

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

**Ανάπτυξη μεθοδολογίας προσδιορισμού γλυκαντικών ουσιών σε
φύλλα στέβιας με τη φωτομετρική μέθοδο NIR
(Developing of a methodology for determining sweeteners in stevia
leaves with NIR photometric method)**



Ονόματα Σπουδαστών

ΝΙΚΖΑΣ ΑΧΙΛΛΕΑΣ

ΖΑΡΛΑΚΟΥΤΑ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων καθηγητής

Ιωάννης Βασιλάκογλου, Αναπληρωτής Καθηγητής

Λάρισα, 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα	
1	Εισαγωγή	2
1.1	Ιστορικά στοιχεία για την προέλευση του φυτού στέβια	2
1.2	Καταγωγή στέβιας και η εξάπλωσή της στον κόσμο	4
1.3	Χρήσεις και γλυκαντικές ουσίες στέβιας	6
1.4	Οικολογικές απαιτήσεις στέβιας	9
1.5	Μέθοδοι ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης γλυκοσιτών στέβιας	9
1.6	Σκοπός της εργασίας	12
2	Υλικά και μέθοδοι	14
2.1	Πειραματικό σχέδιο	14
2.2	Συλλογή δεδομένων	15
2.3	Προσδιορισμός μαθηματικού μοντέλου	16
3	Αποτελέσματα και συζήτηση	18
4	Συμπεράσματα	23
5	Βιβλιογραφία	24

1. Εισαγωγή

1.1. Ιστορικά στοιχεία για την προέλευση του φυτού στέβια

Το φυτό στέβια (*Stevia rebaudiana* Bertoni) είναι γνωστό στη νότια Αμερική για πολλούς αιώνες. Οι ινδιάνοι Γκουαράνι από τα βουνά της Παραγουάης χρησιμοποιούσαν τα φύλλα του φυτού στέβια στη φυσική τους μορφή πολύ πριν την ανακάλυψη της Ηπείρου από τον Κολόμβο. Με αυτά γλυκαίνανε τα ιδιαίτερα τσάγια βοτάνων και αφεψήματα. Το εκχύλισμα από τα φύλλα του το χρησιμοποιούσανε και σε προβλήματα πέψης, ενώ τα θρυμματισμένα φυτά για την θεραπεία πληγών από κοψίματα και άλλα δερματικά προβλήματα (Λόλας 2009).

Τον 16ο αιώνα, όταν οι ισπανοί κατακτητές επέστρεψαν από τον Νέο Κόσμο έφεραν φύλλα στέβια στην Ευρώπη. Το φυτό σύντομα αποκτά φήμη ως γλυκαντικό και εναλλακτικό της ζάχαρης. Το φυτό στέβια γνωστό επίσης και ως «Ka'a He'ê» (στην γκουαρανί), το οποίο σημαίνει «καλό δένδρο» μέλι ή βότανο, παίρνει την επιστημονική του ονομασία από τον ισπανό βοτανολόγο καθηγητή Pedro Esteve. Το 1887 ο Ιταλός βοτανολόγος και ερευνητής καθηγητής Moisés Santiago Bertoni, διευθυντής του Κολεγίου Γεωργίας στο Ασουσιόν, Παραγουάη, μαθαίνει κατά την διάρκεια ερευνητικής αποστολής στις ανατολικές περιοχές από τον ινδιάνο οδηγό του για «πολύ περίεργα φυτά» με γλυκά φύλλα. Το 1903 δημοσιεύει τα αποτελέσματα από την έρευνά του στην οποία ορίζει το φυτό στέβια με τον ακόλουθο τρόπο: *«είναι τόσο καλύτερο από την ζάχαρη που δεν χρειάζεται να περιμένουμε τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις για να επιβεβαιώσουν τα οικονομικά του πλεονεκτήματα»*.

Το επόμενο σημαντικό γεγονός στην ιστορία της στέβια είναι το 1931, όταν δύο γάλλοι χημικοί καταφέρνουν να αποσπάσουν από τα φύλλα και καθαρή λευκή ουσία, την οποία ονομάζουν 'στεβιοσίδη' (stevioside). Είναι 200 με 300 φορές πιο γλυκιά από την ζάχαρη, δεν είναι τοξική και δεν εμφανίζει ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την κατανάλωση.

Τις δεκαετίες του 1960 και 1970, η Ιαπωνία πραγματοποιεί μεγάλη πρόοδο στην προώθηση της στέβιας. Στη δεκαετία του '60, καταβάλλοντας προσπάθειες για την κατάργηση των χημικών προσθηκών στα τρόφιμα, η κυβέρνηση απαγορεύει την χρήση μη φυσικών γλυκαντικών. Τα προϊόντα που εμπεριέχουν στέβια μπαίνουν στην αγορά την δεκαετία του '70 και οι Ιάπωνες σύντομα ανακαλύπτουν το φυσικό αντικατάστατο της ζάχαρης που είναι η στέβια. Από το 1988 μέχρι και σήμερα η Ιαπωνία κατέχει την πρώτη θέση στον κόσμο στην κατανάλωση στέβιας. Από τότε μέχρι και σήμερα το μερίδιο της στέβιας στην αγορά ζαχαρών και γλυκαντικών έχει αυξηθεί στο 41 % και συνεχίζει να αυξάνεται.

Η στέβια (*Stevia rebaudiana* Bertoni) είναι, εδώ και λίγα χρόνια, το πιο συζητημένο φυτό σε παγκόσμια κλίμακα και τείνει να χαρακτηριστεί σαν το 'φυτό της νέας χιλιετίας'. Και αυτό γιατί χάριν στις φυσικές της ιδιότητες μπορεί να συμβάλει στην υγιεινή διατροφή και στην καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών, αφού τα ακατέργαστα φύλλα της στέβιας είναι 30-40 φορές πιο γλυκά από τη ζάχαρη, ενώ η καθαρή γλυκαντική ουσία που περιέχεται σε αυτά είναι 300 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη. Το



σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα της είναι πως έχει μηδενική θερμιδική αξία και δε παρουσιάζει καμία ανεπιθύμητη επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό (Λόλας, 2009).

Πατρίδα καταγωγής της στέβιας θεωρείται η Παραγουάη, όπου η στέβια συναντάται ως αυτοφυές φυτό σε άγρια κατάσταση, αλλά καλλιεργείται και σε έκταση 15.000 στρεμμάτων. Μεγαλύτερη παραγωγός χώρα είναι σήμερα η Κίνα και μεγαλύτερη καταναλωτής η Ιαπωνία. Ταυτόχρονα, η Στέβια είναι ήδη δημοφιλές γλυκαντικό σε αρκετές χώρες κυρίως της Ασίας (Ιαπωνία, Κίνα, Κορέα, Ταϊλάνδη, Μαλαισία και Ινδία), αλλά και στη Βραζιλία, στην Αργεντινή, στην Παραγουάη και στο Ισραήλ, δηλαδή στο μεγαλύτερο πληθυσμό της Γης, ενώ πρόσφατα χορηγήθηκε έγκριση χρήσης της Στέβιας στα τρόφιμα και στα ποτά στη Νέα Ζηλανδία και στην Αυστραλία. Στις ΗΠΑ επιτρέπεται η χρήση της μόνον σαν διαιτητικό συμπλήρωμα τροφίμων, αλλά όχι σαν τρόφιμο. Την ίδια στιγμή, πολλές χώρες ετοιμάζονται με πυρετώδεις ρυθμούς για να επεκτείνουν την καλλιέργεια της στέβιας, αφού αναμένεται αναπόφευκτα η ζήτησή της να παρουσιάσει αλματώδη αύξηση.

Κρίσιμη στιγμή για το μέλλον της στέβιας αποτελεί η απόφαση των ΗΠΑ να επιτρέψει τη χρήση της στέβιας ως γλυκαντική ουσία στα τρόφιμα και στα ποτά. Αυτή η απόφαση θα αυξήσει κατακόρυφα τη διεθνή ζήτηση και κατανάλωση της στέβιας, ενώ ταυτόχρονα θα αυξηθούν και οι καλλιεργούμενες εκτάσεις της στέβιας για την κάλυψη της διεθνούς ζήτησης για προϊόντα της.

1.2. Καταγωγή της στέβιας και η εξάπλωση της στον κόσμο

Η *Stevia rebaudiana* Bertoni είναι ένα βότανο της οικογένειας των Asteraceae, που βρίσκεται αυτοφυές ως ιθαγενές φυτό στα βορειανατολικά υψίπεδα της Παραγουάης, στα σύνορα με τη Βραζιλία και σε μικρό μέρος της Αργεντινής, κοντά στον 25^ο νότιο παράλληλο. Οι πρώτοι που ανακάλυψαν, έμαθαν, καλλιέργησαν και χρησιμοποίησαν τη στέβια ήταν οι διάφορες τοπικές φυλές των Ινδιάνων στην τροπική και υποτροπική Αμερική. Στις μέρες μας έγινε γνωστό πως τα διάφορα άλλα ήδη της στέβιας ήταν διαδεδομένα σε μέρη της Βόρειας, της Κεντρικής και της Νότιας Αμερικής (Λόλας, 2009).

Σύμφωνα με την παράδοση, οι Ισπανοί φαίνεται να γνώρισαν και να έμαθαν τη στέβια από το 16^ο αιώνα χωρίς όμως να της δώσουν σημασία με αποτέλεσμα να ξεχαστεί. Το 1887 ο Bertoni ανακάλυψε τη Στέβια και τις ιδιότητες της, μετά τις επαφές του με τους Ινδιάνους, αλλά δεν κατάφερε να κινήσει το ενδιαφέρον για την καλλιέργεια της. Στα μετέπειτα χρόνια, η στέβια και οι χρήσεις της απασχόλησαν τους Αμερικανούς και τους Γάλλους.

Στην Ιαπωνία η καλλιέργεια της στέβιας ξεκίνησε το 1954. Οι Ευρωπαίοι πληροφορήθηκαν για την ύπαρξη της στέβιας το 1940, όταν δοκιμάστηκε να καλλιεργηθεί στην Αγγλία, λόγω έλλειψης στη ζάχαρη, εξαιτίας του αποκλεισμού από τους Γερμανούς. Η προσπάθεια όμως, για άγνωστους λόγους δεν είχε συνέχεια. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και στις αρχές τις δεκαετίας του 1980, η στέβια αρχίζει να καλλιεργείται στην Παραγουάη και τη Βραζιλία, το 1984 στην Κίνα και στον Καναδά το 1985. Ταυτόχρονα, αρχίζουν οι μελέτες και η παραγωγή της στέβιας στην Κορέα, τη Μαλαισία, την Ταϊλάνδη, την Ινδία και το Ισραήλ. Σήμερα, εκτός από τις χώρες αυτές, η στέβια καλλιεργείται και στην Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία, την Αφρική, τη Βόρεια και τη Νότια Αμερική. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι πρώτες

προσπάθειες για την καλλιέργειά της ξεκινούν μετά το 1990 από την Ισπανία, τη Γερμανία, το Βέλγιο, την Ιταλία και την Ελλάδα. Σήμερα στην Ευρωπαϊκή Ένωση καλλιεργούνται πέραν των 1500 στρεμμάτων στη Ρωσία, την Ισπανία, τη Γαλλία, την Πορτογαλία τη Βουλγαρία και την Ελλάδα. Η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα είναι σήμερα είναι η Κίνα, ενώ ο μεγαλύτερος καταναλωτής είναι η Κορέα και η Ιαπωνία.

1.3. Χρήσεις και γλυκαντικές ουσίες της στέβιας

Η Στέβια είναι σήμερα, το πιο συζητημένο φυτό σε παγκόσμια κλίμακα αφού προκαλεί ραγδαίες ανακατατάξεις στην αγορά γλυκαντικών και ζάχαρης και δίκαια χαρακτηρίζεται σαν το 'μαγικό φυτό της νέας χιλιετίας'. Οι λόγοι για τους οποίους γίνεται ευρεία συζήτηση και απασχολεί τους διεθνείς ιατρικούς, εμπορικούς, επιχειρηματικούς, αλλά και τους γεωπονικούς κύκλους, είναι οι θαυμαστές φυσικές ιδιότητες της, αφού η στέβια αποτελεί πηγή πολύ χρήσιμων φυσικών χημικών ουσιών, όπως η στεβιοσίδη (φυσική γλυκαντική ουσία), η γιββερελλίνη (φυτοορμόνη), η χλωροφύλλη (φυσική χρωστική), οι φυτοστερόλες (ιατρική, τρόφιμο) και η ισοστεβιόλη (ιατρική).



Η στέβια έχει τεράστια συμβολή στην υγιεινή διατροφή και στην αντιμετώπιση διαφόρων διατροφικών προβλημάτων, όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπογλυκαιμία, αλλά και προληπτικά για την πρόληψη των ανεπιθύμητων παρενεργειών της υπερκατανάλωσης της ζάχαρης, αφού είναι πλούσια στη στεβιοσίδη, μία φυσική γλυκαντική ουσία 300 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη, χωρίς όμως να προσδίδει καθόλου θερμίδες στον ανθρωπινό οργανισμό, γεγονός που το καθιστά ασφαλές για την ανθρώπινη υγεία, αφού δεν παρουσιάζει καμία ένδειξη ανεπιθύμητης δράσης στον ανθρώπινο οργανισμό .

Ταυτόχρονα με τις θαυμάσιες αντιδιαβητικές, αντιυπογλυκαιμικές ιδιότητες που έχει διακρίνεται και για τις αντιυπερτασικές, αντισηπτικές, επουλωτικές, αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριδιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της. Την ίδια στιγμή, ενισχύει την άμυνα του οργανισμού και προστατεύει από τους ιούς και από ιογενείς καρκίνους, αλλά και από βλάβες του DNA. Πέραν από αυτά, έχει αντιγηραντική δράση στο δέρμα, ωφελεί στην υγιεινή του στόματος, προστατεύοντας το από την άφθα, την ουλίτιδα, την πλάκα και την τερηδόνα των δοντιών.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα της στέβιας είναι ότι η κρυσταλλική γλυκαντική ουσία της παραμένει αναλλοίωτη μέχρι και τους 200 °C, σε αντίθεση με την ασπαρτάμη, γεγονός που επιτρέπει τη χρήση της στη μαγειρική. Τα φύλλα χρησιμοποιούνται ως χλωρά ή ξηρά, τριμμένα ή αλεσμένα. Οι μεγαλύτεροι χρήστες της στεβιοσίδης είναι η βιομηχανία των τροφίμων, των ποτών, η ζαχαροπλαστική (υποκαθιστά τη ζάχαρη και την πράσινη χρωστική) και η ιατρική (για τους διαβητικούς). Σε ορισμένες χώρες (ΗΠΑ. κ.α.) επιτρέπεται μόνο ως διαιτητικό συμπλήρωμα, ενώ σε άλλες χώρες (Ιαπωνία από το 1971, Βραζιλία, κ.ά.) ως υποκατάστατο της ζάχαρης, ως συμπλήρωμα διατροφής και ως διαιτητικό συμπλήρωμα.



Για όλους αυτούς τους λόγους η στέβια προβάλλεται σήμερα ως ισχυρός ανταγωνιστής των άλλων φυσικών και τεχνητών γλυκαντικών ουσιών (όπως της ασπαρτάμης), τις οποίες αναμένεται βάσιμα ότι θα εκτοπίσει, αλλά προβάλλει ακόμη και σαν ανταγωνιστής της ίδιας της ζάχαρης, από την οποία αναμένεται ότι θα αποσπάσει ένα μεγάλο μερίδιο αγοράς, σαν φυσικό γλυκαντικό χωρίς θερμίδες.

Ως προς την αφάλεια της χρήσης της, η στέβια δεν συμμετέχει στον μεταβολισμό, δεν συγκεντρώνει στοιχεία ή επιβλαβές ουσίες στον οργανισμό. Οι αρμόδιες αρχές στην Ευρωπαϊκή Ένωση επιβεβαιώνουν την ασφάλεια της.

Σχετικά με τη σταθερότητά της, κατά την εισαγωγή της στην παραγωγή προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων, η στέβια μειώνει σημαντικά την

προσκόλληση, αποτρέπει την εμφάνιση βακτηριδίων και επιμηκύνει την ημερομηνία λήξης του προϊόντος.

1.4. Οικολογικές απαιτήσεις στέβιας

Ο τόπος στον οποίο η στέβια αναπτύσσεται ως αυτοφυές φυτό, δηλαδή στο ιθαγενές της περιβάλλον, είναι πλησίον του 25^{ου} νότιου παράλληλου και από 54^ο έως 56^ο γεωγραφικό πλάτος. Αναπτύσσεται δηλαδή σε υποτροπικό περιβάλλον, με μέση θερμοκρασία 25 °C, ετήσια βροχόπτωση γύρω στα 1000-15000 mm και υψόμετρο 200 έως 1000 m. Αυτοφύεται σε αμμώδη εδάφη, που δεν έχουν ιδιαίτερη γονιμότητα, στις άκρες ποταμών και ρεμάτων. Αυτό φανερώνει πως δε πρόκειται για ένα ιδιαίτερα απαιτητικό φυτό, όσον αφορά τις συνθήκες ανάπτυξης του. Χωρίς κλάδεμα φτάνει περίπου τα 60 εκατοστά. Ταυτόχρονα, οι ανάγκες του σε έδαφος είναι ελάχιστες, οπότε οποιοδήποτε μείγμα για γλάστρες με ουδέτερο ή ελαφρά όξινο έδαφος είναι ικανοποιητικό. Αντίθετα, η στέβια παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στις καιρικές συνθήκες, αφού είναι ένα τρυφερό φυτό που δεν αντέχει στις χαμηλές θερμοκρασίες και στο χειμερινό ψύχος. Σε βόρειες χώρες καλλιεργείται ως μονοετές φυτό, αλλά σε χώρες όπως την Ελλάδα σε περιοχές με ήπιο χειμώνα ή με μια μικρή προστασία κατά τις ημέρες του χειμώνα παρέχεται η δυνατότητα να καλλιεργηθεί σαν τρυφερό πολυετές φυτό.

1.5. Μέθοδοι ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης γλυκοσιτών στέβιας

Περισσότερα από 100 συστατικά έχουν εντοπιστεί στη *Stevia rebaudiana*, τα πιο γνωστά από τα οποία είναι οι γλυκοσίτες στεβιόλης, στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α που κατέχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα στο φυτό. Η στεβιοσίδη, μια διτερπενική γλυκοσίδη που έχει την ιδιότητα να είναι 300 φορές πιο γλυκιά από τη σακχαρόζη (Briedel και Lavieille 1931). Εκτός από τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α, στα φύλλα στέβια απαντώνται σε μικρότερες ποσότητες τα γλυκοσίδια rebaudioside Β, C, D και E, αλλά και η dulcoside Α (Tanaka 1982).

Όλες οι γλυκαντικές ουσίες μέσα στα φύλλα της *S. rebaudiana* περιέχουν στεβιόλη (ent-13-hydroxykaur-16-en-19-oic acid). Η επεξεργασία της άγλυκης στεβιόλης στην *S. rebaudiana* από ποικίλες γλυκοζυλοτρανσφεράσες δημιουργεί τουλάχιστον οκτώ διαφορετικές γλυκοσίδες στεβιόλης και μπορεί να ποικίλει από 4% μέχρι 20% του ξηρού βάρους του φύλλου, ανάλογα με την ποικιλία και της συνθήκες ανάπτυξης, μολονότι στις περισσότερες καλλιέργειες περιέχεται περίπου το 10% από το ξηρό βάρος του φύλλου (Brandle κ.ά. 1998).

Αυτές οι φυσικές γλυκαντικές ουσίες γίνονται όλο και περισσότερο σημαντικές στον τομέα των τροφίμων, ποτών και στις φαρμακοβιομηχανίες (Kinghorn και Soejarto 1985). Σε χώρες όπως η Βραζιλία και η Ιαπωνία η ποσοτική κατανάλωση στεβιοσίδης ανέρχεται σε 300 τόνους το χρόνο. Η αυξημένη ζήτηση στεβιοσίδης έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση της αξίας και του ποιοτικού ελέγχου της μεθόδου αυτής ώστε να υπολογίζει τη γλυκοσίδη από τα φύλλα της στέβιας που έχουν αποκοπεί πρόσφατα από το φυτό.

Η τριγλυκοσίδη στεβιοσίδη και οι τετραγλυκοσίδες ρεμπαουδιοσίδη Α και ρεμπαουδιοσίδη C, τυπικά εκπροσωπούν την πλειονότητα των γλυκοσίδων στεβιόλης που υπάρχουν στα φύλλα της *S. rebaudiana* (Kinghorn και Soejarto 1985).

Η καλή διαχωριστικότητα αυτών των γλυκοσίδων στεβιόλης αποκτάται χρησιμοποιώντας μια αμινική (NH₂) στήλη σε υδροχρωματογραφία υψηλής πίεσης ανάλυσης εκχυλίσματος από την *S. rebaudiana*. Πιθανόν μέχρι και τέσσερις γλυκοσίδες στεβιόλης με μικρότερα μοριακά βάρη και σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση κρύβονται από φυτικά, μητρικά συστατικά στην ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Πολλές αναλυτικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γλυκών διτερπένιων γλυκοσιδίων από τα φύλλα της στέβιας. Ο Mizukami κ.ά. (1982) επέτυχαν ποσοτικό προσδιορισμό της στεβιοσίδης ακολουθώντας μια ενζυματική υδρόλυση, ενώ οι Sakaguchi και Kan (1982) προσδιόρισαν τη συνολική περιεκτικότητα σε στεβιόλες μέσω αέριας χρωματογραφίας μετά από όξινη υδρόλυση. Η χρωματογραφία λεπτής στρώσης έχει επίσης εφαρμοστεί για να προσδιοριστούν οι τέσσερις πιο άφθονες γλυκοσίτες, η στεβιοσίδη, η ρεμπαουδιοσίδη Α, η σουλκοσίδη Α και η ρεμπαουδιοσίδη C.

Ο Makarugay κ.ά. (1984) προσδιόρισαν, όχι μόνο τα φυσικά προϊόντα που περιέχονται στα φύλλα της στέβιας, αλλά και τη στεβιολβιοσίδη και την ρεμπαουδιοσίδη Β, προϊόντα υδρόλυσης της ατεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης Α, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που αποτελείται από την εξαγωγή των γλυκοζιτών του δείγματος μέσω Soxhlet και τον διαχωρισμό αυτών με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία. Πιο πρόσφατα, ο Mauri κ.ά. (1996) έχουν χρησιμοποιήσει μια τριχοειδή μέθοδο ηλεκτροφόρησης για της ανάλυση των γλυκοζιτών της στέβιας, αποκτώντας ρεμπαουδιοσίδη Α και στεβιολβιοσίδη από μια υψηλής ποιότητας υγρή χρωματογραφία.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των γλυκοζιτών στα φύλλα στέβιας επιτυγχάνεται με την αναλυτική μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) (Hashimoto και Moriyasu 1978; Ahamed και Doberstein 1982; Kasai κ.ά, 1987; Kitada κ.ά. 1989). Εντούτοις, η μεθοδολογία αυτή είναι πολύ δαπανηρή, επειδή απαιτεί περίπλοκη παρασκευαστική διαδικασία. Συνεπώς, μία λιγότερο πολύπλοκη και γρήγορη μέθοδος είναι απαραίτητη. Σε αυτό το γενικό πλαίσιο, η φασματοσκοπία ανάκλασης πλησίον του υπέρυθρου (NIR) μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη ενός αξιόπιστου και επαναλήψιμου αναλυτικού συστήματος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας στεβιοσίδης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων (Wetzel 1983).

Η φασματοσκοπία ανάκλασης (NIR) πλησίον του υπέρυθρου έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σαν μια γρήγορη και ακριβής, αλλά και ασφαλής μέθοδος ανάλυσης πρωτεΐνης σε τροφές και ζωοτροφές (Williams κ.ά. 1975), αλκαλοειδή (Clark κ.ά. 1987) και υδατάνθρακες στα σιτάρια (Brown κ.ά. 1987).

1.6. Σκοπός της εργασίας

Τα γλυκοσίδια στεβιόλης (SGs), που εξάγονται από τα φύλλα της *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni, είναι αντικείμενο αυξανόμενου ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια ως πιθανό υποκατάστατο ζάχαρης, καθώς είναι 300 φορές πιο γλυκές από τη σακχαρόζη (0,4% διάλυση) στον ανθρώπινο ουρανίσκο (Soejarto κ.ά. 1982). Τα πλεονεκτήματα των γλυκοσιδών στεβιόλης ως διαιτητικό συμπλήρωμα για τους ανθρώπους είναι πολλαπλά: είναι θερμικώς σταθερές, μη θερμιδικές, βοηθούν στην υγεία των δοντιών μειώνοντας την κατανάλωση ζάχαρης κι ανοίγουν την πιθανότητα για χρήση από διαβητικούς, ασθενείς που πάσχουν από

φαινυλκαιτονουρία και από παχυσαρκία (Geuns 2003). Σε αντίθεση με άλλα γλυκαντικά υψηλής δραστηριότητας όπως η ασπαρτάμη, η σακχαρίνη, η σουκραλόζη και η ακεσουφάλη K, οι γλυκοσίδες στεβιόλης είναι φυσικό, φυτικό προϊόν.

Το αντικείμενο αυτής της έρευνας ήταν να προσδιορισθεί μία μέθοδος φασματοσκοπίας πλησίον του υπέρυθρου (NIR) που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων των κυριότερων γλυκοζιτών, της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης A, στα φύλλα της στέβιας, με την ίδια ακρίβεια όπως επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (HPLC).



2. Υλικά και μέθοδοι

Η εγκατάσταση του πειράματος έγινε στο χώρο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλίας τον Ιούνιο του 2012. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους ήταν άμμος 50,9%, άργιλος 29,1%, ιλύς 20%, pH 7,5, οργανική ουσία 6%. Η προφυτευτική ανάλυση του εδάφους που διεξήχθη το φθινόπωρο του 2011 έδειξε ότι η αρχική περιεκτικότητα σε νιτρικά ήταν περίπου 100 mg kg^{-1} . Ο πειραματικός αγρός ήταν φυσικά μολυσμένος από άγριο σινάπι (*Sinapis arvensis* L.), (*Papaver rhoeas* L.), ζωχό (*Sonchus oleraceus* L.) και περιπλοκάδα (*Convolvulus arvensis* L.) όπως επιβεβαιώνεται από οπτικές παρατηρήσεις που έγιναν κατά την προηγούμενη της εγκατάστασης καλλιεργητική περίοδο. Το πείραμα διεξήχθη για 2 συνεχόμενες καλλιεργητικές περιόδους (2012 και 2013). Το κλίμα στην κεντρική Ελλάδα, όπου και πραγματοποιήθηκε το πείραμα, χαρακτηρίζεται ως ηπειρωτικό με κρύους χειμώνες, θερμά καλοκαίρια και άνοιξη με λίγες βροχοπτώσεις.

2.1. Πειραματικό σχέδιο

Δύο ποικιλίες άγριας στέβιας ('Morita' και 'Candy-stevia') φυτεύθηκαν με το χέρι σε αποστάσεις 60 cm μεταξύ των γραμμών και 40 cm μεταξύ φυτών στη γραμμή, προκειμένου να επιτευχθεί μια, κατά προσέγγιση, πυκνότητα της τάξης των 4150 φυτών/στρέμμα, η οποία αντανακλά την συνήθη τακτική των Ελλήνων

καλλιεργητών στέβιας. Αυτές οι δύο ποικιλίες εισήχθησαν πρόσφατα στην Ελλάδα. Ειδικότερα η 'Morita' ανήκει στις περισσότερο καλλιεργούμενες ποικιλίες στέβιας στον κόσμο. Η σπορά των φυτών έγινε στο θερμοκήπιο το Μάρτιο του 2012 και η μεταφύτευση στον αγρό έγινε με το χέρι στις 3 Ιουνίου του 2012. Δύο μέρες πριν τη φύτευση διασπάρθηκαν και ενσωματώθηκαν στο έδαφος όλων των πειραματικών τεμαχίων τα απαραίτητα λιπαντικά στοιχεία που περιελάμβανε το πείραμα. Η λίπανση επαναλήφθηκε το 2013, μέσω του συστήματος στάγδην άρδευσης.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό σχέδιο των υπο-υποδιαιρεμένων ομάδων, με ένα πλήρες τυχαίοποιημένο σχεδιασμό τεμαχίων με τέσσερις επαναλήψεις. Τα κύρια τεμάχια αποτελούνταν από δύο επίπεδα άρδευσης (στο 75% και στο 100% της εξατμισοδιαπνοής) με διαστάσεις τεμαχίου 30 x 6 m. Η στάγδην άρδευση εφαρμόστηκε σε σειρές που απείχαν μεταξύ τους 1,2 m, ενώ οι σταλάκτες απείχαν 0,5 m επάνω στο σωλήνα, ώστε να επιτευχθεί παροχή 5,7 mm νερού κάθε ώρα. Όλα τα κύρια τεμάχια χωριζόταν με διάδρομο 2 m. Κάθε κύριο τεμάχιο ήταν χωρισμένο σε δύο υποτεμάχια 14 x 6 m, με 8 σειρές στέβιας το καθένα. Το κάθε υποτεμάχιο αντιστοιχούσε στις δύο ποικιλίες στέβιας. Τα υποτεμάχια ήταν χωρισμένα μεταξύ τους με διάδρομο 2 m. Κάθε υποτεμάχιο ήταν κι αυτό διαιρεμένο σε υπο-υποτεμάχια έκτασης 6 x 2 m, που το καθένα είχε 4 σειρές στέβιας. Το ένα υπο-υποτεμάχιο δέχθηκε λίπανση N-P-K σε αναλογία 1-1-1, ενώ το άλλο δέχθηκε λίπανση σε αναλογία 1-1,5-1,5. Η απομάκρυνση των ζιζανίων πραγματοποιήθηκε με το χέρι κατά τη διάρκεια των δύο καλλιεργητικών περιόδων.

2.2. Συλλογή δεδομένων

Κατά τη συγκομιδή, αξιολογήθηκε η νωπή και ξηρή συνολική βιομάζα, η απόδοση σε ξηρά φύλλα, καθώς και οι συγκεντρώσεις των κυριότερων γλυκοζιτών, της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης Α. Η συγκομιδή γίνονταν με το χέρι στη μία κεντρική σειρά μήκους 6 m κάθε υπο-υποτεμαχίου. Τον πρώτο χρόνο έγινε μία συγκομιδή τον Οκτώβριο του 2012, ενώ το δεύτερο έτος έγιναν δύο συγκομιδές τον Ιούλιο και το Σεπτέμβριο του 2013. Μετά τη συγκομιδή η εναπομείνασα βιομάζα της στέβιας κόβονταν και απομακρύνονταν από τον αγρό. Αυτή η πρακτική αντανακλά τις πρακτικές συγκομιδής στους αγρούς στέβιας των Ελλήνων αγροτών. Οι συγκομιζόμενοι βλαστοί της στέβιας δένονταν σε μικρά δεμάτια και τοποθετούνταν σε θερμοκήπιο για 5 ημέρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί με φυσικό τρόπο η ξήρανσή τους. Κατόπιν, γίνονταν διαχωρισμός των στελεχών από τα φύλλα, ζύγιση του βάρους των ξηρών φύλλων και τοποθετησή τους σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των δύο γλυκοζιτών. Η συγκέντρωση των γλυκοζιτών σε 24 δείγματα που πάρθηκαν στην πρώτη συγκομιδή του 2012 προσδιορίστηκε με τη χημική μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (LPLC/DAD) στο Εργαστήριο Φυσικοχημικών Αναλύσεων του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (ΙΤΕΓΕΠ, Λυκόβρυση Αττικής). Τα δείγματα αυτά αλέστηκαν σε μύλο 2 mm και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή των φασμάτων τους σε αναλυτή φασμάτων πλησίον του υπέρυθρου ακτινοβολίας (NIR) (Model SpectraAlyzer, ZEUTECH OPTO-ELEKTRONIK GmbH, Rendsburg) (Εικόνα 1).

2.3. Προσδιορισμός μαθηματικού μοντέλου

Για τον υπολογισμό της καταλληλότερης μαθηματικής εξίσωσης που περιγράφει τη σχέση μεταξύ των φασμάτων των ξηρών φύλλων στέβιας και των συγκεντρώσεων στεβιοσίδης και ρεμπαουδιοσίδης σε αυτά τα φύλλα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Application Worx 2.1.5 της ZEUTEC (Germany).

Για κάθε γλυκοζίτη (στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη) χρησιμοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν ως προς την ακρίβεια και επαναληψιμότητά τους δύο μοντέλα εξισώσεων: το MLR (Multi Linear Regression model) και το PLSR (Partial Least Squares Regression model).

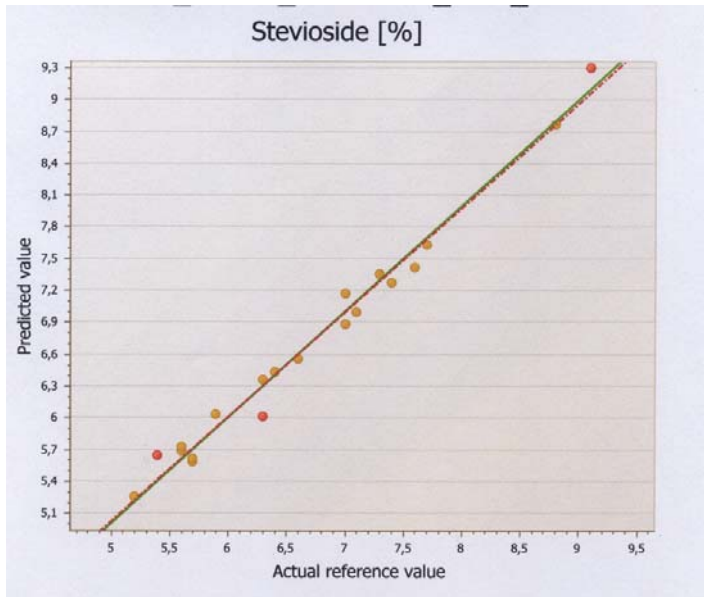


Εικόνα 1. Αναλυτής φασμάτων ανάκλασης ακτινοβολίας πλησίον του υπέρυθρου (NIR) (Model SpectraAlyzer, ZEUTEC OPTO-ELEKTRONIK GmbH, Rendsburg).

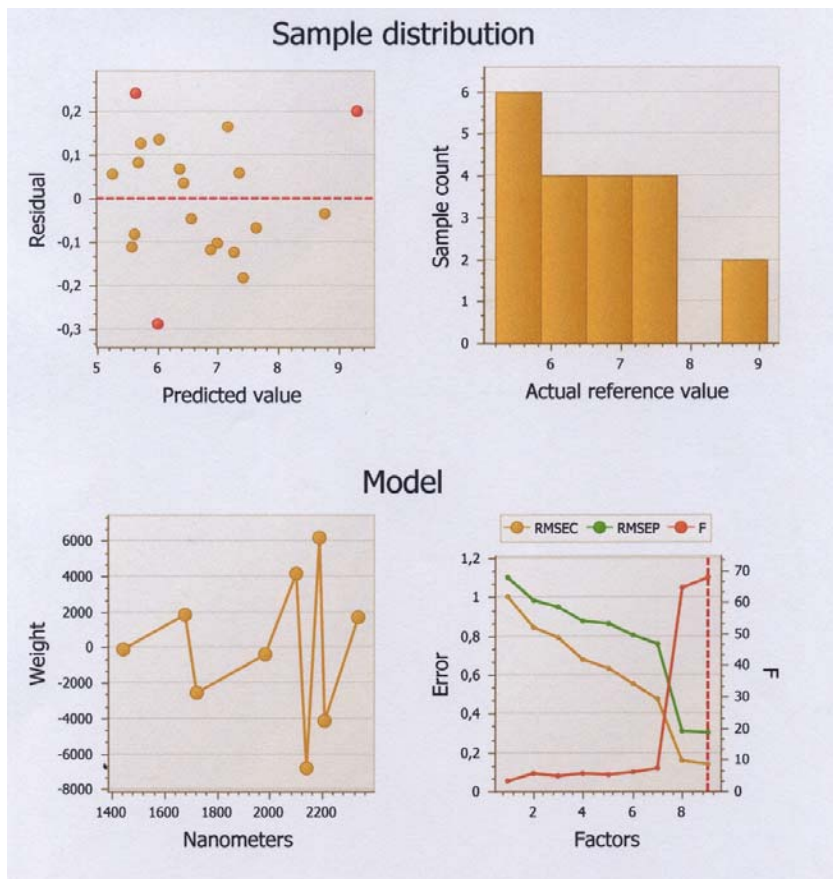
3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών των εξισώσεων συμμεταβολής μεταξύ πραγματικών και υπολογισμένων συγκεντρώσεων γλυκοζιτών στα φύλλα στέβιας έδειξαν ότι η φωτομετρική μέθοδος ανάκλασης ακτινοβολίας πλησίον του υπέρυθρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ποιοτικών συστατικών απόδοσης (συγκέντρωση στεβιοσίδης και ρεμπαουδιοσίδης A) της καλλιέργειας αυτής. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους Nishiyama και Alvarez (1992) και από τους Hearn και Subedi (2009) οι οποίοι αναφέρουν ότι η φασματοσκοπία πλησίον του υπέρυθρου αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης των γλυκοζιτών στα φύλλα στέβιας. Μάλιστα, η μέθοδος αυτή απαιτεί μικρότερο χρονικό διάστημα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γλυκοζιτών, ενώ δεν απαιτεί ιδιαίτερα αναλώσιμα υλικά.

Σχετικά με τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της στεβιοσίδης στα ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας το μοντέλο MLR έδειξε μεγαλύτερη αξιοπιστία και επαναληψιμότητα σε σύγκριση με το μοντέλο PLSR (Σχήματα 1, 2, 3 και 4). Ειδικότερα, το μοντέλο MLR παρουσίασε συντελεστή συσχέτισης (R) ίσο με 0,9919, ενώ το μοντέλο PLSR παρουσίασε συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,9545.

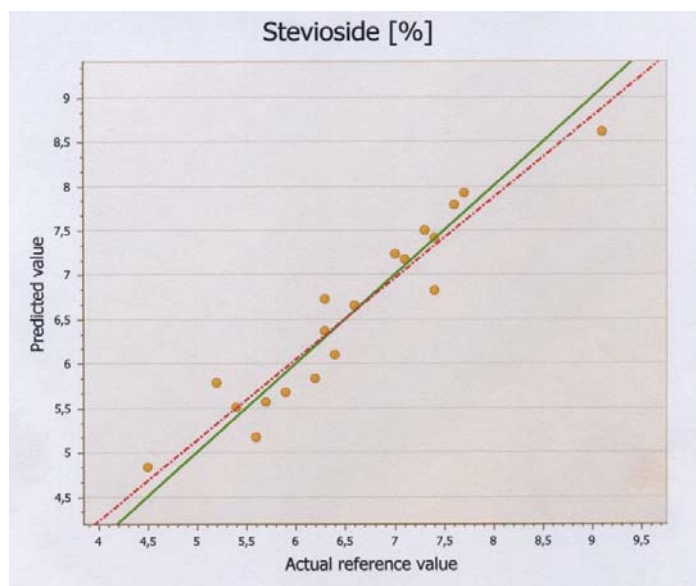


Σχήμα 1. Συσχέτιση μεταξύ πραγματικών και αναμενόμενων τιμών συγκεντρώσεων στεβιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας, υπολογιζόμενη με το μοντέλο MLR.

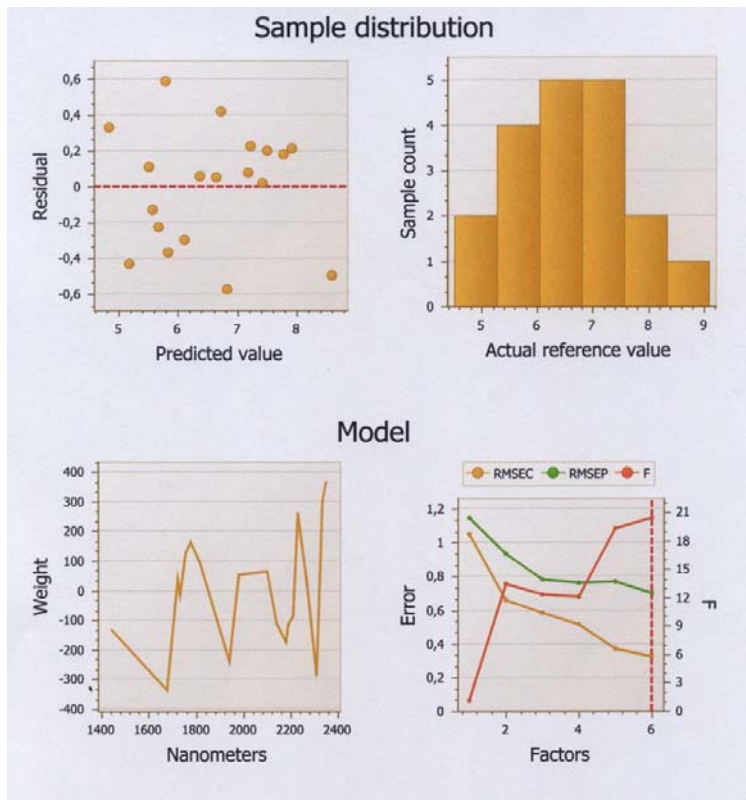


Σχήμα 2. Κατανομή τιμών συγκεντρώσεων στεβιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας και παράμετροι μοντέλου MLR.

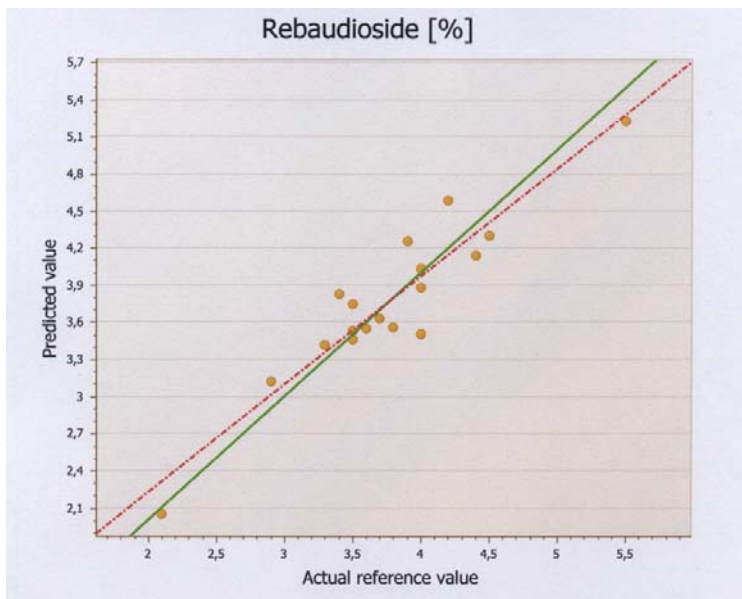
Σχετικά με τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδισίδης στα ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας το μοντέλο PLSR έδειξε μεγαλύτερη αξιοπιστία και επαναληψιμότητα σε σύγκριση με το μοντέλο MLR (Σχήματα 5, 6, 7 και 8). Ειδικότερα, το μοντέλο MLR παρουσίασε συντελεστή συσχέτισης (R) ίσο με 0,9332, ενώ το μοντέλο PLSR παρουσίασε συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,9879.



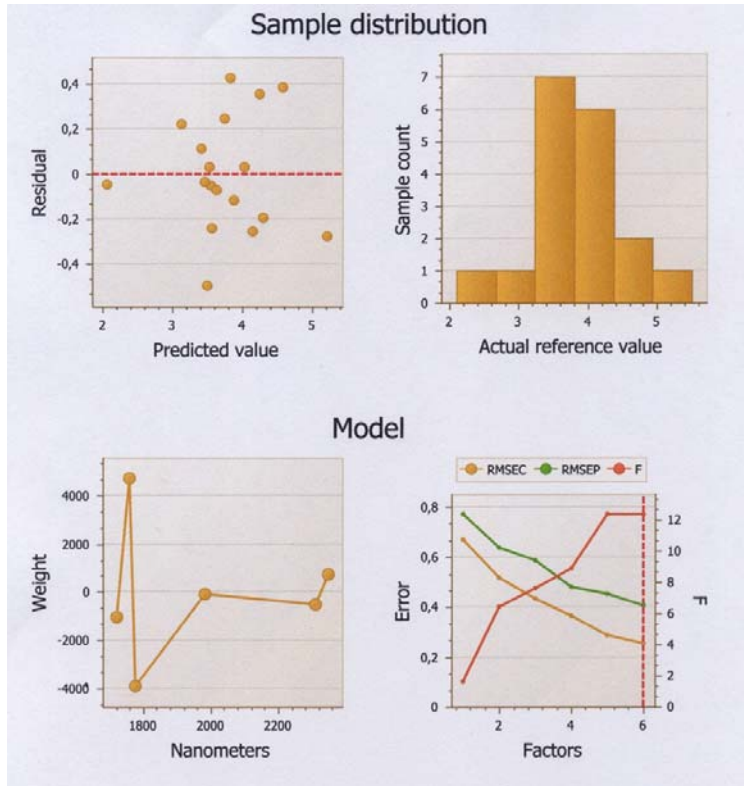
Σχήμα 3. Συσχέτιση μεταξύ πραγματικών και αναμενόμενων τιμών συγκεντρώσεων στεβιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας, υπολογιζόμενη με το μοντέλο PLSR.



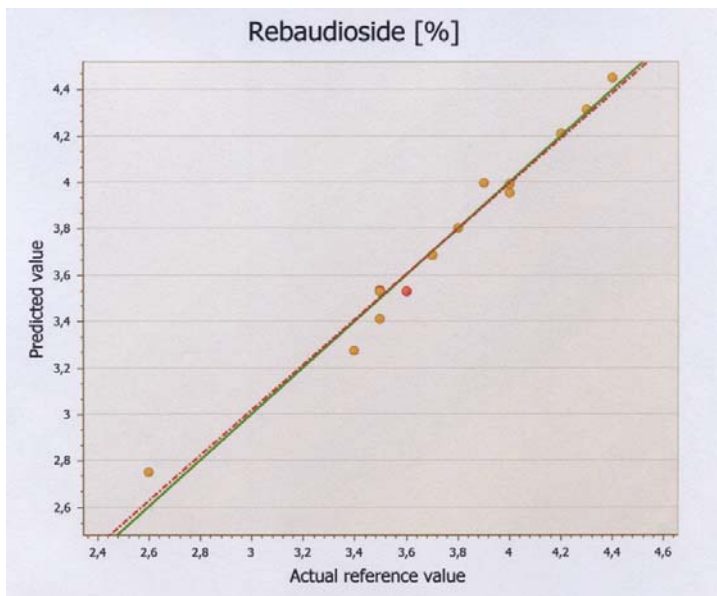
Σχήμα 4. Κατανομή τιμών συγκεντρώσεων στεβιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας και παράμετροι μοντέλου PLSR.



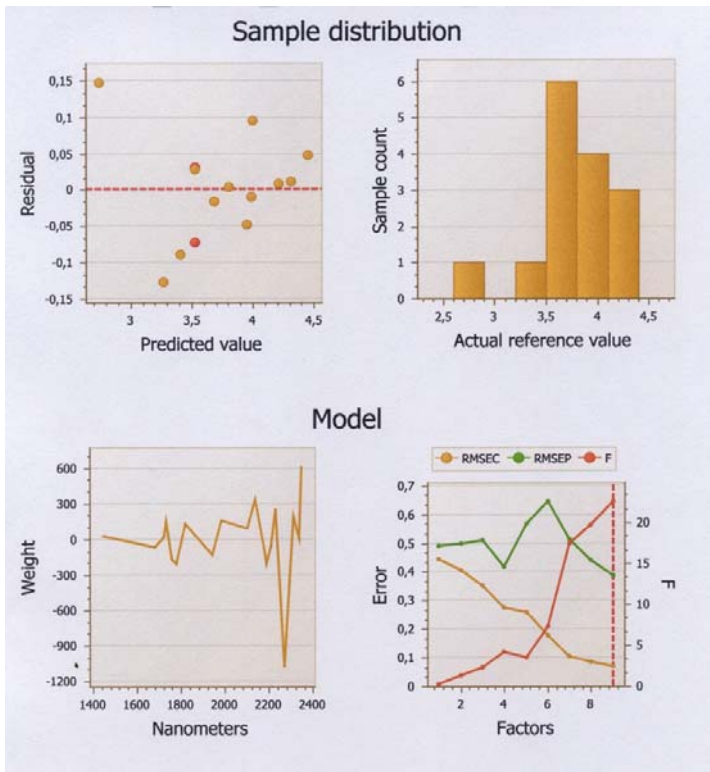
Σχήμα 5. Συσχέτιση μεταξύ πραγματικών και αναμενόμενων τιμών συγκεντρώσεων ρεμπαουδιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας, υπολογιζόμενη με το μοντέλο MLR.



Σχήμα 6. Κατανομή τιμών συγκεντρώσεων στεβιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας και παράμετροι μοντέλου MLR.



Σχήμα 7. Συσχέτιση μεταξύ πραγματικών και αναμενόμενων τιμών συγκεντρώσεων ρεμπαουδιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας, υπολογιζόμενη με το μοντέλο PLSR.



Σχήμα 8. Κατανομή τιμών συγκεντρώσεων στεβιοσίδης σε ξηρά και αλεσμένα φύλλα στέβιας και παράμετροι μοντέλου PLSR.

4. Συμπεράσματα

Η επαλήθευση των υπολογισμένων με τη μέθοδο της φωτομετρίας πλησίον του υπέρυθρου συγκεντρώσεων στεβιοσίδης και ρεμπαουδιοσίδης στα φύλλα στέβιας έδειξε ότι η μέθοδος αυτή αποτελεί μία σύντομη, αξιόπιστη και επαναλήψιμη μέθοδο προσδιορισμού των συγκεντρώσεων των γλυκαντικών ουσιών της στέβιας.

Η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα εργοστάσια παραλαβής και επεξεργασίας των φύλλων στέβιας (όταν ολοκληρωθεί η κατασκευή τους) προκειμένου να αξιολογούνται με ακρίβεια τα ποιοτικά χαρακτηριστικά (συγκέντρωση γλυκαντικών ουσιών) των φύλλων στέβιας στα σημεία παραλαβής τους από τους παραγωγούς.

5. Βιβλιογραφία

- Ahamed, M.S. and R.H. Doberstein. 1982. High performance liquid chromatography separation and quantitation of stevioside, rebaudioside-A and rebaudioside-C. *Journal of Chromatography* 236:523-526.
- Βασιλάκογλου, Ι. 2012. Σύγχρονη Ζιζανιολογία. Β' έκδοση. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα.
- Brandle, J.E., A.N. Starrat, and M. Gijzen. 1998. *Stevia rebaudiana*: it's agricultural, biological and chemical properties. *Canadian Journal of Plant of Science* 78:527-536.
- Briedel, S. and R. Lavielle. 1931. Sur le principe a saveur sucee du kaa-he-e (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal Pharm Chim* 14:99-113.
- Brown, W.F., C.K. Piacitelli, and P. Mislevy. 1987. Near infrared reflectance analysis of total nonstructural carbohydrate concentration in tropical grasses. *Crop Science* 27:786-788.
- Clark, D.H., M.H. Realphs, and R.C. Lamb. 1987. Total alkaloid determinations in larkspur and lupine with near infrared reflectance spectroscopy. *Agronomy Journal* 79:481-485.
- Geuns, J.M.C. 2003. Molecules of interest: stevioside. *Phytochemistry* 64:913-921.
- Harrington, K.C., R.C. Southward, K.L. Kitchen and X.Z. He. 2011. Investigation of herbicides tolerated by *Stevia rebaudiana* crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 39:21-33.
- Hashimoto, Y. and M. Moriyasu. 1978. Determination of sweet components in *Stevia rebaudiana* by high performance liquid chromatography. Ultraviolet detection. *Shoyakugaku Zasshi* 32:209-211.
- Hearn, L.K. and P.P. Subedi. 2009. Determining leaves of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:165-168.
- Kasai, R., H Yamaguchi, and o. Tanaka. 1987. High performance liquid chromatography of glycosides on a new type of hydroxyapatite column. *Journal of Chromatography* 407:205-210.

- Kinghorn, A.D. and D.D. Soejarto. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human uses. In: Economic and Medical Plant Research, Vol 1. Academic Press, London. pp. 1-52.
- Kitada, Y., M. Sasaki, Y. Yamazoe, and H. Nakazawa. 1989. Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside-A and C and ducloside-A in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 474:447-451.
- Kolb, N., J.L. Herrera, D.J. Ferreyra, and R.F. Uliana. 2001. Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: improved HPLC method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:4538-4541.
- Makapugay, H.C., N.P.D. Nanayakkara, and A.D. Kinghorn. 1984. Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. *Journal of Chromatography* 192:387-393.
- Mauri, P., G. Catalano, C. Gardana, and P. Pietta. Analysis of stevia glycosides by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 17:367-371.
- Mizukami, H., K. Shiiba, and H. Ohashi. 1982. Enzymatic determination of stevioside in *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 21:1927-1930.
- Λόλας, Π. 2009. Καλλιέργεια Στέβιας. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος.
- Nishiyama, P. and M. Alvarez. 1992. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Science and Food Agriculture* 59:277-281.
- Sakaguchi, M. and T. Kan. 1982. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) e o Esteviosideo. *Ciencia e Cultura* 34:235-248.
- Tanaka, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. *Trends of Analytical Chemistry* 1:246-248.
- Wetzel, D.L. 1983. Near infrared reflectance analysis. Sleeper among spectroscopic techniques. *Analytical Chemistry* 55:1165-1176.
- Williams, P., C. Norris, and D.C. Sobering. 1975. Determination of protein and moisture in wheat and barley by near infrared transmission. *Journal of agriculture and Food Chemistry* 33:239-244.

Wolwer-Rieck, U. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. Journal of Agriculture and Food Chemistry.

Διαδικτυακές πηγές

- http://www.agro-help.com/2012/02/blog-post_04.html
- http://www.express.gr/afieroma/trofima-pota/255305oz_20100120255305.php3
- http://www.steviola.gr/stevia_plant.html
- <http://stevia2010.blogspot.com/>
- <http://www.kalliergo.gr/home-kalliergo/stevia-kalliergeia-plirofories-16072011.html>
- <http://geoponoikozanis.blogspot.com/2011/10/stevia-rebaudiana-bertoni.html>
- http://cityfarmer.gr/2012/06/24/stevia_eisagwgikes-plirofories-gia-tin-kalliergeia-tis/
- <http://www.nileasoliveoil.gr/news-gr/econews-gr/steve-natural-sweetenerstebia-mia-phasiske-glukantike-ousia.html>
- <http://www.minagric.gr/greek/data/stevia090412.pdf>
- <http://www.biostevia.gr/>