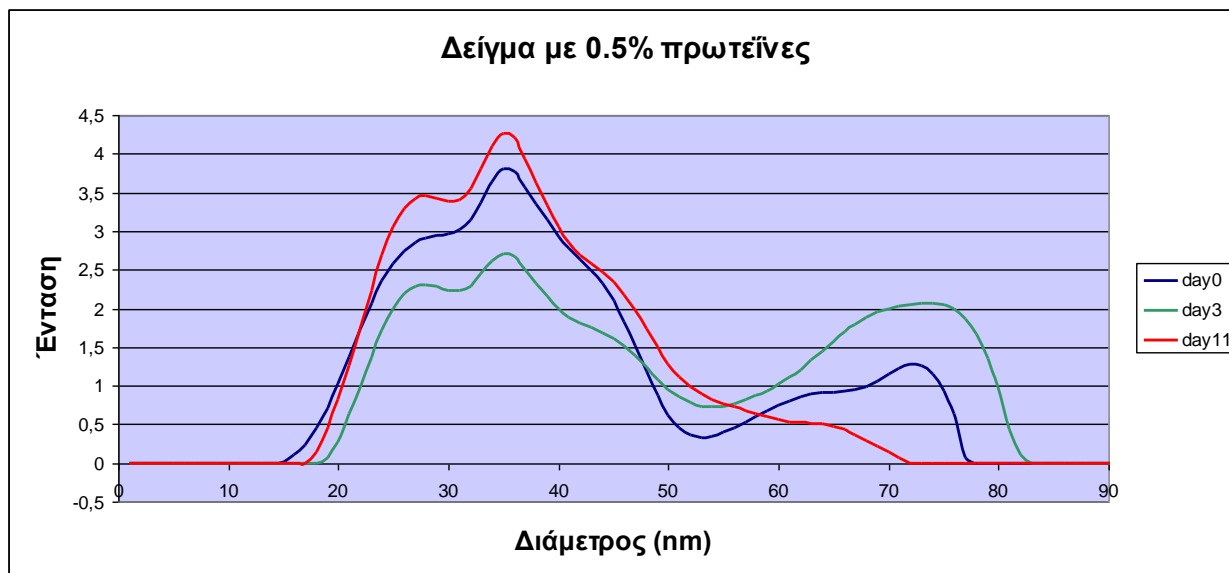
Σχήμα 8. Καμπύλες κατανομής σωματιδίων του γαλακτώματος (0.1% πρωτεΐνη) βάση του μεγέθους τους, την 0^η, 3^η και 11^η ημέρα.

0.25% σε πρωτεΐνες, ενώ παρατηρείται μια μείωση της κορυφής και ταυτόχρονη μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά, την 11^η ημέρα η κορυφή της καμπύλης αυξάνεται και έχουμε μετατόπιση προς τα αριστερά. Κάτι ανάλογο παρατηρείται για το γαλάκτωμα με 0.5% πρωτεΐνες (Σχήμα 9.), με τη διαφορά ότι την 11^η μέρα το ύψος της κορυφής, ξεπερνά ακόμα και αυτό της πρώτης ημέρας. Παρόλο που την πρώτη ημέρα παρατηρούμε μια συγκέντρωση σταγονιδίων μεγαλύτερα των 50nm, η οποία συνεχίζει να αυξάνεται την 3^η ημέρα, την 11^η ημέρα επέρχεται μείωσή τους, αυξάνοντας τη συγκε

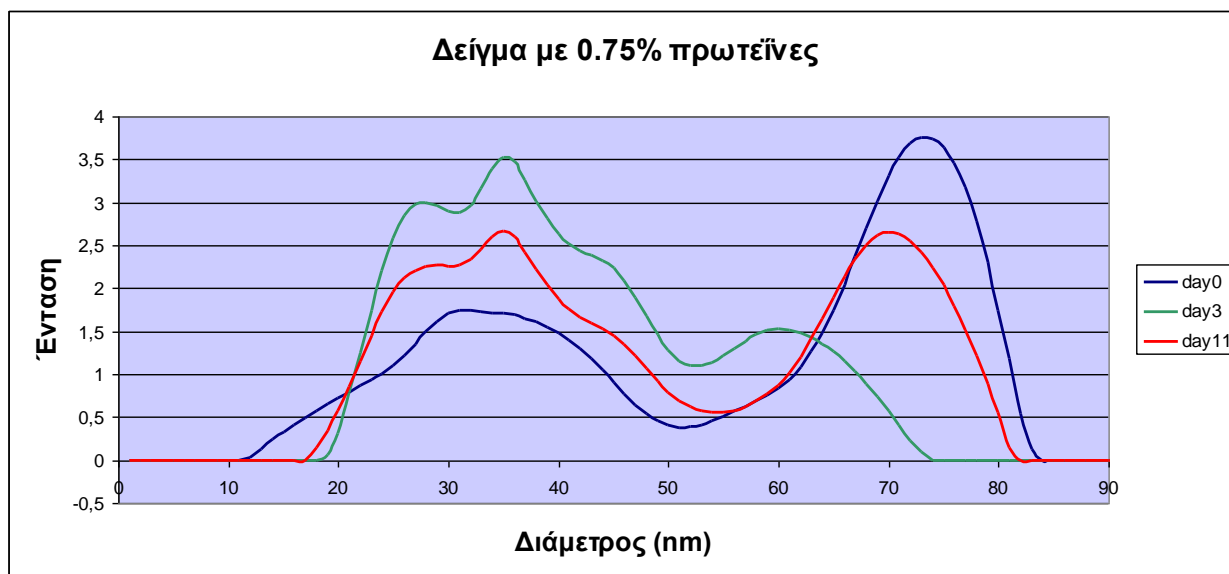


Σχήμα 9. Καμπύλες κατανομής σωματιδίων του γαλακτώματος (0.25% πρωτεΐνη) βάση του μεγέθους τους, την 0^η, 3^η και 11^η ημέρα

ντρωση των μικρότερων σταγονιδίων ($\leq 40\text{nm}$). Καθώς το ποσοστό των πρωτεϊνών στο γαλάκτωμα μεγαλώνει στο 0.75% (Σχήμα 11.), παρατηρούμε ήδη από της πρώτες ώρες αυξημένη συγκέντρωση, μεγαλύτερου μεγέθους σωματιδίων ($\geq 60\text{nm}$). Την 3^η ημέρα η καμπύλη μετατοπίζεται αριστερά ως αποτέλεσμα της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων. Τελικά την 11^η ημέρα η καμπύλη μετατοπίζεται προς τα δεξιά, έχοντας δυο κορυφές δηλώνοντας τόσο την ύπαρξη μικρών, όσο και μεγαλύτερων σωματιδίων. Στο

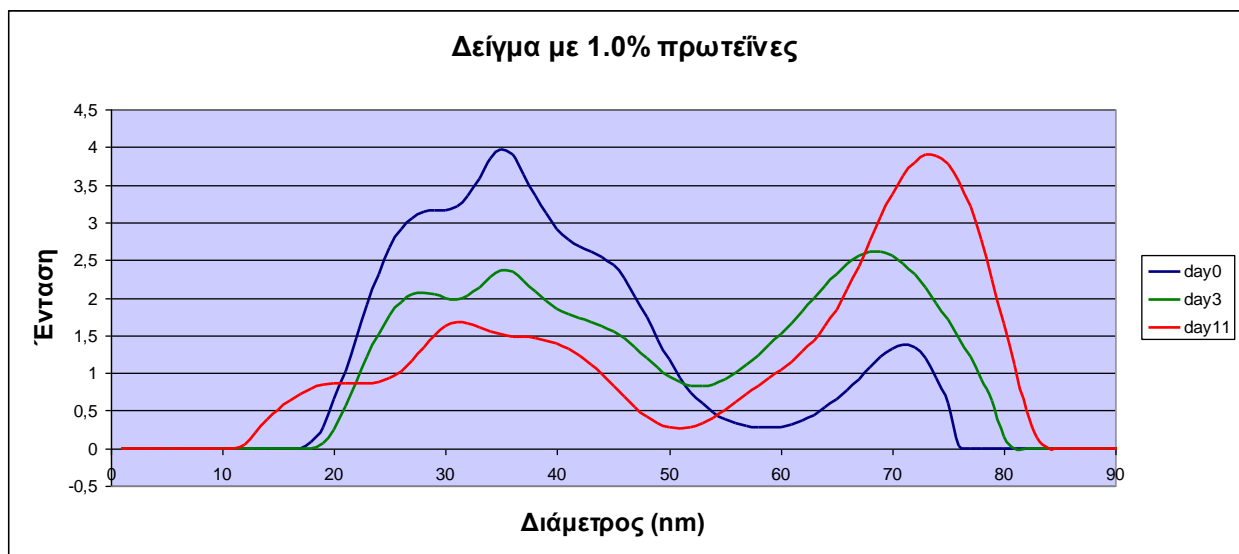


Σχήμα 10. Καμπύλες κατανομής σωματιδίων του γαλακτώματος (0.5% πρωτεΐνη) βάση του μεγέθους τους, την 0^η, 3^η και 11^η ημέρα.

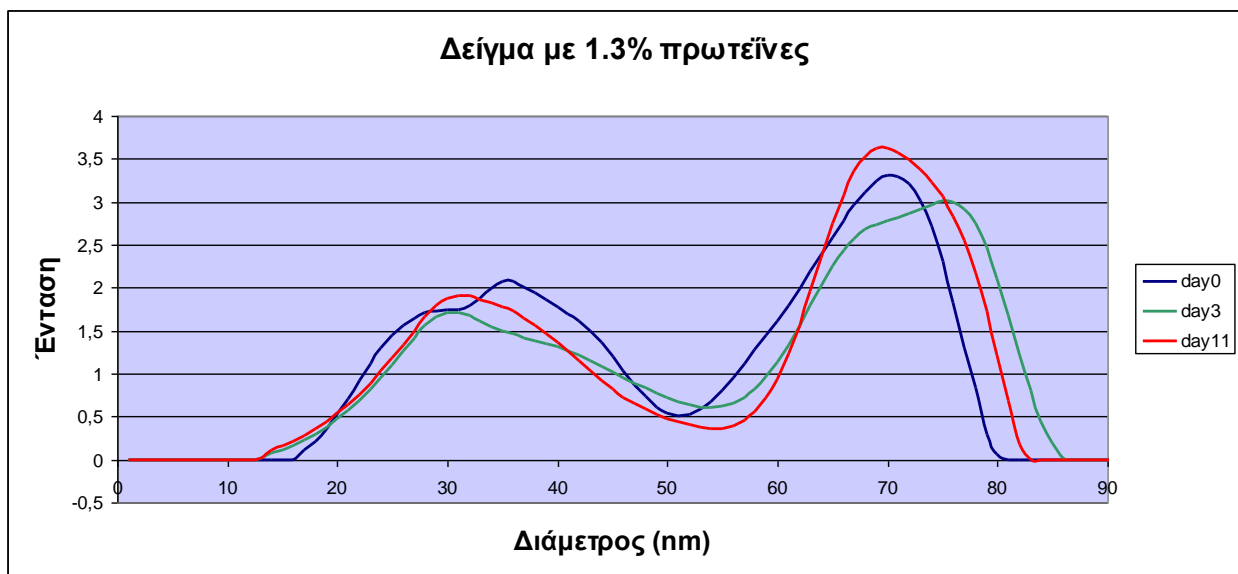


Σχήμα 11. Καμπύλες κατανομής σωματιδίων του γαλακτώματος (0.75% πρωτεΐνη) βάση του μεγέθους τους, την 0^η, 3^η και 11^η ημέρα.

Σχήμα 12. που ακολουθεί, ήδη από τις πρώτες ώρες παρατηρούμε την ύπαρξη μεγάλων σταγονιδίων. Την 3^η ημέρα η καμπύλη μετατοπίζεται προς τα δεξιά ως αποτέλεσμα της αύξησης του ποσοστού των συσσωματωμάτων και της μείωσης των μικρότερων, όπως είναι εμφανής και η ποσότητα του ορού που έχει διαχωριστεί στην Εικόνα 4.. Την 11^η ημέρα συνεχίζεται η μείωση της συγκέντρωσης των μικρών σταγονιδίων ($\leq 50\text{nm}$) και η αύξηση των συσσωμάτων, μετατοπίζοντας την καμπύλη κατανομής ακόμα πιο δεξιά. Τέλος στο Σχήμα 13. το μεγαλύτερο μέρος της καμπύλης είναι μετατοπισμένο δεξιά, που σημαίνει αυξημένη συγκέντρωση των μεγάλων σταγονιδίων και τις τρεις ημέρες που έγιναν οι μετρήσεις. Αυτό φαίνεται και από τον αυξημένο δείκτη γαλακτωματοποίησης (Σχήμα 6) και την αποβολή ορού (Εικόνα 4.)



Σχήμα 12. Καμπύλες κατανομής σωματιδίων του γαλακτώματος (1.0% πρωτεΐνη) βάση του μεγέθους τους, την 0^η, 3^η και 11^η ημέρα.

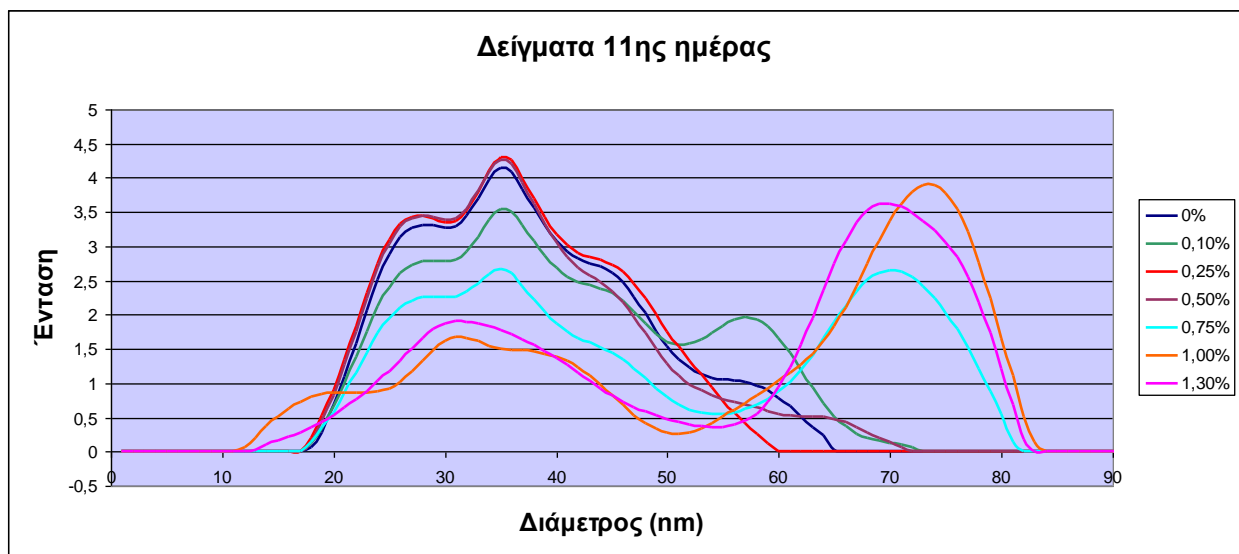


Σχήμα 13. Καμπύλες κατανομής σωματιδίων του γαλακτώματος (1.3% πρωτεΐνη) βάση του μεγέθους τους, την 0^η, 3^η και 11^η ημέρα

Παρατηρώντας τις φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 5.), παρουσιάζεται άμεση συσχέτιση με τις καμπύλες που παίρνουμε από τη δυναμική σκέδαση φωτός την 11^η ημέρα. Στο γαλάκτωμα με 0% περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες διακρίνεται μια ομοιομορφία των σταγονιδίων στο σώμα του γαλακτώματος. Στο σύνολο τα σταγονίδια της λιπαρής ύλης είναι μικρού μεγέθους, ως αποτέλεσμα της δράσης του Twin20. Η προσθήκη 0.1% πρωτεΐνης δείχνει ότι επηρεάζει το μέγεθος των σταγονιδίων. Στο γαλάκτωμα υπάρχουν πλέον και μεγαλύτερου μεγέθους σταγονίδια (Εικόνα 5.), κάτι που φαίνεται και στην αντίστοιχη καμπύλη του Σχήματος 13. Ωστόσο, η πλειοψηφία ανήκει στα μικρού μεγέθους σταγονίδια. Καθώς η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται (0.25%), δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά όσον αφορά το μέγεθος και του αριθμού των σωματιδίων (Εικόνα 5.).

Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την καμπύλη που δίνεται από το Mastersizer, πιθανόν λόγω της κακής δειγματοληψίας ή της έντονης ανακίνησης του γαλακτώματος πριν τη μέτρηση. Το γαλάκτωμα με 0.5% σε πρωτεΐνες δείχνει να είναι πιο σταθερό σε σύγκριση με αυτά των 0.1 και 0,25%. Μικρού μεγέθους σταγονίδια υπάρχουν σε όλο το σώμα του

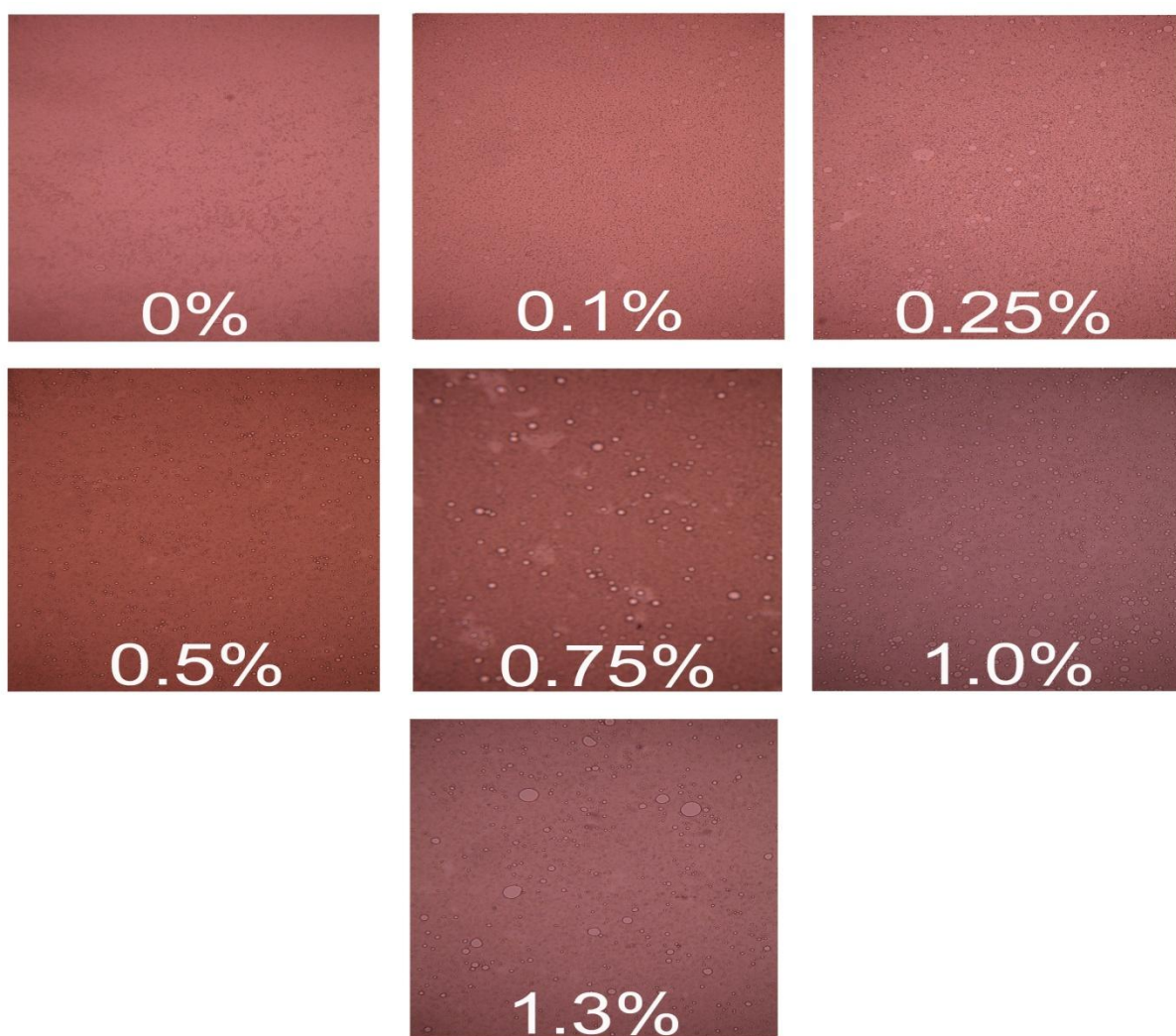
γαλακτώματος, χωρίς την εμφάνιση συσσωματωμάτων, όπως φαίνεται και από την καμπύλη που δίνεται από το Mastersizer. Αντίθετα στο γαλάκτωμα με 0.75% σε πρωτεΐνες (Εικόνα 5.), τα σταγονίδια είναι αρκετά μεγαλύτερα όπως άλλωστε δείχνει και η καμπύλη κατανομής των σωματιδίων, συγκέντρωση τόσο των σταγονιδίων με διάμετρο από 20-50nm, όσο και σταγονίδια με διάμετρο από 60-80nm. Το φαινόμενο γίνεται εντονότερο για τα γαλακτώματα με 1.0 και 1.3% σε πρωτεΐνες, όπου η παρατηρούνται αρκετά συσσωματώματα, κάτι που φαίνεται τόσο στις καμπύλες κατανομής του Σχήματος 14., όσο και στην Εικόνα 5.



Σχήμα 14. Καμπύλες κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων από τα γαλακτώματα την 11^η ημέρα.

5.6.3. Μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal laser scanning microscopy)

Με την μέθοδο μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal laser scanning microscopy) πάρθηκαν φωτογραφίες από για δείγματα τις 11^{ης} ημέρας όπου παριστάνονται τα συμπεράσματα από το σχήμα 14 και αποδεικνύουν ότι το γαλάκτωμα με 0.5% σε πρωτεΐνες δείχνει να είναι πιο σταθερό σε σύγκριση με αυτά των 0.1 και 0,25% εξαιτίας του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων που υπάρχουν σε όλο το σώμα του γαλακτώματος, χωρίς την εμφάνιση συσσωματωμάτων.



Εικόνα 5. Φωτογραφίες των γαλακτωμάτων από μικροσκόπιο, την 11^η ημέρα.

6. Συμπεράσματα

Παρατηρήθηκε ότι το μέγιστο ποσοστό κατά την αλκαλική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε pH 10.5 ενώ στην όξινη διαλυτοποίηση σε pH 1.5. Βάση των παραπάνω πειραμάτων αποδείχθηκε ότι η μέθοδος της αλκαλικής διαλυτοποίησης ήταν πιο αποδοτική από την μέθοδο της όξινης διαλυτοποίησης με μια διαφορά της τάξης του 50% περίπου.

Επιπλέον παρατηρήσαμε πως το γαλάκτωμα με 0.5% περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες δείχνει να είναι πιο σταθερό σε σύγκριση με αυτά των 0.1 και 0,25%. Μικρού μεγέθους σταγονίδια υπάρχουν σε όλο το σώμα του γαλακτώματος, χωρίς την εμφάνιση συσσωματωμάτων, όπως φαίνεται και από την καμπύλη που δίνεται από το Mastersizer. Το ίδιο παρατηρείται με την μέθοδο μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal laser scanning microscopy) όπου οι φωτογραφίες που πάρθηκαν για τα δείγματα της 11ης ημέρας αποδεικνύουν ότι το γαλάκτωμα με 0.5% σε πρωτεΐνες δείχνει να είναι πιο σταθερό σε σύγκριση με αυτά των 0.1 και 0,25% εξαιτίας του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων που υπάρχουν σε όλο το σώμα του γαλακτώματος, χωρίς την εμφάνιση συσσωματωμάτων. Αυτό οφείλεται στη συσσωμάτωση των σταγονιδίων λόγω χαμηλών απωθητικών δυνάμεων και ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών με αποτέλεσμα την μείωση της διαλυτότητας και απορροφητικότητας αυτών.

Μετά το πέρας όλων των πειραματικών διαδικασιών καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα μπάμιας έχουν κάποια γαλακτωματοποιητική ικανότητα η οποία συγκριτικά με άλλα τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες όπως αυγού και σόγιας, θεωρείτο μικρή στις συνθήκες που εξετάστηκαν.

7.Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Ολοκληρώνοντας την παρούσα πτυχιακή εργασία θα θέλαμε να αναφερθούμε σε κάποιες μελλοντικές έρευνες οι οποίες θα βοηθούσαν είτε στην καλύτερη κατανόηση και επεξήγηση της αστάθειας των γαλακτωμάτων με εκχυλίσματα μπάμιας είτε θα ερευνούσαν διάφορες μεθόδους βελτίωσης της σταθερότητας.

Θα ήταν καλό αν γινόταν μια μέτρηση των πηκτινών που έχουν απορροφηθεί στην επιφάνεια των πρωτεϊνών τα οποία είναι ήδη απορροφημένα στην διεπιφάνεια, ακόμα περισσότερο θα βοηθούσε η μελέτη της δομής των πρωτεϊνών στην διεπιφάνεια.

Μετάπειτα, θα μπορούσε να γίνει μια μελέτη για τις αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν μεταξύ των πρωτεϊνών και των πηκτινών και πως αυτό επηρεάζει την διαλυτότητα και την προσροφητικότητα των πρωτεϊνών στην διεπιφάνεια.

Τέλος θα ήταν καλό να μελετηθεί η γαλακτωματοποιητική ικανότητα των εκχυλισμάτων σε διάφορες τιμές pH, όπως ακόμα η προσθήκη διαφόρων αλάτων στα γαλακτώματα.

8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής

Abu-Tarbush H.M., & Ahmed S.B., (1996). Studies on karkade (*Hibiscus sabdariffa*)Q protease inhibitor, in vitro protein digestibility & gossy-pol content. *Food Chemistry* 56(1):15-19.

Adelakun O.E., O.J. Oyeladea, B.I.O. Ade-Omowayea, I.A. Adeyemia, M. Byler, D.M. & Susi, H. (1986) *Biopolymers* 25, 469-487 *Food & Chemical Toxicology*, 47, 1123–1126. Experimental methods & general theory. *Journal Chemistry Physics*1956, 25: 534–549.

Adetuyi F.O., A.U. Osagie, A.T. Adekunle.(2011). Nutrient, antinutrient, mineral & zinc bioavailability of okra *Abelmoschus esculentus* (L) Moench Variety. *American journal of food & nutrition*, 1, 49-54.

Ames J.M., & Macleod G., (1990). Volatile components of okra. *Phytochemistry*, 29, 1201-1207.

Baoru Y., Deng W.,Huang X.K., Yao L.P., (2012). Stable nano-sized emulsion produced from soy protein & soy polysaccharide complexes. *Journal of Colloids & Interface Science*, 380, 51-59.

Belitz D.H., Grosch W., Schieberle P., (2006). Χημεία τροφίμων, 3η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Bhat U.R., Tharanathan R.N., (1987). Functional properties of okra (*Hibiscus esculentus*) mucilage. *Starch* 39:165-167.

Bligh, E.G. & Dyer W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction & purification. *Canadian. Journal of Biochemistry & Physiology.*, 37: 911-917.

Brückner J., Mieth G., Weigalt E., (1984). Albumingewinnung mittels Stärkesulfaten & Xanthosoma-polysacchariden. *Nahrung* 28:867.\

Calisir S.,Ozcan M., Haciseferogulları H., Yildiz M.Y., (2005). A study on some physico-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta* L.) seeds. *Journal of Food Engineering*, 68, 73–78.

Chen L., Chen J., Zhao J.R.M., (2011). Modification of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment & controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 25, 887-897.

Costantino A.J., & Romanchik-Cerpovicz J.E.,(2004). Physical & sensory measures indicate moderate fat replacement in frozen dairy dessert is feasible using okra gum as a milk-fat ingredient substitute. *Journal of the American dietetic association*, 104, 44.

El-Mahdy A.R., & El-Sebaiy L.A., (1983). Preliminary Studies on the Mucilages Extracted from Okra Fruits, Taro Tubers, Jew's Mellow Leaves & Fenugreek Seeds. *Food Chemistry* 14 (1984) 237-249.

Glicksman, M., (1969). Ed. Gum technology in the food industry. *Academic Press, London*, Ch. 14, p. 509.

Hamada, J.S., (1996). Separation & molecular mass distribution of rice proteins by size-exclusion high performance liquid chromatography in a dissociating buffer. *Journal Chromatography. A*. 734:195-203.

Hirose K., Endo K., Hasegawa K., (2004). A convenient synthesis of lepidimoide from okra mucilage & its growth promoting activity in hypocotyls carbohydrate polysaccharides. 339:9-19.

Hultin H.O., & Kelleher S.D., (2000). High efficiency alkaline protein extraction. Patent US6136959.

Jambhale, N.D. & Nerkar Y.S., (1998). Okra In: Handbook of Vegetable Science & Technology, production, composition, storage & processing. (Salunkhe DK & Kadam SS, Eds.),Marcel Dekkar, Inc. New York. pp: 589-607.

Jideani V.A., & Bello B.M., (2009). Functional properties of okra protein products containing different levels of mucilage. *Journal of Food,Agriculture & Environment*, 7, 252-255.

Jideani V.A., & Bello B.M., (2009). *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.7 (2) : 252 - 255 .

Jones I.K.N. & Smith F., (1945). Plant gums & mucilages. *Advances in Carbohydrate Chemistry.*, 4, 243-91.

Karakoltsidis, P. A., Constantinides, S. M. (1975). Okra seed: A new protein source. *Journal of Agricultural & Food chemistry*, 23, 1204–1207.

Kim J., Aaurre C., de Pablo S., (1985). Functional properties of lupin protein isolates (*Lupinus albus* co Multolupa). *Journal Food Science*. 50: 82.

Kinsella J.E., Damodaran S., German B., (1985). Physiochemical & functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins Ch. 5. In "New Protein Foods, seed Storage. Proteins." Vol 5, A.M. Altschul & H.L. Wilcke (Ed.), p. 107. *Academic Press, Inc., Orl&o, FL*.

Kong J., & Shaoning Y.U., (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, *Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai* , 39(8): 549–559.

Kontogiorgos V., Biliaderis C.G., Kiosseoglou V., Doxastakis G., (2004). Stability & rheology of egg-yolk-stabilised concentrated emulsion containing cereal β -glucans of varying molecular size. *Food Hydrocolloids*,18,987-998.

Laemmli U.K., Molbert E., Showe M., & Kellenberger E., (1970) *Journal of Morecural Biology* 49. 99-113.

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

Lengsfeld C., Titgemeyer F., Faller G, Hensel A. (2004b). Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Journal. Of Agricultural & Food Chemistry*. 52, 1495-1503.

Lissant, K.J.,(1974). Ed. *Emulsions & emulsion technology*; Marcel Dekker: New York; Parts 1 & 2, Part 3, 1984.

Longe O.G., Fetuga B. L., Akenova M. E., (1982). Changes in the composition & carbohydrate constituents of okra (*Abelmoschus Esculentus*, Linn.) with age. *Food Chemistry*, 8, 27-32.

Lowry O. H., Rosenburgh N. J., Farr A. L., R&all R. J., (1951). Protein estimation with the folin ciocalteu reagent. *Journal.of Biological. Chemistry.*, 193, 265-75.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., R&all R. J., (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal Biological Chemistry*. 193: 265-275.

Malik, C. P., & Srivastava, A. K. (1982). Text book of plant physiology. New Delhi: Ludhiana.

Martin F.W., & Ruberte R., (1979). Milling & use of okra seed meal at the household level. *Journal. Agricultural. Univercity of. Puerto Rico*, 63: 1-7.

- McClements D.J., & Yan L., (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion & release of lipophilic food components. *Advances in Colloid & Interface Science*, 159, 213–228.
- McGarvie, D., & Parolis, H. (1979a). Analysis of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Research*, 69, 171–179.
- Ndjouenkeu R., F.M. Goycoolea, E.R. Morrisav, J.O. Akingbala. (1996). Rheology of okra (*Hibiscus esculentus* L.) & dika nut (*Irvingia gabonensis*) polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 29, 263-269.
- Ndjouenkeu R., Goycoolea F.M., Morris E.R, Akingbala J.O., (1996). Rheology of okra (*Hibiscus esculentus* L.) & dika nut (*Irvinia gabonensis*) polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 29: 263-269.
- Neiryneck N., P. Van der Meeren S., Gorbe B., Dierckx S., Dewettinck K., (2004). Improved emulsion stabilizing of whey protein isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocolloids*, 18, 949-957.
- Pearson D., (1970). General methods. The chemical analysis of foods, 6th ed. Churchill, London, p. 23.
- Romanich- Cerpovicz J.E., Tilmon R.W., Baldree K.A., (2002). Moisture retention & consumer acceptability of chocolate bar cookies prepared with okra gum as a fat ingredient substitute. *Journal of the American dietetic association*, 102, 1301-1303.
- Romanich-Cerpovicz J.E., Costantino A.C., Gunn L.H.,(2006). *Journal of the American dietetic association*, 106, 594-597.
- Rubatzky V.E & Yamaguchi M., (1997). World vegetables. Principles, production & nutritive values. 2nd Ed. Inter. Thomson Publ., New York. Pp. 681 – 686.
- Savello, P.A., Martin F.W., Hill J.M., (1982). Nutritional composition of okra seed meal. *Journal .of Agricultural. Food. Chemistry.*, 28: 1163-1166.
- Schafer W. & Stahnke O., (1979), Freeze-drying of foodstuffs, *Chemistry & Industry* 461-465.
- Sengkhampan N., Leonard M.C. de Vries S.R., Schols H.A., Sajjaanantakul T.A., Voragen G.J.(2010). Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Food Hydrocolloids*, 24, 35–41.

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

Sengkhamparn N., Bakx E.J, Verhoef R., Schols H. A., Sajjaanantakul T.A., Voragen G.J. (2009b). Okra pectin contains an unusual substitution of its ramosyl residues with acetyl & alpha-linked galactosyl groups. *Carbohydrate Research*, 344, 1842–1851.

Tokle T., & McClements D.J., (2011). Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: Effects of pH, salt & heating. *Food Hydrocolloids*, 25, 976-982.

Udayasekhara P.R.,(1985). Chemical composition & biological evaluation of Okra (*Hibiscus esculentus*) seeds & their kernels. *Plant Foods of Human Nutrition*, 35, 389-396.

Wandawi H.A., (1983). Chemical composition of seeds of two okra cultivars. *Journal of Agricultural. Food Chemistry*, 31, 1358-1360.

Weber, K., & Osborn, M. (1969).The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of *Journal Biological Chemistry*, 244, 4406–4412.

Woolfe L.M., Chaplin F., Otchere, G., (1977). Studies on the mucilages extracted from okra fruits (*Hibiscus esculentus* L.) & Baobab leaves (*Adansonia digitata* L.) *Journal. Science.of Food Agricultural.*, 28, 519-29.

Woolfe M.L, Martin F.C., Otchere G., (1977). Studies on the mucilages extracted from okra fruits (*Hibiscus esculentus* L.) & baobab leaves (*Adansonia digitata* L.). *Journal Science of Food Agricultural.* 28:519-529.

Ελληνική

Παναγιώτου Κ.,(1998). Διεπιφανειακά φαινόμενα και κολλοειδή συστήματα. Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Ζήτη, 2^η έκδοση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Πρότυπη καμπύλη πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry με βάση την οποία υπολογίστηκε το ποσοστό διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών.

